



Estudo da influência do agonista do recetor de estrogénio na reatividade do músculo liso vascular cerebral

(Versão final após defesa)

Francisca Maria Jorge Gonçalves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

julho de 2022

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todas as pessoas que, das mais diversas formas, me apoiaram e incentivaram para a sua realização.

Agradecimentos

Ao longo desta jornada, várias pessoas me apoiaram, incentivaram e auxiliaram em toda a construção desta Dissertação.

Desta forma, gostaria de deixar algumas palavras de apreço e profunda gratidão a essas pessoas.

À Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues, pela oportunidade de desenvolver este projeto, a minha admiração pela paciência e competência na sua orientação.

Ao Manuel, por toda a ajuda na adaptação ao trabalho laboratorial e pela excelente passagem de testemunho.

Ao restante grupo de investigação, nomeadamente à Margarida por partilhar os seus conhecimentos, pela simpatia e disponibilidade com que sempre me acolheu, à Ana, Carolina e Melissa por todos os momentos de trabalho, pelos momentos vividos e pela amizade.

À Cathy e Susana, o meu muito obrigado por me terem facultado programas e amostras extremamente necessários à realização da componente prática e por me proporcionarem momentos de incentivo e amizade.

À minha família, sobretudo aos meus pais, agradeço por todas as oportunidades que me proporcionaram, pela paciência e por tudo o que sou hoje. Sem os seus esforços nada disto seria possível. A minha profunda gratidão.

À minha querida Fátima Alexandra, a minha enorme gratidão, o meu respeito e a minha admiração. O meu genuíno apreço por todos os momentos vividos e amizade. A pessoa que sempre me acompanhou desde o início desta longa jornada e que levo com muito carinho para a vida futura.

Por último, ao mais importante, ao meu namorado, Francisco Santos, a minha gratidão não é suficiente para expressar todo o amor, a compreensão e a paciência sempre demonstrados ao ouvir os meus desabafos em momentos de maior ansiedade.

A Todos, muito obrigada!

Resumo

Apesar de representar apenas 2% da massa corporal do ser humano, o cérebro é considerado um órgão altamente evoluído e com elevados consumos metabólicos. Deste modo, este contém uma rede especializada, a unidade neurovascular, que é responsável pela manutenção dos níveis de perfusão adequados para existir uma correta homeostasia cerebral. Dentro desta rede, podemos destacar as células musculares lisas (SMC) que são os componentes celulares maioritários que constituem as artérias e são responsáveis pela alteração do diâmetro das mesmas, recorrendo a mecanismos de contração e relaxamento, permitindo assim a regulação do fluxo sanguíneo em função das necessidades energéticas e metabólicas do cérebro. No entanto, quando ocorrem alterações fisiológicas, como por exemplo, após uma situação de isquemia, devido à tentativa de adaptação, pode haver modificação da sinalização entre as células astrocíticas, endoteliais e SMC, que pode levar tanto à vasodilatação como à vasoconstrição. Por este motivo, o objetivo fulcral deste trabalho é analisar o efeito do G-1, um agonista do recetor 1 de estrogénio acoplado à proteína G (GPER), com propriedades vasoativas na regulação da função vascular. Para tal, recorreu-se ao isolamento das artérias cerebrais médias (MCA) de ratos *Wistar* que foram explantadas em placas de culturas previamente revestidas com colagénio. A partir dessas artérias cerebrais foi possível obter-se culturas puras de SMC. Estas células foram expostas ao composto G-1 em diferentes concentrações e também a meios condicionados por co-culturas de neurónios e astrócitos, previamente submetidos a privação de oxigénio e glucose (OGD), de modo a simular a situação de isquemia e posteriormente incubados com diferentes concentrações de G-1. Utilizando a técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA) foi possível analisar a resposta das SMC ao agente contráctil, noroadrenalina (NA), ao agente relaxante, nitroprussiato de sódio (SNP) e ao G-1 diretamente.

A utilização direta do G-1, nas SMC da MCA, parecia ser um bom componente terapêutico. No entanto, quando incubamos as SMC, durante um período de 24 horas a capacidade vasodilatadora do G-1 começou a reduzir. Ainda, no momento em que verificámos o efeito nestas células, quando incubadas com co-culturas neuro-gliais de astrócitos e neurónios com G-1, após OGD, verificámos que as SMC obtiveram um comportamento contraditório, passando a expressar uma resposta vasoconstritora. Nesta perspetiva, o agonista do GPER, aparenta não induzir neuroproteção após um evento isquémico, uma vez que leva à contração das SMC. Assim, devem ser feitos mais estudos para avaliar os efeitos neurovasculares do G-1.

Palavras-chave

Artéria cerebral média; Células do músculo liso; Contratibilidade; G-1; Isquemia; Privação de oxigênio e glucose; Unidade Neurovascular

Abstract

The brain is considered a highly evolved organ with high metabolic consumption, even though it represents only 2% of the human body mass. Therefore, it contains a specialised network, the neurovascular unit, which is responsible for maintaining adequate perfusion levels for correct cerebral homeostasis. Within this network, we can highlight smooth muscle cells (SMC), which are the main cellular components that constitute the arteries. These cells are responsible for controlling blood vessel diameter, using contraction and relaxation mechanisms, thus regulating the blood flow according to the brain's energy and metabolic needs. However, when physiological alterations occur, such as after a situation of ischaemic, there may be a modification in the signalling mechanisms between the astrocytic, endothelial cells and SMC, which may lead to both vasodilation and vasoconstriction. For this reason, the main objective of this work is to analyse the effect of G-1, an GPER agonist with vasoactive properties, on the regulation of vascular function. For this purpose, we used isolated medium cerebral arteries (MCA) from Wistar rats which were explanted in culture plates, previously coated with collagen. From these cerebral arteries it was possible to obtain pure cultures of SMC. Then, these cells were exposed to different concentrations of G-1 and also to medium conditioned by co-cultures of neurons and astrocytes, previously submitted to oxygen and glucose deprivation (OGD) - to simulate the situation of ischemia - and later incubated with different concentrations of G-1. Using the *Planar Cell Surface Area* (PCSA) technique it was possible to analyse the SMC response to the contractile agent, noradrenaline (NA), to the relaxing agent, sodium nitroprusside (SNP) and to G-1 directly.

The administration of G-1, in the SMC of MCA, appeared to be a good therapeutic drug. However, when SMC were incubated, over 24 hours, the vasodilator capacity of G-1 started to reduce. Also, when these cells were incubated with neuro-glial co-cultures of astrocytes and neurons with G-1, after OGD, we found that SMCs obtained a contradictory behaviour, starting to express a vasoconstrictor response. For this reason, the GPER agonist does not induced neuroprotection after an ischaemic event. Thus, further studies should be done to evaluate the neurovascular effects of G-1.

Keywords

Contractibility; G-1; Ischemia; Middle cerebral artery; Neurovascular Unit; Oxygen and glucose deprivation; Smooth muscle cells

Índice

1. Introdução.....	2
1.1. Unidade Neurovascular	2
1.1.2. Estradiol na Unidade Neurovascular	4
1.2. Efeitos do E2 nos Componentes da Unidade Neurovascular	8
1.2.1. Neurónios	8
1.2.2. Astrócitos	10
1.2.3. Microglia	15
1.2.4. Oligodendrócitos.....	17
1.2.5. Células Musculares Lisas	20
1.2.6. Pericitos	37
1.2.7 Células Endoteliais.....	39
1.3. Acidente Vascular Cerebral.....	48
1.3.1. Patofisiologia do Acidente Vascular Cerebral	48
1.3.2. Estradiol no Acidente Vascular Cerebral.....	50
2. Enquadramento e Objetivos da Investigação.....	54
3. Materiais e Métodos	56
3.1. Cultura celular de células musculares lisas	56
3.2. Incubação com G-1 de culturas celulares mistas de astrócitos e neurónios anteriormente sujeitas a privação de oxigénio e glucose	57
3.3. Ensaio de Planar Cell Surface Area	58
3.4. Análise Estatística	59
3.5. Soluções e Materiais	59
3.5.1. Soluções.....	59
3.5.2. Químicos.....	60
3.5.3. Materiais.....	61
4. Resultados	62
4.1. Obtenção de culturas primárias de células musculares lisas a partir da artéria cerebral média	62
4.2. Ensaio de contratilidade celular	62

4.2.1. Efeito da incubação do agonista G-1 sobre a resposta da noradrenalina em células musculares lisas cerebrais	63
4.2.2. Efeito da incubação do agonista G-1 sobre a resposta do óxido nítrico em células musculares lisas cerebrais	66
4.2.3. Efeitos rápidos do agonista G-1 e do óxido nítrico na resposta contráctil induzida por Noradrenalina	67
5. Discussão geral	70
6. Conclusão e Perspetivas Futuras	76
7. Referências Bibliográficas.....	78

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da unidade neurovascular e possíveis consequências da sua disfunção responsável por processos patológicos no cérebro	3
Figura 2. Representação esquemática das vias de sinalização que o estrogénio endógeno 17β -estradiol e o agonista G-1 conseguem modular	5
Figura 3. Representação dos mecanismos envolvidos no processo contráctil.....	22
Figura 4. Representação dos mecanismos envolvidos no processo de relaxamento	31
Figura 5. Representação esquemática dos eventos de sinalização causados pela isquemia cerebral	49
Figura 6. Cérebro de rato Wistar adulto.....	56
Figura 7. Microscópio de fluorescência invertido - Zeiss Axio Observer Z1	59
Figura 8. Cultura primária de SMC obtidas através do explante da MCA de rato Wistar adulto.....	62
Figura 9. Efeito da NA (1 μ M) nas SMC da MCA. Percentagem de contração induzida pela NA após 24 horas de incubação com G-1 (100 nM e 200 nM) diluído em MSS. ...	63
Figura 10. Efeito da NA (1 μ M) nas SMC da MCA. Percentagem de contração induzida pela NA após 24 horas de incubação com meios condicionados por co-culturas corticais de astrócitos e neurónios incubadas com G-1	65
Figura 11. Efeito do SNP (1 μ M) nas SMC da MCA após contração com NA	67
Figura 12. Efeito do SNP (1 μ M) e do G-1 (100 nM e 200 nM) nas SMC da MCA após contração com NA	68

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais efeitos não genómicos do E2 e/ou do seu agonista G-1	43
Tabela 2. Soluções e respetivas composições utilizadas nos processos experimentais da cultura celular e no PCSA	60
Tabela 3. Materiais/Equipamentos e respetivas marcas utilizados ao longo deste trabalho	61

Lista de Acrónimos

[Ca ²⁺] _i	Concentração de Ca ²⁺ intracelular
5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BBB	Barreira hematoencefálica (do inglês <i>blood-brain barrier</i>)
BK _{Ca}	Canais de K ⁺ de alta condutância ativados pelo Ca ²⁺ (do inglês <i>large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺</i>).
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
Ca _v 1.2	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem do tipo-L
Ca _v 3.2	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem do tipo-T
CBF	Fluxo sanguíneo cerebral (do inglês <i>cerebral blood flow</i>)
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CNS	Sistema nervoso central (do inglês <i>central nervous system</i>)
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAG	Diacilglicerol
dCA	Autorregulação cerebral dinâmica (do inglês <i>dynamic cerebral autoregulation</i>)
DPN	Diarylpropionitrila
E2	17β-estradiol
EDHFs	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (do inglês <i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>)
EET	Ácido eicosatrienoico (do inglês <i>epoxyeicosatrienoic acids</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>Epidermal growth factor</i>)
ER	Recetores de estrogénio (do inglês <i>estrogen receptor</i>)
ERE	Elementos de resposta ao estrogénio
ERK1/2	Quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ERα	Recetor de estrogénio α (do inglês <i>estrogen receptor α</i>)
ERβ	Recetor de estrogénio β (do inglês <i>estrogen receptor β</i>)
FBS	Soro fetal de bovino (do inglês <i>fetal bovine serum</i>)
G-1	1-[(3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-il]etanona
G-15	(3aR,4R,9bS)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolina
G-36	(3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-8-propan-2-il-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolina
GPER	Recetor 1 de estrogénio acoplado à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled estrogen receptor</i>)
GPR30	Recetor 30 acoplado à proteína G (do inglês: Receptor 30 Coupled to Protein G)
GSK-3β	Glicogénio sintase cinase 3 beta (do inglês <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i>)
HBSS	Solução salina tamponada de <i>Hank</i> (do inglês <i>Hank Balanced Salt Solution</i>)
IL-1β	Interleucina 1β

IL-6	Interleucina 6
IP3	1,4,5 trifosfato de Inositol (do inglês <i>inositol-1,4,5- triphosphate</i>)
IP3R	Recetores do inositol trifosfato (do inglês <i>inositol triphosphate receptor</i>)
K ⁺	Ião Potássio
K _{2p}	Canais de K ⁺ de domínio 2 poros em tandem
K _{ATP}	Canais sensíveis ao ATP
K _{ca}	Canais de K ⁺ ativados pelo Ca ²⁺
K _{ir}	Canais de K ⁺ retificadores de influxo (do inglês <i>inward rectifier K⁺</i>)
K _{ir} 6.1	Subunidades retificadoras internas
K _v	Canais de K ⁺ operados por voltagem
LTCC	Canais de Ca ²⁺ tipo-L (do inglês <i>L-type Ca²⁺ channels</i>)
MAP	Proteínas associadas a microtúbulos (do inglês <i>microtubule-associated protein</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCA	Artéria cerebral média (do inglês <i>medial cerebral artery</i>)
MCC	Meio de cultura completo
mitoK _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis ao ATP mitocondriais
MSS	Meio de cultura sem soro
NA	Noroadrenalina
Na ⁺	Sódio
NBM	Meio Neurobasal (do inglês <i>Neurobasal Medium</i>)
NMDA	N-metil D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase 3 (do inglês <i>Nitric oxide synthase</i>)
NVU	Unidade neurovascular (do inglês <i>Neurovascular Unit</i>)
OGD	Privação de oxigénio e glucose (do inglês <i>oxygen and glucose deprivation</i>)
OPCs	Células progenitoras de oligodendrócitos (do inglês <i>oligodendrocyte precursor cells</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCSA	<i>Planar Cell Surface Area</i>
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PI3K/Akt	Via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase/proteína quinase B (do inglês <i>phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B pathway</i>)
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (do inglês <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PKA	Proteína quinase A (do inglês <i>protein kinase A</i>)
PKC	Proteína quinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKG	Proteína quinase G (do inglês <i>protein kinase G</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês <i>phospholipase C</i>)
PPT	Propilpirazotriol
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
RyR	Recetores de rianodina (do inglês <i>ryanodine receptors</i>)
SAA	Solução antibiótico-antimicótico
sCA	Autorregulação cerebral estática (do inglês <i>static cerebral autoregulation</i>)
sGC	Guanilato ciclase solúvel (do inglês <i>soluble guanylyl cyclase</i>)
SMC	Células musculares lisas (do inglês <i>smooth muscle cells</i>)
SNP	Nitroprussiato de sódio (do inglês <i>sodium nitroprusside</i>)

Src	Proto-oncogene tirosina-proteína quinase (do inglês <i>Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase</i>)
SUR2B	Sulfonilureia
TALK	(do inglês <i>TWIK-related alkaline pH-activated K⁺ channels</i>)
TASK	(do inglês <i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>)
TASK-1	(do inglês <i>TWIK-related K⁺ channel 1</i>)
TASK-3	(do inglês <i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel 3</i>)
TGF-β1	Fator de crescimento transformador beta 1 (do inglês <i>transforming growth factor beta 1</i>)
TGF-β2	Fator de crescimento transformador beta 2 (do inglês <i>transforming growth factor beta 2</i>)
THIK	(do inglês <i>tandem-pore domain halothane-inhibited K⁺ channels</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>),
TREK	(do inglês <i>TWIK-related K⁺ channel</i>)
TREK-1	(do inglês <i>TWIK-related K⁺ channel 1</i>)
TRESK	(do inglês <i>TWIK-related spinal cord K⁺ channels</i>)
TRP	Recetores de potencial transitório (do inglês <i>transient receptor potential</i>)
TRPA	Recetores de potencial transitório anquirina
TRPC	Recetores de potencial transitório clássico ou canónico
TRPM	Recetores de potencial transitório melastatina
TRPM4	Recetores de potencial transitório melastatina 4
TRPML	Recetores de potencial transitório mucoliptina
TRPP	Recetores de potencial transitório policistina
TRPV	Recetores de potencial transitório vaniloide
TRPV4	Recetores de potencial transitório vaniloide tipo 4
TWIK	(do inglês <i>TWIK-tandem of pore domains in a weak inward rectifying K⁺ channel</i>)
VDCC	Canais de Ca ²⁺ operados por voltagem (do inglês <i>voltage dependent calcium channel</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular local (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)
V _m	Potencial de membrana (do inglês <i>membrane potential</i>)

1. Introdução

1.1. Unidade Neurovascular

O cérebro é o órgão mais complexo e evoluído do corpo humano, sendo este responsável pelo consumo, de cerca de 20% do oxigênio e da glucose do corpo (Brown et al., 2019; Khakh e Deneen, 2019; Muoio et al., 2014; Xiao et al., 2017). Este é considerado altamente específico, com uma hierarquia estrutural e funcional e com uma exigência metabólica constante, apesar do cérebro ter uma capacidade limitada para armazenar energia (Muoio et al., 2014). Também compreende uma vasta diversidade de tipos celulares que, em conjunto, trabalham para o adequado funcionamento da biologia cerebral (Khakh e Deneen, 2019).

O fornecimento de glucose e de oxigênio ao sistema nervoso central (CNS: do inglês *central nervous system*) é efetuado pelo fluxo sanguíneo cerebral (CBF: do inglês *cerebral blood flow*) e, conseqüentemente, transportados pela barreira hematoencefálica (BBB: do inglês *blood-brain barrier*) para que exista consumo ao nível do cérebro (Xiao et al., 2017). Deste modo, as funções cerebrais dependem de uma autorregulação correta dos vasos sanguíneos, o que implica um sistema cardiovascular saudável (Xiao et al., 2017). Assim, quando ocorrem pequenas alterações no fornecimento ou na regulação existem notáveis conseqüências metabólicas (Muoio et al., 2014).

O cérebro dos mamíferos, para assegurar o correto fluxo sanguíneo, bem como a homeostase cerebral, desenvolveu o conceito de uma unidade funcional e complexa reconhecida como unidade neurovascular (NVU: do inglês *Neurovascular Unit*), que conecta o parênquima cerebral à vasculatura cerebral. (Brown et al., 2019; Pouso e Cairrao, 2022; Sá-Pereira et al., 2012; Yang et al., 2017). A NVU engloba componentes da matriz extracelular, células do parênquima cerebral, como a microglia, os oligodendrócitos, os neurónios e os astrócitos, onde estes interagem com células vasculares, nomeadamente, com os pericitos nos capilares, com as células musculares lisas (SMC: do inglês *smooth muscle cells*) nas artérias e arteríolas, e com as células endoteliais (Brown et al., 2019; del Zoppo, 2010; Dore-Duffy e Cleary, 2011; Muoio et al., 2014; Pouso e Cairrao, 2022; Quelhas et al., 2019; Yang et al., 2017). As células que compõem a NVU estão intimamente ligadas entre si, compartilhando inúmeras características, para que consigam estabelecer um sistema altamente anatómico e funcional que lhes permita trabalhar sincronizada e reciprocamente (Figura 1) (Muoio et al., 2014).

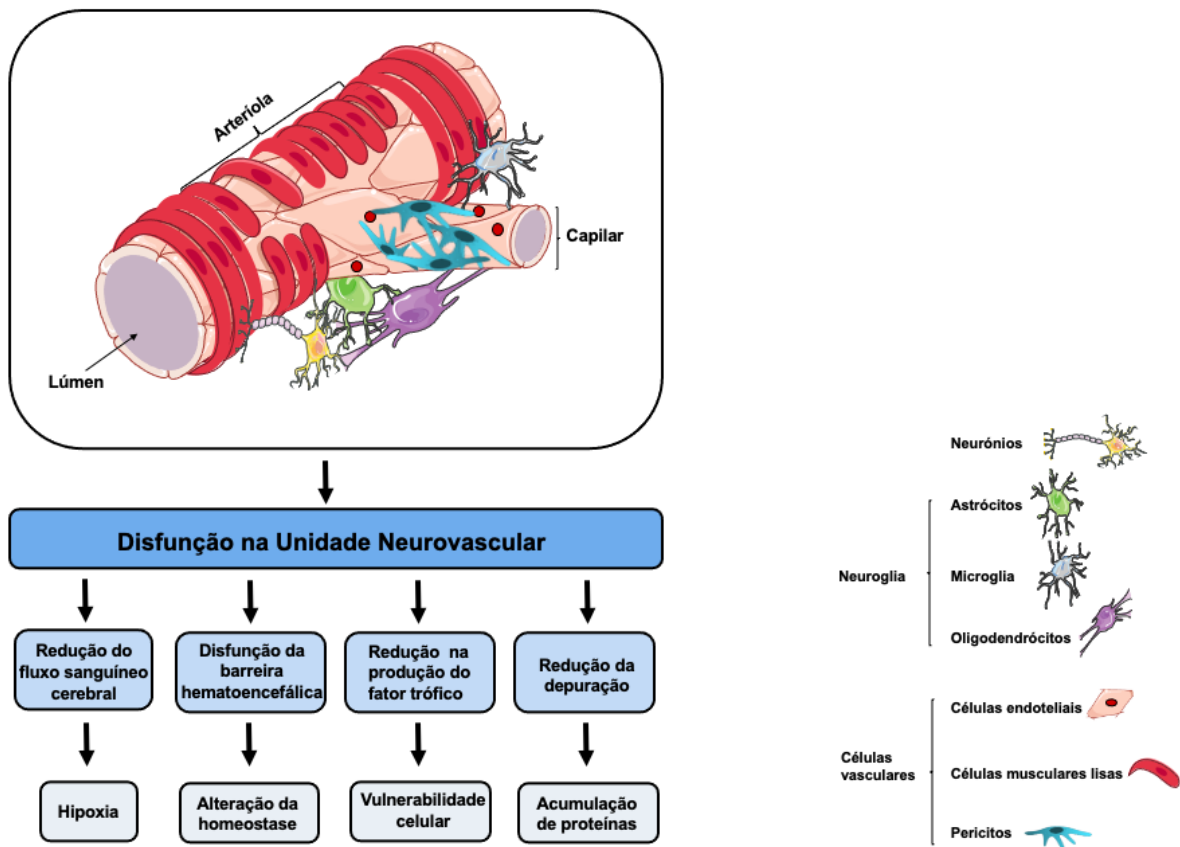


Figura 1. Representação esquemática da unidade neurovascular e possíveis consequências da sua disfunção responsável por processos patológicos no cérebro. A unidade neurovascular é constituída por neurónios; por células da neuroglia (astrócitos, microglia e oligodendrócitos); células vasculares (células endoteliais, células musculares lisas e pericitos).

A NVU emergiu devido à sua importância na manutenção das funções cerebrais, mais concretamente na regulação do CBF e na formação da BBB (Brown et al., 2019). A BBB é uma área de interação entre o sangue e o cérebro, que compreende células endoteliais da microvasculatura, envolvida por pericitos e pés astrocitários e é suportada por uma membrana basal. Esta barreira estabelece a passagem de diversos nutrientes e componentes essenciais, proteínas e substâncias químicas entre a corrente sanguínea e o tecido parenquimatoso (Dore-Duffy e Cleary, 2011; Sá-Pereira et al., 2012). Os organismos que contêm um CNS desenvolvido possuem uma BBB, para que não ocorra difusão sanguínea de substâncias tóxicas e prejudiciais ao CNS (Iadecola, 2017; Sá-Pereira et al., 2012). No CNS existe uma rede complexa e funcionalmente adaptada, formada por células vasculares e neuronais, onde a dinâmica vascular e a execução neuronal estão estreitamente conectadas (Andreone et al., 2015). Assim, a BBB tem notáveis funções, uma vez que permite a absorção de nutrientes solúveis em água, metabolitos e moléculas indispensáveis para o CNS; exporta compostos exógenos ou tóxicos para o cérebro através de um sistema específico de transporte, expresso pelas células endoteliais cerebrais, existente na corrente sanguínea (Sá-Pereira et al., 2012).

Em suma, as interrelações entre as células da NVU regulam diversas funções que englobam o desenvolvimento e a permeabilidade à BBB, a regulação do CBF e a resposta ao stress. A maior parte das patologias do CNS são devidas à desregulação neurovascular, transformando deste modo a NVU num potencial alvo para eventuais intervenções terapêuticas. Quando ocorrem mudanças no ambiente celular, a NVU toma decisões e adapta-se às novas condições de maneira a que homeostase seja promovida e não exista comprometimento da viabilidade tecidual (Dore-Duffy e Cleary, 2011; Yang et al., 2017).

1.1.2. Estradiol na Unidade Neurovascular

Nos mamíferos foi demonstrado a presença de uma hormona estrogénica que executa uma ampla gama de funções, o 17 β -estradiol (E2). O E2 é considerado a forma fisiológica natural mais ativa do estrogénio, pode ser formado a partir da aromatização da testosterona, pela aromatase citocromo P450 (Kumar et al., 2018; Kumar et al., 2015; Meyer e Barton, 2016; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2011, 2014; Puglisi et al., 2019; Tran, 2020; Wang et al., 2019). A nível reprodutor, as mulheres e as fêmeas produzem esta hormona maioritariamente nos folículos em desenvolvimento, na placenta e no corpo lúteo, já nos homens e machos é produzido pelos testículos. Podemos verificar que quantidades mais pequenas de E2 podem ser também sintetizadas pelos seios, glândulas suprarrenais, pelo fígado e entre outros tecidos e órgãos (Iorga et al., 2017; Kumar et al., 2018; Luo e Liu, 2020).

Em 1958, através da demonstração da presença de um componente proteico intracelular que se ligava especificamente ao estrogénio, demonstrou-se pela primeira vez a existência nos ovários de um recetor de estrogénio, o ER α (ER α : do inglês *estrogen receptors α*). Ao longo de diversos anos pensava-se que este recetor seria o único responsável por toda a atividade estrogénica nos tecidos. Até que no ano de 1996 foi descoberto um segundo recetor, apelidado de ER β (ER β : do inglês *estrogen receptors β*) (Jia et al., 2015; Molina et al., 2017; Yaşar et al., 2017). Ambos os recetores ER α e ER β são classificados como recetores clássicos de estrogénio, pertencendo à família de recetores nucleares (Barton, 2016; Beyer et al., 2002; Kumar et al., 2018; Meyer e Barton, 2016; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2014; Tran, 2020). Embora sejam recetores nucleares e por definição devem estar localizados nos núcleos das células, 5% dos recetores ER α e ER β encontram-se no citoplasma e uma fração é localizada na membrana plasmática, especialmente nas caveólas (Molina et al., 2017; Prossnitz e Arterburn, 2015). Quando os investigadores começaram a verificar que os recetores clássicos ER α e ER β não podiam ser os únicos responsáveis pelos efeitos produzidos nas células, foi descoberto no final dos anos 90, um recetor órfão inicialmente denominado de

GPR30 (do inglês: *Receptor 30 Coupled to Protein G*) (Meyer et al., 2009; Meyer et al., 2011; Molina et al., 2017; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2009). Por fim, no ano de 2000, este recetor deixou de ser caracterizado como um recetor órfão, uma vez que a sua influência na ativação de mecanismos de sinalização rápidos foi comprovada. Além disso, no ano de 2007 a *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* designou oficialmente este recetor de recetor 1 de estrogénio acoplado à proteína G (GPER: do inglês *G protein-coupled estrogen receptor*) (Barton, 2016). Através de estudos confocais verificaram que o GPER está localizado na membrana plasmática e uma fração nas membranas intracelulares como o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático (Figura 2) (Iorga et al., 2017; Luo e Liu, 2020; Meyer e Barton, 2016; Meyer et al., 2014; Meyer et al., 2009; Meyer et al., 2011; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2009, 2011, 2014; Tran, 2020; Wise et al., 2001).

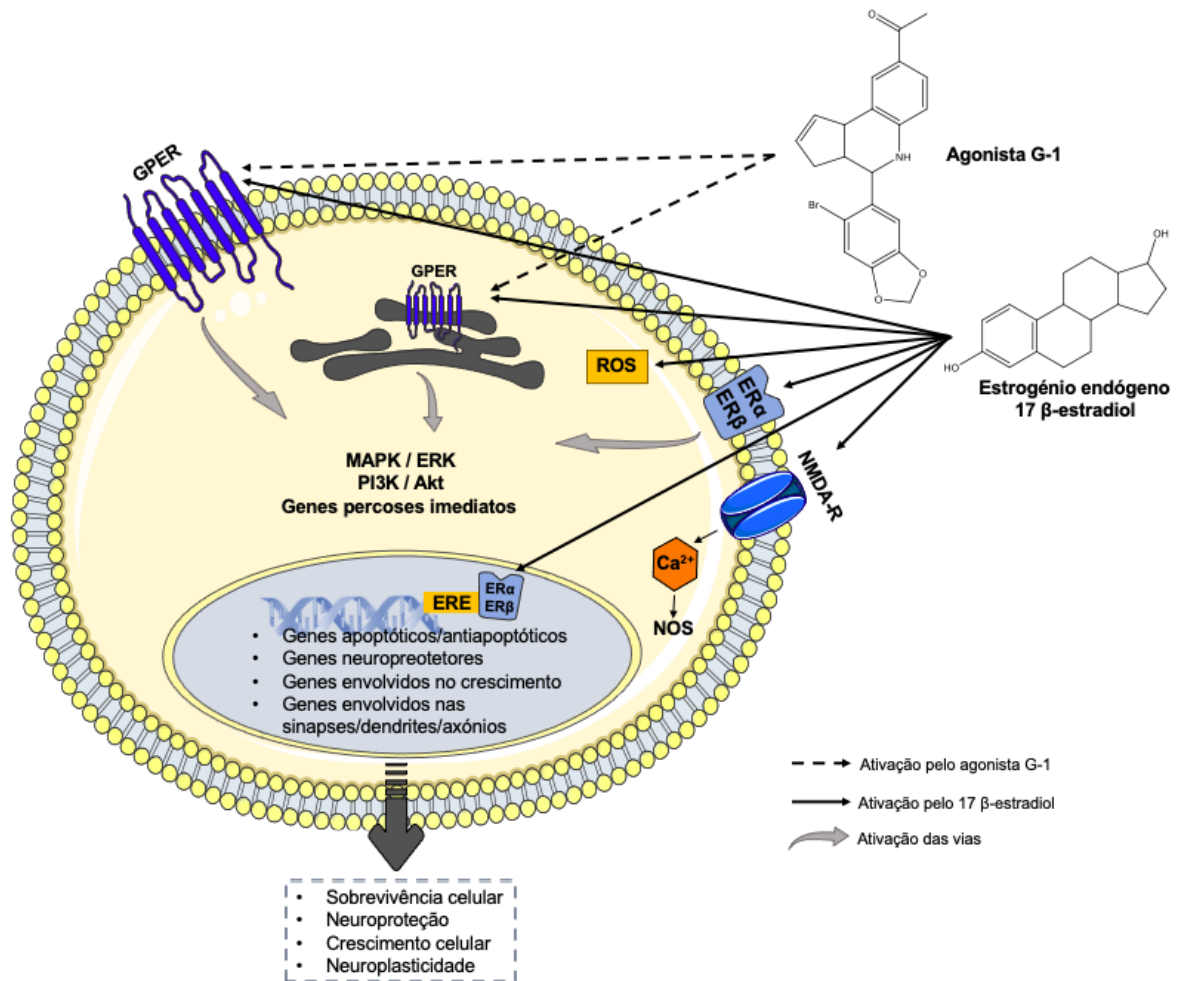


Figura 2. Representação esquemática das vias de sinalização que o estrogénio endógeno 17 β-estradiol e o agonista G-1 conseguem modular. As estruturas químicas foram desenhadas recorrendo ao programa *ChemDraw 18.0*. Abreviaturas: 17 β-estradiol (E2); recetor 1 de estrogénio acoplado à proteína G (GPER); receptores de estrogénio α (ERα); receptores de estrogénio β (ERβ); proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); cinases reguladas por sinal extracelular (ERK); fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K); proteína quinase B (Akt); Espécie reactiva de oxigénio (ROS); Cálcio (Ca²⁺); Sintases de óxido nítrico (NOS); Receptor NMDA (NMDA-R); elemento de resposta ao estrogénio (ERE).

Assim, podemos concluir que atualmente sabe-se que a hormona E2 medeia os seus efeitos através de três recetores celulares conhecidos até ao momento, nomeadamente os recetores clássicos de estrogénio ER α e ER β , bem como o GPER. Os recetores de estrogénio (ER: do inglês *estrogen receptor*) podem ser expressos por diversos tecidos reprodutores como o ovário, os testículos, os seios, o endométrio e as trompas de Falópio, bem como pulmões, fígado, cérebro, coração, rim e células endoteliais e musculares lisas (Iorga et al., 2017; Kumar et al., 2018; Meyer e Barton, 2016; Meyer et al., 2014; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2011). Ao longo dos tempos, as respostas celulares ao estrogénio e aos compostos estrogénicos, têm sido explicadas ao nível dos recetores nucleares “clássicos”, ER α e ER β , que tradicionalmente são associados à regulação da expressão génica, conhecida como sinalização “genómica”. Este tipo de sinalização ocorre através da formação de homo ou heterodímeros do recetor e consequente ligação a elementos de resposta ao estrogénio (ERE) nas regiões reguladoras e promotoras dos genes alvo. Além disso, os recetores nucleares, conseguem interagir com diferentes fatores de transcrição e DNA alterando proteínas pelo meio de complexas interações entre proteína-proteína. Assim, os recetores nucleares regulam a expressão do gene e as funções celulares. Este modo de ação genómica através do E2 é um processo lento, que demora horas a dias para que surjam efeitos fisiológicos (Barton, 2016; Beyer et al., 2002; Kumar et al., 2018; Meyer e Barton, 2016; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2014; Tran, 2020). Ao invés, o GPER, também pode ser ativado pelo E2 e deste modo, consegue ativar cascatas de sinalização intracelulares associadas aos recetores da proteína G e permitir assim desencadear diversas respostas celulares rápidas (Lebesgue et al., 2010). As respostas da ativação deste recetor ocorrem num curto período de tempo, entre segundos a minutos, mediadas pelo estrogénio e manifestadas através de canais iónicos e vias enzimáticas. Assim, os GPER podem ser mediadores de vias de sinalização celular rápida, também designadas de vias de sinalização “não-genómicas” ou de sinalização “extra-nuclear” (Barton, 2016; Kumar et al., 2018; Luo e Liu, 2020; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2014).

Ao nível não genómico o E2 caracteriza-se por ser um mediador com atuação em diversificados eventos de sinalização celular rápida/não genómica. Dentro desses eventos podemos destacar de uma forma generalizada a sintetização de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP: do inglês *cyclic adenosine monophosphate*), a mobilização de cálcio (Ca²⁺), a ativação de canais iónicos, a ativação de cinases proteicas com a consequente ativação de inúmeras cascatas de sinalização secundárias e efetores, que conseguem também atuar ao nível da regulação da transcrição de forma independente ou através dos ERs (Kumar et al., 2018; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2009, 2011, 2014). Assim, vários estudos já demonstraram que ao nível das vias da sinalização

intracelular iniciadas pelo GPER ocorre: (1) a ativação das cinases, onde em diversas células, após o E2 ativar o GPER vai desencadear a ativação das vias da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK: do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e/ou da via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase/proteína quinase B (PI3K/Akt: do inglês *phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B pathway*); (2) a produção de cAMP, onde a geração deste vai atenuar a atividade de MAPK pelo E2, ou seja, o E2 primeiro tem a capacidade de estimular e depois conseguir atenuar a atividade da MAPK por intermédio do GPER; (3) a mobilização de Ca²⁺, onde o GPER em diversas células, através da mediação de E2 ou derivados de estrogénio permeáveis à membrana, consegue mobilizar uma resposta rápida de Ca²⁺; (4) a ativação da transcrição, ou seja, embora esta função seja associada aos recetores nucleares ER α e ER β , comprovou-se que eventos de sinalização rápida iniciados pelo GPER, após exposição ao E2, também têm a capacidade de intervir na regulação da expressão génica (Han et al., 2013; Kumar et al., 2018; Prossnitz e Barton, 2009, 2011; Tran, 2020).

No sistema nervoso central e periférico de humanos e roedores, os efeitos do E2 são diversos. Atuam na regulação da plasticidade sináptica e do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal; na manutenção da homeostase; no comportamento sexual; na modulação da sensação de dor; ao nível da memória e cognição e também na neuroprotecção (Kumar et al., 2015; Kumar e Foster, 2020; Luo e Liu, 2020; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2011; Tang et al., 2014). Apesar de muitos dos efeitos desencadeados pelo E2 envolverem os recetores clássicos nucleares, ER α e ER β , estudos recentes evidenciam o papel crucial do GPER nas atividades neurológicas dos organismos (Luo e Liu, 2020; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2011).

Atualmente, e em diversos estudos, identificaram um composto de origem não esteroidal como sendo um agonista do específico do GPER, através de um *screening* virtual e biomolecular, denominando-o de 1-[(3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolin-8-il]etanona (G-1) (Bologa et al., 2006; Luo e Liu, 2020; Meyer et al., 2011; Prossnitz et al., 2008; Prossnitz e Barton, 2009). Ou seja, o G-1 demonstrou ser capaz de mimetizar os efeitos do E2 nos sistemas fisiológicos. Apesar de ser agonista do GPER, o G-1 não apresenta afinidade para os recetores clássicos ER α e ER β , não interferindo com as suas vias de sinalização, de transcrição proteica ou de desregulação dos mesmos. A partir da estrutura molecular do G-1 foi descoberto mais tarde dois antagonistas do GPER, o (3aR,4R,9bS)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolina (G-15) e o (3aS,4R,9bR)-4-(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-il)-8-propan-2-il-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-ciclopenta[c]quinolina (G-36).

Isto é, estes ligandos têm a capacidade de inibir a ação do E2 e do G-1 nas células (Hadjimarkou e Vasudevan, 2018; Prossnitz e Barton, 2011). Assim, o uso e caracterização

funcional do G-1 tem sido crucial na investigação do papel fisiológico do GPER nos diversos sistemas (Prossnitz e Barton, 2009), tal como será abordado ao longo deste trabalho nos sistemas associados à NVU. Pensa-se que a mediação do E2 ou do seu agonista G-1 na ativação e/ou expressão do GPER seja crítica em vários tipos celulares na NVU, nomeadamente, ao nível da vasorelaxação das SMC, na neuroprotecção das células neuronais e ao nível da proliferação e diferenciação celular (Garcia-Segura et al., 2001; Iorga et al., 2017; Kumar et al., 2018; Prossnitz e Barton, 2011; Tang et al., 2014).

1.2. Efeitos do E2 nos Componentes da Unidade Neurovascular

1.2.1. Neurónios

O sistema nervoso possui na sua base as células neuronais que são consideradas as unidades fundamentais e o marcapasso da unidade neurovascular. Estas são responsáveis por todos os impulsos nervosos que dominam o organismo (Muoio et al., 2014; Quelhas et al., 2019).

As células neuronais morfológicamente caracterizam-se por possuírem um corpo celular, com núcleo e numerosos organelos, um axónio e também numerosas dendrites. Os neurónios expressam proteínas do citoesqueleto, nomeadamente neurofilamentos, que estão organizados, nas dendrites e axónios, como filamentos com 10 nm de espessura (Sá-Pereira et al., 2012).

Devido à alta sensibilidade que os neurónios possuem, estes conseguem detetar ligeiras variações no número de nutrientes e na quantidade de oxigénio disponíveis. Através de mecanismos complexos de comunicação estabelecidos entre os neurónios, os astrócitos e os vasos sanguíneos cerebrais da NVU é possível regular temporal e espacialmente o fornecimento de sangue às exigências neuronais, por intermédio de sinais químicos. (Muoio et al., 2014; Quelhas et al., 2019; Sá-Pereira et al., 2012).

Estudos indicam que existem inúmeros neurónios que inervam diretamente as células endoteliais e os prolongamentos astrocíticos, como neurónios colinérgicos; os serotoninérgicos; os noradrenérgicos e também os neurónios GABAérgicos (Sá-Pereira et al., 2012). Também, existem evidências que as células neuronais conseguem regular as funções do vaso sanguíneo através da indução da expressão de enzimas únicas das células endoteliais para responderem às condições metabólicas (Sá-Pereira et al., 2012). Ou seja, nas artérias, os neurónios conseguem ativar os recetores N-metil D-aspartato (NMDA) neuronais para desempenharem funções dilatadoras e posteriormente para a síntese e

secreção de óxido nítrico (Quelhas et al., 2019). Em suma, os neurónios e as células astrocíticas libertam fatores vasoativos que atuam no tónus vascular, no fluxo sanguíneo e também na correta formação da vasculatura do cérebro (Quelhas et al., 2019).

1.2.1.1. Efeitos do estradiol nos neurónios

No referente ao efeito do E2, classicamente, era apenas referida como uma hormona que conseguia exercer efeitos biológicos pela transcrição génica regulada pela ligação do ERs nucleares ao ERE. No qual verificaram que o E2 conseguia exercer ações tróficas sobre os neurónios; promover a sobrevivência neuronal e diminuir os danos neurodegenerativos causados por diversos insultos neuronais (Azcoitia et al., 2011). Atualmente, diversas investigações apontam para que o ER esteja envolvido em diversos eventos de maneira não genómica no citosol em neurónios (Honda et al., 2001). Sabe-se que os efeitos não genómicos do E2, nas células neuronais, são essenciais para a regulação da extensão de neurites, para a plasticidade das sinapses, bem como na síntese e no catabolismo de neurotransmissores (Beyer et al., 2003). Para além disso, o E2 é crucial na manutenção da integridade celular do sistema dopaminérgico ao ajudar no desenvolvimento dos neurónios e a exercer neuroproteção no mesencéfalo ao estimular as vias anti-apoptóticas PI3K/Akt (Beyer et al., 2003; Dhandapani et al., 2005; Evans et al., 2016; Honda et al., 2001; Ivanova et al., 2002; Lebesgue et al., 2010; Zhao, Shi, et al., 2016). Isto é, a Akt fosforilada pela PI3K medeia a sinalização pró-sobrevivência neuronal. Deste modo, a via PI3K/Akt consegue modular diretamente a maquinaria de apoptose celular, a regulação génica envolvida na apoptose/sobrevivência celular e na integração do metabolismo celular (Honda et al., 2001; Zhao, Shi, et al., 2016). Também foi verificado que em níveis semelhantes ao estrogénio natural o agonista G-1 consegue ativar o GPER e proteger os neurónios do hipocampo e do estriado (Kosaka et al., 2012; Lebesgue et al., 2010).

Outros trabalhos demonstraram que a ativação estrogénica de proteína quinase A (PKA: do inglês *protein kinase A*) está envolvida nos aumentos rápidos dos níveis de cAMP. Esta ativação é um mecanismo de alteração rápida da transmissão sináptica que pode suplementar em outras atividades do E2 (Evans et al., 2016; Ivanova et al., 2002; Kelly et al., 1999). Ivanova e seus colaboradores acrescentam que os efeitos do E2 na neuritogénese são transmitidos através de recetores membranares acoplados à via de sinalização de Ca²⁺/cAMP/PKA (Ivanova et al., 2002).

Em outras investigações realizadas em neurónios dopaminérgicos e GABAérgicos cerebrais, revelou-se que quando o E2 e o seu agonista G-1 ativam os REs e o GPER, respetivamente, é de imediato desencadeado um aumento transitório da concentração de

Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) (Beyer e Raab, 1998; Brailoiu et al., 2007; Funakoshi et al., 2006). Assim, pensa-se que a sinalização de Ca²⁺ induzida pelo E2 participe de uma forma não genômica na modulação funcional e na regulação do desenvolvimento dos sistemas dopaminérgicos do mesencéfalo (Beyer e Raab, 1998).

Estudos posteriores verificaram que nas células neuronais o GPER consegue mediar os efeitos na neurotoxicidade induzida pelo glutamato e pela isquemia (Evans et al., 2016; Liu et al., 2012). Liu *et al.* acrescentam que a ativação do GPER atenuou a excitotoxicidade do NMDA através da cascata de sinalização de quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2: do inglês *extracellular signal-regulated kinases*), acoplada à proteína G. Esta via de quinase têm a capacidade de controlar e modular diversas respostas celulares nomeadamente ao nível da proliferação; da migração; da diferenciação e da apoptose. Deste modo, a ativação de ERK1/2 através do GPER é fundamental para proteger as células neuronais contra o insulto do NMDA (Liu et al., 2012).

Em suma, os ERs e o GPER encontram-se amplamente distribuídos no CNS incluindo nos neurónios, onde parecem desempenhar funções crucias (Lee et al., 2002). A via de transdução de sinal PI3K/Akt mostrou possuir uma notável importância na sobrevivência dos neurónios, onde o E2 exerceu um papel anti-apoptótico de uma forma não genômica. Também foi verificado que o E2 influencia rapidamente outras vias de sinalização como a formação de cAMP e indução de PKA; estimulação de MAPK; ativação de eventos dependentes de Ca²⁺ e a modulação e regulação da atividade das células neuronais. Por fim, acredita-se que o E2 e o agonista G-1 sejam moléculas com uma forte capacidade neuroprotetora contra a isquemia cerebral global.

1.2.2. Astrócitos

As células gliais compõem a maioria das células do CNS, sendo estas extremamente necessárias para o funcionamento do cérebro como um órgão estruturalmente complexo e hierarquizado (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Khakh e Deneen, 2019; Khakh e Sofroniew, 2015). Estas revelam uma notável variabilidade entre espécies e áreas do cérebro. Inclusive, a abundância deste tipo celular em cada diferente tipo de sistema nervoso parece correlacionar-se com o tamanho do animal, como por exemplo, encontramos 25% de células gliais em drosophilas e 97% destas em elefantes (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Khakh e Sofroniew, 2015). Segundo a funcionalidade, a morfologia e a localização podemos classificar da seguinte forma as células gliais: a microglia, conhecida por ser as únicas células gliais com origem imune; os astrócitos; os oligodendrócitos e as células de Schwann, que têm a capacidade de gerar camadas de mielina em volta dos

axónios nos sistemas nervosos central e periférico, respetivamente (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Em mamíferos, os astrócitos são as células gliais mais frequentes e representam entre 20% a 40% do número total de células cerebrais, sendo deste modo, considerado as células mais abundantes desta região (Daneman e Prat, 2015; Khakh e Sofroniew, 2015; Liu e Chopp, 2016; Quelhas et al., 2019; Zhou et al., 2019). Os astrócitos desempenham uma variedade de funções cruciais nomeadamente, na sinaptogénese; nos circuitos e comportamentos; na homeostasia iónica; no tamponamento de neurotransmissores; na secreção de moléculas neuroativas; na defesa contra o stresse oxidativo e fazem parte integrante da (Daneman e Prat, 2015; Guttenplan e Liddelow, 2019; Khakh e Deneen, 2019; Liu e Chopp, 2016; Sofroniew, 2020; Zhou et al., 2019). Ao nível da sinaptogénese, os astrócitos, controlam o desenvolvimento neuronal ao secretarem moléculas sinaptogénicas e ao eliminarem o excesso de sinapses. Também, conseguem manter a homeostasia do CNS, bem como, a promoção da sobrevivência neuronal ao transportarem metabólitos, ao libertarem fatores tróficos e ao regularem o fluxo sanguíneo. Por fim, os astrócitos, reagem a lesões e a doenças do CNS num fenómeno denominado de astrogliose reativa, ou seja, consiste num estado ativado das células da glia que favorece a inflamação e posteriormente a sua resolução (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Guttenplan e Liddelow, 2019; Sofroniew, 2020).

O cérebro contém diversificados tipos de astrócitos e estes são tradicionalmente catalogados de acordo com a sua morfologia, organização espacial e fenótipo do antigénio. Deste modo, incluem-se: os astrócitos protoplasmáticos na substância cinzenta do cérebro; os astrócitos fibrosos na região da substância branca; os astrócitos radiais em volta dos ventrículos (como exemplo, poderemos encontrar na retina as células de Müller e no cerebelo as células de Bergmann); os astrócitos velados localizados na camada granular do cerebelo; os astrócitos associados à superfície; os astrócitos interlaminares nas camadas supragranulares do córtex cerebral; os astrócitos Gomori do arqueado e pituicitos da neurohipófise, entre outros (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Khakh e Deneen, 2019; Liu e Chopp, 2016; Zhou et al., 2019). Classicamente, os astrócitos foram classificados somente em duas vastas categorias nomeadamente, em astrócitos protoplasmáticos e fibrosos. A distinção entre estas duas classes devia-se apenas à morfologia e localização na substância cinzenta e branca, respetivamente (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Khakh e Deneen, 2019; Khakh e Sofroniew, 2015). Os astrócitos protoplasmáticos possuem uma morfologia arredondada e espongiiforme com diversos ramos principais, cujos quais, culminam em processos bastante ramificados e uniformemente distribuídos. Estes são encontrados na substância cinzenta e os seus processos entram em contacto quer com as sinapses quer com os vasos sanguíneos. Já os astrócitos fibrosos são menos ramificados

comparativamente com os astrócitos protoplasmáticos e os seus processos são mais longos e mais semelhantes às fibras. Estas células encontram-se na substância branca e entram em contacto com os nós de Ranvier e os vasos sanguíneos (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Khakh e Deneen, 2019; Zhou et al., 2019).

Eventualmente, quando se verifica qualquer tipo de lesão ou doença do CNS, ocorre a astrogliose reativa, como referido anteriormente. Para que seja possível a distinção entre os vários subtipos de astrócitos reativos, temos que atentar na morfologia, estado proliferativo, tipos de células com as quais os astrócitos estabeleceram uma interação e na estruturação tecidual para a qual os astrócitos contribuíram. Apoiado nestes fundamentos, existem dois grandes subtipos diferentes nos quais podemos enquadrar os astrócitos nomeadamente, em astrócitos que num curto espaço de tempo proliferaram e organizaram-se numa nova estrutura tecidual constante que cria limites em volta das áreas danificadas ou com inflamação; e em astrócitos que não proliferaram e que mantiveram a estrutura celular de origem, a estrutura do tecido e as interações funcionais tais como atuavam no tecido saudável (Sofroniew, 2020).

Ao nível da regulação do tónus cerebrovascular nas artérias e arteríolas, os astrócitos, podem tanto desempenhar uma função vasodilatadora, como possuírem intervenções vasoconstritoras (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Muoio et al., 2014; Quelhas et al., 2019). Deste modo, podemos constatar que na NVU existem subpopulações de células astrocíticas com funcionalidades e características distintas e com vários desempenhos ao longo das vias de sinalização. Isto é, em resposta à atividade neuronal, os astrócitos reagem ao modificarem a $[Ca^{2+}]_i$ por intermédio da secreção de fatores tróficos, já outros astrócitos conseguem modificar o tónus vascular ao regularem os canais de potássio (K^+). Também, estas células produzem e secretam outras substâncias que levam ao desencadeamento dos processos de vasodilatação e vasoconstrição tais como, as prostaglandinas, a adenosina trifosfato (ATP) e o óxido nítrico (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Muoio et al., 2014; Quelhas et al., 2019).

Os astrócitos caracterizam-se por serem células excitáveis e constituintes da comunicação celular, apesar de não gerarem potenciais de ação. Através de um processo denominado de gliotransmissão, as células astrocíticas podem ser ativadas através de sinais externos ou internos e enviarem mensagens características para células adjacentes. Estas células são as mais versáteis da NVU, pois conseguem estabelecer interações com diversificados tipos de células. Isto é, interagem quer com células neuronais quer com células não neuronais, englobando os neurónios e as suas sinapses; a microglia; os oligodendrócitos; as células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs: do inglês *oligodendrocyte precursor cells*); algumas células peri-vasculares; as células do sistema imunitário e os fibroblastos (Muoio et al., 2014; Sofroniew, 2020). Os astrócitos exibem aumentos temporários na $[Ca^{2+}]_i$, e

são esses picos os responsáveis pela comunicação entre astrócito-astrócito e astrócito-neurónio (Guillamón-Vivancos et al., 2015; Sofroniew, 2020). Os sinais de Ca^{2+} dos astrócitos apresentam ainda mais funções fisiológicas como, atuarem em diversificadas vias ao regularem a secreção de moléculas de sinalização, bem como moléculas relacionadas com as lesões e mediadores inflamatórios; ao monitorizarem o diâmetro dos vasos sanguíneos; ao controlarem a libertação de fatores sinaptogénicos/tróficos; ao regularem a expressão génica; ao capturarem neurotransmissores e K^+ ; ao participarem na neuromodulação e no alargamento do potencial de ação axonal (Galland et al., 2019; Khakh e Sofroniew, 2015).

Em suma, a noção que as células astrocíticas são diversificadas e possuem a capacidade de mediar respostas em diversas vias de sinalização possibilita a exploração de um caminho para a obtenção de efeitos terapêuticos. Por exemplo, uma boa estratégia seria tentar compreender as proteínas que os astrócitos expressam e, para tal, começar por perceber os recetores acoplados à proteína G.

1.2.2.1. Efeito do estradiol nos astrócitos

Em mamíferos, o E2 têm vindo a ser considerado como um importante modulador no desenvolvimento do sistema nervoso e durante muitos anos acreditava-se que a principal atuação desta hormona era nas células neuronais. Após vários estudos, a ação genómica do E2 foi confirmada em diversos parâmetros funcionais e também em outras células, como nos astrócitos. Dentro dessas competências podem ser destacadas a ação genómica do E2 para o crescimento dos prolongamentos astrocíticos; a regulação dos níveis de Ca^{2+} , importante na comunicação dos astrócitos com as células da glia e com os neurónios; na mediação da expressão de diversas proteínas nas células astrocíticas, que cooperam na regulação da neuroproteção e da neuroinfamação, nos níveis extracelulares de glutamato e na homeostasia neuronal (Acáz-Fonseca et al., 2014; Beyer et al., 2003; Chaban et al., 2004; Dhandapani et al., 2005; Ivanova et al., 2002; Wang et al., 2019).

Em relação aos feitos não genómicos do E2, ele está envolvido no desenvolvimento e neuroproteção do CNS, sendo estes efeitos mediados por interações estrogénio-astroglia. Assim, está demonstrado que o E2 exerce uma influência sustentada na função das células astrocíticas do mesencéfalo através da estimulação das vias de sinalização, como na via MAPK (Beyer et al., 2003; Ivanova et al., 2002; Pawlak et al., 2005; Wang et al., 2019). Além disso, o estudo de Dhandapani e dos seus colaboradores verificou que o E2 induz a expressão dos genes TGF- β 1 e TGF- β 2 em culturas de astrócitos e que este consegue estimular rapidamente a ativação da via antiapoptótica PI3K-Akt. A ativação desta via demonstrou particular interesse uma vez que quando bloqueada atenuava

significativamente a capacidade do E2 aumentar a expressão do TGF- β nas células astrocitárias. Ou seja, acredita-se que, apesar de uma expressão dispersa dos recetores de estrogénio, estas vias juntamente com os efeitos neuroprotetores diretos do E2 conseguem proteger todo o sistema nervoso e seus constituintes (Dhandapani et al., 2005).

Outras linhas de evidência sugerem que os ERs membranares parecem estar acoplados à proteína G, como é o caso do GPER astrocitário (Chaban et al., 2004; Wang et al., 2019). Uma vez que o aumento causado pelo E2 na $[Ca^{2+}]_i$ não exigiu a necessidade de Ca^{2+} extracelular. Deste modo, verificou-se que o Ca^{2+} mobilizado pelo E2 foi libertado de reservas intracelulares (Chaban et al., 2004). Este dado foi importante na medida em que permitiu que Chaban e os seus investigadores constatassem que, ao nível não genómico, os astrócitos com base nas variações do $[Ca^{2+}]_i$ podiam regular os neurónios integrando sinais sinápticos e estabelecendo respostas de feedback. Além disso, comprovaram ainda que os astrócitos conseguiam controlar a sinaptogénese e que um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ poderia estabelecer novos circuitos no cérebro adulto. Assim sendo, demonstrou-se a existência de uma sinalização direta, rápida e reversível do $[Ca^{2+}]_i$ nos astrócitos mediado pelo E2. Revelando assim, um mecanismo pelo qual o E2 pode atuar ao nível da excitabilidade nos astrócitos (Chaban et al., 2004).

Em 2019 Wang e seus colaboradores mostraram que o GPER astrocitário está envolvido na autofagia, na neuroprotecção contra danos e na ativação das células astrocitárias induzidas por glutamato. O mecanismo pelo qual ocorrem estas ações deve-se principalmente à redução da libertação de citocinas inflamatórias e à restauração da autofagia após exposição ao glutamato nos astrócitos em cultura. Também, verificaram que o efeito regulador do GPER na autofagia dependia da via de sinalização MAPK (Wang et al., 2019).

Em suma, os astrócitos eram classicamente conhecidos por serem as células de suporte cruciais à atividade neuronal. Com o decorrer dos estudos, revelou-se que nas diversas áreas do CNS, a função astrocitária é demasiado diversificada sob condições fisiológicas ou patológicas (Wang et al., 2019). As vias ativadas direta e rapidamente por E2, nos astrócitos, podem interagir com os recetores de neurotransmissores ionotrópicos e com os canais iónicos; podem induzir a plasticidade sináptica dependente da interação astrocitária-neuronal e produzir consequentemente efeitos nos astrócitos, nomeadamente na expressão e secreção de fatores tróficos; na modificação da morfologia celular e na resposta à lesão. Geralmente, as funcionalidades mediadas pelo E2 compreendem distintos mecanismos de sinalização celular, incluindo ações “genómicas” e “não genómicas”, que contribuem igualmente para o desenvolvimento e função dos astrócitos. Em concentrações fisiológicas ou clinicamente terapêuticas, o E2 protege o CNS via astrocitária, apesar de nessas regiões os recetores de estrogénio se encontrem dispersos.

1.2.3. Microglia

No CNS a microglia desenvolve-se de uma forma singular. A microglia deriva de progenitores de macrófagos do saco vitelino e ao longo do desenvolvimento embrionário migram para o cérebro. Posteriormente, antes da arborização da vasculatura cerebral e da BBB estarem completamente formadas, estes progenitores vão se diferenciar em microglia residente e exibir antígenos de superfície de macrófagos. Já as outras células do CNS como os astrócitos, os neurónios e os oligodendrócitos têm origem no epitélio da crista neuronal (Chen e Trapp, 2016; Guttenplan e Liddelow, 2019; Peferoen et al., 2014; Sá-Pereira et al., 2012).

Dentro das células da glia, a microglia representa um total de 10% a 20% e executa funções semelhantes às dos macrófagos tecidulares. Conseguimos morfologicamente distinguir a microglia dos macrófagos devido à sua aparência ramificada muito característica nas condições fisiológicas (Peferoen et al., 2014). No cérebro adulto, a microglia encontra-se limitada pela BBB e converte-se num nicho de células autónomas e com uma vida duradoura, que possuem a capacidade de se autorrenovar e dividir ao longo da sua vida (Chen e Trapp, 2016).

A microglia caracteriza-se por ser a célula imune inata residente do CNS e a resposta primária ao longo de uma extensa rede de defesa que abrange todo o parênquima cerebral (Chen e Trapp, 2016; Guttenplan e Liddelow, 2019; Prinz et al., 2019). Segundo as condições cerebrais podemos classificar a microglia em duas categorias fundamentais. Nas situações fisiológicas, a microglia em repouso apresenta corpos pequenos e numerosos prolongamentos longos e finos, reconhecida como morfologia ramificada. Esta morfologia representa a forma vigilante que estas células possuem para detetar ativamente qualquer distúrbio que exista na homeostase do CNS, ao estenderem e retraírem os prolongamentos enquanto examinam o ambiente em seu redor. Em situações de patologia, ocorre ativação da microglia e esta pode manifestar uma morfologia fagocítica com os prolongamentos curtos, reconhecida como morfologia ameboide (Chen e Trapp, 2016; Peferoen et al., 2014; Sá-Pereira et al., 2012; Savage et al., 2019). Esta microglia ativada partilha algumas funcionalidades com os macrófagos de tecido nomeadamente, em conseguir destruir e fagocitar bactérias, vírus e agentes estranhos; em conseguir apresentar os antígenos aos linfócitos infiltrantes e poder eliminar detritos celulares como parte do processo de cicatrização de feridas e reparação tecidual (Chen e Trapp, 2016). A evolução de uma morfologia para a outra deve-se às alterações na secreção de citocinas e antígenos de superfície, que corresponde a diferentes fenótipos (Sá-Pereira et al., 2012). Através de estudos ultraestruturais revelou-se que os prolongamentos altamente dinâmicos da microglia conseguem interagir com praticamente todas as células do neurópilo, tais como,

os axônios; os corpos celulares neuronais e astrocitários; as espinhas dendríticas; as fendas sinápticas e a lâmina basal dos vasos sanguíneos. Para além de altamente vigilantes, as células ramificadas da microglia são ativamente neuroprotetoras (Prinz et al., 2019; Savage et al., 2019).

Ao nível das principais funções que a microglia exerce destacam-se a vigilância, como falado anteriormente, a fagocitose, a neuroproteção e a toxicidade (Chen et al., 2014; Chen e Trapp, 2016; Sá-Pereira et al., 2012). Primeiro, a microglia consegue proteger o CNS através da remoção sináptica. Ou seja, a microglia ativada insere os seus prolongamentos na fenda sináptica para separar os componentes pré sinápticos dos pós sinápticos. Deste modo, consegue separar as sinapses inibitórias axossomáticas, levando a um aumento da atividade neuronal. Este aumento ativa os recetores NMDA sinápticos, levando ao influxo de Ca^{2+} dos canais iónicos no citosol (Chen et al., 2014; Chen e Trapp, 2016). Uma vez que existe influxo de Ca^{2+} as vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} podem ser ativadas e resultar na transcrição de genes ou na ativação pós tradução de moléculas antiapoptóticas e neuroprotetoras. Também a ativação dos recetores NMDA sinápticos podem causar a expressão de um gene específico de resposta tardia -fator nuclear I subtipo A- e deste modo, promover a sobrevivência neuronal através das vias dependentes de NOS/MEK (Chen et al., 2014; Chen e Trapp, 2016). Em segundo lugar, a microglia pode também, restaurar a homeostase, extinguir a neuroinflamação e secretar citocinas inflamatórias e fatores citoativos para protegerem e repararem os tecidos. Estudos recentes descrevem que culturas celulares de monócitos mieloides são capazes de polarizar em fenótipos pró-inflamatórios ou também designados de classicamente ativados ou M1; ou em fenótipos anti-inflamatórios, estes podem também ser classificados de alternativamente ativos ou M2. As células M1 criam grandes níveis de citocinas pró-inflamatórias e metabolitos oxidativos necessárias à defesa do hospedeiro, contudo não conseguem evitar danos colaterais aos tecidos adjacentes saudáveis. Ao invés, as células M2, têm a capacidade de suprimir as respostas imunológicas destrutivas e promover a cicatrização de feridas. Esta atribuição em fenótipos M1 ou M2, para além de ser utilizada para culturas celulares de monócitos mieloides, foi também alargada para a microglia in vivo (Chen e Trapp, 2016). Atualmente, através de alterações na morfologia da microglia e densidade regional descobriu-se diferenças essencialmente entre os tratos da substância cinzenta e da substância branca. Para além da existência desta heterogeneidade, ao longo da idade a morfologia da microglia consegue modificar-se radicalmente, ou seja, durante o desenvolvimento do CNS a microglia apresenta mais fenótipos fagocíticos e ameboides quando comparado com o CNS maduro. Assim, é espetável que num cérebro envelhecido seja frequente a ocorrência de alterações da microglia (Savage et al., 2019).

1.2.3.1. Efeito do estradiol na microglia

O efeito neuroprotetor do E2 é mediado pelos REs nucleares e extra-nucleares. Nomeadamente a presença do recetor não clássico GPER foi descoberta também na microglia e este foi relatado como responsável pela sinalização não genómica e efeitos transcricionais do E2 (Guan et al., 2017; Zhao, Ding, et al., 2016).

Hormonas como o caso do E2 e agonistas como o G-1 podem interagir com os seus respetivos recetores presentes na microglia e mediar algumas doenças. A microglia ativada está relacionada com algumas patologias neurodegenerativas e neuroimunológicas, como o caso da doença de Parkinson; da doença de Alzheimer; da esclerose múltipla; da encefalopatia do HIV e do AVC. Quando ocorre a ativação da microglia, esta produz o fator de necrose tumoral (TNF- α : do inglês tumor necrosis factor) e óxido nítrico, que podem ser tóxicos para as células (Drew e Chavis, 2000).

Vários estudos indicaram que o E2 e o G-1, mediados pelo GPER, podem desencadear efeitos anti-inflamatórios (Drew e Chavis, 2000; Guan et al., 2017; Zhao, Ding, et al., 2016). Demonstraram que o GPER se encontra altamente expresso na microglia ativada e que o E2 e o G-1 conseguiram reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (Guan et al., 2017; Zhao, Ding, et al., 2016). Ao longo dos tempos têm vindo a aumentar a relevância pelo processo inflamatório após-isquemia, incluindo perceber como ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células da microglia e o recrutamento de células inflamatórias da corrente sanguínea. Uma vez que este processo inflamatório da microglia ativada e secreta citocinas pró-inflamatórias que agravam a recuperação neuronal após isquemia. Por outro lado, a microglia também pode ser benéfica e neuroprotetora ao secretar substâncias neurotróficas e anti-inflamatórias para ajudar na sobrevivência neuronal (Guan et al., 2017; Zhao, Ding, et al., 2016).

Em suma, o E2 consegue exibir efeitos anti e pró-inflamatórios através de mecanismos dependentes e independentes de REs. A recente descoberta que o GPER é altamente expresso na microglia ativada e que os seus mediadores E2 e o agonista G-1 conseguem reduzir a ativação da microglia e a produção de citocinas pró-inflamatórias está a levar a mais investigações nesse âmbito. Ao examinarem a forma como o GPER modula estes mecanismos novos alvos neuroterapêuticos podem ser estabelecidos.

1.2.4. Oligodendrócitos

No CNS podemos encontrar distribuídos dispersamente, tanto na substância branca como na substância cinzenta, um outro tipo de célula, os oligodendrócitos, que representam

aproximadamente 5% a 8% do total de células existentes no CNS. Este tipo de células caracterizam-se por serem células de pequena dimensão, unipolares ou bipolares e cujas quais podem ser identificadas pela expressão do proteoglicano NG2, do recetor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas e dos marcadores de linhagem oligodendroglial gerais (Amaral et al., 2016; Sá-Pereira et al., 2012).

Os oligodendrócitos são os constituintes das células gliais que tem como objetivo fulcral a formação de bainhas de mielina que envolvem e isolam os axónios, importante para a condução dos estímulos neuronais e para o aumento da velocidade da condução do potencial de ação (Dimou e Simons, 2017; Khakh e Deneen, 2019; Kipp, 2020; Sá-Pereira et al., 2012; Tognatta e Miller, 2016).

Os vertebrados no seu CNS possuem as OPCs que se encontram em locais discretos do tubo neuronal inicial e que vão dar origem aos oligodendrócitos. Os OPCs ao longo do desenvolvimento embrionário surgem das regiões ventral e dorsal e durante o período pós-natal migram para as substâncias brancas e cinzentas do CNS em desenvolvimento. Posteriormente, uma parte das OPCs conseguem associar-se a um axónio e diferenciar-se em oligodendrócitos mielinizantes, enquanto outras permanecem no parênquima como células imaturas/progenitores adultos (Amaral et al., 2016; Dimou e Simons, 2017; Hayashi e Suzuki, 2019; Tognatta e Miller, 2016). Em suma, estas células demonstram semelhanças com as células estaminais, uma vez que conseguem originar células filhas, como oligodendrócitos e astrócitos, capacidade de auto-renovação e de multipotência (Amaral et al., 2016; Tognatta e Miller, 2016).

As células oligodendrocitárias são descritas como sendo uma população homogénea e que podem possuir três diferentes localizações. Em primeiro lugar, os oligodendrócitos interfasciculares situados entre as vias axonais e que são os principais a atuar ao nível da mielinização das fibras axonais na substância branca. Temos os oligodendrócitos perineuronais encontrados ao lado dos corpos celulares neuronais e que atuam como células de reserva para a remielinização e na regulação da excitabilidade neuronal. Por fim, existem os oligodendrócitos perivasculares que conectam os vasos sanguíneos e suportam metabolicamente os axónios (Hayashi e Suzuki, 2019; Kipp, 2020). Para mais, classificou-se os oligodendrócitos em quatro categorias distintas, do tipo I ao IV, dependendo do tamanho, da morfologia e do número de axónios que conseguem mielinizar. Os oligodendrócitos dos tipos I e II após receberem um sinal específico conseguem mielinizar axónios de pequenas dimensões. Já os oligodendrócitos dos tipos III e IV mielinizam poucos ou nenhuns axónios de grandes dimensões (Butt et al., 1995; Hayashi e Suzuki, 2019).

1.2.4.1. Efeitos do estradiol nos oligodendrócitos

A hormona E2 possui efeitos genómicos ao nível da neuroproteção e da promielinização dos oligodendrócitos. Sendo que estes efeitos protetores foram relatados para muitas doenças neurológicas nomeadamente na doença de Parkinson; na doença de Alzheimer; na esclerose múltipla e na lesão isquémica da substância branca cerebral (Hirahara et al., 2013).

Atualmente já existem estudos nos quais demonstram que esta hormona também pode atuar por mecanismos não genómicos, como a existência de evidências da presença de REs associados à membrana de oligodendrócitos e às membranas de mielina (Arvanitis et al., 2004; Hirahara et al., 2009; Hirahara et al., 2013). Estudos já demonstraram que o mER é codificado pelo mesmo gene que os recetores nucleares ER α e ER β e transportado posteriormente para a membrana plasmática. (Hirahara et al., 2009; Hirahara et al., 2013).

Arvanitis et al. revelou a localização de ERs e da caveolina nos oligodendrócitos do cérebro e da medula espinhal, verificando que o ER é responsável por eventos de sinalização não genómicos iniciados na membrana plasmática dos oligodendrócitos. Ainda, verificaram que o E2 em oligodendrócitos cultivados conseguiu estimular a extensão dos prolongamentos, o crescimento celular e a expressão da proteína básica antimielina. Deste modo, concluíram que o E2 podia atuar diretamente na mielina e possibilitar a sua função ou a sua preservação (Arvanitis et al., 2004).

Uma outra investigação corrobora com a presença de REs nas membranas de oligodendrócitos da medula espinhal, o qual pode ser ativado pelo E2. Desta ligação pode surgir a ativação da MAPK e Akt. O mER de uma reserva citoplasmática pode movimentar-se para a face interna da membrana plasmática através de proteínas como a caveolina ou recetores de fator de crescimento. Sendo que é através da sinalização do E2 com base na caveolina que resulta a ativação das vias MAPK e Akt. Deste modo, Hirahara e os seus trabalhadores revelaram uma nova função não genómica dos mERs. Onde a sinalização rápida através do mER pode ser relevante para o desenvolvimento e sobrevivência dos oligodendrócitos, uma vez que a ativação da MAPK e Akt por fosforilação inibe a apoptose em oligodendrócitos imaturos e maduros (Hirahara et al., 2009).

Um estudo posterior demonstrou que os mERs presentes em oligodendrócitos da medula espinhal foram localizados em domínios enriquecidos com glicosfingolípido/colesterol juntamente com moléculas sinalizadoras. Verificaram também que a ligação do E2 a estes mERs induziu uma rápida transdução de sinal através das vias MAPK, Akt e glicogénio sintase cinase 3 beta (GSK-3 β : do inglês *glycogen synthase kinase-3 beta*). Com estes

resultados Hirahara *et al.* concluíram que a ligação do E2 a domínios enriquecidos com glicosfingolípido/colesterol é responsável pela rápida regulação e reorganização do citoesqueleto, levando a um aumento da remielinização dos oligodendrócitos (Hirahara *et al.*, 2013).

Em suma, nos oligodendrócitos o E2 também desempenha funções não genómicas, apresentando efeitos diretos nos ERs das membranas dos oligodendrócitos ou na mielina. Contudo a presença do recetor GPR30 nunca foi demonstrada nestas células. Acredita-se que em baixas concentrações o E2 seja neuroprotetor ao proteger estas células contra lesões induzidas e a evitar diminuições de MAPK e Akt após tratamento *in vitro* e *in vivo*. No entanto são necessárias mais investigações para entender melhor o potencial do E2 nas funcionalidades dos oligodendrócitos.

1.2.5. Células Musculares Lisas

Os vasos sanguíneos cerebrais são constituídos por três camadas distintas. Temos a túnica íntima, que se caracteriza pela camada mais interna e é apenas composta por uma única camada de células endoteliais. Ao nível mais externo, encontramos a túnica adventícia, as fibras de colagénio e os fibroblastos. Por fim, existe a túnica média que é constituída principalmente pelas SMC (Mariana *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2012).

Ao longo da NVU, todas as artérias e arteríolas são constituídas por SMC (Quelhas *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2012). No entanto, quando as arteríolas mudam para os capilares cerebrais, as SMC desaparecem e temos por sua vez os pericitos. Ou seja, as células reguladoras fulcrais nas artérias são as SMC, ao invés que nos capilares existe uma maior participação dos pericitos. Células como os pericitos semelhantes a SMC e as SMC são de extrema importância ao nível da vasculogénese e angiogénese para a formação e maturação de redes vasculares funcionais (Badaut e Bix, 2014; Quelhas *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015).

As SMC são células multifuncionais e essenciais. Estas encontram-se estruturadas em volta da lâmina basal em camadas concêntricas e manifestam consideravelmente mais plasticidade de que qualquer outro tipo celular, de modo a conseguirem exercer diversas competências especializadas. Dentro deste parâmetro destacam-se a migração; a biossíntese; a proliferação; a contração e a libertação de proteínas para a síntese da matriz extracelular (Shi *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). A função predominante das SMC é a contração e para tal recorrem ao Ca^{2+} para atuar como principal mediador. A contração muscular ocorre no citosol, local onde o complexo Ca^{2+} -calmodulina é gerado através da ligação entre o Ca^{2+} e a calmodulina. Este complexo, na presença de ATP vai ativar uma enzima fosforiladora de cadeias leves de miosina. Da

posterior fosforilação criam-se pontes cruzadas entre os filamentos de actina e a cabeça de miosina, promovendo a força necessária para a ocorrer a contração muscular (Quelhas et al., 2019; Wang et al., 2015).

A estrutura da parede dos vasos sanguíneos é suportada principalmente pelas SMC. Estas células, também regulam o tónus vascular e o diâmetro dos vasos sanguíneos. Deste modo conseguem manter a pressão intravascular e a perfusão tecidual (Badaut e Bix, 2014; Mariana et al., 2021; Quelhas et al., 2019; Shi et al., 2020; Wang et al., 2015; Xiao et al., 2017). Durante o desenvolvimento do sistema vascular, estas células, libertam moléculas da matriz extracelular e colagénio imprescindíveis para as características mecânicas dos vasos sanguíneos maduros (Badaut e Bix, 2014; Quelhas et al., 2019). Nestes vasos sanguíneos adultos, as SMC têm uma taxa de proliferação lenta, uma atividade sintética baixa e revelam uma vasta quantidade de proteínas contráteis (actina, calponina e miosina), canais iónicos e moléculas de sinalização indispensáveis à função contrátil das células (Badaut e Bix, 2014; Quelhas et al., 2019; Shi et al., 2020; Wang et al., 2015).

As SMC surgem de inúmeras linhagens mesodérmicas, tal como da mesoderme esplânica, da mesoderme paraxial ou somática, da mesoderme da placa lateral e da crista neural (Wang et al., 2015). Podemos destacar duas diferentes classes de SMC, a contrátil ou diferenciada que é um fenótipo expresso pelas SMC completamente diferenciadas ou maduras; e a sintética ou proliferativa, um fenótipo que ocorre quando existe modificação do meio vascular, onde as células diferenciam-se de um fenótipo contrátil para um fenótipo extremamente sintético. Este último fenótipo é definido por uma elevada taxa de migração, de proliferação, de elaboração de substâncias da matriz extracelular e por uma diminuição dos marcadores específicos das SMC contráteis (Mariana et al., 2021; Quelhas et al., 2019, 2020; Shi et al., 2020; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2012). O fenótipo das SMC está dependente da influência de diversas condições do ambiente perivascular. Quando, por exemplo, existe uma lesão cerebrovascular ocorre perda do tónus miogénico e da autorregulação, podendo levar a alterações metabólicas. Assim, devido ao comprometimento da resposta do sistema vascular, as SMC contráteis, ao serem células altamente dinâmicas vão diferenciar-se num fenótipo sintético para, numa primeira fase, aumentarem o CBF e para que posteriormente seja garantida a homeostasia neuronal do local afetado (Reho et al., 2014; Shi et al., 2020; Xiao et al., 2017; Zhang et al., 2012).

1.2.5.1. Mecanismos envolvidos no processo contrátil

A autorregulação cerebral estática (sCA: do inglês *static cerebral autoregulation*) é um termo que relaciona o estado estacionário relativo entre o CBF e a pressão arterial. Esta é caracterizada por uma inclinação positiva de 0,8% de aumento do CBF/mmHg entre o

intervalo autorregulatório de 60 a 150 mmHg de potencial de ação. Ao invés a autorregulação cerebral dinâmica (dCA: do inglês *dynamic cerebral autoregulation*) corresponde à resposta transitória do CBF às flutuações agudas da pressão arterial, devido às propriedades miogénicas das artérias cerebrais (Longden et al., 2016; Purkayastha e Raven, 2011; Quelhas et al., 2019). Isto é, o CBF é mantido constante apesar de ocorrer variações fisiológicas na pressão de perfusão cerebral entre as faixas de 60 a 150 mmHg devido a propriedades miogénicas intrínsecas na autorregulação do cérebro (Longden et al., 2016; Purkayastha e Raven, 2011). As artérias cerebrais têm a capacidade de contrair ou dilatar em resposta a diversos estímulos, nomeadamente a alterações na pressão arterial sistémica, na pressão de CO₂ e de O₂, no pH extracelular, na atividade metabólica cerebral, bem como outras diversas condições (Quelhas et al., 2019; Yu et al., 2014).

De referir então que a contração das SMC pode ser iniciada através de estímulos elétricos, químicos e mecânicos. Posteriormente, consoante o estímulo recebido vão ser despoletadas diferentes vias de transdução de sinal que podem ativar o mecanismo contrátil destas células (Yang et al., 2003). No entanto, apesar dos mecanismos serem diferentes, todas as vias levam primeiramente a um aumento da [Ca²⁺]_i (Yang et al., 2003). Este aumento de Ca²⁺ pode surgir de duas maneiras distintas: através de canais de Ca²⁺ operados por voltagem (VDCC: do inglês *voltage dependente calcium channel*) presentes na membrana plasmática e/ou através da libertação de Ca²⁺ dos reservatórios intracelulares, como por exemplo do retículo sarcoplasmático (Figura 3) (Quelhas et al., 2019; Yang et al., 2003).

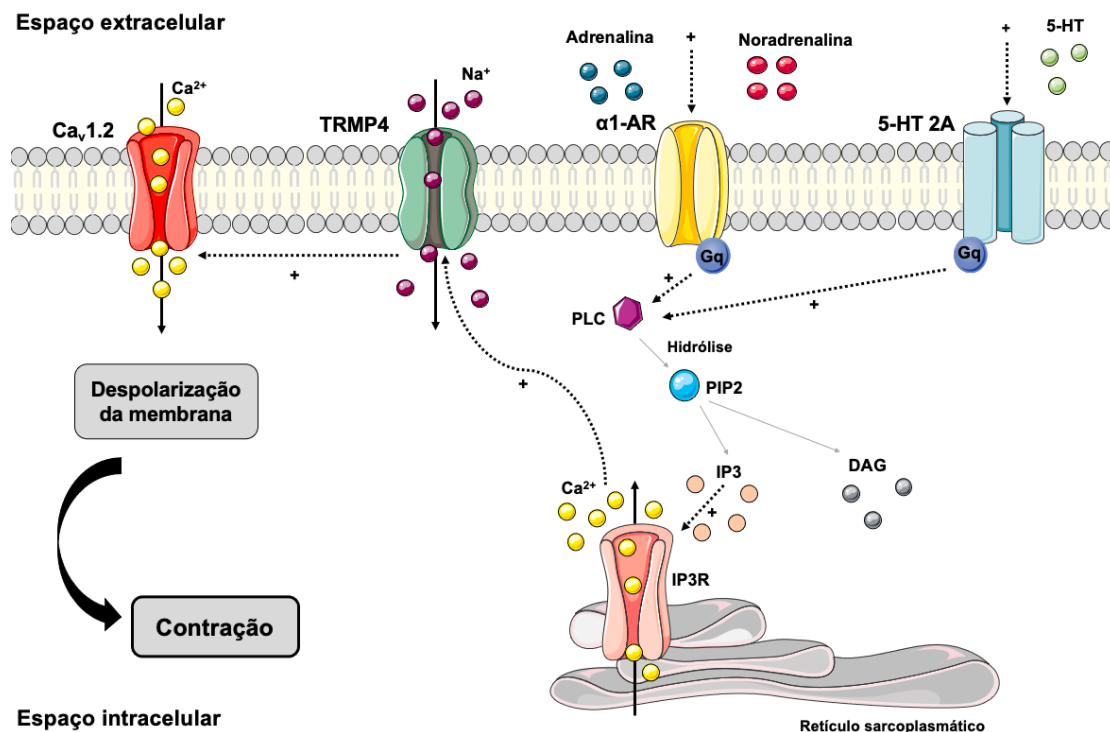


Figura 3. Representação dos mecanismos envolvidos no processo contrátil. Os receptores adrenérgicos e de serotonina estão ambos associados à proteína G, que por sua vez leva à ativação da PLC e consequentemente origina a formação de IP₃ e DAG. As moléculas de IP₃ formadas ativarão os receptores do retículo

sarcoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} e conseqüentemente a ativação dos canais de Ca^{2+} , levando deste modo à contração. O Ca^{2+} vai ativar os IP₃R no retículo sarcoplasmático juntamente com as moléculas IP₃. Desta ativação é promovida a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através dos IP₃R. Esta ação ativa os recetores TRPM4, cujos quais, vão promover a despolarização da membrana e ativar os $\text{Ca}_v1.2$. Também, a ativação dos $\text{Ca}_v1.2$ leva ao processo contrátil. As linhas a tracejado representam a ativação. *Abreviaturas:* cálcio (Ca^{2+}); canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo-L ($\text{Ca}_v1.2$); sódio (Na^+); Recetores de potencial transitório melastatina 4 (TRMP4); 5-hidroxitriptamina (5-HT); Fosfolipase C (PLC); Diacilglicerol (DAG); 1,4,5 trifosfato de Inositol (IP₃); recetores do inositol trifosfato (IP₃R); Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). Adaptado de (Quelhas et al., 2019).

A. Despolarização da Membrana Celular

As SMC possuem canais iônicos que demonstram uma notável importância ao nível da regulação do CBF, uma vez que a variação da concentração iônica ao longo da atividade neuronal consegue modular o potencial de membrana (V_m : do inglês *membrane potential*), cujo qual vai exercer um forte efeito no diâmetro das artérias cerebrais (Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019). Em arteríolas, o aumento gradual da pressão intravascular causa uma despolarização gradual do V_m , levando deste modo, a um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e por consequência ocorre vasoconstrição (Longden et al., 2016). Pelo contrário, a hiperpolarização leva a que ocorra vasorelaxamento. O fenómeno de despolarização/vasoconstrição devido ao aumento da pressão é apelidado de “resposta miogénica” e é uma característica da resistência intrínseca das arteríolas. Este revela-se particularmente importante ao nível da autorregulação cerebral, uma vez que os vasos sanguíneos contraem ou relaxam de forma a garantir um nível constante de perfusão cerebral, apesar de existirem variações na pressão sanguínea periférica (Brayden et al., 2013; Longden et al., 2016; Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019). Assim sendo, a regulação miogénica é crucial para definir o tónus basal a partir do qual as arteríolas podem contrair ou relaxar em resposta a fatores secretados durante a atividade neuronal (Longden et al., 2016; Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019).

Desde algum tempo que se conhece uma relação muito estreita entre o V_m das SMC e o tónus ativo nos vasos sanguíneos, de modo a que pequenas alterações no V_m traduzem-se em mudanças substanciais na força contrátil destas células (Liu et al., 2002). Em artérias cerebrais, as SMC sob gradientes iônicos fisiológicos normais, o potencial de equilíbrio de K^+ é de aproximadamente -80 mV, no entanto, o V_m em repouso é de cerca de -45 mV (Earley, 2013; Gonzales e Earley, 2013). Portanto, a atividade do canal do K^+ não consegue determinar completamente a excitabilidade da membrana. Canais permeáveis a catiões (influxo de Ca^{2+} e Na^+) e a aniões (efluxo de Cl^-), que medeiam a despolarização da membrana, podem ser encontrados nas SMC. No entanto os mecanismos pelos quais pode ocorrer ainda não estão completamente esclarecidos (Gonzales e Earley, 2013).

◆ Canais Recetores de Potencial Transitório

Os canais recetores de potencial transitório (TRP: do inglês *transient receptor potential*) são uma família ampla e diversificada de canais permeáveis a catiões não seletivos, não operados por voltagem e por norma permeáveis maioritariamente ao Ca^{2+} . Além disso estes canais têm a capacidade de detetarem e responderem a diversos estímulos químicos e físicos (Brayden et al., 2008; Grayson et al., 2017; Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019).

Os membros da família TRP são compostos de subunidades de proteínas TRP que têm em comum a mesma topologia básica, cuja qual é constituída por seis domínios transmembranares, que levam à formação de canais homoméricos, heteroméricos ou tetraméricos, distribuídos pela membrana plasmática e por inúmeros organelos da maior parte dos tipos de células e tecidos (Grayson et al., 2017; Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019). Em mamíferos, os canais TRP podem ser classificados em seis subfamílias segundo a homologia de sequência nomeadamente, em TRPA (anquirina), em TRPC (clássico ou canónico), em TRPM (melastatina), em TRPML (mucoliptina), em TRPP (policistina) e em TRPV (vaniloide) (Brayden et al., 2008; Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019). De realçar, um membro do TRPM, o TRPM4 demonstrou ser crucial para a regulação do potencial e da contratilidade da membrana das SMC nas artérias cerebrais (Earley, 2013; Quelhas et al., 2019). Através do recurso a ferramentas farmacológicas e moleculares verificaram que nas SMC de artérias cerebrais, o TRPM4 ao nível da regulação do V_m em repouso denota funções cruciais como a envolvimento na vasoconstrição induzida pelo aumento da pressão e a autorregulação do fluxo sanguíneo das artérias (Earley, 2013; Quelhas et al., 2019). Como expectável, nas artérias cerebrais quando ocorre inibição da expressão dos TRPM4 existe uma redução significativa na despolarização da membrana das SMC, bem como na vasoconstrição, o que desencadeia um aumento da pressão intravascular (Earley e Brayden, 2015).

Dentro da família dos TRP, o único recetor com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} é o TRPM4 (Brayden et al., 2008). Contudo, este revela elevada permeabilidade a catiões monovalentes, como o sódio (Na^+) e o K^+ , o que leva à regulação da despolarização da membrana e consequentes funções celulares (Earley e Brayden, 2015). Assim, nos TRPM4 a sensibilidade para o Ca^{2+} pode ser modelada por inúmeras vias intracelulares. Uma vez que já se verificou que este canal possui locais de ligação como o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2: do inglês *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), a calmodulina, a proteína quinase C (PKC: do inglês *protein kinase C*) e o ATP, para os diferentes intervenientes para a sua regulação (Gonzales e Earley, 2013).

Os mecanismos pelos quais os TRP podem ser regulados não estão completamente elucidados. Contudo, sabe-se que a ativação dos TRPM4 ocorre após um aumento da $[Ca^{2+}]_i$ através da libertação de Ca^{2+} que se encontra no retículo sarcoplasmático (Earley, 2013; Quelhas et al., 2019). Isto é, a libertação inicia-se através da atividade da fosfolipase C (PLC: do inglês *phospholipase C*), na qual origina diacilglicerol (DAG: do inglês *diacylglycerol*) e 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3: do inglês *inositol-1,4,5- triphosphate*). O IP3 vai ativar os seus recetores no retículo sarcoplasmático, levando à libertação do Ca^{2+} para o espaço intracelular, enquanto que o DAG estimula a atividade da PKC. Portanto, o resultado destas duas vias é a ativação do TRPM4 e a promoção da translocação de canais de TRPM4 para a membrana plasmática (Earley, 2013; Gonzales e Earley, 2013; Quelhas et al., 2019).

Por fim, existe evidências de um outro canal, o TRPC6, que parece ser parte integrante de um complexo que regula a vasoconstrição nas SMC das artérias cerebrais, ao influenciar a atividade do TRPM4 (Earley e Brayden, 2015; Quelhas et al., 2019). Em momentos de stresse o TRPC6 é ativado pelo DAG, sendo este permeável ao Ca^{2+} leva ao aumento da atividade dos recetores do IP3, que conseqüentemente vai ativar os TRPM4 existentes nas proximidades. Assim, os TRPM4 vão mediar a despolarização das SMC ao promoverem o influxo de Ca^{2+} através dos VDCC, o que leva à subseqüente vasoconstrição (Brayden et al., 2008; Earley e Brayden, 2015; Quelhas et al., 2019).

◆ **Canais de Cálcio Operados por Voltagem**

Os canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo-L (Ca_v 1.2) são expressos em diversificados tipos de células, incluindo SMC, neurónios e miócitos cardíacos. Nas SMC, os Ca_v 1.2 demonstram ser a principal via de entrada de Ca^{2+} e os responsáveis pela regulação de inúmeras funções celulares, como a contratilidade e a expressão génica (Bannister et al., 2009; Harraz et al., 2014). Estes canais caracterizam-se por serem complexos heteromultiméricos que compreendem uma subunidade α_1 , importante para a formação de poros e subunidades com a capacidade de auxiliar a passagem de proteínas para a membrana plasmática (Bannister et al., 2009; Harraz et al., 2014).

Os Ca_v 1.2 manifestam um papel crucial ao nível da resposta miogénica. Pois quando estão num estado ativo, conseguem aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ e provocar vasoconstrição de maneira a manter a perfusão sanguínea cerebral constante (Narayanan et al., 2013). Deste modo, os Ca_v 1.2 são considerados os principais sensores de voltagem nas SMC, uma vez que são capazes de transcrever as alterações no V_m em alterações na $[Ca^{2+}]_i$, e assim, ajustar o estado contrátil da célula (Longden et al., 2016). A importância destes recetores como reguladores também pode ser evidenciada uma vez que, na presença de inibidores dos

VDCC, alterações no V_m induzidas por diferenças de pressão ou por outros agentes não demonstram efeitos no tónus vascular (Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019).

Devido à ativação dos Ca_v 1.2 pode ocorrer contração das SMC. Isto é, devido à ativação destes canais, vai entrar Ca^{2+} para o citosol, que conseqüentemente se liga à calmodulina, ativando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Este complexo têm a capacidade de estimular a cadeia leve da miosina, o que leva à contração celular (Ureña et al., 2013).

Por fim, estudos em artérias cerebrais de ratos e murganhos, já abordam a existência de outros canais para além do Ca_v 1.2, nomeadamente os canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo-T (Ca_v 3.2) que podem ser ativados a baixas voltagens ou a voltagens transitórias. Também, têm sido constatado que tal como o Ca_v 1.2, a condutância do tipo-T, desempenha um papel direto no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Harras et al., 2014; Quelhas et al., 2019). Para além disso, a atividade destes canais parece diferir com as diferenças de pressão. Para baixas pressões, os canais do tipo-T são os preferencialmente ativados, sendo que à medida que a pressão vai aumentando, vai aumentando também a atividade dos canais do tipo-L (Abd El-Rahman et al., 2013; Kuo et al., 2011; Quelhas et al., 2019).

B. Mensageiros Químicos

Ao nível da redução do tónus vascular, os recetores acoplados a proteínas G desempenham papéis cruciais. Uma vez que estes conseguem sofrer mudanças conformacionais que facilitam a interação de algumas proteínas sinalizadoras, como as proteínas G (proteínas de nucleotídeos de guanina heterotriméricas), com as diversas vias de sinalização intracelulares (Longo e Goyal, 2013). As aminas biogénicas, nomeadamente as catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e a serotonina [ou 5-hidroxitriptamina (5-HT)] têm a capacidade de ativar estes recetores e entrarem no núcleo transmembranar (Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019).

De forma similar à vasculatura sistémica, os vasos sanguíneos cerebrais são densamente inervados por fibras nervosas simpáticas. Estas encontram-se conectadas a recetores α -1 adrenérgicos que estão localizados nas arteríolas do cérebro (Purkayastha e Raven, 2011). Apesar de os recetores α -1 adrenérgicos serem os mais numerosos a nível cerebral, o seu envolvimento no CNS ainda não está completamente elucidado (Purkayastha e Raven, 2011).

Os recetores adrenérgicos pertencem à vasta família de recetores acoplados à proteína G de proteínas de membrana e podem ser subdivididos com base na sua heterogeneidade em recetores adrenérgicos α -1A, α -1B e α -1D (Piascik e Perez, 2001; Purkayastha e Raven, 2011; Quelhas et al., 2019). Dentro destes três subtipos, o recetor α -1 adrenérgico é o mais encontrado a nível cerebral, sendo caracterizado como sendo um recetor pós sináptico e

por desempenhar funções fundamentais na libertação de neurotransmissores como o glutamato e a acetilcolina (Piascik e Perez, 2001; Purkayastha e Raven, 2011; Quelhas et al., 2019). Em geral, os recetores adrenérgicos conseguem atuar através de mecanismos dependentes e independentes de Ca^{2+} . Para além da sua função trófica, estes recetores conseguem desempenhar outras funções de particular importância em condições de hipoxia, hipertensão e entre outras situações de stress (Longo e Goyal, 2013). Nas SMC sabe-se que os recetores α -1 adrenérgicos têm a capacidade de se ligarem à norepinefrina ou a outras aminas biogénicas. Através do acoplamento deste recetor com as proteínas do tipo Gq vai ser estimulada a atividade da fosfolipase C, que consequentemente leva à promoção da hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato, que origina IP₃ e DAG. Ao serem produzidas estas duas moléculas vão atuar como segundos mensageiros para mediar a libertação do Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares e ativarem a PKC que desencadeia cascatas de sinalização necessárias ao processo contrátil, para deste modo ocorrer a vasoconstrição (Longden et al., 2016; Longo e Goyal, 2013; Purkayastha e Raven, 2011).

Outros recetores revelam importância nas SMC cerebrais, nomeadamente os recetores do IP₃ (IP₃R: do inglês *inositol triphosphate receptor*). Estes recetores são constituídos por quatro subunidades com um peso molecular de aproximadamente 310 KDa cada. Existem três isoformas diferentes (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3) codificadas por três genes distintos, mas nas SMC já se sabe que a isoforma 1 é a predominante (Dabertrand et al., 2013). Ao invés, nas células astrocíticas a principal isoforma é a 2 e acredita-se que seja a responsável pela libertação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares. No entanto, apesar de existirem estudos sobre o papel do IP₃R nos astrócitos e o seu envolvimento na sinalização de Ca^{2+} no controlo do CBF, mais pesquisas têm que surgir para se perceber a relação destes recetores com as SMC (Longden et al., 2016).

Todos os subtipos de IP₃R podem ser ativados pelo IP₃ resultante da ativação da PLC em resposta à ativação do recetor acoplado à proteína Gq. Assim sendo, estes recetores encontram-se envolvidos nas respostas a diversificadas moléculas vasoativas endógenas, como é exemplo a acetilcolina, a endotelina 1, a noradrenalina e a 5-HT (Dabertrand et al., 2013). Um interessante envolvimento da libertação de Ca^{2+} mediada pelo IP₃R é a possível ativação de canais TRPM4 e canais de k^+ de larga condutância em artérias piiais (Dabertrand et al., 2013).

Por fim, conhece-se uma outra via relevante para o controlo do tónus vascular nas artérias cerebrais, a via que é ativada pela ligação da serotonina (Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019). A serotonina é uma monoamina neurotransmissora que executa inúmeras funções na vasculatura cerebral, incluindo o seu envolvimento na hemóstase, na agregação plaquetária e no vasospasmo cerebral após uma hemorragia intracraniana. Os recetores da serotonina podem pertencer a diversas famílias e subtipos, nos quais os tipos 5-HT₁ e 5-

HT2 parecem estar associados às SMC, onde atuam através de proteínas G para mediar respostas vasoconstritoras (Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019).

C. Contração Independente de Cálcio

Como referido anteriormente, o principal mecanismo de contração das SMC cerebrais é através da via de fosforilação mediada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina da cadeia leve da miosina. Para além deste mecanismo existem outras alternativas para que ocorra contração celular e que não sejam diretamente influenciadas pelo Ca^{2+} . Sabe-se que já existem evidências que sugerem que a ativação da cascata MAPK demonstra atividades cruciais na modulação do processo de contração/relaxamento (Longo e Goyal, 2013).

Normalmente, as células respondem ao seu ambiente extracelular por intermédio de diversos mediadores, dentro dos quais podemos incluir os fatores de crescimento, algumas hormonas e os recetores de citocinas (Irving e Bamford, 2002; Quelhas et al., 2019). As cascatas de sinalização mediadas por proteínas quinases revelam ser cruciais na comunicação do espaço extracelular com o ambiente intracelular. Existem três vias de sinalização de quinases bem caracterizadas, nomeadamente a via da quinase regulada por sinais extracelulares ERK1/2 e as vias das quinases ativadas pelo stresse p38/SAPK2 e JNK/SAPK. Cada uma destas vias envolvem a MAPK que têm a capacidade de interagir com estruturas celulares, transportá-las para o núcleo e desta forma, modular os fatores de transcrição que estão na origem das diversas respostas biológicas (Irving e Bamford, 2002; Quelhas et al., 2019).

Na base da ativação das vias de sinalização ERK1/2 nas artérias cerebrais, está a dupla fosforilação de um resíduo de tirosina e de um resíduo de treonina, que desempenha uma notável importância ao nível da regulação do tónus vascular. Além disso, têm-se verificado, que em vasos sanguíneos adultos, a via ERK1/2 através da regulação da atividade da PKC consegue diminuir a sensibilidade para o Ca^{2+} (Longo e Goyal, 2013). Por fim, também já se avaliou o efeito da via MAPK na isquemia cerebral. Onde sugerem que esta via está mais ativa em situações de stresse, como é o caso da isquémia, pois nestas circunstâncias são secretados exacerbadamente diversos fatores, incluindo as citocinas, o glutamato e os radicais livres que vão estimular a sua ativação (Irving e Bamford, 2002; Quelhas et al., 2019).

1.2.5.2. Mecanismos envolvidos no processo de relaxamento

A manutenção rigorosa da extensão da resposta miogénica, através do controlo do influxo de Ca^{2+} , é extremamente necessária para que seja possível ocorrerem mudanças no

diâmetro arterial e para poder ser iniciado um novo estímulo. Para tal, acredita-se que existe um mecanismo de *feedback* negativo que envolve a ativação dos canais de K^+ das SMC, necessário para haver hiperpolarização da membrana plasmática. Contudo, serão necessários mais estudos para esclarecer quais os canais e os mecanismos de regulação envolvidos neste tipo de resposta (Chen et al., 2006; Quelhas et al., 2019).

A. Canais de Potássio

Nas SMC arteriais, o V_m é uma condição essencial para o tônus vascular e é regulado através dos canais de K^+ (Dunn e Nelson, 2010). Isto é, os canais de K^+ ajudam a determinar o potencial de repouso da membrana e na regulação do volume celular (Haddy et al., 2006). Como as células conseguem manter uma concentração intracelular de K^+ muito superior à concentração presente no meio extracelular, quando existe a abertura desses canais nas SMC, vai permitir o efluxo do K^+ , que conseqüentemente resultará numa hiperpolarização da membrana e posterior inativação dos VDCC (Dunn e Nelson, 2010; Haddy et al., 2006). Os VDCC são canais extremamente sensíveis ao V_m , de modo a que ligeiras variações neste pode alterar drasticamente a entrada de Ca^{2+} , o que implica a diminuição significativa do diâmetro arterial (Dunn e Nelson, 2010).

Os canais de K^+ demonstram possuir funções essenciais nos eventos de sinalização celular, como a regulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo. Com base na sua estrutura e de acordo com o *Nomenclature Compendium-International Union of Pharmacology subcommittee on potassium channels*, os canais de K^+ são classificados em quatro subgrupos: os canais de K^+ retificadores de influxo (K_{ir} : do inglês *inward rectifier K^+*); os canais de K^+ operados por voltagem (K_v); os canais de K^+ ativados pelo Ca^{2+} (K_{ca}) e os canais de K^+ de domínio 2 poros em tandem (K_{2p}) (Figura 4) (Dogan et al., 2019; Haddy et al., 2006; Quelhas et al., 2019; Rubaiy, 2016).

◆ **Canais de Potássio retificadores de influxo**

Os K_{ir} são canais regulados pelos fosfolípidos da membrana, pelo PIP₂, bem como por outros fatores reguladores ou ligantes, como o ATP e proteínas G. Todas as proteínas que foram identificadas dos K_{ir} têm um tamanho que compreende os 360 a 500 aminoácidos (Quelhas et al., 2019; Rubaiy, 2016). A família ao qual pertencem os K_{ir} é composta por sete subfamílias distintas (K_{ir1-7}) e compreende um total de quinze isoformas de subunidades. Estes canais funcionais caracterizam-se por serem tetrâmeros formados a partir de conjuntos homo ou heteroméricos de subunidades individuais. Deste modo, com base nas suas características funcionais os canais K_{ir} podem ser separados em quatro

grupos distintos, nomeadamente em clássicos; acoplados a proteínas G; sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e em transportadores de K^+ (Longden e Nelson, 2015). Por fim, os K_{ir} podem ser considerados sensores metabólicos, uma vez que estes possuem a capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo e produzir vasodilatação quando acumulam K^+ no fluido extracelular, nos casos de atividade neuronal ou de exercício físico, por exemplo (Haddy et al., 2006).

Em relação aos K_{ATP} já foi demonstrado que são um octómero constituído por quatro recetores de sulfonilureia (SUR2B) e por quatro subunidades retificadoras internas ($K_{ir6.1}$) (Dunn e Nelson, 2010; Longden et al., 2016; Longden e Nelson, 2015; Rodrigo e Standen, 2005). De salientar que estes canais possuem uma fraca capacidade para retificarem o influxo, no entanto podem desempenhar um papel importante na dilatação das artérias cerebrais em situações de isquémia e de acidose metabólica (Longden et al., 2016). Ao invés, nas situações fisiológicas, os K_{ATP} são fortemente ativados por vasodilatadores que ativam a cAMP e inibidos por vasoconstritores que ativam PKC (Dunn e Nelson, 2010). Devido à elevada sensibilidade dos K_{ATP} ao estado metabólico do organismo implica que estes estejam relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo em função das necessidades metabólicas dos tecidos (Rodrigo e Standen, 2005). Ao nível do CNS e periférico verificou-se que os K_{ATP} conseguem modular inúmeros processos fisiológicos, incluindo a proteção neuronal, a libertação de neurotransmissores e de hormonas e a perceção de excitação e de dor (Rodrigo e Standen, 2005). A ativação destes canais leva a uma diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ e consequentemente, gera um relaxamento vascular (Yamada, 2016). Também já se verificou que em órgãos intatos, quando ocorre hipoxia cerebral, vai existir a ativação destes canais (Rodrigo e Standen, 2005).

Os canais K_{ATP} da membrana plasmática encontra-se distribuídos por todo o cérebro, preferencialmente na *substantia nigra*, no córtex, no hipocampo e hipotálamo, bem como no sistema nervoso periférico (Rodrigo e Standen, 2005). Também, existem relatos que os K_{ATP} podem estar presentes nas membranas de mitocôndrias (mito K_{ATP}) de miócitos cardíacos, estando envolvidos na proteção cardiovascular em situações de isquémia cardíaca (Rodrigo e Standen, 2005). Uma vez que a nível cerebral existe uma maior expressão de mitocôndrias que possuem canais K_{ATP} comparativamente com o coração (Rodrigo e Standen, 2005), seria interessante perceber-se quais as funções e os possíveis impactos da ação deste recetor na isquémia cerebral.

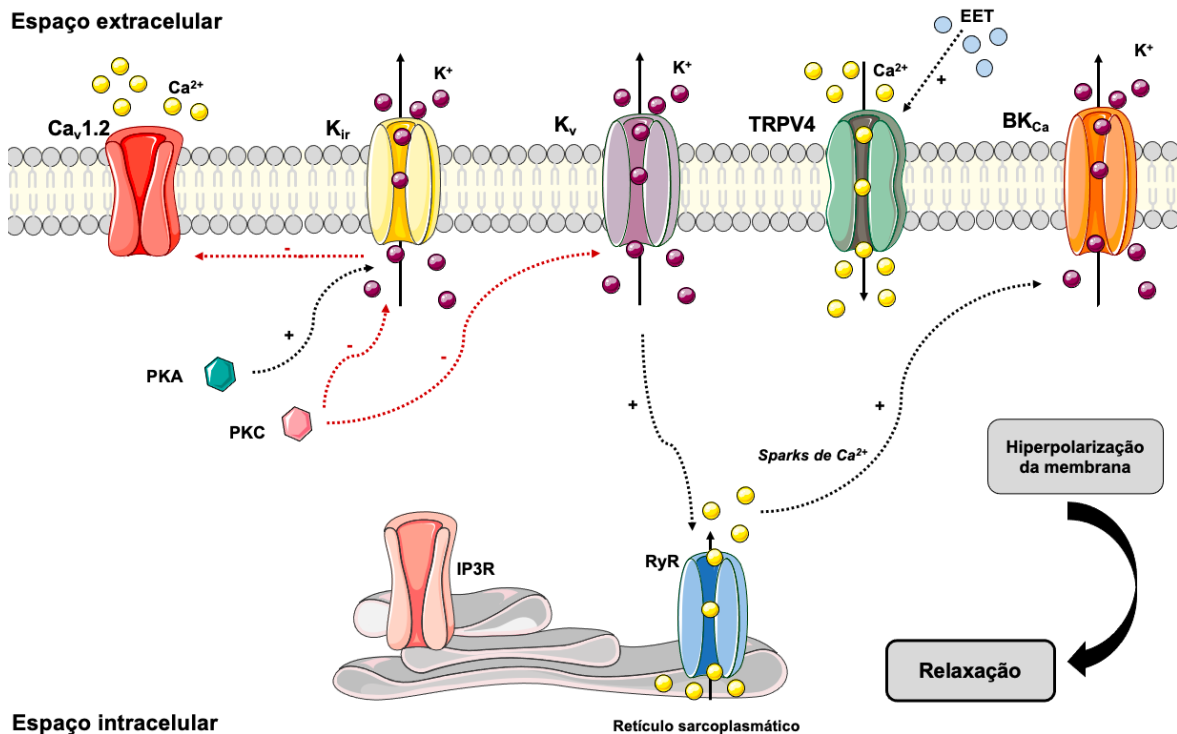


Figura 4. Representação dos mecanismos envolvidos no processo de relaxamento. Os canais de potássio estão envolvidos nos processos de hiperpolarização da membrana. Estes têm a capacidade de promover a saída de K^+ para o meio extracelular e conseqüentemente inibição dos $Ca_v1.2$. A ativação TRPV4 pelo EET leva a um influxo de Ca^{2+} e à ativação dos RyR. Desta ativação é promovido o efluxo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático sob a forma de *sparks* de Ca^{2+} . Os *sparks* de Ca^{2+} conseguem ativar os canais BK_{Ca} próximos que, deste modo, vão promover a hiperpolarização da membrana e o relaxamento. As linhas pretas a tracejado representam a ativação e as vermelhas representam a inibição. *Abreviaturas:* canais de K^+ de alta condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}); canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo-L ($Ca_v1.2$); cálcio (Ca^{2+}); íão potássio (K^+); ácido eicosatrienoico (EET); Recetores do inositol trifosfato (IP3R); Canais de K^+ retificadores de influxo (K_{ir}); Canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v); Recetores de potencial transitório vaniloide tipo 4 (TRPV4); proteína quinase A (PKA); proteína quinase C (PKC). Adaptado de (Quelhas et al., 2019).

◆ Canais de Potássio Ativados pelo Cálcio

Os K_{Ca} são canais de potássio que apresentam elevada sensibilidade para o Ca^{2+} intracelular como para possíveis mudanças no V_m . Deste modo, estes canais denotam uma particular importância na regulação do tónus vascular (Quelhas et al., 2019; Tano e Gollasch, 2014). A família dos K_{Ca} pode ser dividida em três grupos principais, sendo eles baixa, intermédia e elevada condutância (BK_{Ca} : do inglês *large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+*). Atendendo à sequência amioacídica da região do poro e do domínio onde se liga o complexo Ca^{2+} -calmodulina, as condutâncias baixas e intermédias pertencem ao mesmo subgrupo (Tano e Gollasch, 2014).

Um dos fulcrais reguladores do tónus vascular são os BK_{Ca} , pois conseguem facilitar a criação de um mecanismo de *feedback* negativo que vai reduzir a vasoconstrição provada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Brenner et al., 2000; Howitt et al., 2011; Longden et al., 2016). Isto é, quando os BK_{Ca} apresentam uma baixa atividade conseguem exercer um potente efeito hiperpolarizante no V_m , levando deste modo, à redução da entrada de Ca^{2+} e

consequentemente causar vasodilatação (Howitt et al., 2011). Nas SMC este canal é o que se encontra mais expresso (Tano e Gollasch, 2014).

Os BK_{Ca} são constituídos por quatro subunidades α formadoras de poros e por quatro subunidades β reguladoras, sendo estas segundas mais envolvidas para a sensibilidade ao Ca²⁺. Dentro das subunidades β , podemos destacar a subunidade β_1 como a principal expressa nas SMC das artérias. A sua atividade contribui para aumentar a sensibilidade ao Ca²⁺, conduzindo à ativação do canal, resultando num efluxo de K⁺ culminando na hiperpolarização da membrana e na vasodilatação (Howitt et al., 2011; Quelhas et al., 2019).

Por fim, já foi evidenciado que os BK_{Ca} também podem ser expressas nas mitocôndrias das células cardíacas. Portanto, verificaram que estes canais podem desempenhar uma função cardioprotetora em situações de reperfusão isquémica, devido à ativação dos BK_{Ca} nas mitocôndrias dos cardiomiócitos (Singh et al., 2013; Tano e Gollasch, 2014). Não só a nível cardíaco foram demonstrados estudos protetores, a nível cerebral já foi estudada a proteção em situações de acidente vascular cerebral (AVC). Onde a ativação dos BK_{Ca} potenciavam a redução da área lesada pela isquémia (Liao et al., 2010; Tano e Gollasch, 2014).

◆ **Canais de Potássio Operados por Voltagem**

Os canais K_v são reconhecidos por possuírem importantes funções ao nível da regulação do processo contrátil originado pelo incremento da pressão intravascular. A ativação destes canais já foi demonstrada em SMC, em células endoteliais e nos pés astrocitários (Dunn e Nelson, 2010; Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019). Sabe-se que os K_v são um conjunto de canais iónicos que têm a capacidade de gerar correntes operadas por voltagem quando ativados pela despolarização da membrana (Amberg e Santana, 2006; Longden et al., 2016). Estes canais são os constituintes maioritários da superfamília de canais de K⁺ e são formados a partir de quatro subunidades α homo ou heteroméricas, cada uma delas com seis domínios transmembranares e ainda com subunidades β adicionais (Dunn e Nelson, 2010; Ko et al., 2010; Longden et al., 2016; Nieves-Cintrón et al., 2018).

No cérebro, os K_v das artérias piiais intervêm na regulação do tónus miogénico quando ocorrem situações de pressão elevadas e podem ser inibidos por vasoconstritores através da ativação da PKC (Dunn e Nelson, 2010). Já a inibição dos K_v nas artérias do parênquima cerebral pode levar a uma contração significativa. Deste modo, indica que os estes canais conseguem fornecer um efluxo hiperpolarizante de K⁺, que se opõe à vasoconstrição que ocorre em pressões fisiológicas (Longden et al., 2016).

Por fim, verificou-se que existe uma relação direta entre a constrição vascular devido à hipoxia e a inibição dos K_v . Isto é, a inibição destes canais pode estar relacionada com a vasoconstrição hipóxica através do aumento do período de repolarização para a entrada de Ca^{2+} (Liu et al., 2014).

◆ **Canais de Potássio de Domínio 2 Poros em Tandem**

Os canais constituintes da família de proteínas K_{2p} são o suporte para a condutância e manutenção do potencial negativo no espaço interior da membrana de todas as células (Quelhas et al., 2019; Sepúlveda et al., 2015). O nome “domínio de 2 poros” deve-se à tipologia distinta das subunidades do canal de K^+ , ou seja, cada subunidade possui dois domínios para a formação do poro do canal de K^+ , ao invés das outras famílias de canais de K^+ que são caracterizadas apenas por possuírem um poro (Borsotto et al., 2015; Enyedi e Czirják, 2010). Desta maneira, a formação dos K_{2p} envolve quatro segmentos transmembranares e dois poros em tandem, cujos quais são responsáveis pelas correntes de fundo de K^+ em células excitáveis (Borsotto et al., 2015). De salientar que estes canais possuem uma elevada sensibilidade a diversos estímulos quer físicos quer químicos, como por exemplo ao pH, ao oxigénio, aos fosfolípidos, aos neurotransmissores, entre outros. Sugerindo o envolvimento dos K_{2p} na regulação do V_m e na excitabilidade em inúmeros tipos celulares em diversificadas situações fisiológicas e patológicas (Borsotto et al., 2015). Com base nas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas dos K_{2p} podemos dividi-los em seis subfamílias, nomeadamente em TWIK (do inglês *TWIK-tandem of pore domains in a weak inward rectifying K^+ channel*), TREK (do inglês *TWIK-related K^+ channel*), TASK (do inglês *TWIK-related acid-sensitive K^+ channel*), TALK (do inglês *TWIK-related alkaline pH-activated K^+ channels*), THIK (do inglês *tandem-pore domain halothane-inhibited K^+ channels*) e TRESK (do inglês *TWIK-related spinal cord K^+ channels*) (Borsotto et al., 2015; Enyedi e Czirják, 2010). Dentro da subfamília TASK, o TASK-1 (do inglês *TWIK-related K^+ channel 1*) e o TASK-3 (do inglês *TWIK-related acid-sensitive K^+ channel 3*) mostraram possuir aplicabilidade para proteção contra a isquemia, devido ao facto de ambos serem inibidos em situações de redução de pH e privação de oxigénio (Borsotto et al., 2015).

A nível cerebral, as células endoteliais e as SMC da artéria basilar, possuem expressão de um canal da família dos TREK, o TREK-1 (do inglês *TWIK-related K^+ channel 1*), envolvido na regulação do tónus vascular (Enyedi e Czirják, 2010). Também, no decorrer de um ataque isquémico, os TREK conseguem atuar de modo a levar à hiperpolarização da membrana e promover a circulação sanguínea em redor da região afetada. Deste forma, é

possível levar à neuroproteção cerebral, no entanto os mecanismos pelos quais atuam ainda não estão completamente esclarecidos (Enyedi e Czirják, 2010; Quelhas et al., 2019).

B. Canais Recetores de Potencial Transitório

Anteriormente referidos como envolvidos no processo de contração, os TRP potenciam outras funcionalidades, incluindo o processo de relaxamento, na qual a família TRPV desempenha o papel principal. Podemos caracterizar a nível estrutural o canal TRPV4 por possuir seis domínios transmembranares, sendo que para montar um canal funcional na membrana plasmática são necessárias quatro subunidades TRPV4. Este canal quando funcional têm a capacidade de interagir com diversas proteínas, como os IP₃R, os filamentos de actina, as proteínas associadas a microtúbulos (MAP: do inglês *microtubule-associated protein*), a aquaporinas e também com canais BK_{Ca} (Filosa et al., 2013; Quelhas et al., 2019). Também, conhece-se que os TRPV4 são não seletivos, no entanto têm uma grande permeabilidade ao Ca²⁺ e podem ser ativados pelo ácido eicosatrienoico (EETs: do inglês *epoxyeicosatrienoic acids*) (Earley et al., 2005; Filosa et al., 2013; Jia et al., 2004; Longden et al., 2016). Isto é, os EETs caracterizam-se por serem agonistas endógenos dos TRPV4, tendo efeito ao nível da hiperpolarização das SMC, que consequentemente leva ao relaxamento vascular. De salientar, que o efeito deste agonista na hiperpolarização das SMC pode persistir se a produção de prostaciclina e de óxido nítrico forem inibidas. Por isso, frequentemente os EETs são chamados de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs: do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) (Filosa et al., 2013; Jia et al., 2004).

Um dos mecanismos da estimulação dos TRPV4 pelos EETs demonstrou que conseguiu promover a entrada de Ca²⁺ para a célula. Assim, a ocorrência deste influxo vai ativar os recetores de rianodina (RyR: do inglês *ryanodine receptors*) localizados no retículo sarcoplasmático, que promove *sparks* de Ca²⁺ dos reservatórios intracelulares, causando vasodilatação (Earley et al., 2005; Longden et al., 2016; Quelhas et al., 2019). Quando os *sparks* de Ca²⁺ são provenientes dos RyR conseguem ativar os BK_{Ca} próximos para causar hiperpolarização da membrana e consequentemente vasodilatação (Earley e Brayden, 2015; Earley et al., 2005).

Em suma, um *sparks* de Ca²⁺ é identificado por uma libertação local, rápida e transitória de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, por intermédio dos RyR (Brenner et al., 2000; Essin e Gollasch, 2009; Quelhas et al., 2019). O Ca²⁺ proveniente deste mecanismo vai ativar então os BK_{Ca} das proximidades, causando uma corrente hiperpolarizante de maneira a

opor-se à vasoconstrição (Brenner et al., 2000; Essin e Gollasch, 2009; Quelhas et al., 2019). Ao nível cerebral, nas SMC a atividade do BK_{Ca} consegue ser modulada por proteínas endógenas, como as quinases e as fosfatases, sendo esta regulação alterável ao longo do crescimento (Longo e Goyal, 2013). Ou seja, em SMC fetais parece haver maior atividade da fosfatase e da proteína quinase G (PKG: do inglês *protein kinase G*) e menor atividade da PKA comparativamente a um adulto. Estas diferenças nas atividades destas proteínas relacionadas com a idade sugerem que a modulação por fosforilação é responsável pela elevada sensibilidade dos BK_{Ca} ao Ca²⁺ em SMC fetais., comparativamente a um adulto. Logo, com o avançar da idade a [Ca²⁺]_i poderá aumentar e levar a um potencial de repouso da membrana mais despolarizado (Longo e Goyal, 2013; Quelhas et al., 2019).

1.2.5.3. Efeito do estradiol nas células musculares lisas

A ligação não genómica do E2 e de moléculas agonistas têm vindo a ser investigadas ao longo dos anos uma vez que parecem mostrar importantes expressões e atividades no equilíbrio e nos efeitos deletérios/protetores das SMC.

Logo no início do século, Salom *et al.* demonstrou que o E2 consegue induzir o relaxamento das SMC cerebrais independentemente do endotélio. No entanto, verificou que existiam diferenças significativas no efeito relaxante relativamente ao género. Isto é, as artérias basílicas das coelhas fêmeas relaxaram menos comparativamente com os coelhos machos. Também evidenciaram que este efeito vasodilatador devia-se à inibição do influxo de Ca²⁺ extracelular para a vasculatura lisa vascular. No entanto, os autores constataram que ao contrário do que acontece nas SMC das artérias coronárias, nas artérias cerebrais a ativação do efluxo de K⁺ não está envolvido (Salom et al., 2001).

Anos mais tarde, a investigação de Patkar *et al.* revelou-se pioneira ao estudar os efeitos vasculares em resposta ao E2 e ao G-1 na artéria cerebral média (MCA: do inglês *medial cerebral artery*). Os investigadores constataram que em concentrações micromolares o E2 têm a capacidade de induzir vasodilatação da MCA. Também o G-1 exerceu dilatação indicando um possível envolvimento dos ER α , ER β e GPER, todos localizados na membrana plasmática, tal como foi comprovado pelo recurso a anticorpos específicos. A investigação indica que o relaxamento foi rápido, independente do endotélio e de óxido nítrico, de acordo com o que foi verificado no estudo anterior de Salom e dos seus colaboradores. Por fim, ainda revelaram que o relaxamento não foi bloqueado pelo antagonista clássico dos ERs, mas foi imitado pelo agonista do ER α - propilpirazotriol (PPT), pelo agonista do ER β - diarilpropionitrila (DPN) e pelo agonista do GPER - G-1. Em suma, os resultados fornecem evidências que a exposição aguda ao E2 e ao G-1 ativam

os ER α /ER β e GPER, respetivamente, nas membranas plasmáticas das SMC da MCA de rato e induzem o relaxamento dependente da concentração, mas independente de endotélio e de óxido nítrico (Patkar et al., 2011).

Um estudo posterior, apresentou resultados que vão de acordo com os dados anteriormente referidos. Nomeadamente, demonstraram que o E2 conseguiu induzir um importante efeito relaxante, dependente da concentração e independente de endotélio nas SMC das artérias basílicas caninas, que estão envolvidas no fornecimento de fluxo sanguíneo para os tecidos cerebrais. De salientar, que os efeitos vasodilatadores induzidos pelo E2 foram observados num curto intervalo de tempo (segundos a minutos), indicando que não poderia ser mediado por mecanismos clássicos genómicos envolvendo ativação transcricional de genes, sugerindo assim uma ação não genómica. Por outro lado, este estudo também vai de acordo com a investigação de Salom *et al.* que verificou que o E2 produz vasorelaxamento pelo bloqueio do influxo de Ca²⁺ através da inibição dos canais de Ca²⁺ tipo L (LTCC: do inglês *L-type Ca²⁺ channels*). Isto é, os canais de Ca²⁺ operados por voltagem desempenham um papel crucial ao nível da regulação do tónus vascular, no qual os LTCC parecem ser os canais dominantes nas SMC, uma vez que fornecem um influxo de Ca²⁺ durante a despolarização membranar (Ramírez-Rosas et al., 2014).

Em 2016, Deer e Stallone tentaram perceber os efeitos da idade e do E2 na reatividade cerebrovascular na MCA em ratos fêmeas. Assim, os autores observaram que o tratamento com E2 teve efeitos dependentes da idade dos ratos na vasoconstrição cerebral. Isto é, o E2 é um importante regulador da vasoconstrição da MCA, potência os efeitos vasodilatadores benéficos em fêmeas jovens, ao invés que em fêmeas idosas aumenta os efeitos deletérios vasoconstritores. Além disso, neste estudo também demonstraram que o E2 melhorou as vias prostanoídes dependentes de cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2) na vasoconstrição cerebrovascular dependentes da idade. Ou seja, os prostanoídes vasodilatadores dependentes de COX-1 são dominantes na MCA em fêmeas jovens, esse efeito do E2 com o avançar da idade foi revertido, revelando uma dominância para prostanoídes constritores derivados de COX-2 (Deer e Stallone, 2016).

Dois anos mais tarde, em 2018, Evanson e colaboradores investigaram os efeitos que o G-1, agonista específico do GPER, poderia ter na ativação do canal BK_{Ca} em miócitos arteriais cerebrais. Os dados do estudo demonstraram que em concentrações nanomolares, o G-1 consegue inibir a ativação do canal BK_{Ca}. Uma vez que o G-1 atenua a amplitude da corrente transitória do BK_{Ca} o que é consistente com o efeito inibitório na ativação do canal BK_{Ca}. Também, em concentrações micromolares o G-1 provocou o vasorelaxamento das artérias cerebrais, no entanto a função do canal BK_{Ca} foi diminuída na presença do agonista do GPER. Estes dados sugeriram que a ativação do GPER através do G-1 provoca vasodilatação independente do endotélio nas artérias cerebrais, mas a magnitude é

atenuada devido a uma redução mediada pelo G-1 na ativação e nas correntes do canal BK_{Ca} (Evanson et al., 2018).

Um último estudo realizado por Xia *et al.* mostrou que para além dos $ER\alpha$ e $ER\beta$ nas SMC cerebrais humanas, também averiguou a presença do GPER, onde o E2 consegue aumentar a expressão do GPER em SMC do cérebro humano. Deste modo, o E2 pode inibir a proliferação de SMC não apenas pela mediação dos $ER\alpha$ e $ER\beta$, mas também através do GPER de maneira dependente da concentração. Assim, este mecanismo poderia estar correlacionado com a proteção dos vasos sanguíneos cerebrais através do E2 (Xia et al., 2020).

Em suma, segundo a maioria dos estudos apresentados foi demonstrado que os mecanismos rápidos mediados pelo E2 são independentes de endotélio, e deste modo, conseguem explicar a vasodilatação das artérias em pessoas e em animais com um endotélio danificado ou disfuncional e o relaxamento das SMC *in vitro*. Também outros estudos verificaram que o principal mecanismo envolvido no efeito vassorrelaxante através do E2 nas artérias cerebrais foi através da inibição do influxo de Ca^{2+} pelo bloqueio de canais LTCC. Estas novas descobertas ajudam a melhorar a compreensão dos efeitos benéficos do E2 ao nível cerebral e fornecem novos caminhos para futuras investigações sobre o relaxamento farmacológico induzido pelo E2 ou G-1 nas doenças cerebrovasculares.

1.2.6. Pericitos

A BBB possui uma função vital na prevenção da entrada de substâncias tóxicas na circulação cerebral. Esta barreira é constituída por células endoteliais não fenestradas que originam as paredes dos vasos sanguíneos e é suportada por pericitos e astrócitos (Brown et al., 2019; Muoio et al., 2014; Yang et al., 2017). Os pericitos conseguem regular e manter a BBB através da secreção de fatores de sinalização autócrinos e parácrinos para orientar a polarização dos prolongamentos dos astrócitos e limitar o número de junções estreitas das células endoteliais. Assim, a ocorrência da diminuição do número de pericitos leva a uma perda significativa das junções estreitas que existem entre as células endoteliais, e conseqüentemente ocorrer um aumento da permeabilidade na BBB (Andreone et al., 2015; Brown et al., 2019; Dore-Duffy e Cleary, 2011; Xiao et al., 2017). Para além da permeabilidade da BBB, os pericitos denotam outras funções essenciais para a correta homeostasia cerebral. Nomeadamente ao nível neurovascular regulam a hemodinâmica dos capilares; conseguem excretar substâncias tóxicas; possuem funções ao nível da migração, reparação e citoproteção de tecidos; na troca de iões e como segundos mensageiros. Estas células ainda estão envolvidas no processo angiogénico

endotelial através da modulação da sinalização do fator de crescimento endotelial vascular local (VEGF: do inglês *vascular endothelial growth factor*) e na atividade das células-estaminais neurais (Brown et al., 2019; Dore-Duffy e Cleary, 2011; Muoio et al., 2014; Quelhas et al., 2019; Sá-Pereira et al., 2012; Su et al., 2019; Yang et al., 2017).

Os pericitos podem também ser apelidados de células murais dos capilares uma vez que se encontram em volta dos capilares de diversas espécies e estes são contínuos com as SMC de artérias e de veias (Sá-Pereira et al., 2012; Su et al., 2019). Estes caracterizam-se por serem células polimórficas e morfologicamente apresentam-se em forma plana ou estrelada, com um corpo celular oval ou esférico e possuem um núcleo relativamente grande e arredondado ou em forma de rim. De referir, que o citoplasma dos pericitos contém um grande número de mitocôndrias e organelos que são capazes de sintetizar proteínas e gerar grande fluxo de ATP e diversos lisossomas, que criam uma aparência externa dos pericitos granular (Dore-Duffy e Cleary, 2011; Muoio et al., 2014; Su et al., 2019; Yang et al., 2017).

Ao longo da vascularização embrionária, os pericitos cerebrais podem ser originados a partir de diversas células progenitoras distintas e dependendo da localização anatómica nos vasos sanguíneos (Su et al., 2019; Yang et al., 2017). Por exemplo, os pericitos cerebrais humanos possuem elevadas quantidades de fosfatase ácida e funções de fagocitose, o que indica que estas células podem ter origem de macrófagos (Su et al., 2019). Para além da diversidade na origem dos pericitos, estes também conseguem diferenciar-se em múltiplas células nomeadamente, em células de gordura; da cartilagem; do músculo; das células ósseas; entre outros tipos celulares, uma vez que os pericitos possuem características de células estaminais (Su et al., 2019; Yang et al., 2017).

Devido à sua localização privilegiada na interfase entre os vasos sanguíneos e o parênquima cerebral, embutidos na membrana basal e entre as células endoteliais, neurónios e astrócitos, os pericitos conseguem atuar como sensores químicos para estabelecerem comunicação entre os grupos de células. Estas células expressam uma diversidade de proteínas contráteis, como alfa actina do músculo liso, a miosina e a tropomiosina para fornecerem a capacidade contrátil às células pericitárias (Brown et al., 2019; Su et al., 2019; Yang et al., 2017). Além disso, também sintetizam laminina, glicosaminoglicanos e colágeno IV para a formação da lâmina basal (Xiao et al., 2017). Por outro lado, diversas moléculas vasoativas, iões extracelulares e neurotransmissores, ativam canais iónicos e recetores expressos pelos pericitos, levando ao aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e culminando em processos de relaxamento ou contração nos pericitos (Yang et al., 2017).

1.2.6.1. Efeitos do estradiol nos pericitos

No referente aos efeitos da ação do E2 nos pericitos, Kurmann et al começaram por verificar que existe expressão dos recetores nucleares ER α e ER β e do GPER nestas células. Demonstrando que os pericitos podem contribuir para os efeitos neuroprotetores do E2 observados em diversos estudos *in vivo* e em estudos clínicos. Isto é, em cérebros isquémicos de roedores analisaram que os efeitos neuroprotetores do E2 estava interligado à ativação atenuada de ERK1/2 (Kurmann et al., 2021).

No caso das células endoteliais, a sinalização mediada pelo E2 está relacionada com o aumento da fosforilação da MAPK e Akt, promovendo a proliferação e migração celular. Ao invés, nas SMC estas mesmas cascatas de quinases promovem o oposto, levando a uma consequente diminuição da função mitogénica. Uma vez que os pericitos parecem derivar da mesma linhagem celular e são fenotipicamente semelhantes às SMC, Kurmann *et al.* verificaram que após exposição ao E2 a atividade dessas cascatas de quinases é reduzida. Este autor também observou que a sinalização não genómica dos ERs pode conseguir levar ao deslocamento dos pericitos da parede do vaso sanguíneo em resposta a estímulos inflamatórios induzido por citocinas e deste modo, a integridade da BBB é protegida (Kurmann et al., 2021).

Em suma, atualmente apenas existe um estudo onde foi demonstrado que a hormona E2 consegue modular as vias de sinalização celular rápidas nos pericitos. A fim de promover a proliferação e migração celular, bem como a proteção da integridade da BBB.

1.2.7 Células Endoteliais

O endotélio vascular caracteriza-se por ser uma monocamada heterogénea revestida por células endoteliais altamente especializadas (Hennigs et al., 2021). As células endoteliais identificam-se como células epiteliais escamosas que sofrem modificações mesodermicamente para formarem as paredes dos vasos sanguíneos (Daneman e Prat, 2015; Hennigs et al., 2021; Quelhas et al., 2019; Sturtzel, 2017). Morfologicamente, as grandes veias e artérias contém dezenas de células endoteliais na sua constituição, ao invés dos pequenos capilares que apenas possuem uma simples célula endotelial enrolada sobre si mesma de modo a formar o lúmen do vaso (Daneman e Prat, 2015). As células endoteliais encontram-se frontalmente ao lado luminal de todos os vasos sanguíneos e representam a primeira barreira física à passagem de todas as moléculas, células ou substâncias patogénicas que estejam a circular na corrente sanguínea (Hennigs et al., 2021; Quelhas et al., 2019).

Ao nível do CNS, encontramos a BBB que têm como objetivos fulcrais fornecer funções de barreira física, metabólica e de transporte (Quelhas et al., 2019). As células endoteliais que constituem a barreira física do CNS têm características bioquímicas, morfológicas e funcionais únicas comparativamente com outras células endoteliais de outros tecidos. Para conseguirem regular os movimentos celulares, moleculares e iónicos entre o sangue e o cérebro. Deste modo, as células endoteliais do CNS estão unidas por dois complexos juncionais distintos a fim de realizarem essas passagens nomeadamente, as junções aderentes e as junções estreitas (Daneman e Prat, 2015; Quelhas et al., 2019; Sá-Pereira et al., 2012; Sturtzel, 2017).

Todas as células que constituem a BBB, têm em comum quatro características específicas para manterem a integridade da BBB (Andreone et al., 2015; Sá-Pereira et al., 2012). Em primeiro lugar, as junções estreitas que existem entre as células endoteliais impossibilitam a passagem de nutrientes e iões no ambiente paracelular. Em segundo, as células endoteliais do CNS apresentam taxas consideravelmente baixas de tráfico vesicular entre as membranas celulares, num processo designado de transcitose. Ao contrário, as células endoteliais periféricas, conseguem facilmente recorrer a vésiculas carregadas para o transporte de macromoléculas do sangue para os tecidos subjacentes. As células endoteliais do CNS, contém uma quantidade elevada de mitocôndrias, importante para gerar o ATP necessário aos gradientes iónicos utilizados para as funções de transporte (Daneman e Prat, 2015; Sá-Pereira et al., 2012). Em terceiro lugar, ao invés de utilizar o tráfico vesicular, as células endoteliais cerebrais manifestam inúmeros transportadores como, a glucose, os aminoácidos e os iões para fornecer nutrientes ao cérebro. Estes transportadores também removem substâncias potencialmente neurotóxicas do CNS. Por último, as células endoteliais do CNS dispõem de uma baixa expressão de moléculas de adesão leucocitária. Deste modo, conseguem prevenir a movimentação das células do sistema imunitário para o ambiente imuno-privilegiado do cérebro (Andreone et al., 2015; Daneman e Prat, 2015; Sturtzel, 2017).

Em homeostase, o tónus vascular é regulado pelas células endoteliais através de sinais vasoconstritores e vasodilatadores de modo a ajustar a pressão e o fluxo sanguíneo às condições das atividades no momento. Como agentes vasoconstritores, as células endoteliais são responsáveis pela produção de tromboxano e de endotelina, como agentes vasodiladores produzem óxido nítrico (Muio et al., 2014; Quelhas et al., 2019; Sturtzel, 2017). As células endoteliais enviam sinais parácrinos às SMC à volta dos vasos para regularem o tónus vascular. Deste modo, podem dilatar os vasos sanguíneos por relaxamento ou contrai-los por contração (Sturtzel, 2017).

1.2.7.1. Efeito do estradiol nas células endoteliais

Os efeitos das ações não genômicas da hormona E2 e do agonista G-1 nas células endoteliais, já começaram a surgir algumas investigações em artérias cerebrais que o relatam. No ano de 2003, Momoi *et al.* verificaram que as células endoteliais vasculares podem libertar compostos vasodilatadores, nomeadamente o óxido nítrico, as prostaglandinas e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Para além disso, foi demonstrado que a serotonina, a prostaglandina F2, a endotelina e o stresse de cisalhamento conseguem estimular a libertação de óxido nítrico e prostaglandinas vasodilatadoras das células endoteliais das artérias do cérebro. Os resultados deste estudo revelam que o tratamento com E2 causou o aumento rápido nos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP: do inglês *cyclic guanosine monophosphate*) nos microvasos cerebrais, culminando num aumento de óxido nítrico endógeno (Momoi et al., 2003).

A descoberta de Stirone e dos seus colaboradores revelou que a presença de ERs na membrana das células endoteliais ativam a cascata de PI3K em vasos sanguíneos cerebrais. Deste modo ocorrem aumentos rápidos nos níveis de Akt e óxido nítrico sintase 3 (NOS: do inglês *Nitric oxide synthase*), bem como aumentos na produção de óxido nítrico. A ativação da NOS através da via PI3K/Akt também parece aumentar o CBF, diminuindo o tamanho do infarte cerebral. O estudo de Stirone *et al.* também revelou através de imagem confocal que existem ER α co-localizadas com caveolina-1 na membrana plasmática das células endoteliais. No qual, a rutura das cavéolas inibe a produção de óxido nítrico estimulada pelo E2. Assim, as ações não genômicas do E2 mediadas pelos ERs associados às cavéolas podem contribuir para os efeitos protetores cerebrovasculares (Stirone et al., 2005).

Uma investigação executada por Holm *et. al* demonstrou que em concentrações micromolares do agonista G-1 pode diminuir a proliferação das células endoteliais ao inibir a síntese de DNA e acumular as células nas fases S e G2 do ciclo celular. Mostraram deste modo, que o G-1 induz antiproliferação das células endoteliais através do GPER (Holm et al., 2011).

Através de um modelo de células endoteliais vasculares cerebrais humanas, Tu e Jufri, constataram que o GPER encontra-se situado na membrana plasmática e no reticulo endoplasmático. Revelaram que quando o E2 se liga ao GPER, rapidamente é ativada a cascata de sinalização proteica por meios de vias envolvendo proteínas G. Também é ocorre a produção de cAMP, de Bcl-2, fator de crescimento nervoso, ciclina D2 e c-Fos. A ativação do recetor GPER através da proteína G têm a capacidade de desencadear a clivagem do fator de crescimento epidérmico ligado à heparina (EGF: do inglês *Epidermal growth factor*), culminando na transativação do recetor EGF, deste modo é mobilizado

[Ca²⁺]_i e a ativação da ERK1/2, de proto-oncogene tirosina-proteína quinase (Src: do inglês *Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase*) e de PI3K. Por fim, este estudo demonstrou que o E2 mantém o processo homeostático normal das células endoteliais, estimula a proliferação endotelial e reduz o tônus vascular por interação com o GPER. Assim, este estudo concluiu que a aplicação de E2 poderá ser benéfica na preservação do normal funcionamento do sistema vascular cerebral (Tu e Jufri, 2013).

Um último estudo realizado por Altmann e os seus investigadores tentou perceber de que modo o GPER produz efeito nas células endoteliais da microvasculatura cerebral. Através do uso do agonista G-1 verificaram que existiu um aumento do influxo de Ca²⁺ pelos LTCC. Para tal microinjetaram intracelular e extracelularmente G-1, onde apenas a administração extracelular produziu aumentos de [Ca²⁺]_i. Deste modo, confirmaram que nas células endoteliais microvasculares cerebrais existem GPER funcionais. Os autores ainda analisam o efeito que o agonista G-1 poderia ter na produção de óxido nítrico. Concluíram que da ativação do GPER nas células endoteliais microvasculares ocorria um consequente aumento de óxido nítrico e ativação dos canais de K⁺, que podem contribuir para os efeitos protetores na microcirculação cerebral (Altmann et al., 2015).

Em suma, os diversificados efeitos não genómicos da hormona E2 e do agonista G-1 nas células endoteliais cerebrais podem desencadear uma rápida sinalização através da ligação a ERs membranares ou ao GPER que ativam quinases celulares. Os diversos estudos verificaram que a sinalização rápida mediada pelo GPER pode influenciar muitos efeitos protetores ao nível neurovascular, pode promover a ativação da NOS endotelial, a produção de óxido nítrico e de outras moléculas importantes para a vasodilatação. Assim sendo, estes e os restantes mecanismos abordados demonstram uma importante contribuição para os efeitos vasculares cerebrais saudáveis da sinalização do E2.

Tabela 1. Principais efeitos não genómicos do E2 e/ou do seu agonista G-1. *Abreviaturas:* Monofosfato cíclico de adenosina (cAMP); Cálcio (Ca²⁺); Concentração de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i); Via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase/proteína quinase B (PI3K-Akt); Proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK); Quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK); Recetores N-metil D-aspartato (NMDA); Fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β1); Fator de crescimento transformador beta 2 (TGF- β2); fator de necrose tumoral (TNF-α); Interleucina 1β (IL-1β); Interleucina 6 (IL-6); Glicogénio sintase cinase 3 beta (GSK-3β); Canais de Ca²⁺ tipo-L (LTCC); Artéria cerebral média (MCA); Canais de K⁺ de alta condutância ativados pelo Ca²⁺ (BK_{Ca}); Células musculares lisas(SMC); Recetor de recetor 1 de estrogénio acoplado à proteína G (GPER); Óxido nítrico sintase 3 (NOS); Proto-oncogene tirosina-proteína quinase (Src).

Tipo celular	Ano	Organismo	Célula/Cultura	Estrutura Química	Efeitos não genómicos do E2 e/ou G-1	Referência
Neurónios	1998	Murganhos <i>BALB/c</i>	Neurónios cerebrais embrionários	Oestrogénio 17 β-estradiol	- Aumento das [Ca ²⁺] _i	(Beyer e Raab, 1998)
	1999	Porquinhos da Índia fêmeas	Secções cerebrais	17 β-estradiol	- Alteração rápida da transmissão sináptica - Aumento de cAMP	(Kelly et al., 1999)
	2001	Fetos de ratos <i>Sprague-Dawley</i>	Cultura de neurónios cerebrais corticais	17 β-estradiol	- Ativação da via PI3K-Akt - Fosforilação da MAPK - Efeitos neuroprotetores	(Honda et al., 2001)
	2002	Murganhos gestantes <i>BALB/c</i>	Cultura de células neuronais e gliais	oestrogénio	- Aumento de cAMP - Ativação da via PI3K-Akt - Estimulação de MAPK	(Ivanova et al., 2002)
	2002	Ratos fêmeas <i>Sprague-Dawley</i>	Cultura de células neuronais	17 β-estradiol	- Efeitos neuroprotetores - Inibição de correntes de Ca ²⁺	(Lee et al., 2002)
	2003	Murganhos gestantes <i>BALB/c</i>	Cultura de células neuronais	17 β-estradiol	- Ativação da via PI3K-Akt - Efeitos neuroprotetores - Regulação da extensão das neurites	(Beyer et al., 2003)

				<ul style="list-style-type: none"> - Regulação da plasticidade das sinapses - Síntese e catabolismo de neurotransmissores 	
2005	Córtex cerebral de ratos <i>Holtzman</i>	Cultura primária de astrócitos	17 β -estradiol	<ul style="list-style-type: none"> - Efeitos neuroprotetores - Ativação de Akt e ERK1/2 	(Dhandapani et al., 2005)
2005	Ratos fêmeas e machos <i>Sprague-Dawley</i>	Neurónios da zona compacta e da zona reticulada	17 β -estradiol	- Efeitos na frequência da descarga de neurónios	(Torres-Hernández e González-Vegas, 2005)
2006	Ratos <i>Wistar</i> machos adultos	Secções cerebrais	17 β -estradiol	- Aumento das $[Ca^{2+}]_i$	(Funakoshi et al., 2006)
2007	Murganho	Cultura celular neuronal do hipotálamo	Estradiol G-1	- Aumento das $[Ca^{2+}]_i$	(Brailoiu et al., 2007)
2010	Ratos fêmeas e machos <i>Sprague-Dawley</i>	Cultura de células neuronais do hipotálamo	G-1	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação da via PI3K-Akt - Efeitos neuroprotetores - Ativação da via MAPK 	(Lebesgue et al., 2010)
2012	Murganhos macho <i>C57B1/6</i>	Cérebro in vivo Secções cerebrais	17 β -estradiol G-1	- Efeitos neuroprotetores	(Kosaka et al., 2012)
2012	Murganhos <i>C57BL/6J</i>	Cultura neuronal cortical	G-1	<ul style="list-style-type: none"> - Atenuação da excitotoxicidade do NMDA - Ativação da sinalização de ERK1/2 	(Liu et al., 2012)
2014	Ratos fêmeas adultas <i>Sprague-Dawley</i>	Região CA1 do hipocampo microdissecada	17 β -estradiol	- Efeitos neuroprotetores	(Tang et al., 2014)
2016	Murganho	Linha celular do hipocampo de embriões de murganho (<i>mHippoE-18</i>)	17 β -estradiol	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de cAMP - Ativação da via PI3K-Akt - Efeitos neuroprotetores 	(Evans et al., 2016)
				- Atenuação da neurotoxicidade induzida pelo	

					glutamato e isquemia - Controlo e libertação de hormonas	
	2016	Murino	Neurónios do hipocampo	17 β -estradiol	- Ativação da via PI3K-Akt - Efeitos neuroprotetores	(Zhao, Shi, et al., 2016)
Astrócitos	2002	Murganhos gestantes <i>BALB/c</i>	Cultura de células neuronais e gliais	oestrogénio	- Estimulação da via de sinalização MAPK	(Ivanova et al., 2002)
	2003	Murganhos gestantes <i>BALB/c</i>	Cultura de células neuronais	17 β -estradiol	- Estimulação da via de sinalização MAPK	(Beyer et al., 2003)
	2004	Ratos <i>Long-Evans</i>	Cultura de astrócitos do córtex neonatal	17 β -estradiol	- Mediação das variações do $[Ca^{2+}]_i$	(Chaban et al., 2004)
	2005	Ratos <i>Holtzman</i>	Cultura primária de astrócitos do córtex cerebral	17 β -estradiol	- Indução da expressão dos genes TGF- β 1 e TGF- β 2 - Ativação da via antiapoptótica PI3K-Akt	(Dhandapani et al., 2005)
	2005	Murganho <i>BALB/c</i>	Cultura astrogliar de cérebro	17 β -estradiol	- Estimulação da via de sinalização MAPK	(Pawlak et al., 2005)
	2019	Murganhos embrionários <i>C57BL/6J</i>	Cultura neuronal cortical primária	G-1	- Estimulação da via de sinalização MAPK	(Wang et al., 2019)
Microglia	2000	Rato	Cultura de microglia pura de córtices cerebrais		- Efeitos anti-inflamatórios - Inibição da ativação da microglia	(Drew e Chavis, 2000)
	2016	Ratos fêmea adultos <i>Sprague-Dawley</i>	Cultura primária de microglia	G-1	- Efeitos anti-inflamatórios - Redução de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β	(Zhao, Ding, et al., 2016)

	2017	Murganhos macho <i>C57BL/6</i>	Cérebro in vivo Células de linha celular de microglia (BV2)	G-1	- Efeitos anti-inflamatórios - Redução de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 - Redução da ativação da microglia	(Guan et al., 2017)
Oligodendrócitos	2004	Ratos <i>Wistar</i>	Oligodendrócitos do cérebro e da medula espinhal		- Estimulação do crescimento celular - Estimulação da extensão dos prolongamentos - Expressão da proteína básica antimielina	(Arvanitis et al., 2004)
	2009	Ratos <i>Wistar</i>	Oligodendrócitos da medula espinhal	17 α - estradiol 17 β -estradiol	- Ativação da via MAPK - Revelante no desenvolvimento e sobrevivência	(Hirahara et al., 2009)
	2013	Ratos <i>Wistar</i>	Oligodendrócitos da medula espinhal	17 α - estradiol 17 β -estradiol	- Ativação das vias MAPK, Akt e GSK-3 β - Regulação e reorganização do citoesqueleto - Aumento da remielinização dos oligodendrócitos	(Hirahara et al., 2013)
Células Musculares Lisas	2001	Coelhos brancos fêmea da Nova Zelândia	Artéria basilar	17 β -estradiol	- Efeito vasorelaxante independente de endotélio - Inibição do influxo de Ca ²⁺	(Salom et al., 2001)
	2011	Ratos macho <i>Sprague- Dawley</i>	Artéria cerebral média	17 β -estradiol G-1	- Efeito vasorelaxante independente de endotélio e de óxido nítrico	(Patkar et al., 2011)
	2014	Cães machos mestiços	Artéria basilar	17 β -estradiol	- Efeito vasorelaxante independente de endotélio, mas dependente da concentração - Inibição do influxo de Ca ²⁺ através dos LTCC	(Ramírez-Rosas et al., 2014)

	2016	Ratos fêmeas <i>Sprague-Dawley</i>	Artéria cerebral média	17 β -estradiol	- Regulador da vasoconstrição da MCA - Melhoramento das vias prostanóides	(Deer e Stallone, 2016)
	2018	Ratos fêmeas <i>Sprague-Dawley</i>	Células musculares lisas da artéria cerebral média	G-1	- Efeito vasorelaxante independente de endotélio - Ativação do canal BK _{Ca}	(Evanson et al., 2018)
	2020	Humano	Cultura de células musculares lisas cerebrais	17 β -estradiol	- Aumento da expressão do GPER - Inibição da proliferação das SMC	(Xia et al., 2020)
Pericitos	2021	Humano	Pericitos vasculares humanos (<i>hBVPs</i>)	17 β -estradiol	- Efeitos neuroprotetores - Ativação atenuada de ERK1/2	(Kurmann et al., 2021)
Células endoteliais	2003	Ratos fêmeas <i>Sprague-Dawley</i>	Pequenas artérias cerebrais anteriores	17 β -estradiol	- Aumento dos níveis de cGMP e óxido nítrico	(Momoi et al., 2003)
	2005	Ratos fêmeas	Células endoteliais de artérias cerebrais	17 β -estradiol	- Ativação da cascata PI3K - Aumento das NOS e de óxido nítrico	(Stirone et al., 2005)
	2011	Murganho	Linhas celulares endoteliais microvasculares do cérebro (bEnd.3)	G-1	- Indução da antiproliferação pelo G-1 através do GPER	(Holm et al., 2011)
	2013	Humano	Células endoteliais vasculares cerebrais	17 β -estradiol	- Mobilização de [Ca ²⁺] - Ativação de ERK1/2, Src e PI3K - Estimulação da proliferação celular	(Tu e Jufri, 2013)
	2015	Rato	Células endoteliais microvasculares cerebrais	G-1	- Aumento do influxo de Ca ²⁺ pelos LTCC - Aumento do óxido nítrico - Ativação de canais de K ⁺	(Altmann et al., 2015)

1.3. Acidente Vascular Cerebral

1.3.1. Patofisiologia do Acidente Vascular Cerebral

O AVC representa a doença neurológica mais comum e é a segunda maior causa de morte em todo o mundo. Deste modo, esta doença cerebrovascular é caracterizada por elevadas taxas de morbidade, incapacidade (50% dos sobreviventes possuem deficiência crônica) e mortalidade (Crupi et al., 2018; Feske, 2021; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Wang et al., 2021; Xing e Bai, 2020; Zhang et al., 2021).

Em pacientes de ambos os sexos pode ocorrer o AVC (Datta et al., 2020; Mizuma e Yenari, 2021). No entanto a idade e o gênero são determinantes essenciais nesta patologia, pois as incidências revelam que o AVC ocorre mais frequentemente em mulheres idosas comparativamente com os homens (Datta et al., 2020; Mizuma e Yenari, 2021). Para além da idade e do gênero, existem outros fatores de risco que contribuem para o AVC nomeadamente a hipertensão; a hiperlipidemia; a fibrilação auricular; a diabetes; o tabagismo; o consumo de álcool; a falta de atividade física e dietas pouco saudáveis (Datta et al., 2020; Mizuma e Yenari, 2021; Paul e Candelario-Jalil, 2021). Apesar destes múltiplos fatores, as mulheres ainda estão mais propensas ao risco de AVC devido à gravidez, à menopausa, ao uso de contraceptivos orais e a terapias de reposição hormonal (Datta et al., 2020).

O AVC pode ser dividido em duas categorias nomeadamente em AVC isquémico e hemorrágico. O AVC isquémico é causado por uma interrupção no fluxo sanguíneo ao cérebro devido a uma obstrução embólica ou trombótica de um vaso sanguíneo e é o responsável por cerca de 70% a 85% do total dos AVCs (Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Wang et al., 2021; Xing e Bai, 2020; Zhang et al., 2021). Após a ocorrência de AVC isquémico existe sintomatologia devido à interrupção da função neuronal normal. Isto é, as conexões inter-hemisféricas e a atividade sináptica, devido à morte neuronal, são interrompidas dos seus circuitos neuronais normais (Xing e Bai, 2020). Ao invés, o AVC hemorrágico acontece devido à rutura de um vaso sanguíneo cerebral levando ao sangramento no cérebro ou no espaço subaracnóideo (Paul e Candelario-Jalil, 2021).

No cérebro o suprimento sanguíneo pode dividir-se em circulação anterior e circulação posterior. Para tal, existe uma estrutura anatómica conhecida por polígono de Willis que tem a capacidade de proporcionar uma conexão anastomótica entre as circulações anterior e posterior. Proporcionando deste modo, um fluxo colateral para regiões cerebrais mais afastadas quando ocorre incompetência arterial (Rosner et al., 2022). Dentro desta estrutura podemos destacar a MCA que é alvo de diversificados estudos,

uma vez, que cerca de 80% dos AVCs isquêmicos desenvolvem-se devido à oclusão desta artéria (Crupi et al., 2018; González Delgado e Bogousslavsky, 2012; Quelhas et al., 2020).

Quando ocorre um AVC isquêmico, os tecidos neuronais ficam hipoperfundidos e ocorrem dois processos patológicos primários nomeadamente perda de oxigênio e a interrupção do fornecimento de glucose para determinadas áreas cerebrais. Consequentemente, a fisiopatologia do dano cerebral isquêmico desencadeia múltiplas cascatas celulares e moleculares como a despolarização da membrana celular; a disfunção mitocondrial; a rutura da BBB; a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS: do inglês *reactive oxygen species*); a falha imediata das bombas e canais iônicos dependentes de energia; o colapso do metabolismo energético; respostas inflamatórias por microglia ativada e a morte celular apoptótica (Datta et al., 2020; Feske, 2021; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Wang et al., 2021; Xing e Bai, 2020). Após o fluxo sanguíneo ser prejudicado inevitavelmente os neurónios centrais falecem devido à hipoperfusão excessiva, pois apenas 20% do fluxo sanguíneo basal permanece. Em redor desta área necrótica existe uma região denominada de penumbra onde ainda existe cerca de 60% do fluxo sanguíneo basal. Assim, a menos que a recuperação do fluxo sanguíneo seja rápida (dentro de poucas horas), a progressão do dano cerebral isquêmico afetará irreversivelmente a área da penumbra (Figura 5) (Datta et al., 2020; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Xing e Bai, 2020; Zhang et al., 2021).

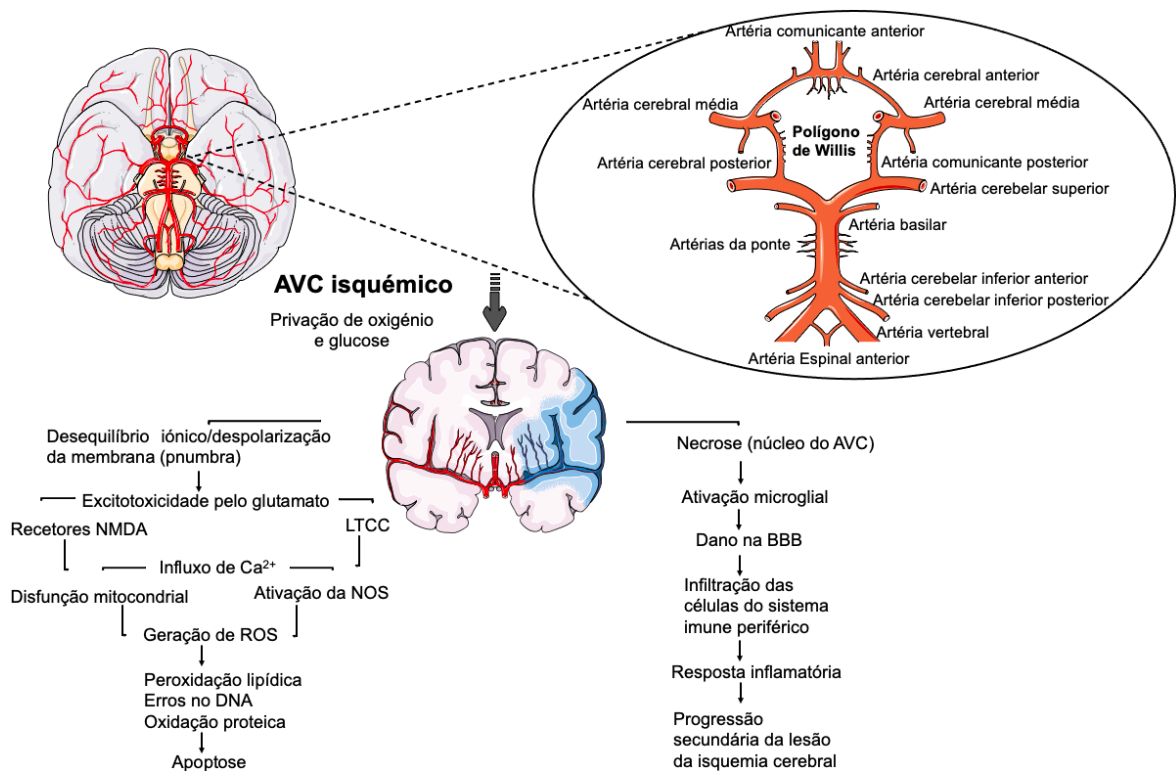


Figura 5. Representação esquemática dos eventos de sinalização causados pela isquemia cerebral que leva à apoptose e necrose, neurotoxicidade e inflamação que contribuem para a progressão da lesão no cérebro.

Abreviaturas: Acidente vascular cerebral (AVC); canais de Ca²⁺ tipo L (LTCC); Cálcio (Ca²⁺); Sintases de óxido nítrico (NOS); Espécie reactiva de oxigénio (ROS); Barreira hematoencefálica (BBB).

A NVU desempenha no AVC isquémico funções cruciais nomeadamente na regulação da BBB; na preservação celular; na resposta imune inflamatória e na reparação durante ou após o AVC isquémico (Wang et al., 2021). Isto é, as funcionalidades da BBB estão dependentes das junções estreitas entre as células endoteliais e o microambiente perivascular. Após a isquemia, na fase aguda, a perturbação da NVU promove a rutura da BBB, uma vez que existe a redução da expressão de proteínas específicas aumentando assim, a permeabilidade da BBB e conseqüentemente o aumento do risco de edema cerebral (Paul e Candelario-Jalil, 2021; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021). Sabe-se que as células constituintes da NVU contribuem de forma específica quando existe a ocorrência desta patologia. Nomeadamente, os pericitos promovem ainda mais o edema cerebral desencadeando-se um fenótipo pró-inflamatório (Wang et al., 2021). As células gliais contribuem para a destruição da BBB ao produzirem metaloproteinases da matriz, que possuem a capacidade de dismantelar as proteínas da matriz da BBB. Assim, vai aumentar a permeabilidade desta o que pode levar à infiltração de células do sistema imune periféricas (Paul e Candelario-Jalil, 2021; Wang et al., 2021). Ainda, na fase inicial do AVC isquémico, os astrócitos vão sofrer gliose reativa, isto é, resposta destas células a situações tais como traumatismo cerebral ou da medula espinal, epilepsia, acidente vascular cerebral ou doenças neurodegenerativas (Pekny e Pekna, 2016), iniciando alterações morfológicas e funcionais para suportar os danos celulares durante a isquemia. Estas células também se encontram envolvidas no processo de inflamação e neurotoxicidade, como por exemplo, a cicatriz glial leva à expansão da área afetada pelo AVC e inibe o crescimento axonal (Shen et al., 2021; Zhang et al., 2021). No referente às SMC, Mariana *et al.* observou que em situação de isquemia, estas conseguem regular o tónus vascular e controlar o correto fornecimento de sangue na área circundante devido aos fatores vasoativos libertados pelos astrócitos e neurónios (Mariana et al., 2021).

1.3.2. Estradiol no Acidente Vascular Cerebral

Ao longo dos anos, são várias as investigações que demonstram os efeitos genómicos das hormonas esteroides, como o caso do E2, ao nível do desenvolvimento, da maturação, da sobrevivência e das funcionalidades de diversas populações celulares em diferentes regiões cerebrais (Roque et al., 2019; Zhao, Ding, et al., 2016). Mais recentemente, o envolvimento do GPER mediado pelo E2 ou o seu agonista G-1 na isquemia cerebral também foi iniciado (Broughton et al., 2013; Broughton et al., 2014;

Murata et al., 2013; Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2011; Roque et al., 2019; Schreihofe e Ma, 2013; Zhao, Ding, et al., 2016).

Ao nível das células astrocitárias a estimulação da via de sinalização ERK1/2 desempenha um papel crucial para tolerar a isquemia cerebral (Pawlak et al., 2005). Por outro lado, a ativação do GPER mediada pelo E2 nos astrócitos aumentou a perda destas células devido à isquemia. Isto é, verificou-se que a ativação do GPER desencadeia um aumento nos níveis da $[Ca^{2+}]_i$ e conseqüentemente leva à apoptose dos astrócitos (Roque et al., 2019). Por último, o estudo realizado por Wang e os seus colaboradores constatou que o stresse oxidativo, as respostas inflamatórias e a excitotoxicidade estão interligados com a ocorrência de AVC. No qual, os astrócitos, nas regiões isquémicas podem formar tecido cicatricial para delimitar a disseminação de células inflamatórias ou em casos mais severos de isquemia cerebral libertarem glutamato em vez de o conseguirem remover do espaço extracelular (Wang et al., 2019). Nas células neuronais, Suzuki e os seus investigadores demonstraram que o E2 após a lesão isquémica consegue aumentar o número de neurónios recém-formados, reduzir a extensão da morte celular e aumentar a neurogênese. Com este estudo pretendeu-se que a função cerebral normal fosse mantida, que a área de lesão fosse atenuada e que ocorresse a diminuição das alterações deletérias associadas à lesão neurodegenerativa (Suzuki et al., 2007). Além disso, os estudos de Prossnitz et al. verificaram que no cérebro e na medula espinal, o E2 e o agonista G-1 têm a capacidade de promoverem a sobrevivência neuronal após isquemia, bem como o aumento da conectividade neuronal e um melhor desempenho cognitivo (Prossnitz e Arterburn, 2015; Prossnitz e Barton, 2011).

Um estudo pioneiro de Broughton *et al* verificou que, após AVC, a distribuição e expressão do GPER nos homens foi aumentada e que em mulheres/mulheres ovariectomizadas pouca ou nenhuma alteração foi verificada (Broughton et al., 2013). Como referido anteriormente, nas SMC a apoptose pode ser mediada pelo GPER. Cujá ativação deste recetor pelo E2 ou G-1 pode estimular a fosforilação de ERK através da via PI3K, culminado assim na apoptose (Broughton et al., 2014). Neste sentido, o estudo posterior elaborado por Broughton et al. indicou que a ativação do GPER pelo G-1, após AVC, obteve um desfecho diferente em diferentes géneros e idades. Nomeadamente, em machos a ativação do GPER piorou o resultado do AVC isquémico, uma vez que levou à ativação de mecanismos de sinalização apoptóticos. Ao invés, em fêmeas ovariectomizadas, o G-1 conseguiu reduzir a apoptose neuronal e melhorar a deficiência funcional após o AVC isquémico. Isto é, o GPER exerce ações anti-apoptóticas em fêmeas ovariectomizadas ou em mulheres através da via de sinalização

ERK1/2, mas em machos e em homens muda para uma ação pró-apoptótica, presumivelmente devido aos níveis de expressão de GPER (Broughton et al., 2014).

Um estudo seguinte revelou que, após o AVC, o GPER também pode ser expresso na microglia (Zhao, Ding, et al., 2016). O E2 e o agonista G-1 podem reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , após o AVC isquêmico. No entanto, o trabalho de Zhao e dos seus colaboradores demonstrou que o GPER mediado pelo E2 expressa efeitos anti-inflamatórios após o AVC isquêmico in vivo e na microglia primária em cultura (Zhao, Ding, et al., 2016).

Por fim, a investigação de Murata *et al* verificou que em ratos machos e fêmeas a ativação do GPER mediada pelo agonista G-1 poderia melhorar a função microvascular cerebral após lesão isquêmica de igual forma (Murata et al., 2013).

Em suma, o AVC isquêmico leva à morte neuronal devido ao ineficiente fluxo sanguíneo no cérebro e, deste modo, pode causar altas taxas de morbidade e mortalidade (Crupi et al., 2018; Feske, 2021; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Wang et al., 2021; Xing e Bai, 2020; Zhang et al., 2021; Zhao, Ding, et al., 2016). O tratamento atual para a resolução desta patologia consiste em remover o coágulo sanguíneo quimicamente ou cirurgicamente. Contudo, apesar de relativamente eficaz no resgate neuronal e na prevenção de incapacidade pós-isquemia, estes tratamentos têm que ser efetuados em apenas algumas horas depois do AVC. (Datta et al., 2020; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Shen et al., 2021; Xing e Bai, 2020; Zhang et al., 2021; Zhao, Ding, et al., 2016).

Para encontrar novos tratamentos para esta patologia, as hormonas esteroides como o E2 e o agonista G-1, têm sido amplamente estudadas, uma vez que demonstraram potenciais efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios em condições inflamatórias aguda como é o caso do AVC (Choi et al., 2021; Prossnitz e Arterburn, 2015; Schreihöfer e Ma, 2013; Zhao, Ding, et al., 2016). No entanto, através dos estudos aqui apresentados podemos concluir que ainda é controversa a atuação do GPER na mediação da função neuroprotetora e anti-inflamatória do estradiol após isquemia. Uns investigadores apontam que a ativação do GPER em machos é prejudicial, mas vantajosa ao nível da melhoria neuronal após o AVC, em fêmeas ovariectomizadas (Broughton et al., 2014). Outros estudos apontam para uma distribuição e expressão aumentada do GPER após AVC nos homens, mas não em mulheres/mulheres ovariectomizadas (Broughton et al., 2013). Ainda, um outro trabalho, afirma que tanto em machos como em fêmeas a ativação do GPER restaurou a função dos vasos cerebrais após insulto isquêmico (Murata et al., 2013). A ativação deste recetor pode também ser mediada pela inflamação desencadeada pela microglia. Uma vez que o GPER microglial, após AVC isquêmico, revelou efeitos anti-inflamatórios (Zhao, Ding,

et al., 2016). Por último, ao nível dos astrócitos a ativação do GPER demonstrou que pode levar à indução da apoptose e aumentar a perda das células astrocíticas após AVC (Roque et al., 2019).

As múltiplas interações entre os diferentes tipos celulares que constituem a NVU, bem como todas as funcionalidades e estruturas que esta no seu conjunto possui, devem ser consideradas quando se pensa em investigações/estratégias farmacológicas ou potencialmente terapêuticas para o AVC.

2. Enquadramento e Objetivos da Investigação

Em todo o mundo, as doenças cerebrovasculares, como é o exemplo do AVC isquémico, são responsáveis por causar elevadas taxas de morbidade, mortalidade e incapacidade na população. A NVU durante e após o AVC isquémico desempenha funções cruciais ao nível da regulação e da preservação celular, na resposta imunitária e inflamatória, bem como na sobrevivência e reparação celular e/ou tecidual.

Este tipo de patologia afeta maioritariamente os vasos sanguíneos cerebrais, nomeadamente a oclusão da MCA leva à interrupção do fornecimento de oxigénio e de glucose para determinadas zonas cerebrais. No núcleo da lesão isquémica e na zona da penumbra as principais células da NVU são lesadas, nomeadamente as SMC. Estas células são as principais reguladoras do tónus vascular, sendo responsáveis pela correta manutenção da pressão intravascular e da perfusão tecidual. Assim, quando ocorre condições de isquemia estas células podem sofrer uma adaptação notável, o que pode ser prejudicial ou benéfico para a recuperação a este distúrbio.

Com o contínuo aumento das taxas de ocorrência de AVC isquémico, torna-se evidente a necessidade de desenvolver investigações e metodologias para evitar ou atenuar as consequências incapacitantes ou mesmo letais desta doença. Assim, o estradiol tem sido apontado como um importante alvo terapêutico, uma vez que já foram demonstrados potenciais efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios em condições inflamatórias aguda como é o caso do AVC. Desta forma o objetivo fulcral deste trabalho foi a análise da regulação vascular pelas SMC em meios condicionados com G-1, caracterizado como sendo o agonista seletivo do recetor de estrogénios ligados à proteína G.

Para atingir este propósito foram estabelecidos os seguintes objetivos:

1. Isolamento e cultura de SMC da MCA de rato Wistar;
2. Análise da mecanística do efeito do G-1 na reatividade das SMC recorrendo à técnica de PCSA:
 - Avaliação dos efeitos genómicos do G-1 em SMCs incubadas por 24h - efeitos de longo prazo;
 - Avaliação dos efeitos não genómicos do G-1 em SMCs- efeitos de curto prazo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura celular de células musculares lisas

De modo a respeitar todos os requisitos éticos de pesquisa animal, todos os animais utilizados para a realização das culturas celulares foram tratados em conformidade com a Diretiva do Parlamento Europeu nº 2010/63/UE relativa à proteção de animais vertebrados utilizados para fins experimentais ou para qualquer outro tipo de propósito científico. Este trabalho foi também aprovado pela comissão do biotério da Universidade da Beira interior, com o número de aprovação do Conselho de Revisão institucional T0023. Para a obtenção de células musculares lisas o método utilizado foi baseado no modelo estabelecido por Quelhas e os seus colaboradores a partir da MCA de ratos Wistar de ambos os sexos (Quelhas et al., 2020). Para tal, começou-se por anestésiar os animais (87,5 mg/Kg quetamina e 12,5 mg/Kg xilazina) e de seguida proceder à sua decapitação. Recorrendo ao auxílio do material cirúrgico, extraiu-se o cérebro e colocou-se numa placa de Petri contendo PBS (1400 mM de NaCl; 81 mM de Na₂HPO₄; 27 mM de KCl e 15 mM de KH₂PO₄, pH= 7,4) (Tabela 2). Após a limpeza do cérebro no PBS, foi realizado o explante da MCA e estas também foram colocadas em PBS (Figura 6). Posteriormente, as artérias foram colocadas numa placa de cultura de 6 poços, previamente revestidas com colagénio (5µg/cm²) e colocadas durante 3 a 5 minutos na incubadora a 37°C, numa atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Após sair da incubadora, foi adicionado 1 mL de meio de cultura completo [MCC: DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS – 5%: do inglês *fetal bovine serum*); Albumina de soro bovino (BSA -0,25%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/mL); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0,5 ng/mL); heparina (2µg/mL), insulina (5µg/mL) e solução antibiótico-antimicótico (SAA 1%), pH 7,4]. Após 24 horas foi adicionado novamente 1 mL de MCC. A cada 2 dias o meio de cultura é renovado, tendo estas culturas primárias atingindo a confluência após 20-25 dias. Até à quarta passagem as subculturas das células foram utilizadas para as experiências.



Figura 6. Cérebro de rato Wistar adulto. A região assinalada representa a área a explantar para cultura primária da artéria cerebral média.

3.2. Incubação com G-1 de culturas celulares mistas de astrócitos e neurónios anteriormente sujeitas a privação de oxigénio e glucose

Para obtenção de culturas celulares, o método utilizado foi baseado num modelo estabelecido por Mariana e colaboradores (Mariana et al., 2021). Resumidamente, retiraram-se através da cavidade abdominal, embriões de ratos fêmeas Wistar com cerca de 15 dias de vida, e decapitados, tendo as células corticais isoladas de acordo com o estabelecido por Mariana e colaboradores (Mariana et al., 2021). Os córtices obtidos foram cortados em pequenas porções e colocados em solução *phosphate buffered saline* (PBS). Posteriormente, o tecido foi dissociado mecanicamente e centrifugado a 400 x g, durante 3 minutos. O *pallet* obtido foi ressuspensionado em meio Neurobasal (NBM: do inglês *Neurobasal Medium*) [(NBM; Gilco) suplementado com 2% de B27 (Gibco), 0,5 mM de glutamato (Sigma), 0,5 mM de glutamina (Sigma), 120 µg/mL de gentamicina (Sigma) e 10% FBS] e colocado em placas de cultura de 24 poços previamente revestidas por poli-D-lisina. As células foram colocadas numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Passados 4 dias em cultura, o meio foi renovado, e ao sexto dia de cultura iniciaram-se os ensaios experimentais. Em primeiro, as culturas primárias mistas de astrócitos e neurónios foram sujeitas a privação de oxigénio e glucose (OGD: do inglês *oxygen and glucose deprivation*), representando deste modo o AVC isquémico. Para tal, estas células foram lavadas duas vezes e depois incubadas com solução salina tamponada de *Hank* (HBSS: do inglês *Hank Balanced Salt Solution*) [HBSS: 1,26 mM CaCl₂; 5,36 mM KCl; 0,44 mM KH₂PO₄; 0,49 mM MgCl₂; 139,9 mM NaCl; 4,17 mM NaHCO₃; 3,38 mM Na₂HPO₄, pH = 7,4]. Posteriormente, recorreu-se a uma câmara de hipoxia (*Stemcell Technologies*), com uma atmosfera com 95% de N₂ e 5% de CO₂, para colocar as células submetidas a OGD, e tendo sido colocada esta câmara numa incubadora, a 37°C, durante 4 horas. Simultaneamente, o grupo controlo (HBSS + Glucose) foi lavado duas vezes e depois incubado com HBSS suplementado com 5,56 mM de glucose e colocado novamente durante 4 horas numa incubadora a 37°C, com uma atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂. Após este período de tempo, foram retiradas da incubadora as co-culturas e o meio de reperfusão foi adquirido através da substituição de HBSS por meio de cultura com as diferentes concentrações de G-1 (100 nM e 200 nM) diluídas em NBM. De seguida, as células foram mantidas na incubadora com uma atmosfera de 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂, a 37°C, durante mais 24 horas. Passado este período, o meio condicionado destas co-culturas foi recolhido e armazenado a -80°C.

3.3. Ensaio de *Planar Cell Surface Area*

O estudo da contratilidade celular foi baseado em Quelhas e colaboradores (Quelhas et al., 2020), através da técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA). Para a realização deste ensaio foi necessário que as SMC, entre a terceira e a quarta passagem, tivessem atingido o estado de confluência. De seguida, as células confluentes são colocadas em meio sem soro (MSS), durante um período de 24 horas. Após o término desse tempo, o MSS foi retirado e as células foram incubadas. Para a realização de estudos genómicos, as culturas foram incubadas com (1) Meios condicionados por co-culturas mistas de astrócitos e neurónios, previamente expostas a diferentes concentrações de G-1 (100 nM e 200 nM), sujeitas e não sujeitas a OGD; e com (2) Meios compostos apenas por G-1 nas diferentes concentrações (100 nM e 200 nM) diluídos em MSS, durante novamente 24 horas. Para os estudos não genómicos as culturas permaneciam só com a incubação de MSS durante um período de 24 horas. Passado o período indicado de incubação, as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em MSS e plaqueados 500 μ L em caixas de Petri apropriadas, previamente revestidas por 5 μ L de colagénio. As caixas foram de imediato colocadas na incubadora a 37°C, numa atmosfera composta por 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂, durante 4 horas. Por fim, foi retirado o MSS e as células foram lavadas 4 vezes com 495 μ L de Krebs. Na última lavagem, a solução de Krebs é mantida na caixa de Petri, tendo a mesma sido colocada no microscópio para a realização da experiência.

Para a observação das células recorreu-se a um microscópio de fluorescência invertido (*Zeiss Axio Observer Z1*, Jena, Alemanha) (Figura 7). Trata-se de um microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade (*Axio Cam Hsm*), no qual possui um sistema de incubação incorporado para permitir o controlo da temperatura, sendo este um fator crucial para a manutenção da viabilidade celular ao longo do decorrer do processo experimental. Após a escolha de um plano favorável, foi tirada uma foto que serviu de controlo. Durante 20 minutos as células foram filmadas no microscópio sem adição de nenhum agente contrátil ou relaxante. Após este tempo, foi tirada uma segunda foto para a observação da contração basal, tendo sido adicionado de imediato o agente contrátil usado neste estudo – 5 μ L de Noroadrenalina (NA – 1 μ M). Passados 20 minutos foi tirada novamente uma outra foto e adicionado o agente relaxante - 5 μ L de Nitroprussiato de sódio (SNP - 1 μ M : do inglês *sodium nitroprusside*) nas experiências genómicas ou 5 μ L de G-1 (100 nM ou 200 nM) nas experiências não genómicas, tendo sido tirado no final de 20 minutos outra foto. Através do programa *AxioVision 4.8* software e com o programa de medição automática (*Automatic measurement*) pode-se analisar e tratar as imagens obtidas

pelas experiências. Deste modo, conseguiu-se medir a diferença de área das células após a adição dos agentes vasoativos.



Figura 7. Microscópio de fluorescência invertido - *Zeiss Axio Observer Z1* - com incorporação de câmara digital monocromática de alta velocidade - *Axio Cam Hsm* - e com uma placa de aquecimento.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos, de n experiências independentes, representam-se expressos em função da média \pm erro padrão (S.E.M). A análise estatística, desses mesmo dados, foi realizada através do programa *GraphPad Prism*. Para analisarmos a significância estatística entre dois grupos recorreu-se ao teste *t-student*. Ao invés, quando precisávamos de comparar entre mais de dois grupos analisou-se através do método *One-way ANOVA*, seguido de teste de *Tukey*. As diferenças significativas foram consideradas quando os níveis de probabilidade foram inferiores a 5% ($p < 0,05$).

3.5. Soluções e Materiais

3.5.1. Soluções

Para a realização da presente investigação recorreu-se a diversas soluções. Na Tabela 2 abaixo representada podemos evidenciar as várias soluções utilizadas bem como as suas respetivas composições.

Tabela 2. Soluções e respectivas composições utilizadas nos processos experimentais da cultura celular e no PCSA.

Solução	Composição
Krebs Básico Concentrado	5,0 mM de KCl; 0,03 mM EDTA; 1,5mM de CaCl ₂ ·2H ₂ O; 1,2 mM de MgSO ₄ ·7H ₂ O, 1.2mM de KH ₂ PO ₄ 0,03mM EDTA-Na ₂ , 0,6 mM de Ácido L- ascórbico
Krebs Diluído	Krebs Básico Concentrado; 0,5 mM CaCl ₂ ; 119 mM NaCl; 25 mM NaHCO ₃ e 11 mM Glucose, pH= 7,4
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS – 5%); Albumina de soro bovino (BSA -0,25%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/mL); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0,5 ng/mL); heparina (2µg/mL), insulina (5µg/mL) e SAA (1%), pH 7,4
Meio de cultura completo com 10% FBS	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS – 10%); Albumina de soro bovino (BSA -0,25%) e SAA (1%), pH= 7,4
Meio de cultura sem soro (MSS)	DMEM-F12; Albumina de soro bovino (BSA – 0,25%), pH= 7,4
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	1400 mM de NaCl; 81 mM de Na ₂ HPO ₄ ; 27 mM de KCl e 15 mM de KH ₂ PO ₄ , pH= 7,4
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg)
Solução de <i>dulbecco's modified eagle's médium/f12</i> (DMEM-f12)	DMEM-F12 Liofilizado sigma; NaHCO ₃ (1,2g/L) e ácido L-ascórbico (20mg/L), pH= 7,4

3.5.2. Químicos

Ao longo de toda a investigação utilizaram-se inúmeros compostos químicos, nomeadamente o G-1, a NA e o SNP. Todos estes químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Relativamente à concentração inicial do G-1, este foi preparado em DMSO, sendo que para a realização da metodologia laboratorial foi diluído em água Milli-Q. Os restantes químicos foram também diluídos em água Milli-Q.

3.5.3. Materiais

Para auxiliar todo o presente trabalho foi imprescindível o recurso a diversos equipamentos e materiais. A Tabela 3 apresenta os materiais e os equipamentos utilizados ao longo desta investigação.

Tabela 3. Materiais/Equipamentos e respectivas marcas utilizados ao longo deste trabalho.

Isolamento e Cultura da artéria cerebral média	
Materiais/Equipamentos	Marca
Câmara de Fluxo Laminar	NuAire
Caixas de Cultuta/Multiwells	Orange Scientific VWR
Material Cirúrgico Específico	Dumostar; FST; Stainless; Tekno
Material Específico de Laboratório	-
Sistema de Incubação	Pecon
<i>Planar Cell Surface Area</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Caixas de Petri Específicas para o Microscópio de Fluorescência	Sarstedt
Material Específico de Laboratório	-
Microscópio de Fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
Software do Microscópio de Fluorescência	Axio Vision program 4.8
Preparação de Soluções	
Materiais/Equipamentos	Marca
Balança Digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm

4. Resultados

4.1. Obtenção de culturas primárias de células musculares lisas a partir da artéria cerebral média

A cultura de SMC foi obtida através de explantes das MCA de ratos Wistar adultos, como está estabelecido no protocolo para obtenção de culturas primárias SMC-MCA, previamente publicado pelo grupo de Cairrão (Mariana et al., 2021; Quelhas et al., 2020). A figura 8A ilustra a artéria em cultura após 7 a 10 dias. A figura 8B evidencia o estado da cultura em pré confluência. Por fim, a figura 8C representa a cultura após cerca de 20 a 25 dias, onde as SMC já atingiram o estado de confluência expectável.



Figura 8. Cultura primária de SMC obtidas através do explante da MCA de rato Wistar adulto. (A) Cultura de SMC, com a respetiva MCA, após 7 a 10 dias. (B) Cultura de SMC após 10 a 20 dias, num estado de pré confluência. (A) e (B) foram adquiridas recorrendo a um microscópio ótico através da objetiva de 40x. (C) Cultura de SMC após 20 a 25 dias, no estado de confluência, recorrendo a um microscópio ótico através da objetiva de 10x. *Abreviaturas:* Artéria cerebral média (MCA); células musculares lisas (SMC).

4.2. Ensaios de contratilidade celular

Após obtenção de culturas de SMC recorreu-se à técnica de PCSA, com base no que estava previamente estabelecido pelo nosso grupo de investigação (Mariana et al., 2021; Quelhas et al., 2020), foi avaliada a resposta vasoativa destas células ao agente contrátil (NA - 1 μ M), ao agente relaxante (SNP - 1 μ M) e ao agonista seletivo do GPER (G-1 - 100 nM e 200 nM). De maneira a poder-se avaliar o potencial que o G-1 apresenta na resposta vasoativa das SMC-MCA após a ocorrência de um episódio de isquemia. Para esta condição, as células foram pré-incubadas com meios condicionados por co-culturas mistas de astrócitos e neurónios, anteriormente incubadas com duas concentrações diferentes de G-1 (100 nM e 200 nM), sujeitas e não sujeitas a ambiente isquémico. Para além disso, para percebermos melhor o potencial do G-1 na resposta

vasoativa das SMC-MCA foi analisado o efeito em SMC apenas incubadas, durante 24 horas, com G-1 nas diferentes concentrações (100 nM e 200 nM) e a resposta das SMC quando era diretamente adicionado G-1 (100 nM e 200 nM). Q

4.2.1. Efeito da incubação do agonista G-1 sobre a resposta da noradrenalina em células musculares lisas cerebrais

Podemos verificar pela figura 9 a representação do efeito induzido pela NA numa concentração de 1 μ M, nas SMC da MCA após pré incubação com G-1 (100 nM e 200 nM), durante 24 horas. Para além disso, estão também representados os respetivos controlos, nomeadamente o controlo MSS e o controlo DMSO.

A ação da NA resultou numa diminuição significativa da resposta contrátil das SMC incubadas com G-1 (100 nM G-1 = $14,05 \pm 0,83$ %; 200 nM G-1 = $14,25 \pm 1,40$ %) quando comparadas com SMC não incubadas (Controlo MSS = $18,73 \pm 0,94$ %; Controlo DMSO = $19,95 \pm 1,38$ %) (Figura 9). Assim, conforme evidenciado, quando as SMC são incubadas com meios com G-1, o perfil contrátil destas diminui em resposta ao agente contrátil.

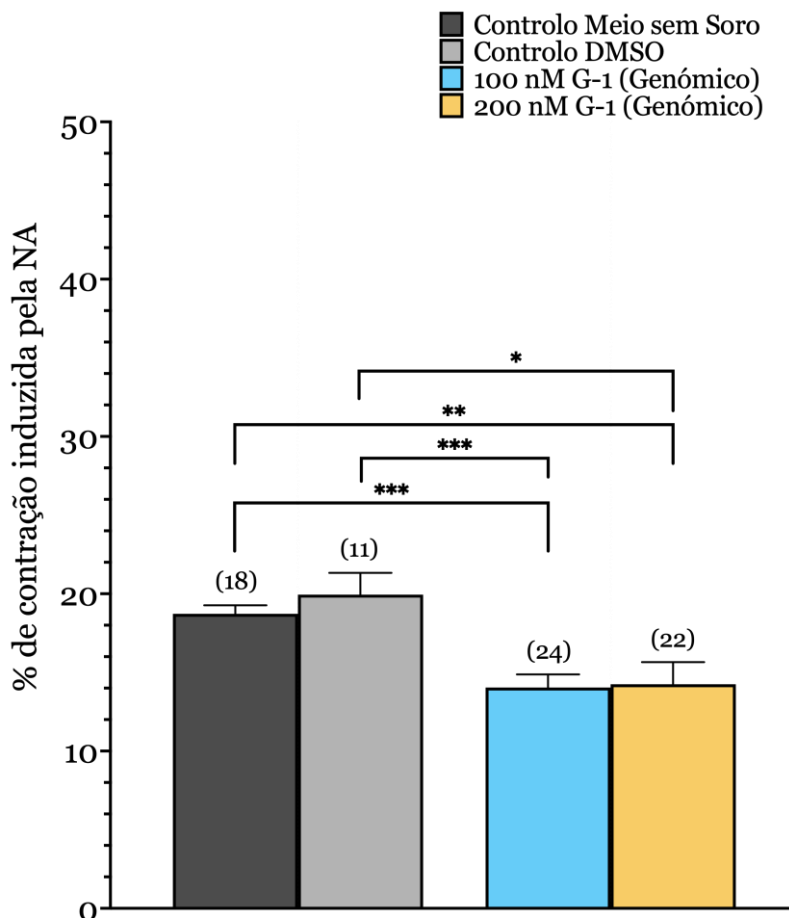


Figura 9. Efeito da NA (1 μ M) nas SMC da MCA. Percentagem de contração induzida pela NA após 24 horas de incubação com G-1 (100 nM e 200 nM) diluído em MSS. Os dados foram expressos em

percentagem (%) de variação de área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média \pm erro padrão (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Tukey*, onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. *Abreviaturas*: Artéria cerebral média (MCA); Células musculares lisas (SMC); Noradrenalina (NA).

A figura 10 representa o efeito induzido pela NA numa concentração de 1 μM nas SMC-MCA, após pré incubação com meios condicionados por co-culturas de astrócitos e neurónios incubados com G-1, submetidas (Grupo OGD) e não submetidas (Grupo HBSS + Glucose) a ambiente isquémico. Encontram-se também representados os respetivos controlos, ou seja, a resposta das SMC condicionadas pelo secretoma das co-culturas de astrócitos e neurónios, que não foram incubadas com G-1 e que foram sujeitas (Controlo OGD) e não sujeitas a ambiente isquémico (Controlo HBSS + Glucose). Assim, podemos verificar que a NA induziu diferenças significativas na contração das SMC que estavam condicionadas pelo secretoma das co-culturas neuro-gliais não incubadas com G-1, sujeitas a ambiente isquémico (Controlo OGD = $10,09 \pm 1,24$ %) e não sujeitas a ambiente isquémico (Controlo HBSS + Glucose = $14,70 \pm 1,35$ %). Relativamente à resposta das SMC condicionadas pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais, não sujeitas a ambiente isquémico, as concentrações 100 nM G-1 e 200 nM G-1 quando comparadas com a resposta das SMC condicionadas pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais sem incubação de G-1 e não sujeitas a OGD (Controlo HBSS + Glucose) não apresentaram diferenças significativas na resposta contrátil das SMC. Ao nível das co-culturas neuro-gliais sujeitas a OGD, ambas as concentrações de 100 nM G-1 e 200 nM G-1 induziram alterações significativas na resposta contrátil das SMC (100 nM G-1 OGD = $24,38 \pm 2,66$ %; 200 nM G-1 OGD = $18,70 \pm 2,45$ %) quando comparadas com a resposta das SMC condicionadas pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais sem incubação de G-1 e sujeito a OGD (Controlo OGD = $10,09 \pm 1,24$ %). Observou-se, deste modo, que a utilização de G-1 potenciou o efeito dos fatores libertados pelos astrócitos e neurónios sujeitos a ambiente isquémico, conduzindo a um aumento da resposta contrátil das SMC à NA.

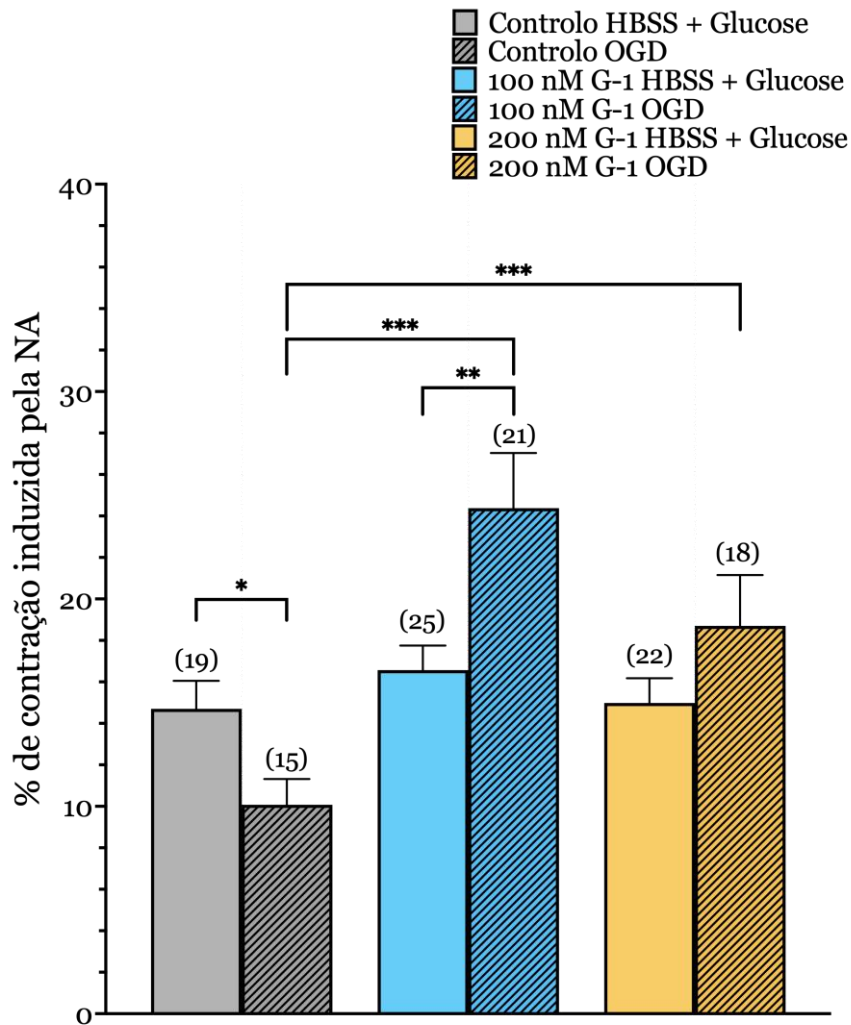


Figura 10. Efeito da NA (1 μ M) nas SMC da MCA. Percentagem de contração induzida pela NA após 24 horas de incubação com meios condicionados por co-culturas corticais de astrócitos e neurónios incubadas com G-1 (100 nM e 200 nM), submetidas (OGD) e não submetidas (HBSS + Glucose) a ambiente isquémico e seus respetivos controlos (co-culturas corticais de astrócitos e neurónios não incubadas com G-1). Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação de área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média \pm erro padrão (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Tukey*, onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. *Abreviaturas:* Artéria cerebral média (MCA); Células musculares lisas (SMC); Noradrenalina (NA); Privação de oxigénio e glucose (OGD).

4.2.2. Efeito da incubação do agonista G-1 sobre a resposta do óxido nítrico em células musculares lisas cerebrais

Depois da exposição das SMC ao agente contrátil recorreu-se à análise do efeito vasoativo do SNP na concentração de 1 μ M (Figura 11). Podemos verificar que as SMC incubadas com meios condicionados por co-culturas neuro-gliais sujeitas a OGD (Controlo OGD = $14,27 \pm 4,74$ %) promoveram um aumento não significativo no relaxamento quando comparado com o relaxamento das SMC incubadas com meios condicionados por co-culturas neuro-gliais não sujeitas a OGD (Controlo HBSS + Glucose = $12,62 \pm 5,75$ %). Apesar dos resultados não serem significativos, os fatores que as células astrocitárias e neuronais libertaram, quando submetidas a ambiente isquémico, induziram relaxamento das MSC em resposta ao SNP.

A resposta das SMC aos meios condicionados pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais, não sujeitas a ambiente isquémico, às concentrações de 100 nM G-1 e 200 nM G-1 não apresentaram diferenças significativas na resposta vasodilatadora, quando comparadas com a resposta das SMC condicionadas pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais sem incubação de G-1 e não sujeitas a OGD (Controlo HBSS + Glucose). Então como evidenciado, a incubação das co-culturas de astrócitos e neurónios com as diferentes concentrações de G-1, não sujeitas a OGD, resultou no relaxamento das SMC em resposta ao SNP.

Quanto às células condicionadas pelos meios de co-culturas neuro-gliais sujeitas a ambiente isquémico verificou-se uma alteração da resposta das SMC ao agente vasodilatador. Os meios condicionados por estas co-culturas, incubadas com as concentrações de 100 nM G-1 e 200 nM G-1, induziram alterações significativas na resposta por parte das SMC (100 nM G-1 OGD = $-26,29 \pm 2,66$ %; 200 nM G-1 OGD = $-24,43 \pm 2,84$ %), quando comparadas com a resposta das SMC condicionadas pelo secretoma de co-culturas neuro-gliais sem incubação de G-1 e sujeito a OGD (Controlo OGD = $14,27 \pm 4,74$ %). Os resultados obtidos revelaram que a exposição das co-culturas de astrócitos e neurónios a ambiente isquémico e com diferentes incubações de G-1 levou à contração das SMC em resposta ao agente vasodilatador.

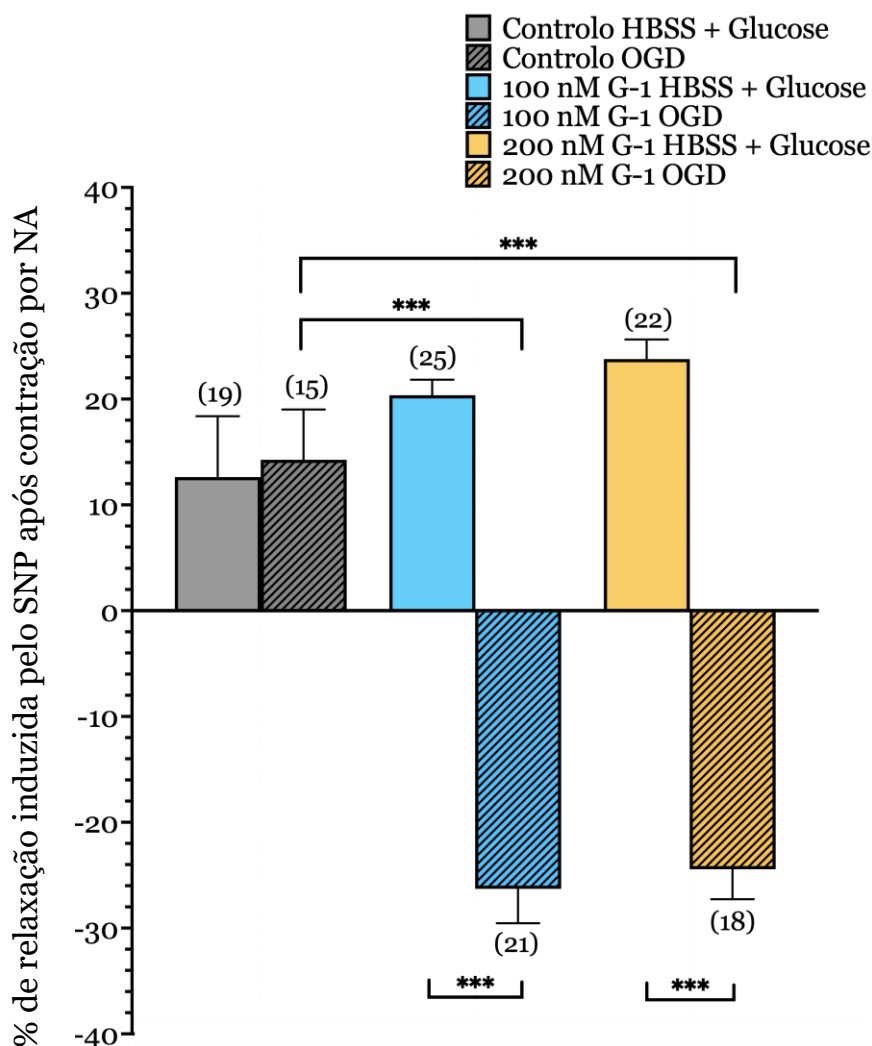


Figura 11. Efeito do SNP (1 μ M) nas SMC da MCA após contração com NA. Percentagem de relaxamento induzido pelo SNP após 24 horas de incubação com meios condicionados por co-culturas corticais de astrócitos e neurónios incubadas com G-1 (100 nM e 200 nM), submetidas (OGD) e não submetidas (HBSS + Glucose) a ambiente isquémico e seus respetivos controlos (co-culturas corticais de astrócitos e neurónios não incubadas com G-1). Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação de área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média \pm erro padrão (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Tukey*, onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. *Abreviaturas:* Artéria cerebral média (MCA); Células musculares lisas (SMC); Noradrenalina (NA); Privação de oxigénio e glucose (OGD), Nitroprussiato (SNP).

4.2.3. Efeitos rápidos do agonista G-1 e do óxido nítrico na resposta contráctil induzida por Noradrenalina

A figura 12 representa o efeito rápido ou direto das SMC ao SNP na concentração de 1 μ M e ao G-1 nas concentrações de 100 nM e 200 nM, após contração com NA (1 μ M). Podemos observar que o SNP induz um efeito varorelaxante inferior aos controlos (Controlo MSS = $23,44 \pm 1,95$ %; Controlo DMSO = $25,58 \pm 2,00$ %) após incubação

com as diferentes concentrações de G-1 (100 nM G-1 (Genómicos) = 14,12 ± 0,93 %; 200 nM G-1 (Genómico) = 19,05 ± 1,65 %) (Figura 12).

No referente aos efeitos diretos do G-1, como podemos observar que a administração do G-1 para as duas concentrações (100 nM G-1 (Não Genómico) = 33,37 ± 3,49 %; 200 nM G-1 (Não Genómico) = 35,41 ± 2,54 %), provoca um efeito vasorelaxante superior ao observado pelo SNP.

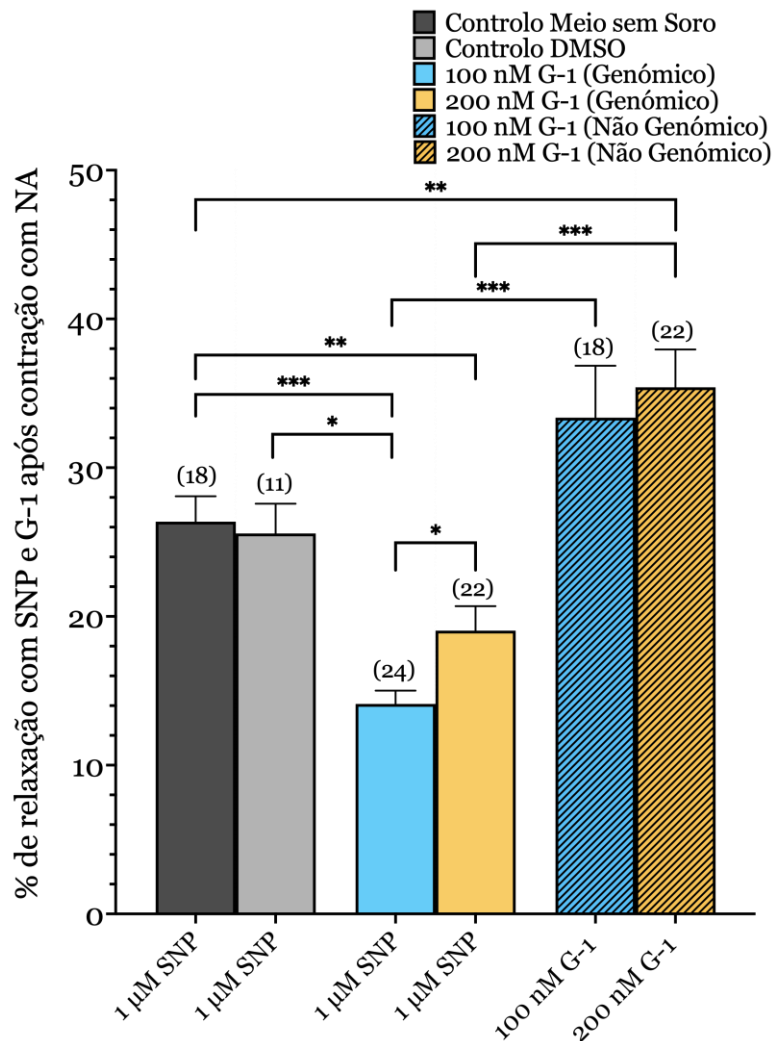


Figura 12. Efeito do SNP (1 µM) e do G-1 (100 nM e 200 nM) nas SMC da MCA após contração com NA. Percentagem de relaxamento induzido pelo SNP após 24 horas de incubação com G-1 (100 nM e 200 nM) e pelo e G-1 diretamente. Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação de área celular em relação à área inicial de cada célula. As barras representam a média ± erro padrão (S.E.M) de três experiências independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste *One-way ANOVA* seguido de teste de *Tukey*, onde * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001. *Abreviaturas:* Artéria cerebral média (MCA); Células musculares lisas (SMC); Noradrenalina (NA); Nitroprussiato (SNP).

5. Discussão geral

Por ano, em todo o mundo, mais de dez milhões de pessoas passam por uma experiência de AVC, dentro das quais cerca de 10% acabam mesmo por falecer. Isto porque o fluxo sanguíneo para o cérebro é interrompido causando a morte das células cerebrais. O AVC pode ser classificado como hemorrágico, quando existe a ruptura de um vaso sanguíneo, ou como AVC isquêmico quando o fluxo sanguíneo é interrompido devido a um bloqueio de uma artéria, sendo esta a principal causa das elevadas taxas de mortalidade e incapacidade (Feske, 2021; Mariana et al., 2021; Paul e Candelario-Jalil, 2021; Pouso e Cairrao, 2022; Shen et al., 2021; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021).

A ruptura da BBB está implicada no aparecimento e progressão do AVC isquêmico. Desta maneira, é fundamental a manutenção das funcionalidades da BBB, bem como a sua integridade, para que deste modo, seja possível minimizar os possíveis danos cerebrais após isquemia. A BBB não atua de forma independente, sendo que diversificados tipos celulares interagem juntos para manter a sua integridade e regular corretamente o CBF. A este conjunto de células designamos de NVU, e é constituído por neurónios; por células da neuróglia (astrócitos, microglia e oligodendrócitos); células vasculares (células endoteliais, SMC e pericitos) e matriz da lâmina basal da vasculatura cerebral (Iadecola, 2017; Mariana et al., 2021; Pouso e Cairrao, 2022; Yang et al., 2019). Denota-se, que durante um evento de isquemia, estas células atuam em conjunto para se adaptarem às condições desfavoráveis, libertando inúmeros fatores na tentativa de protegerem as redes neuronais que são afetadas pela diminuição do CBF. Nomeadamente, as células astrocíticas demonstraram possuir capacidades neuroprotetoras ao libertar moléculas antioxidantes e fatores neutróficos, bem como a providenciar suporte energético e metabólico aos neurónios através da produção de lactato (Gao et al., 2015; Roque e Baltazar, 2017). Estas células gliais juntamente com os neurónios, em momentos de isquemia, podem conduzir a uma atividade mais rápida e eficiente dos neurotransmissores e neuromoduladores. Isto é, os astrócitos e os neurónios, conseguem libertar fatores vasoativos que atuam como mediadores da resposta das SMC, que irão influenciar o tónus vascular e controlar o correto fornecimento de sangue na área circundante (Iadecola, 2017; Mariana et al., 2021; Muoio et al., 2014). Ao encontro destes princípios e de forma a analisar o efeito profilático do G-1 na modulação da resposta vasoativa das SMC por parte das células astrocíticas e neuronais foram usados meios de reperfusão de culturas mistas de astrócitos e neurónios, previamente incubadas com diferentes concentrações de G-1 (100 nM e 200 nM) e sujeitas a OGD durante 4 horas. A determinação deste período de

tempo para submeter estas co-culturas a ambiente isquémico está previamente estabelecido nos estudos de Roque *et al.* e de Mariana *et al.* onde verificaram que a exposição de 4 horas de OGD não refletiu uma diminuição significativa na viabilidade celular, quando comparado com outros tempos de isquemia (Mariana *et al.*, 2021; Roque e Baltazar, 2017).

Dentro de um AVC isquémico a principal artéria afetada é a MCA. Esta artéria tem maioritariamente na sua constituição SMC localizadas na túnica média e que são o principal componente celular responsável pela regulação do fluxo sanguíneo (Crupi *et al.*, 2018; González Delgado e Bogousslavsky, 2012; Yang *et al.*, 2019). Contudo, existe falta de conhecimento no funcionamento da MCA quando ocorre esta patologia. Evidentemente que a falha no conhecimento está relacionada com a escassez de modelos *in vitro* para a realização de estudos e investigações nesta artéria. Assim, a compreensão de como ambientes adversos, como a isquemia, conseguem alterar a função vasoativa das SMC e o desenvolvimento de mecanismos eficientes no controlo do tónus vascular são cruciais. De modo a combater a falta de informação e a perceber melhor as características destas células, podemos recorrer a culturas de células. Uma vez que estas são descritas pela sua simplicidade, fácil manuseamento e com capacidades de responder a estímulos e lesões específicas. Desta forma, conseguimos obter informações celulares pormenorizadas, que se tornam bastante úteis para a compreensão das interações moleculares. Assim, o recurso a culturas celulares pode ser estabelecido como um importante método para o estudo de diversas patologias, como no caso das patologias da vasculatura cerebral (Quelhas *et al.*, 2019; Roque e Baltazar, 2017).

Nesta investigação foram obtidas culturas primárias de SMC derivadas da MCA de ratos Wistar, tal como está previamente descrito pelo grupo de Cairrão (Mariana *et al.*, 2021; Quelhas *et al.*, 2020) e cujas quais revelaram-se fundamentais no decorrer do estudo em desenvolvimento. Como este método de obtenção celular promove o crescimento de SMC num fenótipo sintético, o que não representa as SMC contráteis existentes nos vasos sanguíneos que são responsável pelo tónus vascular (Cairrão *et al.*, 2009; Pouso e Cairrao, 2022), 48 horas antes da realização dos ensaios experimentais, as culturas de SMC-MCA foram expostas a MSS, durante um período de 24 horas, de modo a promover a alteração do fenótipo sintético para um fenótipo contrátil (Cairrão *et al.*, 2009; Mariana *et al.*, 2021; Nishida *et al.*, 2020; Quelhas *et al.*, 2020). Quando as culturas de SMC já se apresentavam num fenótipo contrátil, as mesmas ou eram utilizadas para estudos não genómicos, para avaliação direta da resposta vasoativa do G-1; ou então para a realização de estudos genómicos, onde as culturas de SMC, durante mais 24 horas, eram incubadas com meios condicionados por co-culturas

mistas de astrócitos e neurónios, previamente expostos a diferentes concentrações de G-1, sujeitos e não sujeitos a ambiente isquémico ou incubadas com meios compostos apenas por G-1 diluídos em MSS nas diferentes concentrações.

Com base num *screening* virtual e biomolecular realizado por Bologna *et al.* foi descoberto um composto não esteroide, denominado de G-1, que atua como um agonista seletivo do GPER, demonstrando possuir capacidade de mimetizar os efeitos do E2 nos sistemas fisiológicos. Isto é, este composto não apresenta afinidade para os recetores clássicos ER α e ER β , mas atua ao nível das vias de sinalização intracelular iniciadas pelo GPER, como por exemplo, na ativação da MAPK e/ou PI3K/Akt, na produção de cAMP, na rápida mobilização de Ca²⁺, entre outras (Kumar *et al.*, 2018; Prossnitz e Barton, 2009; Tran, 2020). Também, alguns autores defendem que para além dos efeitos nos diversos sistemas biológicos, este composto apresenta propriedades vasodilatadoras (Evanson *et al.*, 2018; Patkar *et al.*, 2011; Ramírez-Rosas *et al.*, 2014; Salom *et al.*, 2001). No entanto, após uma situação de isquemia devido à tentativa de adaptação, pode haver modificação da sinalização entre as células astrocíticas, endoteliais e SMC, que pode levar tanto à vasodilatação como à vasoconstrição. Neste sentido, recorreu-se à técnica de PCSA para avaliar a resposta vasoativa das SMC quando expostas ao G-1. Para tal, utilizou-se a NA, como agente contrátil, o SNP, como agente relaxante e o G-1. A escolha destes agentes, contrátil e relaxante, baseou-se em investigações realizadas anteriormente neste tipo de células, nas quais foram demonstradas alterações da resposta vasoativa aquando da administração dos mesmos (Mariana *et al.*, 2021; Quelhas *et al.*, 2020). Nas artérias e arteríolas cerebrais existe uma expressão abundante de recetores α_1 -adrenérgicos, portanto, quando estas são expostas à NA vai ocorrer ativação dos mesmos, uma vez que a NA atua como agonista destes recetores (Purkayastha e Raven, 2011). Através do acoplamento do recetor α_1 adrenérgico com as proteínas do tipo Gq vai ser estimulada a atividade da fosfolipase C, que leva à promoção da hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato, originando IP₃ e DAG. Estas duas moléculas vão atuar como segundos mensageiros para mediar a libertação do Ca²⁺ dos reservatórios intracelulares e ativarem a PKC que desencadeia cascatas de sinalização necessárias ao processo contrátil, para deste modo ocorrer a vasoconstrição das SMC (Falkenburger *et al.*, 2013; Longden *et al.*, 2016; Longo e Goyal, 2013; Purkayastha e Raven, 2011). A partir destes aumentos nos níveis de Ca²⁺ vai ser desencadeada a contração das SMC (Purkayastha e Raven, 2011). Deste modo, os resultados obtidos corroboram com os trabalhos anteriormente mencionados, ou seja, aquando da adição da NA, todas as SMC, quer as incubadas com G-1 nas diferentes concentrações, quer as expostas a meios condicionados por co-culturas neuro-gliais, incubadas ou não com G-1, sujeitas e não

sujeitas a OGD, produziram uma resposta contrátil. Ao nível dos resultados dos meios compostos apenas por G-1, durante um período de incubação de 24 horas, apesar de estes produzirem uma resposta contrátil à NA, apresentaram uma diminuição significativa na resposta vasoconstritora, comparativamente com os respetivos controlos. Deste modo, acreditamos que nas condições referidas anteriormente exista já algum comprometimento na expressão ou na atividade dos recetores α_1 -adrenérgicos existentes nas SMC. Ao invés, quando fomos avaliar a resposta das SMC expostas a meios condicionados por co-culturas neuro-gliais, ao mesmo agente contrátil, incubadas com G-1, sujeitas e não sujeitas a ambiente isquémico, o meio de reperfusão condicionado pelas mesmas aumentou a resposta contrátil das SMC, comparativamente aos respetivos controlos. Estes resultados vão ao encontro de dados publicados anteriormente por Monge *et al.* e por Mariana *et al.*. O estudo de Monge *et al.* revelou que a oclusão da MCA, durante um período de 120 minutos e posterior reperfusão por 60 minutos, afetou a resposta adrenérgica cerebrovascular caprina, potenciando a contratilidade destas artérias à NA, uma vez que a expressão dos recetores α -adrenérgicos e prostaciclina I₂ (PGI₂) foram aumentados (Monge *et al.*, 2010). Contudo, devemos sempre ter em consideração as diferenças temporais na exposição destas células a OGD e reperfusão. Também, a investigação levada a cabo por Mariana *et al.* vai de acordo com os nossos resultados, uma vez que, este estudo também utilizou culturas neuro-gliais submetidas a 4 horas de OGD, e obtiveram um aumento na resposta contrátil das SMC à NA (Mariana *et al.*, 2021). Em suma, a incubação das co-culturas de astrócitos e neurónios com G-1, pareceu levar à promoção da libertação de fatores mediadores que modularam a atividade dos recetores α -adrenérgicos, aumentando significativamente a sua expressão, uma vez que foi produzido um aumento da resposta contrátil nas SMC.

Como salientado anteriormente as SMC são as principais responsáveis pelo tónus vascular e têm a capacidade de responder a diversificados estímulos. Desta maneira, estas células podem contrair e relaxar para manter eficazmente o fluxo sanguíneo. Assim, depois da avaliação da resposta contrátil, para os estudos genómicos, foi avaliada a capacidade das SMC relaxarem quando expostas ao agente vasodilatador, SNP. Este agente é um dador de óxido nítrico, onde o aumento da sua concentração intracelular vai promover a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC: do inglês *soluble guanylyl cyclase*) e conseqüentemente vai aumentar os níveis de cGMP. Este é um importante mensageiro secundário que vai conduzir à diminuição da $[Ca^{2+}]_i$, pela ativação da ATPase no retículo sarcoplasmático ou dos canais de K^+ (Cogolludo *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2013; Tewari *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2015).

No que diz respeito à adição do agente vasorelaxante nas SMC, anteriormente incubadas com meios condicionados por co-culturas neuro-gliais, sujeitas e não sujeitas a OGD, os resultados obtidos demonstraram que estas células permanecem viáveis e responsivas, uma vez que, após contraírem com NA, conseguiram relaxar quando foi adicionado o SNP. Ao nível das SMC expostas a co-culturas neuro-gliais condicionadas com G-1 nas diferentes concentrações, mas não sujeitas a OGD, as células foram capazes de aumentar ligeiramente a resposta vasodilatadora quando comparadas com o respetivo controlo. Mostrando, deste modo, que os meios de reperfusão condicionados pelas células astrocitárias e neuronais conseguem mediar a resposta vasoativa do músculo liso vascular, através da libertação de fatores mediadores para o meio de reperfusão. Pelo contrário, as SMC incubadas com co-culturas neuro-gliais condicionadas com G-1 nas diferentes concentrações, sujeitas a OGD, obtiveram um comportamento contraditório do que era eventualmente expectável. Isto é, quando foi adicionado o SNP, nestas células incubadas, verificou-se uma resposta contrátil das SMC e não um efeito vasodilatador semelhante ao que ocorreu nos respetivos controlos, que não foram sujeitos a ambiente isquémico. Estes resultados sugerem que a exposição das SMC com meios condicionados por co-culturas neuro-gliais com G-1, não induziu qualquer proteção contra o insulto isquémico, tal como é evidenciado em outros estudos (Broughton et al., 2014) e noutros modelos de culturas celulares cerebrais (Ding et al., 2009; Lamprecht e Morrison, 2014; Roque et al., 2019). Os nossos resultados revelaram que a exposição a meios condicionados por co-culturas neuro-gliais com G-1 tem efeitos prejudiciais, semelhantes ao que está descrito no modelo de oclusão transitória da MCA sujeita previamente a tratamento com G-1, onde este exacerbou o tamanho da área afetada e piorou os resultados funcionais após isquemia em ratos machos (Broughton et al., 2014). Para além disso, a investigação de Roque *et al.* demonstrou que o G-1 promoveu a morte celular e potenciou a apoptose desencadeada pelo OGD, em astrócitos. Ou seja, o estímulo do GPER nestas células gliais promove a apoptose e agrava a perda de astrócitos induzida pelo OGD (Roque et al., 2019). Este efeito pro-apoptótico, vai ao encontro de um estudo anterior, realizado por Ding *et al.* que evidenciou que a ativação do GPER induziu a apoptose em SMC de aorta de rato, através do processo de ativação da ERK e inibição da PKA (Ding et al., 2009). Ainda, o trabalho de Lamprecht e Morrison num modelo de cultura hipocampal, a exposição do G-1, após OGD não proporcionou recuperação da lesão isquémica (Ding et al., 2009). No entanto, devemos denotar que apesar da nossa investigação e da maioria dos estudos anteriormente referidos não demonstrarem efeitos neuroprotetores após situação de isquémia, os resultados são baseados num modelo *in vitro* de OGD, o que carece de efeitos devido à circulação sanguínea, à perfusão, à BBB,

entre outros efeitos *in vivo*. Deste modo, são necessárias mais investigações para elucidar acerca de como o G-1 pode modular a resposta das SMC, depois de um evento de isquemia. Uma vez, que o papel deste agonista, durante a isquemia, ainda permanece controversa, pois pode induzir efeitos benéficos (Kosaka et al., 2012; Lebesgue et al., 2010), prejudiciais (Broughton et al., 2014; Ding et al., 2009; Lamprecht e Morrison, 2014; Roque et al., 2019) ou com efeitos diferentes consoante o género (Broughton et al., 2014).

Por fim, foi também verificado a influência do SNP em células incubadas, 24 horas, com G-1 nas concentrações de 100 nM e 200 nM. Os dados demonstram que, apesar de em ambas as concentrações existir uma resposta vasodilatadora ao SNP, estas apresentaram uma diminuição significativa na resposta vasorelaxante, comparativamente com os respetivos controlos. Estes resultados sugerem que a incubação com G-1 condicionou a resposta das SMC à ação do SNP, possivelmente através da alteração ou inibição parcial do óxido nítrico. Por outro lado, quisemos perceber, se o G-1, sendo descrito na literatura como um agente vasodilatador, nas mesmas concentrações iria ter o mesmo comportamento quando adicionado diretamente no decorrer da experiência, comparativamente quando incubado durante 24 horas. Nessas condições, já verificamos que o G-1 demonstrou uma resposta vasodilatadora significativamente maior em comparação com os resultados obtidos nas incubações com o mesmo, num período de 24 horas. Ou seja, as SMC expostas diretamente ao G-1 exibem uma resposta vasoativa maior do que as SMC que estão incubadas durante um período de 24 horas com G-1 e depois expostas ao SNP. De facto, foi demonstrado que a ativação seletiva do GPER induz vasodilatação das células cardíacas (Lindsey e Chappell, 2011) e das arteríolas cerebrais (Murata et al., 2013). O estudo de Tang *et al.* que observou que o G-1 demonstra possuir efeitos rápidos, através da modulação do GPER e pela ativação das quinases Akt e ERK no hipocampo de rato (Tang et al., 2014). O estudo de Ding *et al.* também revelou que o GPER nas SMC pode possuir um papel crucial na ativação da ERK (Ding et al., 2009).

Em suma, os resultados obtidos nesta investigação indicam que quando as SMC da MCA são expostas diretamente ao G-1 aparentavam indicar um eventual componente terapêutico. No entanto, quando incubámos as SMC, durante um período de 24 horas apercebemo-nos que a capacidade vasodilatadora que o G-1 possui, começa a diminuir. Além disso, o efeito do G-1 nestas células, quando incubadas com co-culturas neuro-gliais de astrócitos e neurónios com G-1, após OGD, verificámos que as SMC obtiveram um comportamento contraditório, passando a ter uma resposta vasoconstritora. Neste sentido, o agonista seletivo do GPER, parece não induzir neuroproteção após um evento isquémico, uma vez que leva à contração das SMC.

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

O AVC isquémico é a principal doença vascular, sendo responsável por elevadas taxas de mortalidade e incapacidade em todo o mundo. Por essa razão acresce a necessidade urgente de pelo menos minimizar os eventuais danos causados pela perfusão desadequada de oxigénio e glucose característica desta patologia. Para tal, devemos entender os mecanismos associados a este tipo de lesão, de modo a desenvolver novas abordagens terapêuticas. Atualmente, as novas perspetivas incidem sobre a NVU, uma vez que, para existir uma correta e adequada regulação do CBF as células glías, vasculares e neuronais têm que estabelecer um sistema altamente anatómico e funcional que lhes permita trabalhar sincronizada e reciprocamente.

Esta investigação desenvolvida, demonstrou que a exposição ao G-1 pode não apresentar os benefícios terapêuticos desejados após a ocorrência de hipoxia.

Outros estudos devem ser realizados, como por exemplo *real-time PCR* ou *Western Blot* para analisar a expressão dos recetores adrenérgicos ou *Patch-Clamp* para analisar o efeito dos agentes vasoativos sobre as correntes mediadas pelos canais de Ca^{2+} e K^{+} , de forma a se perceber melhor o potencial que o G-1 possui tanto ao nível das SMC da MCA, bem como em toda a dinâmica do CNS.

7. Referências Bibliográficas

- Abd El-Rahman, R. R., Harraz, O. F., Brett, S. E., Anfinogenova, Y., Mufti, R. E., Goldman, D., and Welsh, D. G. (2013). Identification of L- and T-type Ca²⁺ channels in rat cerebral arteries: role in myogenic tone development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304(1), H58-71.
- Acaz-Fonseca, E., Sanchez-Gonzalez, R., Azcoitia, I., Arevalo, M. A., and Garcia-Segura, L. M. (2014). Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 β -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol*, 389(1-2), 48-57.
- Altmann, J. B., Yan, G., Meeks, J. F., Abood, M. E., Brailoiu, E., and Brailoiu, G. C. (2015). G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem*, 133(5), 629-639.
- Amaral, A. I., Tavares, J. M., Sonnewald, U., and Kotter, M. R. (2016). Oligodendrocytes: Development, Physiology and Glucose Metabolism. *Adv Neurobiol*, 13, 275-294.
- Amberg, G. C., and Santana, L. F. (2006). Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291(2), C348-356.
- Andreone, B. J., Lacoste, B., and Gu, C. (2015). Neuronal and vascular interactions. *Annu Rev Neurosci*, 38, 25-46.
- Arvanitis, D. N., Wang, H., Bagshaw, R. D., Callahan, J. W., and Boggs, J. M. (2004). Membrane-associated estrogen receptor and caveolin-1 are present in central nervous system myelin and oligodendrocyte plasma membranes. *J Neurosci Res*, 75(5), 603-613.
- Azcoitia, I., Arevalo, M. A., De Nicola, A. F., and Garcia-Segura, L. M. (2011). Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends Endocrinol Metab*, 22(12), 467-473.
- Badaut, J., and Bix, G. J. (2014). Vascular neural network phenotypic transformation after traumatic injury: potential role in long-term sequelae. *Transl Stroke Res*, 5(3), 394-406.
- Bannister, J. P., Adebisi, A., Zhao, G., Narayanan, D., Thomas, C. M., Feng, J. Y., and Jaggar, J. H. (2009). Smooth muscle cell α 2delta-1 subunits are essential for vasoregulation by CaV1.2 channels. *Circ Res*, 105(10), 948-955.
- Barton, M. (2016). Not lost in translation: Emerging clinical importance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Steroids*, 111, 37-45.

- Beyer, C., Ivanova, T., Karolczak, M., and Küppers, E. (2002). Cell type-specificity of nonclassical estrogen signaling in the developing midbrain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(4-5), 319-325.
- Beyer, C., Pawlak, J., Brito, V., Karolczak, M., Ivanova, T., and Kuppers, E. (2003). Regulation of gene expression in the developing midbrain by estrogen: implication of classical and nonclassical steroid signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1007, 17-28.
- Beyer, C., and Raab, H. (1998). Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur J Neurosci*, 10(1), 255-262.
- Bologa, C. G., Revankar, C. M., Young, S. M., Edwards, B. S., Arterburn, J. B., Kiselyov, A. S., Parker, M. A., Tkachenko, S. E., Savchuck, N. P., Sklar, L. A., Oprea, T. I., and Prossnitz, E. R. (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*, 2(4), 207-212.
- Borsotto, M., Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Devader, C., Mazella, J., and Heurteaux, C. (2015). Targeting two-pore domain K(+) channels TREK-1 and TASK-3 for the treatment of depression: a new therapeutic concept. *Br J Pharmacol*, 172(3), 771-784.
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., and Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol*, 193(2), 311-321.
- Brayden, J. E., Earley, S., Nelson, M. T., and Reading, S. (2008). Transient receptor potential (TRP) channels, vascular tone and autoregulation of cerebral blood flow. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35(9), 1116-1120.
- Brayden, J. E., Li, Y., and Tavares, M. J. (2013). Purinergic receptors regulate myogenic tone in cerebral parenchymal arterioles. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(2), 293-299.
- Brenner, R., Pérez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., and Aldrich, R. W. (2000). Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, 407(6806), 870-876.
- Broughton, B. R., Brait, V. H., Guida, E., Lee, S., Arumugam, T. V., Gardiner-Mann, C. V., Miller, A. A., Tang, S. C., Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2013). Stroke increases g protein-coupled estrogen receptor expression in the brain of male but not female mice. *Neurosignals*, 21(3-4), 229-239.

- Broughton, B. R., Brait, V. H., Kim, H. A., Lee, S., Chu, H. X., Gardiner-Mann, C. V., Guida, E., Evans, M. A., Miller, A. A., Arumugam, T. V., Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2014). Sex-dependent effects of G protein-coupled estrogen receptor activity on outcome after ischemic stroke. *Stroke*, *45*(3), 835-841.
- Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., and Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci*, *13*, 282.
- Butt, A. M., Ibrahim, M., Ruge, F. M., and Berry, M. (1995). Biochemical subtypes of oligodendrocyte in the anterior medullary velum of the rat as revealed by the monoclonal antibody Rip. *Glia*, *14*(3), 185-197.
- Cairrão, E., Santos-Silva, A. J., Alvarez, E., Correia, I., and Verde, I. (2009). Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *45*(3-4), 175-184.
- Chaban, V. V., Lakhter, A. J., and Micevych, P. (2004). A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology*, *145*(8), 3788-3795.
- Chen, T. T., Luykenaar, K. D., Walsh, E. J., Walsh, M. P., and Cole, W. C. (2006). Key role of Kv1 channels in vasoregulation. *Circ Res*, *99*(1), 53-60.
- Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H. J., Gale, J. T., Kidd, G. J., Bernatowicz, R., Gossman, Z. C., Chen, J. T., Dutta, R., and Trapp, B. D. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun*, *5*, 4486.
- Chen, Z., and Trapp, B. D. (2016). Microglia and neuroprotection. *J Neurochem*, *136* Suppl 1, 10-17.
- Choi, J. W., Ryoo, I. W., Hong, J. Y., Lee, K. Y., Nam, H. S., Kim, W. C., Oh, S. H., Kang, J., Lee, H. Y., Na, S. J., Heo, J. H., and Lee, K. O. (2021). Clinical impact of estradiol/testosterone ratio in patients with acute ischemic stroke. *BMC Neurol*, *21*(1), 91.
- Cogolludo, A. L., Pérez-Vizcaíno, F., Zaragoza-Arnáez, F., Ibarra, M., López-López, G., López-Miranda, V., and Tamargo, J. (2001). Mechanisms involved in SNP-induced relaxation and [Ca²⁺]_i reduction in piglet pulmonary and systemic arteries. *Br J Pharmacol*, *132*(4), 959-967.
- Crupi, R., Di Paola, R., Esposito, E., and Cuzzocrea, S. (2018). Middle Cerebral Artery Occlusion by an Intraluminal Suture Method. *Methods Mol Biol*, *1727*, 393-401.
- Dabertrand, F., Nelson, M. T., and Brayden, J. E. (2013). Ryanodine receptors, calcium signaling, and regulation of vascular tone in the cerebral parenchymal microcirculation. *Microcirculation*, *20*(4), 307-316.

- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a020412.
- Datta, A., Sarmah, D., Mounica, L., Kaur, H., Kesharwani, R., Verma, G., Veeresh, P., Kotian, V., Kalia, K., Borah, A., Wang, X., Dave, K. R., Yavagal, D. R., and Bhattacharya, P. (2020). Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Transl Stroke Res*, 11(6), 1185-1202.
- Deer, R. R., and Stallone, J. N. (2016). Effects of estrogen on cerebrovascular function: age-dependent shifts from beneficial to detrimental in small cerebral arteries of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(10), H1285-1294.
- del Zoppo, G. J. (2010). The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med*, 267(2), 156-171.
- Dhandapani, K. M., Wade, F. M., Mahesh, V. B., and Brann, D. W. (2005). Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*, 146(6), 2749-2759.
- Dimou, L., and Simons, M. (2017). Diversity of oligodendrocytes and their progenitors. *Curr Opin Neurobiol*, 47, 73-79.
- Ding, Q., Gros, R., Limbird, L. E., Chorazyczewski, J., and Feldman, R. D. (2009). Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297(5), C1178-1187.
- Dogan, M. F., Yildiz, O., Arslan, S. O., and Ulusoy, K. G. (2019). Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundam Clin Pharmacol*, 33(5), 504-523.
- Dore-Duffy, P., and Cleary, K. (2011). Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*, 686, 49-68.
- Drew, P. D., and Chavis, J. A. (2000). Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J Neuroimmunol*, 111(1-2), 77-85.
- Dunn, K. M., and Nelson, M. T. (2010). Potassium channels and neurovascular coupling. *Circ J*, 74(4), 608-616.
- Earley, S. (2013). TRPM4 channels in smooth muscle function. *Pflugers Arch*, 465(9), 1223-1231.
- Earley, S., and Brayden, J. E. (2015). Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev*, 95(2), 645-690.
- Earley, S., Heppner, T. J., Nelson, M. T., and Brayden, J. E. (2005). TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res*, 97(12), 1270-1279.

- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*, 90(2), 559-605.
- Essin, K., and Gollasch, M. (2009). Role of ryanodine receptor subtypes in initiation and formation of calcium sparks in arterial smooth muscle: comparison with striated muscle. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 135249.
- Evans, N. J., Bayliss, A. L., Reale, V., and Evans, P. D. (2016). Characterisation of Signalling by the Endogenous GPER1 (GPR30) Receptor in an Embryonic Mouse Hippocampal Cell Line (mHippoE-18). *PLoS One*, 11(3), e0152138.
- Evanson, K. W., Goldsmith, J. A., Ghosh, P., and Delp, M. D. (2018). The G protein-coupled estrogen receptor agonist, G-1, attenuates BK channel activation in cerebral arterial smooth muscle cells. *Pharmacol Res Perspect*, 6(4), e00409.
- Falkenburger, B. H., Dickson, E. J., and Hille, B. (2013). Quantitative properties and receptor reserve of the DAG and PKC branch of G(q)-coupled receptor signaling. *J Gen Physiol*, 141(5), 537-555.
- Feske, S. K. (2021). Ischemic Stroke. *Am J Med*, 134(12), 1457-1464.
- Filosa, J. A., Yao, X., and Rath, G. (2013). TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol*, 61(2), 113-119.
- Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M., and Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3), 904-910.
- Galland, F., Seady, M., Taday, J., Smaili, S. S., Gonçalves, C. A., and Leite, M. C. (2019). Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochem Int*, 131, 104538.
- Gao, C., Zhou, L., Zhu, W., Wang, H., Wang, R., He, Y., and Li, Z. (2015). Monocarboxylate transporter-dependent mechanism confers resistance to oxygen- and glucose-deprivation injury in astrocyte-neuron co-cultures. *Neurosci Lett*, 594, 99-104.
- Garcia-Segura, L. M., Azcoitia, I., and DonCarlos, L. L. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*, 63(1), 29-60.
- Gonzales, A. L., and Earley, S. (2013). Regulation of cerebral artery smooth muscle membrane potential by Ca²⁺-activated cation channels. *Microcirculation*, 20(4), 337-347.
- González Delgado, M., and Bogousslavsky, J. (2012). Superficial middle cerebral artery territory infarction. *Front Neurol Neurosci*, 30, 111-114.

- Grayson, T. H., Murphy, T. V., and Sandow, S. L. (2017). Transient receptor potential canonical type 3 channels: Interactions, role and relevance - A vascular focus. *Pharmacol Ther*, *174*, 79-96.
- Guan, J., Yang, B., Fan, Y., and Zhang, J. (2017). GPER Agonist G1 Attenuates Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Neuroimmunomodulation*, *24*(1), 60-66.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., and Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia*, *30*(2), 119-129.
- Guttenplan, K. A., and Liddelow, S. A. (2019). Astrocytes and microglia: Models and tools. *J Exp Med*, *216*(1), 71-83.
- Haddy, F. J., Vanhoutte, P. M., and Feletou, M. (2006). Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *290*(3), R546-552.
- Hadjimarkou, M. M., and Vasudevan, N. (2018). GPER1/GPR30 in the brain: Crosstalk with classical estrogen receptors and implications for behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *176*, 57-64.
- Han, G., Li, F., Yu, X., and White, R. E. (2013). GPER: a novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*, *71*, 53-60.
- Harraz, O. F., Abd El-Rahman, R. R., Bigdely-Shamloo, K., Wilson, S. M., Brett, S. E., Romero, M., Gonzales, A. L., Earley, S., Vigmond, E. J., Nygren, A., Menon, B. K., Mufti, R. E., Watson, T., Starreveld, Y., Furstenhaupt, T., Muellerleile, P. R., Kurjiaka, D. T., Kyle, B. D., Braun, A. P., and Welsh, D. G. (2014). Ca(V)3.2 channels and the induction of negative feedback in cerebral arteries. *Circ Res*, *115*(7), 650-661.
- Hayashi, C., and Suzuki, N. (2019). Heterogeneity of Oligodendrocytes and Their Precursor Cells. *Adv Exp Med Biol*, *1190*, 53-62.
- Hennigs, J. K., Matuszcak, C., Trepel, M., and Körbelin, J. (2021). Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. *Cells*, *10*(10).
- Hirahara, Y., Matsuda, K., Gao, W., Arvanitis, D. N., Kawata, M., and Boggs, J. M. (2009). The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia*, *57*(2), 153-165.
- Hirahara, Y., Matsuda, K. I., Liu, Y. F., Yamada, H., Kawata, M., and Boggs, J. M. (2013). 17 β -Estradiol and 17 α -estradiol induce rapid changes in cytoskeletal organization in cultured oligodendrocytes. *Neuroscience*, *235*, 187-199.
- Holm, A., Baldetorp, B., Olde, B., Leeb-Lundberg, L. M., and Nilsson, B. O. (2011). The GPER1 agonist G-1 attenuates endothelial cell proliferation by inhibiting DNA

- synthesis and accumulating cells in the S and G2 phases of the cell cycle. *J Vasc Res*, 48(4), 327-335.
- Honda, K., Shimohama, S., Sawada, H., Kihara, T., Nakamizo, T., Shibasaki, H., and Akaike, A. (2001). Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res*, 64(5), 466-475.
- Howitt, L., Sandow, S. L., Grayson, T. H., Ellis, Z. E., Morris, M. J., and Murphy, T. V. (2011). Differential effects of diet-induced obesity on BKCa {beta}1-subunit expression and function in rat skeletal muscle arterioles and small cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(1), H29-40.
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42.
- Iorga, A., Cunningham, C. M., Moazeni, S., Ruffenach, G., Umar, S., and Eghbali, M. (2017). The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biol Sex Differ*, 8(1), 33.
- Irving, E. A., and Bamford, M. (2002). Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(6), 631-647.
- Ivanova, T., Mendez, P., Garcia-Segura, L. M., and Beyer, C. (2002). Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *J Neuroendocrinol*, 14(1), 73-79.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(4), 557-568.
- Jia, Y., Wang, X., Varty, L., Rizzo, C. A., Yang, R., Correll, C. C., Phelps, P. T., Egan, R. W., and Hey, J. A. (2004). Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(2), L272-278.
- Kelly, M. J., Lagrange, A. H., Wagner, E. J., and Rønnekleiv, O. K. (1999). Rapid effects of estrogen to modulate G protein-coupled receptors via activation of protein kinase A and protein kinase C pathways. *Steroids*, 64(1-2), 64-75.
- Khakh, B. S., and Deneen, B. (2019). The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci*, 42, 187-207.
- Khakh, B. S., and Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci*, 18(7), 942-952.
- Kipp, M. (2020). Oligodendrocyte Physiology and Pathology Function. *Cells*, 9(9).
- Ko, E. A., Park, W. S., Firth, A. L., Kim, N., Yuan, J. X., and Han, J. (2010). Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: modulation by protein kinases. *Prog Biophys Mol Biol*, 103(1), 95-101.

- Kosaka, Y., Quillinan, N., Bond, C., Traystman, R., Hurn, P., and Herson, P. (2012). GPER1/GPR30 activation improves neuronal survival following global cerebral ischemia induced by cardiac arrest in mice. *Transl Stroke Res*, 3(4), 500-507.
- Kumar, A., Banerjee, A., Singh, D., Thakur, G., Kasarpalkar, N., Gavali, S., Gadkar, S., Madan, T., Mahale, S. D., Balasinor, N. H., and Sachdeva, G. (2018). Estradiol: A Steroid with Multiple Facets. *Horm Metab Res*, 50(5), 359-374.
- Kumar, A., Bean, L. A., Rani, A., Jackson, T., and Foster, T. C. (2015). Contribution of estrogen receptor subtypes, ER α , ER β , and GPER1 in rapid estradiol-mediated enhancement of hippocampal synaptic transmission in mice. *Hippocampus*, 25(12), 1556-1566.
- Kumar, A., and Foster, T. C. (2020). G Protein-Coupled Estrogen Receptor: Rapid Effects on Hippocampal-Dependent Spatial Memory and Synaptic Plasticity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 385.
- Kuo, I. Y., Wölfle, S. E., and Hill, C. E. (2011). T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block? *J Physiol*, 589(Pt 4), 783-795.
- Kurmann, L., Okoniewski, M., and Dubey, R. K. (2021). Estradiol Inhibits Human Brain Vascular Pericyte Migration Activity: A Functional and Transcriptomic Analysis. *Cells*, 10(9).
- Lamprecht, M. R., and Morrison, B., 3rd. (2014). GPR30 activation is neither necessary nor sufficient for acute neuroprotection by 17 β -estradiol after an ischemic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 1563, 131-137.
- Lebesgue, D., Traub, M., De Butte-Smith, M., Chen, C., Zukin, R. S., Kelly, M. J., and Etgen, A. M. (2010). Acute administration of non-classical estrogen receptor agonists attenuates ischemia-induced hippocampal neuron loss in middle-aged female rats. *PLoS One*, 5(1), e8642.
- Lee, D. Y., Chai, Y. G., Lee, E. B., Kim, K. W., Nah, S. Y., Oh, T. H., and Rhim, H. (2002). 17 β -estradiol inhibits high-voltage-activated calcium channel currents in rat sensory neurons via a non-genomic mechanism. *Life Sci*, 70(17), 2047-2059.
- Liao, Y., Kristiansen, A. M., Oksvold, C. P., Tuvnes, F. A., Gu, N., Rundén-Pran, E., Ruth, P., Sausbier, M., and Storm, J. F. (2010). Neuronal Ca²⁺-activated K⁺ channels limit brain infarction and promote survival. *PLoS One*, 5(12), e15601.
- Lindsey, S. H., and Chappell, M. C. (2011). Evidence that the G protein-coupled membrane receptor GPR30 contributes to the cardiovascular actions of estrogen. *Gen Med*, 8(6), 343-354.

- Liu, S. B., Zhang, N., Guo, Y. Y., Zhao, R., Shi, T. Y., Feng, S. F., Wang, S. Q., Yang, Q., Li, X. Q., Wu, Y. M., Ma, L., Hou, Y., Xiong, L. Z., Zhang, W., and Zhao, M. G. (2012). G-protein-coupled receptor 30 mediates rapid neuroprotective effects of estrogen via depression of NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, *32*(14), 4887-4900.
- Liu, W., Wang, D., Song, K., Chen, L., Zhu, Y., Liu, P. and Zhu, Y. (2014). Inhibition of 15-lipoxygenase (15-LOX) reverses hypoxia-induced down-regulation of potassium channels Kv1.5 and Kv2.1. *Int J Clin Exp Med*, *7*(11), 4147-4153.
- Liu, Y., Harder, D. R., and Lombard, J. H. (2002). Interaction of myogenic mechanisms and hypoxic dilation in rat middle cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *283*(6), H2276-2281.
- Liu, Z., and Chopp, M. (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, *144*, 103-120.
- Longden, T. A., Hill-Eubanks, D. C., and Nelson, M. T. (2016). Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, *36*(3), 492-512.
- Longden, T. A., and Nelson, M. T. (2015). Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation*, *22*(3), 183-196.
- Longo, L. D., and Goyal, R. (2013). Cerebral artery signal transduction mechanisms: developmental changes in dynamics and Ca²⁺ sensitivity. *Curr Vasc Pharmacol*, *11*(5), 655-711.
- Luo, J., and Liu, D. (2020). Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Front Endocrinol (Lausanne)*, *11*, 148.
- Mariana, M., Roque, C., Baltazar, G., and Cairrao, E. (2021). In Vitro Model for Ischemic Stroke: Functional Analysis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Mol Neurobiol*.
- Meyer, M. R., and Barton, M. (2016). Estrogens and Coronary Artery Disease: New Clinical Perspectives. *Adv Pharmacol*, *77*, 307-360.
- Meyer, M. R., Fredette, N. C., Howard, T. A., Hu, C., Ramesh, C., Daniel, C., Amann, K., Arterburn, J. B., Barton, M., and Prossnitz, E. R. (2014). G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Sci Rep*, *4*, 7564.
- Meyer, M. R., Haas, E., Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2009). Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, *308*(1-2), 9-16.

- Meyer, M. R., Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2011). The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*, 55(1-3), 17-25.
- Mizuma, A., and Yenari, M. A. (2021). Clinical perspectives on ischemic stroke. *Exp Neurol*, 338, 113599.
- Molina, L., Figueroa, C. D., Bhoola, K. D., and Ehrenfeld, P. (2017). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 21(8), 755-766.
- Momoi, H., Ikomi, F., and Ohhashi, T. (2003). Estrogen-induced augmentation of endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in isolated rat cerebral small arteries. *Jpn J Physiol*, 53(3), 193-203.
- Monge, L., Fernández, N., Salcedo, A., García-Villalón, A. L., and Diéguez, G. (2010). Role of alpha-adrenoceptors and prostacyclin in the enhanced adrenergic reactivity of goat cerebral arteries after ischemia-reperfusion. *Brain Res*, 1346, 121-131.
- Muoio, V., Persson, P. B., and Sendeski, M. M. (2014). The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)*, 210(4), 790-798.
- Murata, T., Dietrich, H. H., Xiang, C., and Dacey, R. G., Jr. (2013). G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats. *Stroke*, 44(3), 779-785.
- Narayanan, D., Bulley, S., Leo, M. D., Burris, S. K., Gabrick, K. S., Boop, F. A., and Jaggar, J. H. (2013). Smooth muscle cell transient receptor potential polycystin-2 (TRPP2) channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *J Physiol*, 591(20), 5031-5046.
- Nieves-Cintrón, M., Syed, A. U., Nystoriak, M. A., and Navedo, M. F. (2018). Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders. *Microcirculation*, 25(1).
- Nishida, M., Tanaka, T., Mangmool, S., Nishiyama, K., and Nishimura, A. (2020). Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity. *J Lipid Atheroscler*, 9(1), 124-139.
- Patkar, S., Farr, T. D., Cooper, E., Dowell, F. J., and Carswell, H. V. (2011). Differential vasoactive effects of oestrogen, oestrogen receptor agonists and selective oestrogen receptor modulators in rat middle cerebral artery. *Neurosci Res*, 71(1), 78-84.
- Paul, S., and Candelario-Jalil, E. (2021). Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. *Exp Neurol*, 335, 113518.

- Pawlak, J., Karolczak, M., Krust, A., Chambon, P., and Beyer, C. (2005). Estrogen receptor-alpha is associated with the plasma membrane of astrocytes and coupled to the MAP/Src-kinase pathway. *Glia*, 50(3), 270-275.
- Peferoen, L., Kipp, M., van der Valk, P., van Noort, J. M., and Amor, S. (2014). Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*, 141(3), 302-313.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1862(3), 483-491.
- Piascik, M. T., and Perez, D. M. (2001). Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(2), 403-410.
- Pouso, M. R., and Cairrao, E. (2022). Effect of retinoic acid on the neurovascular unit: A review. *Brain Res Bull*, 184, 34-45.
- Prinz, M., Jung, S., and Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292-311.
- Prossnitz, E. R., and Arterburn, J. B. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein-Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacol Rev*, 67(3), 505-540.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., and Hathaway, H. J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*, 70, 165-190.
- Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2009). Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 89-97.
- Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12), 715-726.
- Prossnitz, E. R., and Barton, M. (2014). Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol*, 389(1-2), 71-83.
- Puglisi, R., Mattia, G., Carè, A., Marano, G., Malorni, W., and Matarrese, P. (2019). Non-genomic Effects of Estrogen on Cell Homeostasis and Remodeling With Special Focus on Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 733.
- Purkayastha, S., and Raven, P. B. (2011). The functional role of the alpha-1 adrenergic receptors in cerebral blood flow regulation. *Indian J Pharmacol*, 43(5), 502-506.
- Quelhas, P., Baltazar, G., and Cairrao, E. (2019). The Neurovascular Unit: Focus on the Regulation of Arterial Smooth Muscle Cells. *Curr Neurovasc Res*, 16(5), 502-515.

- Quelhas, P., Baltazar, G., and Cairrao, E. (2020). Characterization of culture from smooth muscle cells isolated from rat middle cerebral arteries. *Tissue Cell*, 66, 101400.
- Ramírez-Rosas, M. B., Cobos-Puc, L. E., Sánchez-López, A., Gutiérrez-Lara, E. J., and Centurión, D. (2014). Pharmacological characterization of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by progesterone and 17 β -estradiol on isolated canine basilar and internal carotid arteries. *Steroids*, 89, 33-40.
- Reho, J. J., Zheng, X., and Fisher, S. A. (2014). Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(2), H163-172.
- Rodrigo, G. C., and Standen, N. B. (2005). ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des*, 11(15), 1915-1940.
- Roque, C., and Baltazar, G. (2017). Impact of Astrocytes on the Injury Induced by In Vitro Ischemia. *Cell Mol Neurobiol*, 37(8), 1521-1528.
- Roque, C., Mendes-Oliveira, J., and Baltazar, G. (2019). G protein-coupled estrogen receptor activates cell type-specific signaling pathways in cortical cultures: relevance to the selective loss of astrocytes. *J Neurochem*, 149(1), 27-40.
- Rosner, J., Reddy, V., and Lui, F. (2022). Neuroanatomy, Circle of Willis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Rubaiy, H. N. (2016). The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels. *Acta Pharm*, 66(1), 23-34.
- Sá-Pereira, I., Brites, D., and Brito, M. A. (2012). Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol Neurobiol*, 45(2), 327-347.
- Salom, J. B., Burguete, M. C., Pérez-Asensio, F. J., Torregrosa, G., and Alborch, E. (2001). Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(4), 422-429.
- Savage, J. C., Carrier, M., and Tremblay, M. (2019). Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol Biol*, 2034, 13-26.
- Schreihöfer, D. A., and Ma, Y. (2013). Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? *Brain Res*, 1514, 107-122.
- Sepúlveda, F. V., Pablo Cid, L., Teulon, J., and Niemeyer, M. I. (2015). Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K+-transport channels. *Physiol Rev*, 95(1), 179-217.
- Sharma, N., Bhattarai, J. P., Hwang, P. H., and Han, S. K. (2013). Nitric oxide suppresses L-type calcium currents in basilar artery smooth muscle cells in rabbits. *Neurol Res*, 35(4), 424-428.

- Shen, X. Y., Gao, Z. K., Han, Y., Yuan, M., Guo, Y. S., and Bi, X. (2021). Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci*, *15*, 755955.
- Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G., and He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *319*(3), H613-h631.
- Singh, H., Lu, R., Bopassa, J. C., Meredith, A. L., Stefani, E., and Toro, L. (2013). MitoBK(Ca) is encoded by the *Kcnma1* gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(26), 10836-10841.
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol*, *41*(9), 758-770.
- Stewart, J. M., Medow, M. S., DelPozzi, A., Messer, Z. R., Terilli, C., and Schwartz, C. E. (2013). Middle cerebral O₂ delivery during the modified Oxford maneuver increases with sodium nitroprusside and decreases during phenylephrine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *304*(11), H1576-1583.
- Stirone, C., Boroujerdi, A., Duckles, S. P., and Krause, D. N. (2005). Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol Pharmacol*, *67*(1), 105-113.
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*, *1003*, 71-91.
- Su, X., Huang, L., Qu, Y., Xiao, D., and Mu, D. (2019). Pericytes in Cerebrovascular Diseases: An Emerging Therapeutic Target. *Front Cell Neurosci*, *13*, 519.
- Suzuki, S., Gerhold, L. M., Böttner, M., Rau, S. W., Dela Cruz, C., Yang, E., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A. B., Kindy, M. S., Merchenthaler, I., Gage, F. H., and Wise, P. M. (2007). Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol*, *500*(6), 1064-1075.
- Tang, H., Zhang, Q., Yang, L., Dong, Y., Khan, M., Yang, F., Brann, D. W., and Wang, R. (2014). GPR30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol*, *387*(1-2), 52-58.
- Tano, J. Y., and Gollasch, M. (2014). Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. *Front Physiol*, *5*, 381.
- Tewari, V. K., Bhosale, V., Shukla, R., Gupta, H. K. D., and Sheeba. (2017). Intracarotid Sodium Nitroprusside on Fifth Post Ischemic Stroke Day in Middle Cerebral Artery Occlusion Rat Model. *J Clin Diagn Res*, *11*(8), Afo1-af04.
- Tognatta, R., and Miller, R. H. (2016). Contribution of the oligodendrocyte lineage to CNS repair and neurodegenerative pathologies. *Neuropharmacology*, *110*(Pt B), 539-547.

- Torres-Hernández, A. R., and González-Vegas, J. A. (2005). Effects of 17beta-estradiol on the spontaneous activity of substantia nigra neurons: evidence for a non-genomic mechanism. *Brain Res*, 1049(1), 1-7.
- Tran, Q. K. (2020). Reciprocity Between Estrogen Biology and Calcium Signaling in the Cardiovascular System. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 568203.
- Tu, J., and Jufri, N. F. (2013). Estrogen signaling through estrogen receptor beta and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in human cerebral vascular endothelial cells: implications for cerebral aneurysms. *Biomed Res Int*, 2013, 524324.
- Ureña, J., Fernández-Tenorio, M., Porrás-González, C., González-Rodríguez, P., Castellano, A., and López-Barneo, J. (2013). A new metabotropic role for L-type Ca(2+) channels in vascular smooth muscle contraction. *Curr Vasc Pharmacol*, 11(4), 490-496.
- Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E., and Xu, Q. (2015). Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol*, 593(14), 3013-3030.
- Wang, L., Xiong, X., Zhang, L., and Shen, J. (2021). Neurovascular Unit: A critical role in ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther*, 27(1), 7-16.
- Wang, X. S., Yue, J., Hu, L. N., Tian, Z., Zhang, K., Yang, L., Zhang, H. N., Guo, Y. Y., Feng, B., Liu, H. Y., Wu, Y. M., Zhao, M. G., and Liu, S. B. (2019). Activation of G protein-coupled receptor 30 protects neurons by regulating autophagy in astrocytes. *Glia*, 68(1), 27-43.
- Wise, P. M., Dubal, D. B., Wilson, M. E., Rau, S. W., and Liu, Y. (2001). Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. *Front Neuroendocrinol*, 22(1), 33-66.
- Xia, X., Zhou, C., He, X., Liu, C., Wang, G., and Sun, X. (2020). The relationship between estrogen-induced phenotypic transformation and proliferation of vascular smooth muscle and hypertensive intracerebral hemorrhage. *Ann Transl Med*, 8(12), 762.
- Xiao, M., Li, Q., Feng, H., Zhang, L. and Chen, Y. (2017). Neural Vascular Mechanism for the Cerebral Blood Flow Autoregulation after Hemorrhagic Stroke. *Neural Plast*, 2017, 5819514.
- Xing, Y., and Bai, Y. (2020). A Review of Exercise-Induced Neuroplasticity in Ischemic Stroke: Pathology and Mechanisms. *Mol Neurobiol*, 57(10), 4218-4231.
- Yamada, K. (2016). Vascular potassium channels in NVC. *Prog Brain Res*, 225, 63-73.
- Yang, C., Hawkins, K. E., Doré, S., and Candelario-Jalil, E. (2019). Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*, 316(2), C135-c153.

- Yang, J., Clark, J. W., Jr., Bryan, R. M., and Robertson, C. (2003). The myogenic response in isolated rat cerebrovascular arteries: smooth muscle cell model. *Med Eng Phys*, 25(8), 691-709.
- Yang, S., Jin, H., Zhu, Y., Wan, Y., Opoku, E. N., Zhu, L., and Hu, B. (2017). Diverse Functions and Mechanisms of Pericytes in Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol*, 15(6), 892-905.
- Yao, X., Wu, Y., Zhu, M., Qian, H., and Chen, Y. (2015). Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate inducers sodium nitroprusside and L-arginine inhibit the proliferation of gastric cancer cells via the activation of type II cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase. *Oncol Lett*, 10(1), 479-484.
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., and Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol*, 16(1), 4-20.
- Yu, G. X., Mueller, M., Hawkins, B. E., Mathew, B. P., Parsley, M. A., Vergara, L. A., Hellmich, H. L., Prough, D. S., and Dewitt, D. S. (2014). Traumatic brain injury in vivo and in vitro contributes to cerebral vascular dysfunction through impaired gap junction communication between vascular smooth muscle cells. *J Neurotrauma*, 31(8), 739-748.
- Zhang, J. H., Badaut, J., Tang, J., Obenaus, A., Hartman, R., and Pearce, W. J. (2012). The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology. *Nat Rev Neurol*, 8(12), 711-716.
- Zhang, S., Shang, D., Shi, H., Teng, W., and Tian, L. (2021). Function of Astrocytes in Neuroprotection and Repair after Ischemic Stroke. *Eur Neurol*, 84(6), 426-434.
- Zhao, T. Z., Ding, Q., Hu, J., He, S. M., Shi, F., and Ma, L. T. (2016). GPER expressed on microglia mediates the anti-inflammatory effect of estradiol in ischemic stroke. *Brain Behav*, 6(4), e00449.
- Zhao, T. Z., Shi, F., Hu, J., He, S. M., Ding, Q., and Ma, L. T. (2016). GPER1 mediates estrogen-induced neuroprotection against oxygen-glucose deprivation in the primary hippocampal neurons. *Neuroscience*, 328, 117-126.
- Zhou, B., Zuo, Y. X., and Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*, 25(6), 665-673.

