

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17 B-ESTRADIOL SOBRE A
EXPRESSÃO GÊNICA DA CONEXINA40 E SUAS IMPLICAÇÕES NA
PROPAGAÇÃO DA ATIVIDADE ELÉTRICA CARDÍACA**

DÉBORA BARBOSA AMARANTE

2016



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17 B-ESTRADIOL SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA
DA CONEXINA40 E SUAS IMPLICAÇÕES NA PROPAGAÇÃO DA ATIVIDADE
ELÉTRICA CARDÍACA**

DÉBORA BARBOSA AMARANTE

Sob a Orientação da Professora

Norma Aparecida dos Santos Almeida

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia.

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016**

616.12

A485a

T

Amarante, Débora Barbosa, 1984-

Avaliação do efeito do 17 β -estradiol sobre a expressão gênica da conexina40 e suas implicações na propagação da atividade elétrica cardíaca / Débora Barbosa Amarante. - 2016.

xi, 48 f.: il.

Orientador: Norma Aparecida dos Santos Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

Bibliografia: f. 38-48.

1. Coração - Doenças - Tratamento - Teses. 2. Batimento cardíaco - Teses. 3. Benzoato de estradiol - Teses. 4. Eletrocardiografia - Teses. 5. Regulação de expressão gênica - Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Almeida, Norma Aparecida dos Santos, 1976-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DÉBORA BARBOSA AMARANTE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em (Fisiologia e Farmacologia).

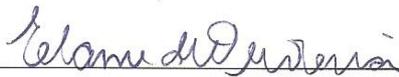
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/2016



Prof.^a. Dr.^a. Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno – PPGCF/UFRRJ, CPF: 07234019774; Orientadora)



Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Membro Interno – PPGCF/UFRRJ /UEZO, CPF:07512862733)



Prof.^a. Dr.^a. Elaine de Oliveira (Membro Externo – UERJ, CPF: 08069672773)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido esposo, Alessandro. Por todo incentivo, dedicação; por estar ao meu lado nas horas difíceis e felizes; e por me encorajar a realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Obrigada pai, por tudo que o senhor fez e faz por mim. Se cheguei até aqui é porque tenho sua presença em minha vida.

Ao meu esposo Alessandro, por todo cuidado, amor e dedicação.

Agradeço a minha irmã Elaine e meu cunhado Marcelo, que me apóiam sempre em tudo que eu faço. Amo vocês.

A todos os familiares que torcem por mim, tios, tias, primos e primas. Em especial, a minha querida prima, Marília, que me incentivou e me mostrou o caminho para o mestrado. Você é muito importante em minha vida.

A minha orientadora Norma Aparecida dos Santos Almeida, por ter confiado desde o primeiro momento que eu seria capaz de realizar este trabalho. Obrigada pela oportunidade, confiança e pelos inúmeros ensinamentos que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

A Prof^ª. Dra. Carmen Cabanelas Pazos Moura, responsável pelo Laboratório de Endocrinologia Molecular do IBCCF/UFRJ, pelo exemplo de profissional e pela colaboração no projeto.

A Dra. Larissa Faustino, pela participação nos experimentos *in vitro*.

A Suelen Guedes, que compartilhou comigo toda sua experiência em técnicas de laboratório, por todos os ensinamentos e sua grande ajuda durante todo o mestrado.

A Tainá Moraes, por toda sua dedicação e auxílio nos experimentos que participamos.

Aos irmãos científicos, tão importantes para que este trabalho fosse concluído. Suelen Guedes, Tainá Moraes, Nathália, Matheus, Luis Felipe, Fabiana, Rômulo e Selma. Obrigada por todo o apoio e dedicação de vocês.

A todos os professores do DCF, que com amor e dedicação proporcionaram-me rica experiência neste processo de ensino-aprendizagem.

Agradeço a Mariana, Fabrício, Caio e George, que me receberam muito bem no laboratório. Aprendi muito através do exemplo de cada um de vocês.

As "Fifetes", Joyce, Livia e Gabriela. Vocês tornaram mais "leve" o mestrado. Obrigada pelas risadas, pelos papos na sorveteria, pelos estudos via Skype e pelos ombros sempre prontos nos momentos difíceis. Vou levá-las para sempre em meu coração.

A todos os alunos do DCF. Em especial, a Verônica, Bruno, Raoni, Raquel, Carla, Carla Duque, Claudinho, Nayana, Iracema, Maressa, Míriam e Fabrícia pela motivação e companheirismo durante o curso.

Agradeço a todos os meus amigos, que são a família que eu pude escolher.

Obrigada, Ivana, Dani e Arthur, Pâmela, Fernanda, Rodrigo e Viviane pela torcida de vocês.

Aos amigos do Colégio Estadual Pau D'Alho de Volta Redonda. Em especial à Iracema Belarmina de Freitas Nogueira, por toda confiança, ajuda e compreensão; e a amiga Samantha, por sua amizade e apoio neste último ano do mestrado.

RESUMO

Amarante, Débora Barbosa. **Avaliação do efeito do 17 β -estradiol sobre a expressão gênica da Conexina40 e suas implicações na propagação da atividade elétrica cardíaca.** 2016. 66 p. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016

O 17 β -estradiol (E2), regula muitos genes cardíacos através de seu receptor (receptor para estrógeno, RE). A propagação da atividade elétrica no miocárdio depende da transferência de corrente através das junções comunicantes. As conexinas 40 (Cx40) e 43 são as principais conexinas que formam as junções expressas no coração. Em camundongos, a Cx40 é restrita ao átrio e sistema de condução. Alterações na expressão ou atividade da Cx40 estão associadas a fibrilação atrial. Aqui nós avaliamos o efeito do E2 *in vitro* e *in vivo* sobre a expressão do RNAm da Cx40 nos átrios e correlacionamos aos estudos eletrocardiográficos (ECG). Nós tratamos a linhagem A7r5 (derivada de músculo liso aórtico de rato embrionário) com alta e baixa concentrações de benzoato de estradiol, BE, (10^{-6} M e 10^{-8} M) durante 24 horas e cultura primária de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos foram incubados com BE 10^{-6} M durante 2, 4 e 8 horas. Ensaios de transfecção transiente foram realizados na linhagem A7r5 com um plasmídeo contendo um segmento da região promotora da Cx40 (-1190/+121Cx40LucpGL3) e tratadas com 10^{-6} M de BE durante 24 horas. Camundongos fêmeas foram ovariectomizadas (OVX) e então tratadas com baixa (2 microgramas) e alta (20 microgramas) doses de benzoato de estradiol (OVX+BE2 e OVX+BE20) durante 15 dias, sendo que o grupo controle sofreu apenas estresse cirúrgico (FO). Foram realizados registros ECG e a expressão atrial do RNAm da Cx40 foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Nós observamos que altas doses de BE diminuí a expressão do RNAm da Cx40 *in vitro* (na linhagem A7r5 e na cultura de cardiomiócitos). A atividade transcricional do promotor foi inibida por BE 10^{-6} M. Nós observamos diminuição da frequência cardíaca dos animais do grupo OVX em relação ao controle, grupo FO. Nenhuma diferença foi observada na frequência cardíaca entre os grupos OVX+BE2 e OVX+BE20. Os animais do grupo OVX apresentaram diminuição na duração da onda P em relação ao grupo FO, no entanto nenhuma diferença foi observada na duração da onda P entre os outros grupos. Nenhuma diferença foi observada nos outros intervalos eletrocardiográficos entre os grupos experimentais. A expressão atrial do RNAm da Cx40 estava reduzida nos animais do grupo OVX+BE20 em relação ao grupo FO. Nossos dados demonstram que altas doses de benzoato de estradiol reduzem a expressão do RNAm da Cx40 *in vitro* e em camundongos ovariectomizados. Nós propomos que altas doses de E2 ativa o seu receptor, e o complexo RE-E2 age diretamente no DNA, inibindo a atividade transcricional do promotor da Cx40.

Palavras-chaves: RNAm da Conexina40, benzoato de estradiol, ECG, coração e camundongo.

ABSTRACT

Amarante, Débora Barbosa. **Evaluation of the effect of 17 β -estradiol on the gene expression of Connexin40 and its implications for the spread of cardiac electrical activity.** 2016. 66 p. Dissertation. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016

The 17 β -estradiol (E2) regulate many cardiac genes via its estrogen receptor (ER). The propagation of electrical activity in the myocardium depends on the current transfer at gap junctions. Connexins 40 (Cx40) and 43 are the predominant junctional proteins. In mice, Cx40 is restricted to the atrium and conduction system. Alterations of Cx40 expression or activity are associated with atrial fibrillation. Here we evaluate the effect of the E2 on Cx40 mRNA expression, *in vitro*, and *in vivo* the effect on atrium expression of Cx40 mRNA in correlation to ECG studies. We treated A7r5 cells (smooth muscle cells from rat thoracic aorta) with low and high doses of estradiol benzoate, EB, (10^{-8} M and 10^{-6} M) for 24h and rat neonatal cardiomyocytes with EB 10^{-6} M for 2, 4 and 8 hours. A7r5 cells were transiently transfected with 0.5 microgramas of the test plasmid (-1190/+121Cx40Luc pGL3) and treated with 10^{-6} M of EB for 24 hours. Female mice were subjected to ovariectomy (OVX) and then, treated with a low (2 μ g) and a high dose (20 μ g) of estradiol benzoate (EB; OVX+EB2 and OVX+EB20) for 15 days. ECG recordings were obtained from mice and atrium Cx40 mRNA expression were evaluated by RT-PCR real time. First, we observed that high doses of EB down regulated Cx40 mRNA *in vitro* (A7r5 cells and rat atrial cardiomyocytes). The transcriptional activity of Cx40 promoter was inhibited by 10^{-6} M of EB in A7r5 cells. We observed lower heart rate for OVX animals when compared to control animals, FO. In this regard, no difference was observed between OVX+EB2 and OVX+EB20 heart rate. The OVX group showed decrease P wave duration when compared to FO group, but no difference in the P wave duration was observed among the others groups. No difference was observed in another ECG intervals among the experimental groups. The atrial Cx40mRNA level was reduced in OVX+EB20 group when compared to FO group. Our data indicate, for the first time, high doses of estradiol benzoate reduce Cx40 mRNA *in vitro* and ovariectomized mice. We proposed that when E2 levels are high, the complex ER-E2 acts directly from the DNA, inhibiting the transcriptional activity of Cx40 promoter.

Key words: Connexin40 mRNA, estradiol benzoate, ECG, heart and mouse.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg:	_____	micrograma
µL:	_____	microlitro
A7r5:	_____	linhagem celular derivada de músculo liso aórtico de rato embrionário
Akt:	_____	proteína quinase serina/treonina
ANGI:	_____	enzima conversora de angiotensina I
ANGII:	_____	angiotensina II
ATP:	_____	trifosfato de adenosina
bpm:	_____	batimentos por minuto
BWEM:	_____	linhagem celular derivada de cardiomiócito de rato embrionário
cDNA:	_____	fita de DNA complementar
CMV-pRL:	_____	plasmídeo contendo o gene renila direcionado pelo promotor do citomegalovirus.
CoRegs:	_____	proteínas co-reguladoras recrutadas
Cx:	_____	conexina
DMEM:	_____	Dulbecco's modified Eagle's médium
DNA:	_____	ácido desoxirribonucléico
E1:	_____	estrona
E2:	_____	17 β-estradiol
E3:	_____	estriol
EBP:	_____	proteínas adaptadoras da membrana plasmática
ECA2:	_____	enzima conversora de angiotensina do tipo 2
ECG:	_____	eletrocardiograma
NOS:	_____	óxido nítrico sintase
ERE:	_____	elemento responsivo ao estrogênio
ET-1:	_____	endotelina-1
FA:	_____	fibrilação atrial
FC:	_____	Frequência Cardíaca
FO:	_____	falsa operada
g:	_____	grama
GPER:	_____	receptor de estrogênio acoplado à proteína G
HDL:	_____	lipoproteína de alta densidade
HeM:	_____	heteroméricos
HeT:	_____	canal heterotípico
HoM:	_____	homoméricos
HoT:	_____	canal homotípico
I_{CaL}:	_____	canal de cálcio do tipo L
IBCCF:	_____	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
IGF-1R:	_____	interação com receptores de membrana
Ip:	_____	intraperitoneal
JC:	_____	junções comunicantes
JNK:	_____	quinase c-Jun
kDa:	_____	kilodalton
kg:	_____	quilograma
LDL:	_____	lipoproteína de baixa densidade
M:	_____	molar
MAPK:	_____	proteína quinase ativada por mitógeno
mg:	_____	miligrama
mL:	_____	mililitro

mM: _____ milimolar
MMP: _____ metaloproteinase
MMP-2: _____ metaloproteinase do tipo 2
ms: _____ milissegundos
MSRE: _____ Moduladores seletivos do receptor de estrogênio
mV: _____ milivolts
NaCl: _____ cloreto de sódio
NADPH: _____ Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NAV: _____ nodo atrioventricular
nM: _____ nanomolar
NO: _____ óxido nítrico
OVX: _____ ovariectomia
OVX+BE2: _____ ovariectomizadas tratadas com 2 µg de benzoato de estradiol.
OVX+BE20: _____ ovariectomizadas tratadas com 20 µg benzoato de estradiol
pc: _____ peso corporal
PI3K: _____ proteína fosfatidilinositol 3 quinase
PKA: _____ proteína quinase A
PKC: _____ proteína quinase C
pmol: _____ picomol
PP1 β: _____ fosfatase 1β
q-PCR: _____ Real-time polymerase chain reaction
RAS: _____ sistema renina-angiotensina
RE: _____ receptores de estrogênio
REN: _____ retículo endoplasmático
REα: _____ receptor de estrogênio do tipo α
REβ: _____ receptor de estrogênio do tipo β
RNA: _____ ácido ribonucléico
RNA_m: _____ RNA mensageiro
ROS: _____ espécie reativa de oxigênio
RTEF-1: _____ transcription enhancer factor-1 – related factor
SERMs: _____ moduladores seletivos dos receptores de estrogênio
SKHep1: _____ células derivadas de adenocarcinoma hepático humano
SP-1: _____ proteína de especificidade 1
Sp3: _____ proteína de especificidade 3
SPN: _____ polimorfismos de nucleotídeo único
TNF-α: _____ fator de necrose tumoral alfa
TR: _____ receptor tireoideano
TRE: _____ elemento responsivo ao hormônio tireoideano
UFRJ: _____ Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ: _____ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UDP: _____ glucuronosil transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Biossíntese de Estrogênios (Adaptado de Katzung, 1998 e Gruber <i>et al.</i>, 2002)	2
Figura 2 - Modelos de Ação do Estrogênio (Adaptada de Deroo e Korach, 2006)	4
Figura 3 - Representação Esquemática da Ação Estrogênica na Cardiomiócitos (Konhilas, 2007)	7
Figura 4 - Modelo Topológico das Conexinas (Kumar e Gilula, 1996)	8
Figura 5 - Desenho esquemático dos possíveis arranjos dos conexons para formar os canais juncionais (Kumar e Gilula, 1996)	9
Figura 6 - Modelo Esquemático representando o ciclo de vida de uma conexina (Adaptado de Segretain e Falk, 2004)	10
Figura 7 - Esquema Ilustrativo do Modelo Experimental	19
Figura 8 - Esquema Representativo do Registro Eletrocardiográfico de um Camundongo Fêmea do Grupo FO aos 3 Meses de Idade	21
Figura 9 - Expressão do RNAm da Conexina40 em Células A7r5 Tratadas com BE10⁻⁸ e 10⁻⁶ M após 24 h de Incubação	24
Figura 10 - Expressão do RNAm da Conexina40 em Cardiomiócitos Atriais de Ratos Neonatos Tratados com BE10⁻⁶ M após 2h, 4h e 8h de Incubação	25
Figura 11 - Células da Linhagem A7r5 Transfectadas com a Construção -1190/+121Cx40 Luc e Tratadas com BE na Concentração10⁻⁶ M Durante 24 horas	26
Figura 12- Eletrocardiograma representativo de camundongos fêmeas não anestesiadas	30
Figura 13 - Expressão do RNAm da Conexina40 no Átrio dos Animais Após 15 Dias de Tratamento	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições da Reação de PCR em Tempo Real para os Iniciadores Específicos	23
Tabela 2- Média de peso Corporal dos animais no Início e ao Final do Tratamento	27
Tabela 3- Média do Peso dos Tecidos de Camundongos Fêmeas após 15 Dias de Tratamento	28
Tabela 4- Análise Eletrocardiográfica de Camundongos Fêmeas após 15 dias de Tratamento	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estrógenos.....	1
1.2 Mecanismo de Ação do Estrógenos.....	2
1.3 Efeitos do Estrógeno.....	4
1.4 Efeitos do Estrógenos no Sistema Cardiovascular.....	5
1.5 Junções Comunicantes.....	7
1.5.1 Regulação do acoplamento da junção comunicante.....	9
1.5.2 Junções comunicantes no coração.....	10
1.6 Conexina40 no Coração.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Cultura de Células.....	17
3.1.1 Tratamento da linhagem celular com benzoato de estradiol.....	17
3.2 Cultura de Células Primárias de Cardiomiócitos Atriais de Ratos Neonatos.....	17
3.3 Transfecção do Segmento do Promotor.....	18
3.4 Animais.....	18
3.4.1 Desenho experimental.....	18
3.4.2 Ovariectomia e tratamento com benzoato de estradiol.....	19
3.4.3 Avaliação eletrocardiográfica.....	20
3.5- Análise da Expressão do RNAm da Conexina40.....	21
3.5.1- Extração do RNA total.....	21
3.5.2 Transcrição reversa.....	22
3.5.3 PCR em tempo real.....	22
3.6 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Avaliação da Expressão do RNAm da Conexina40 em Cultura de Células Imortalizadas (A7r5) Tratadas com Benzoato de Estradiol.....	24

4.2 Efeito do Benzoato de Estradiol sobre a Expressão do RNAm da Conexina40 em Cultura de Células Primárias de Cardiomiócitos Atriais de Ratos Neonatos.....	25
4.3 Ensaio de Transfecção Transiente da Construção do Segmento do Promotor da Cx40, -1190/+121 Cx40Luc, na Linhagem A7r5 Tratada com Benzoato de Estradiol.....	26
4.4. Acompanhamento do Peso Corporal e Avaliação dos Tecidos, Cardíaco e Uterino, após o Tratamento dos Animais com Benzoato de Estradiol.....	26
4.5 Avaliação Eletrocardiográfica de Camundongos Fêmeas após 15 Dias de Tratamento com Benzoato de Estradiol.....	28
4.6 Avaliação da Expressão do RNAm da Cx40 em Camundongos Fêmeas após 15 Dias de Tratamento com Benzoato de Estradiol.....	30
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrógenos

Os estrógenos são hormônios sintetizados nos ovários, testículos e glândulas adrenais. Derivados do colesterol, a estrutura destes é formada por um núcleo esteroidal constituído por dezoito moléculas de carbono. Os estrógenos endógenos incluem o 17 β -estradiol (E2), a estrona (E1) e o estriol (E3), sendo o estradiol o principal estrógeno secretado pelos ovários (Gruber *et al.*, 2002). Sistema nervoso central, tecido adiposo e próstata também são algumas das regiões que sintetizam estradiol.

Os estrógenos são formados a partir do colesterol, que se liga a receptores lipoprotéicos e é captado por células esteroideogênicas, sendo levado aos sítios de síntese de esteróides (Nelson *et al.*, 2000). Diferentes hormônios esteróides são sintetizados pela clivagem da cadeia lateral que se projeta do anel D do colesterol, reduzindo o número dos átomos de carbono de 27 para 18. Este processo intercorre nas mitocôndrias de tecidos produtores de hormônios esteróides, sendo que, o passo limitante na produção destes esteróides é a transferência do colesterol do citosol para a membrana interna mitocondrial (Nelson *et al.*, 2000). As reações de hidroxilação e oxigenação ocorrem durante a biossíntese de esteróides e são catalisadas por oxidases de função mista (citocromo P450 mitocondrial), que utilizam NADPH e O₂ (Nelson *et al.*, 2000).

O último passo no processo de formação de estrógenos é a aromatização. Esta é catalisada pelas aromatases do complexo enzimático citocromo P450 (CYP450), que funcionam como desmetilases e se encontram no retículo endoplasmático liso (Gruber *et al.*, 2002). Essa etapa converte testosterona em estradiol, androstenodiona em estrona e 16 α -hidroxiestrona em estriol (Meinhardt e Mullis, 2002), como demonstrado na figura 1.

As células da teca e as células granulosas dos ovários são fontes primárias de estradiol. As células da teca secretam andrógenos, que se difundem para as células granulosas onde, sob ação das aromatases, são transformadas em estrógenos. A estrona e o estriol são sintetizados no fígado e nos ovários a partir do estradiol (Gruber *et al.*, 2002 e Klaassen, 2001).

Por suas características hidrofóbicas, os hormônios esteróides são transportados por proteínas carreadoras específicas dos órgãos produtores até seus respectivos tecidos alvos e passam para o meio intracelular por difusão simples onde se ligam aos receptores nucleares (Gruber *et al.*, 2002).

Cerca de 2 a 3 % do estradiol total é encontrado livre no plasma. Este se liga de modo reversível a uma β -globulina, ligante de hormônios esteróides, e com menos afinidade a albumina (Gruber *et al.*, 2002).

De acordo com Blom e colaboradores (2001), os estrógenos são metabolizados por sulfotransferases (sulfatação) ou pela UDP- glucuronosil transferase (glucuronidação), e os conjugados são excretados pela bile e na urina. A hidrólise desses conjugados pela microbiota intestinal possibilita a reabsorção do estrogênio, resultando em uma recirculação entero-hepática.

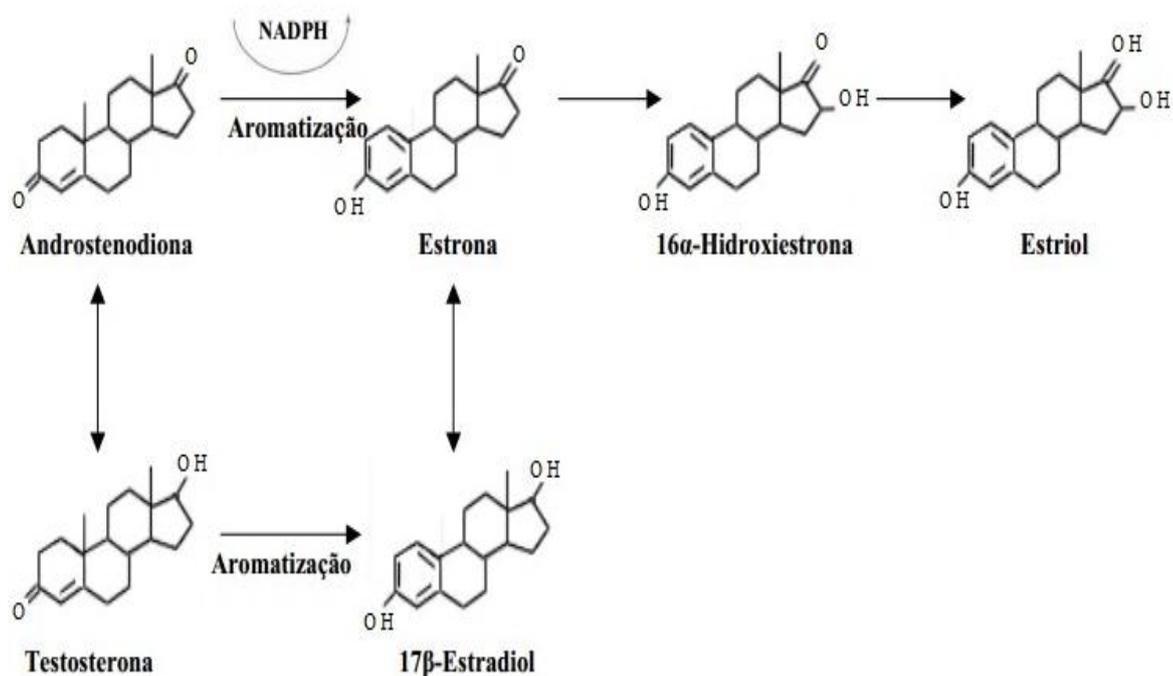


Figura 1- Biossíntese de Estrógenos (Adaptado de Katzung, 1998 e Gruber et al., 2002). Androstenediona e testosterona são os precursores obrigatórios de estrógenos. A aromatase do complexo enzimático citocromo P450 catalisa a conversão de estrógenos e converte testosterona em estradiol, androstenediona em estrona e 16α-hidroxiestrona em estriol. Neste processo três moléculas de NADPH são utilizadas.

1.2 Mecanismo de Ação do 17β-Estradiol

Por apresentar características lipofílicas e baixo peso molecular, o 17β-estradiol atravessa facilmente a membrana celular (Österlund e Hurd, 2001). Este exerce suas ações biológicas, que podem ser genômicas e não-genômicas, através de sua interação com seus receptores. A ligação do E2 com seu receptor desencadeia mudanças conformacionais que regulam sua atividade, sua interação com outras proteínas e com o DNA (Katzenellenbogen, 2000).

Os receptores de estrógenos (RE) inicialmente descritos foram o receptor de estrógeno α (REα) e o receptor de estrógeno β (REβ), que pertencem à superfamília dos receptores nucleares (Prossnitz e Barton, 2011). Esses são receptores intracelulares e possuem várias propriedades em comum, tais como: a localização nuclear e a ligação à sequência específica de DNA (Matthews e Gustafsson, 2003). A definição clássica de que os ERs estão presentes somente no citoplasma mudou, já que foi demonstrado que os receptores ERα e ERβ também podem estar localizados na membrana plasmática através de três mecanismos: associação com a caveolina-1, interação com receptores de membrana (IGF-1R) e modificação pós-translacional do receptor com ácido palmítico (Acconcia e Marino, 2011).

Nos últimos anos, foi descoberto o receptor de estrógeno, acoplado à proteína G (GPER), localizado na membrana plasmática ou adjacente. Este está envolvido com os efeitos não-genômicos do E2, sendo capaz de mediar às ações deste hormônio em vários sistemas, como: sistema imunológico, sistema nervoso, sistema renal, do sistema vascular, e o sistema reprodutor (Prossnitz e Barton, 2011).

O RE α e RE β são codificados por genes diferentes, *Esr1* e *Esr2* respectivamente, que são encontrados em diferentes cromossomos (Koehler *et al.*, 2005). Estes genes codificam variadas isoformas, e suas concentrações nos tecidos definem as respostas ao hormônio (Matthews e Gustafsson, 2003; Zhao *et al.*, 2008; Dornstauder *et al.*, 2001). Já foram descritas cinco variantes de RE β : hER β 1, hER β 2, hER β 3, hER β 4 e hER β 5 (Moore *et al.*, 1998). Outras substâncias podem se ligar seletivamente aos REs, como fitoestrógenos e moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) (Signoretti e Loda, 2001). Os REs interagem com diversas proteínas correguladoras que se intercalam entre o receptor ativado e a maquinaria transcripcional. Os complexos formados por REs - fatores de transcrição e proteínas coativadoras e co-repressoras - modulam a capacidade transcripcional do gene. Estudos indicam que proteínas coativadoras possuem maior capacidade de aumentar a atividade transcripcional dos REs, enquanto que as correpressoras interagem com receptores agonistas ou antagonistas, e também competem com as proteínas coativadoras (Gruber *et al.*, 2002).

Os receptores de estrogênio RE α e RE β apresentam padrões de expressão diferentes nos diversos tecidos do corpo humano (Kuiper *et al.*, 1996 e Mosselman *et al.*, 1996). O RE β possui alta expressão na próstata e ovário (Mosselman *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 1997) e expressão moderada nos testículos e útero, tecidos estes que também expressam RE α (Kuiper *et al.*, 1997). Os RE α e β também são expressos em células endoteliais e na musculatura lisa; nos cardiomiócitos e fibroblastos (Grohé *et al.*, 1997).

No citoplasma, o receptor interage com proteínas cinase entre outras moléculas que regulam a sinalização celular e causam alterações rápidas no metabolismo, caracterizando o efeito não-genômico do E2. No núcleo, os ER atuam como fatores transcripcionais capazes de modular a transcrição gênica, provocando efeito genômico conhecido também por mecanismo de ação clássico do E2 (Cheskis *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que, os RE α e RE β podem formar heterodímeros ou homodímeros, tornando bastante complexa a definição da sua função, individual ou combinada, dentro da célula (Herynk e Fuqua, 2004). A figura 2 resume os diferentes mecanismos de ação do estrógeno.

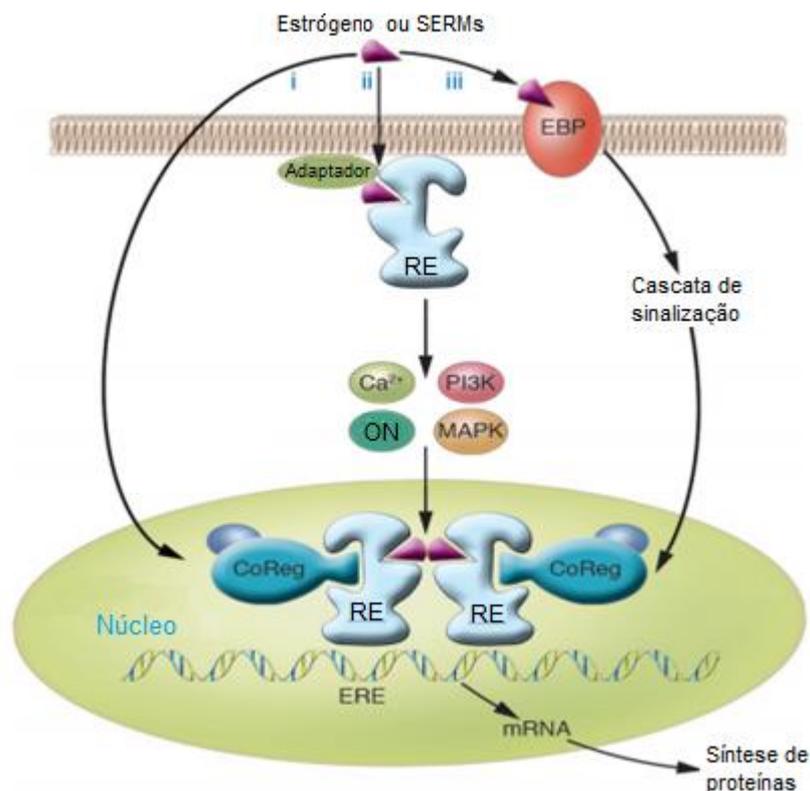


Figura 2- Modelo de ação do estrógeno (Adaptada de Deroo & Korach, 2006). (I) Mecanismo clássico ou genômico: O estrógeno, ou SERMs, liga-se ao RE que é um fator de transcrição ativado por ligante, que regula a transcrição de genes alvos no núcleo pela interação com o elemento responsivo ao estrogênio (ERE). Essa ação corresponde a uma sequência regulatória nos genes alvos e com proteínas co-reguladoras recrutadas (CoRegs), como coativadores; (II) Efeito do estrogênio rápido ou não genômico: O efeito “não-genômico” dos estrógenos pode também ocorrer através do RE situado na membrana plasmática ou adjacente a esta, podendo requerer a presença de proteínas “adaptadoras” que direcionam o RE para a membrana. A ativação do RE de membrana leva a uma rápida mudança na sinalização de moléculas celulares e a uma estimulação da atividade cinase, que pode afetar a transcrição gênica; (III) Outras proteínas não-RE ligantes, se associadas à membrana (EBPs), podem também disparar uma resposta intracelular. (Adaptor: proteínas adaptadoras; EBP: proteínas da membrana plasmática que ligam estrogénos; ERE: “elemento de resposta ao estrogénio”; CoRegs: proteínas coreguladoras; MSRE: Moduladores seletivos do receptor de estrógeno; RE: Receptor dos estrógeno).

1.3 Efeitos do Estrógeno

O estrógeno tem ações em diferentes sistemas e órgãos, regulando diversos processos fisiológicos em tecidos-alvo, principalmente em órgãos do sistema reprodutivo nos quais desempenham importante papel na diferenciação sexual, na regulação da fertilidade e no crescimento e desenvolvimento desses tecidos (Gruber, 2002).

Os estrógenos são agentes vasoprotetores naturais, pois protegem contra a arteroesclerose e reduzem o tônus vascular da musculatura lisa (White *et al.*, 1995). O papel dos estrógenos na manutenção da integridade óssea é comprovado pelo aumento da susceptibilidade a fraturas (osteoporose), que ocorre principalmente a partir da menopausa em decorrência da deficiência deste hormônio. Além disso, os estrógenos podem atuar no sistema nervoso central (Naftolin *et al.*, 1990 e Garcia *et al.*, 1999) e na pele (Schmidt *et al.*, 1996).

Estrógenos são ainda conhecidos como potentes agentes mitogênicos e regulam a proliferação celular no útero e mama, entre outros órgãos-alvo (Kovács *et al.*, 2001).

Os sistemas cardiovascular (Barret-Connor e Bush, 1991), esquelético (Migliaccio *et al.*, 1992), entre outros, são alvos de estrógenos endógenos. Seus efeitos no sistema cardiovascular serão descritos a seguir.

1.4 Efeitos do estrógeno no sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular de homens e mulheres apresenta diferenças bem documentadas. Estudos epidemiológicos mostraram diferenças marcantes entre machos e fêmeas sobreviventes à insuficiência cardíaca (Simon *et al.*, 2001). As incidências de hipertrofia do ventrículo esquerdo, infarto do miocárdio e doenças coronarianas são menos comuns em mulheres na fase pré-menopausa e o prognóstico para mulheres é melhor do que para homens com Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) causada por doenças não-isquêmicas (Simon *et al.*, 2001). Em pacientes idosos, com níveis similares de estenose aórtica, as mulheres apresentam a função cardíaca mais preservada do que os homens (Buttrick e Scheuer, 1992).

Os cardiomiócitos expressam receptores de estrógenos do tipo α e β , responsáveis pelos efeitos diretos deste hormônio no coração (Grohé, *et al.*, 1997).

Efeitos do 17 β -estradiol (E2) no sistema cardiovascular tem atribuído a este um papel cardioprotetor. Estudos demonstraram efeito benéfico deste hormônio sobre o metabolismo de lipídeos e a formação de placas de aterosclerose na parede das artérias (Hong *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1990), além de efeitos diretos na musculatura cardíaca. No metabolismo lipídico a ação do E2 se dá através da diminuição da lipoproteína de colesterol de baixa densidade (LDL) e o aumento dos níveis plasmáticos de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), promovendo vasodilatação coronária, melhorando os níveis plasmáticos de insulina e o metabolismo da glicose (Pelzer, *et al.*, 1996). O E2 estimula a liberação de óxido nítrico, através da estimulação da óxido nítrico sintase, o que confere a este efeito vasodilatador (Jiang *et al.*, 1991 e Lantin-Hermoso *et al.*, 1997)

Estudos demonstraram que o tratamento com estrógeno evita a apoptose e a necrose das células cardíacas e endoteliais. O estrógeno também atenua a hipertrofia cardíaca patológica e pode ter grande benefício no envelhecimento, como um agente anti-inflamatório (Nickenig *et al.*, 2000). A angiotensina II (Ang II) induz a hipertrofia cardíaca e fibrose no ser humano. O E2 pode modular a ação deste hormônio e seu efeito trófico sobre o miocárdio. Assim uma diminuição ou a perda de estrogênio promove o aumento da angiotensina II e conseqüentemente, a fibrose (Zhou *et al.*, 2007 e Pedram *et al.*, 2010). Além disso ele é capaz de diminuir a expressão do receptor AT₁ (Nickenig *et al.*, 2000).

A calcineurina é uma enzima chave envolvida no processo de hipertrofia cardíaca em doenças cardiovasculares. Vários estudos demonstram que o estrógeno aumenta a degradação da calcineurina através de uma via dependente do RE, e esta via parece ser ativada somente por ER β (Pedram *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2009). Perda de calcineurina inibe a sinalização do fator de transcrição, NFAT, que é o principal alvo da calcineurina, o que sugere que esta pode ser a principal via de inibição da hipertrofia por E2 (Pedram *et al.*, 2008 e Donaldson *et al.*, 2009). Em geral, tem sido observado que a ação do estrógeno, além de atenuar a hipertrofia cardíaca, tem efeitos positivos sobre o remodelamento cardíaco.

No coração o E2 parece ter um efeito inibitório sobre a expressão e ativação de metaloproteinases (MMP), enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular, reduzindo a fibrose no miocárdio (Mahmoodzadeh *et al.*, 2009). Mahmoodzadeh e colaboradores (2009) observaram a diminuição da expressão da metaloproteinase 2 (MMP-2) em ratas, por um efeito não genômico, mediado por sinalização rápida de ER α envolvendo

MAP quinase e ERK 1/2 por fosforilar Elk1, que atua como um repressor de transcrição de MMP-2.

Uma série de estudos indicam ainda que o estrogênio pode afetar diretamente as mitocôndrias do tecido cardíaco. Além da sua presença nos núcleos e membrana plasmática, RE α e RE β também se localizam nas mitocôndrias de alguns tipos celulares, tanto em machos quanto em fêmeas (Yang *et al.*, 2004). O E2 tem efeitos cardioprotetores após a lesão, sendo tal efeito atribuído por sua ação nas mitocôndrias (Yang *et al.*, 2004).

Dano mitocondrial é um evento crucial na patogênese da lesão celular isquêmica promovendo morte celular por apoptose (Yang *et al.*, 2004). Evidências recentes sugerem que a apoptose no coração isquêmico pode ser desencadeada por liberação de citocromo c das mitocôndrias, conduzindo à ativação de caspases (Yang *et al.*, 2004). O tratamento com E2 impediu a liberação de citocromo c das mitocôndrias de células cardíacas, induzida por alto teor de cálcio, mostrando que, em concentrações fisiológicas, os estrógenos não afetam a função respiratória mitocondrial. Este pode ser um dos mecanismos através do qual este hormônio preserva a viabilidade das células do miocárdio após isquemia ou reperfusão. (Morkūnienė *et al.*, 2002). O E2 reduziu a apoptose após hipóxia e reoxigenação atenuando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela inibição da fosforilação de p53 e translocação para a mitocôndria (Liu *et al.*, 2011).

A ativação do GPER com um agonista seletivo reduziu o tamanho do infarto cardíaco e melhorou a recuperação funcional em modelo de Langendorff. Este receptor ativa Akt e ERK 1/2, semelhante ao ER α (Simoncini *et al.*, 2000). Parece que, tanto RE α quanto RE β ativam PI3K e Akt, proteínas envolvidas na cascata de sinalização anti-apoptótica no coração de camundongos fêmeas (Wang *et al.*, 2009).

O 17 β -estradiol modula a eletrofisiologia e a função cardíaca (Capasso *et al.*, 1983). Na literatura é descrito que a ocorrência de fibrilação atrial é menor em mulheres e diferenças nos parâmetro eletrocardiográficos são observados entre os sexos. As mulheres apresentam maior frequência cardíaca em repouso, maior duração do intervalo QT e menor dispersão de QT se comparadas aos homens (Larsen *et al.*, 1998; Bailey *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2004). Vários estudos indicam que o E2 pode prevenir arritmias por efeitos diretos sobre a eletrofisiologia cardíaca, modulando os níveis de vários canais iônicos, ou ainda por seus efeitos sobre as junções comunicantes (Murphy e Steenbergen, 2014).

Ren e colaboradores (2003) fizeram um estudo com ratas ovariectomizadas no qual observaram a diminuição da pressão sistólica, do débito cardíaco e da fração de ejeção associados a alterações na expressão das isoformas α e β da cadeia pesada da miosina. Estas alterações eram prevenidas nos animais que recebiam reposição de E2.

A ação inibitória sobre a corrente de cálcio do tipo L (I_{CaL}) seria uma das principais responsáveis pela ação antiarrítmica do E2 (Meyer *et al.*, 1998 e Nakajima *et al.*, 1999). Estudos demonstraram que o tratamento com E2 resulta na ativação de canais de potássio sensíveis a ATP (Lee *et al.*, 2000).

Estudos demonstram ainda que a Cx43 pode ser regulada pelos estrógenos e que a ausência do mesmo pode provocar danos e redução desta conexina, tão importante no acoplamento entre os cardiomiócitos. Alterações na expressão e na organização das junções comunicantes podem desencadear mudanças na condução elétrica e na contração das células cardíacas (Dupont *et al.*, 2001). A diminuição de Cx43 pode levar a heterogeneidade da propagação do impulso entre regiões adjacentes do miocárdio, aumentando a susceptibilidade a arritmias (Severs *et al.*, 2004). Pesquisas com ratas ovariectomizadas, sujeitas ao tratamento com concentrações fisiológicas de estradiol, tiveram aumento da quantidade de Cx43 e o tratamento com E2 aumentou a expressão da mesma (Chen *et al.*, 2010).

A figura 3 representa esquematicamente as vias pelas quais o estrogênio exerce seus efeitos nos cardiomiócitos.

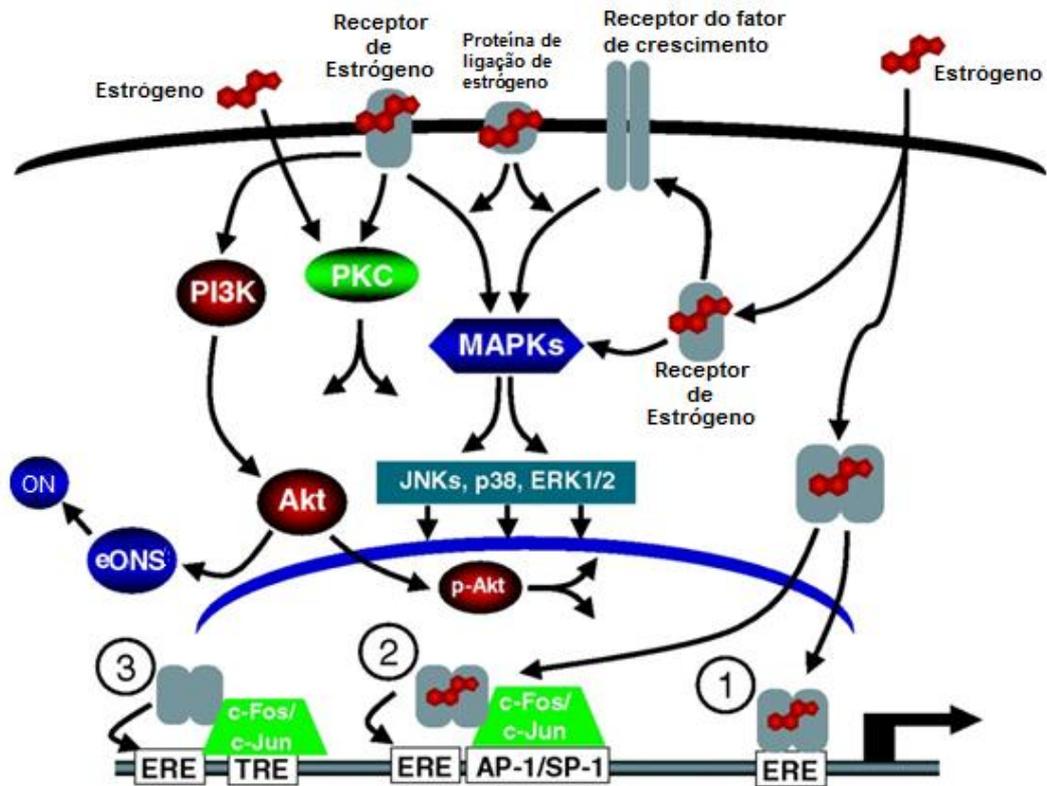


Figura 3- Representação esquemática da ação estrogênica nos cardiomiócitos (Konhilas, 2007). Tem sido demonstrado que o estrogênio atua na sinalização celular através de um certo número de vias. Na ação genômica tradicional acredita-se que o estrogênio age através de receptores nucleares de estrogênio (ERs) que transativam genes. Foi mostrado também que o estrogênio atua rapidamente através de mecanismos não genômicos agindo diretamente nos receptores de fator de crescimento ou o recrutamento de receptores de fatores de crescimento. Além disso, o estrogênio pode se ligar e ativar ERs na membrana plasmática, desse modo induzindo cascatas de sinalização intracelular. A ativação de genes através ERs pode ocorrer por três mecanismos: (1) O estrogênio pode formar complexos homo ou heterodímeros para transativar genes que contêm elementos de resposta de estrogênio (ERE), (2) O complexo estrogênio-ER pode ligar-se aos EREs através de cofatores associados à proteína ativadora 1 / SP-1 local, e (3) ERs podem ser recrutados para EREs pelo complexo ativador de proteína 1 na ausência de estrogênio. eONS indica óxido nítrico sintase endotelial; ERK1 / 2, regulada por sinal extracelular quinase 1/2; JNK, quinase c-Jun N-terminal; ON, óxido nítrico; p38, p38 proteína quinase ativada por mitógeno; PKC, proteína quinase C; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; SP-1, proteína de especificidade 1; e TRE, elementos TPA-responsivos.

1.5 Junções Comunicantes

O coração de mamíferos é um órgão oco de parede muscular formado por quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos, constituídos basicamente por células miocárdicas acopladas entre si, por onde a atividade elétrica se propaga desencadeando a contração cardíaca (Aires, 2008). A contração do coração ocorre de forma coordenada em consequência do acoplamento elétrico e mecânico eficiente dos cardiomiócitos que estão conectados por estruturas especializadas, os discos intercalares, que apresentam *Gap-junctions* ou junções comunicantes (JC) (Severs, 2001). Essas junções, presentes nas membranas dos miócitos, originam vias de baixa resistência entre as células o que faz com que o miocárdio se comporte como um sincício funcional.

As junções comunicantes (JC) são estruturas de contato na forma de canais presente nas membranas celulares especializadas na troca de substâncias, ou seja, na comunicação célula a célula. O acoplamento celular permite a difusão passiva de moléculas com tamanho inferior a 1kDa incluindo mensageiros secundários como o Ca^{2+} , inositol fosfato, nucleotídeos cíclicos e íons (Hervé, 2004). Assim, estas junções possuem papel ativo no ajuste de vias de transdução de sinal e possibilitam um caminho direto para metabólitos que medeiam a homeostase celular e íons que propagam sinais elétricos no coração e no sistema nervoso central (Sosinsky e Nicholson, 2005).

Cada JC é formada a partir de 2 hemicanais ou conexons justapostos, um em cada célula adjacente. Cada canal é composto por 6 unidades protéicas da família das conexinas (Cx), formando um poro aquoso (figura 4) (Kumar e Gilula, 1996). O conexon é constituído por três domínios funcionais: o domínio citoplasmático formado pelas regiões amino e carboxi terminal, o qual influencia o estado de abertura do canal; o domínio transmembrana, que forma o canal e os domínios extracelulares, que são importantes no acoplamento das conexinas e no reconhecimento célula-célula (Sosinsky e Nicholson, 2005).

Diversos tipos de células expressam variadas isoformas de conexinas constituindo conexons homo-oligoméricos, compostos de conexinas similares. No entanto, conexons hetero-oligoméricos podem ser formados por diferentes conexinas. É possível ainda a formação de canais homotípicos, constituído por dois conexons iguais, ou heterotípicos, formados por dois conexons diferentes (figura 5) (Kumar e Gilula, 1996).

A composição específica de conexina formando o conexon confere especificidade para os mensageiros químicos que irão passar pelo canal. As junções apresentam propriedades seletivas quanto à carga e ao tamanho do poro. Assim, junções heterotípicas e homotípicas podem ter permeabilidade molecular distintas (Sosinsky e Nicholson, 2005). As conexinas e as distintas junções por elas formadas, apresentam um padrão de expressão distinto em diferentes tecidos onde desempenham papéis variados. Estudos demonstram que a deficiência de uma determinada isoforma de conexina está associada a diversas doenças como: surdez hereditária, catarata, doenças de pele e do coração, câncer e algumas formas de neuropatias, (Sáez *et al.*, 2003).

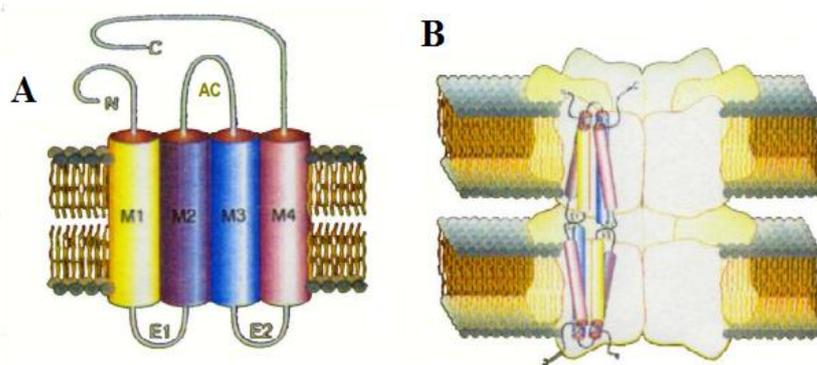


Figura 4- Modelo topológico das conexinas. **A.** Modelo topológico das conexinas. Os cilindros representam os domínios transmembranares (M1-M4). As alças entre o primeiro e segundo, bem como entre o terceiro e quarto domínios transmembranares são extracelulares (E1 e E2, respectivamente), AC- alça intracelular, N- região N-terminal, C- região C-terminal. **B.** Modelo dos domínios transmembranares de seis subunidades de conexinas arranjados para formar o espaço hidrofílico (poro) do canal junctivo. Figuras A e B retiradas de Kumar e Gilula, 1996.

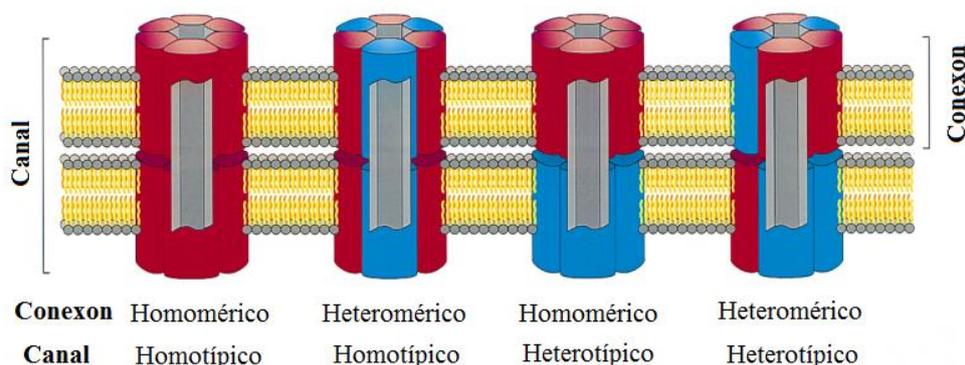


Figura 5- Desenho esquemático dos possíveis arranjos dos conexons para formar canais juncionais. Os conexons consistindo de seis subunidades de conexinas (vermelho e azul) são ilustrados em várias configurações. Conexons podem ser homoméricos (formados por seis subunidades idênticas) ou heteroméricos (formados por mais de duas espécies de conexinas). Conexons cedidos por células adjacentes se associam para formar o canal juncional. O canal pode ser homotípico (se os conexons são idênticos) ou heterotípicos (se os dois conexons são diferentes). Figura retirada de Kumar e Gilula, 1996.

1.5.1 Regulação do acoplamento da junção comunicante

A disponibilidade dos canais e seus estados funcionais favorecem o grau de acoplamento intercelular e pode ser modulada pela quantidade de proteínas sintetizadas pelo retículo endoplasmático (REN) (Hervé *et al.*, 2004). O REN possui ainda um sistema que atesta a qualidade das proteínas que saem do mesmo verificando se estas estão corretamente montadas. No complexo de Golgi, proteínas podem ser transportadas para a membrana ou redirecionadas aos lisossomos. As proteínas já presentes na membrana podem ainda, quando selecionadas, serem endocitadas retornando posteriormente para a membrana ou destinadas à degradação (Hervé *et al.*, 2004).

As conexinas, sintetizadas nos ribossomos do REN, podem ou não passar pelo complexo de Golgi antes de chegar à membrana. Cada subunidade é formada por quatro domínios transmembranares e sua organização estrutural é alcançada quando ocorre a integração destas subunidades à membrana do REN. A formação do poro ocorre após a interação das subunidades prontas. As diversas combinações ultrapassam o número real de diferentes subtipos de canais normalmente montados, o que sugere a existência de uma regulação na montagem das subunidades (Hervé *et al.*, 2004).

De fato a interação entre as isoformas é seletiva, assim a existência de sequências sinal na cadeia polipeptídica permite a interação de conexinas que sejam compatíveis. Esta montagem pode ocorrer no RE ou no complexo de Golgi, e é necessária para a translocação do canal à membrana plasmática. A translocação do canal ocorre por difusão, em casos de proximidade das membranas, ou através de vesículas transportadas ao longo de microtúbulos e filamentos de actina (Segretain e Falk, 2004) conforme demonstrado na figura 6.

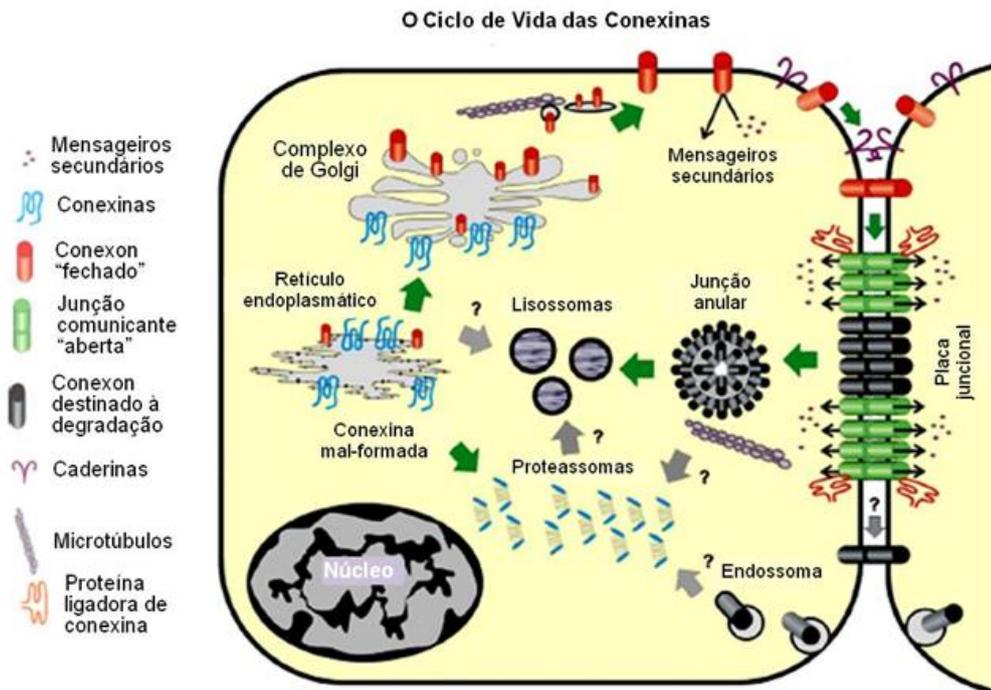


Figura 6- Modelo esquemático representando o ciclo de vida de uma conexina. A síntese da cadeia polipeptídica das conexinas ocorre no retículo endoplasmático, podendo ou não passar pelo complexo de Golgi. Essas organelas também são os sítios de oligomerização e formação de conexons. As proteínas formadas incorretamente sofrem degradação em proteassomas, enquanto os conexons viáveis são destinados à membrana através de vesículas de transporte, processo que pode ser facilitado por microtúbulos. Proteínas de adesão e proteínas ligadoras de conexinas parecem ter um papel na disposição correta dos canais, que tendem a se aglomerar e formar a placa juncional. Pela extremidade, conexons novos são inseridos, enquanto os canais centrais eventualmente perdem a função e são internalizados em estruturas formadas por bicamadas lipídicas oriundas da membrana, chamadas de junções anulares. Posteriormente, estes sofrem degradação por proteassomas e/ou lisossomas, sendo a meia-vida de uma conexina inferior a 5 horas. Adaptado de Segretain e Falk, 2004.

1.5.2 Junções comunicantes no coração

O coração humano expressa três isoformas de conexinas: Cx40, Cx43 e Cx45, sendo as Cx40 e Cx43 as principais conexinas desse órgão (Dhillon, 2014). A Cx 45 é expressa em todo o coração. A Cx43 é encontrada no átrio e ventrículo de várias espécies sendo esta a mais importante Cx do ventrículo. (Gourdie *et al.*, 1991). A Cx40 tem um padrão de expressão mais restrito que a Cx43, e é expressa somente no miocárdio atrial (dependendo da espécie) e no sistema de condução átrio-ventricular como o feixe de His, os ramos do feixe superior e inferior, as fibras de Purkinje e também na vasculatura (Gros *et al.*, 1994). Esta conexina é de fundamental importância para a condução elétrica no átrio.

As junções comunicantes são especialmente importantes no acoplamento elétrico do coração, pois através delas ocorre a passagem de corrente entre os miócitos. Cada tipo celular presente no coração apresenta um padrão de expressão de conexinas, permitindo a propagação coordenada do impulso elétrico e a contração em sequência das câmaras cardíacas (Gourdie *et al.*, 1991). Os cardiomiócitos atriais, células menores e mais alongadas, possuem discos intercalares também menores e menos elaborados que são formados,

principalmente por Cx40, podendo haver co-localização com Cx43 nas mesmas placas juncionais. A conexina45 (Cx45) é encontrada tanto em átrios quanto em ventrículos, onde sua expressão é menor (Severs *et al.*, 2004).

Os cardiomiócitos responsáveis por gerar e conduzir o impulso são estruturalmente distintos das células ventriculares e atriais. Os miócitos do nodo sinoatrial, sítio de geração do impulso, e os miócitos do nodo atrioventricular, sítio em que a velocidade do impulso é reduzida antes de ser direcionada aos ventrículos, possuem poucas e dispersas junções comunicantes formadas principalmente por Cx45, uma conexina que forma canais de baixa condução *in vitro* (Severs *et al.*, 2004).

Já o sistema de condução His-Purkinje na maioria dos mamíferos expressa em seus cardiomiócitos, além da Cx45, a Cx40, cujos canais possuem característica de alta condução. Elas formam grandes e abundantes junções comunicantes que estão associadas à propriedade de condução rápida das fibras deste sistema, facilitando a distribuição rápida do impulso para as células de trabalho do miocárdio ventricular (Severs, *et al.*, 2004).

Alterações na expressão e na organização das junções comunicantes podem desencadear mudanças na condução elétrica e na contração das células cardíacas, e, assim, estarem associadas ao desenvolvimento de arritmias cardíacas como, por exemplo, fibrilação atrial (Dupont *et al.*, 2001).

Aumento na transcrição de Cx40 e diminuição da Cx43 foram observadas em corações isquêmicos que evoluíram para falência cardíaca (Dupont *et al.*, 2001). Acredita-se que nesta situação estaria ocorrendo um tipo de resposta compensatória que poderia melhorar a despolarização do tecido de condução frente a diminuição da expressão de Cx43, mas também poderia levar a heterogeneidade da propagação do impulso entre regiões adjacentes do miocárdio, aumentando a susceptibilidade a arritmias. O mesmo pode ocorrer no átrio diante de situações em que haja expressão atípica da Cx40 (Severs *et al.*, 2004).

Com o surgimento de animais geneticamente modificados em que a expressão de uma conexina específica era abolida, camundongos *knockouts*, surgiram novos caminhos para a investigação do papel das conexinas no coração. Entretanto, alguns modelos são limitados pelo fato de algumas conexinas serem essenciais durante o desenvolvimento. O primeiro modelo de camundongo *knockout* demonstrou que a ausência de Cx43 era compatível durante a vida embrionária, porém o animal morria logo após o nascimento devido à obstrução da artéria pulmonar. Essa anormalidade era adquirida no desenvolvimento resultante da migração incorreta de células da crista neural (Sullivan *et al.*, 1998). Outra pesquisa mostrou os efeitos da falta da Cx43 nos cardiomiócitos após o nascimento em animais *knockout* para Cx43 somente no coração (Gutstein *et al.*, 2001). Estes camundongos apresentaram diminuição da velocidade de condução ventricular e arritmia ventricular espontânea, sendo letal com dois meses de idade, evidenciando que a Cx43 seria mais essencial para a função do ventrículo maduro do que para o neonato, no qual pequenas quantidades de Cx45 ainda presentes seriam aparentemente capazes de manter a propagação do impulso (Gutstein *et al.*, 2001).

O animal *knockout* para Cx45 não sobrevive após o décimo dia de vida embrionária, demonstrando que a expressão desta conexina é vital durante o desenvolvimento (Kruger *et al.*, 2000). Já o *knockout* para a Cx40 mostrou-se compatível com a vida, porém apresentou redução da velocidade do impulso elétrico através do sistema de condução atrio-ventricular (Simon *et al.*, 1998 e Kirchhoff *et al.*, 1998). A capacidade residual do sistema His-Purkinje de suportar a condução na ausência da Cx40 foi atribuída à presença da Cx45.

Camundongos *knockouts* heterozigotos para a expressão da Cx43 (Cx43^{+/-}) apresentam redução de 38% na velocidade de condução ventricular, enquanto nenhuma alteração foi observada na propagação elétrica atrial (Thomas *et al.*, 1998). Este fato indicou que a Cx43 possui importante papel na condução intercelular de corrente nos miócitos

ventriculares, e que, a presença da Cx40 no átrio seria capaz de prevenir o desenvolvimento de um fenótipo de condução alterado, mesmo quando a expressão da Cx43 está reduzida à metade (Thomas *et al.*, 1998). Assim, as junções formadas pela Cx40 parecem ser as principais responsáveis pela condução elétrica no átrio.

1.6 Conexina40 no coração

As junções formadas pela Cx40 parecem ser as principais responsáveis pela condução elétrica no átrio. A regulação da Cx40 na coordenação da contração cardíaca teve sua importância confirmada a partir da utilização de camundongos *knockouts* em Conexina40 (Cx40^{-/-}). Em 1998 dois estudos avaliaram os parâmetros eletrocardiográficos desses animais. Quando comparados com animais selvagens, os camundongos *knockouts* para Cx40 apresentavam mudanças na velocidade de condução atrioventricular. O intervalo PR (equivalente ao tempo entre o início da despolarização atrial e início da despolarização ventricular) foi, em média, 21% mais longo nos *knockouts* que nos animais selvagens ou heterozigotos (Simon *et al.*, 1998 e Kirchhoff *et al.*, 1998). Posteriormente, Verheule e colaboradores (1999), observaram que em camundongos Cx40^{-/-} a condução do impulso elétrico se encontrava alterada não só no sistema de condução atrioventricular, mas também no átrio, mostrando redução na velocidade de condução de aproximadamente 30% nestes animais, quando comparados aos selvagens. Estes estudos indicaram que a expressão de Cx40 é fundamental para a condução de impulsos elétricos nos átrios e no sistema de condução. Já os estudos em camundongos *knockouts* em Cx43 têm mostrado que a duração da onda P não é afetada, sugerindo que a velocidade de condução atrial permanece inalterada o que indica que a Cx43 não é o determinante principal para a condução do impulso atrial na presença de níveis normais de Cx40 (Eckardt *et al.*, 2004). A co-expressão de Cx40 parece ser a maior responsável pelas propriedades de propagação entre aurícula e o ventrículo e, podem desempenhar um papel na gênese da condução miocárdica lenta e arritmias (Lin *et al.*, 2010). A regulação da Cx40 é um processo complexo e preciso, dependente de diversos fatores, cuja caracterização demanda muitos estudos.

Alguns trabalhos descreveram, em níveis moleculares, sobre a regulação da Cx40 no coração e os meios de regulação da condutância do canal composto por Cx40. Um estudo, utilizando cultura de células SKHep1 (células derivadas de adenocarcinoma hepático humano), observou o aumento da condutância das junções compostas por Cx40 após fosforilação por PKA (van Rijen *et al.*, 2000). A Cx40 também apresenta em sua estrutura, além do sítio de fosforilação para PKA, sítios de fosforilação para PKC e PKG, cuja a relevância para o controle da atividade do canal ainda é pouco compreendida. Além desta regulação por fosforilação, a defosforilação da Cx40 foi relacionada a condução atrial defeituosa em camundongos que superexpressavam RTEF-1 (*transcription enhancer factor-1 – related factor*) no coração. Fato este que, por sua vez, aumenta a expressão da proteína fosfatase 1 β (PP1 β), resultando na defosforilação das conexinas no coração, diminuição da condução e arritmias (Chen *et al.*, 2004). Da mesma forma que o animal *knockout* para Cx40, no camundongo que superexpressa RTEF-1 é observado o prolongamento do intervalo PR e arritmias atriais.

Outros estudos, realizados em cultura de células isoladas de ventrículo de rato, demonstram a atuação, ou a aparente não participação, de alguns fatores no controle da expressão da Cx40 (Salameh *et al.*, 2006). A estimulação das células com diferentes concentrações de agonistas α e β -adrenérgicos não foi capaz de modificar a expressão da

Cx40 (Salameh *et al.*, 2006), e da mesma forma, concentrações variadas de Endotelina-1 (ET-1) e Angiotensina II (ANGII) não alteraram a expressão de Cx40 (Polontchouk *et al.*, 2002). No entanto, a participação de outros fatores do sistema renina-angiotensina (RAS) não podem ser excluídas, uma vez que, em animais que superexpressam no coração algum desses fatores como a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA2), enzima conversora de angiotensina I (ANGI) e também a angiotensina 1-7, apresentam problemas de condução, distúrbios de ritmo, taquicardia ventricular sustentada e alta incidência de morte súbita, provocados, pelo menos em parte, pela redução da expressão das proteínas juncionais Cx40 e Cx43 (Donoghue *et al.*, 2003). Porém, não se sabe se esse fenótipo é devido ao aumento dos níveis de angiotensina 1-7 ou pela diminuição dos níveis de ANGI, já que haveria menos ANGI disponível para ser convertida em ANGI.

Sabe-se também que a expressão da Cx40 pode ser temporal e espacialmente regulada através da interação de fatores transcrpcionais com sequências específicas de DNA presentes na região regulatória do gene. A comparação entre os genomas de humano e camundongo permitiu a identificação de sequências conservadas entre as espécies, incluindo as regiões responsáveis por direcionar a atividade promotora da Cx40 (Teunissen e Bierhuizen, 2004).

Para o estudo da região promotora da Cx40, linhagens celulares de cardiomiócitos e músculo liso têm sido usadas com o objetivo de identificar quais fatores são capazes de modular a expressão gênica. Seul e colaboradores (1997), em um estudo utilizando cultura de células BWEM (linhagem derivada de cardiomiócito de rato embrionário), identificaram uma sequência que pode corresponder a um elemento negativo, cuja função é reprimir fortemente a atividade promotora, no entanto, os fatores transcrpcionais que com ele interagem são desconhecidos (Seul *et al.*, 1997). Foi verificada ainda a existência de cinco sítios Sp1/Sp3 na região promotora da Cx40, que permitem igual interação dos fatores Sp1 e Sp3 a fim de ativar a região promotora da Cx40 (Teunissen *et al.*, 2002).

Outros fatores estimuladores foram identificados em trabalhos utilizando animais geneticamente modificados. Entre eles, o Hf-1b também chamado Sp4, demonstrado pela redução da expressão de Cx40 e localização incorreta dos canais por ela formados no modelo de animal deficiente na expressão do fator Sp4 (Nguyễn-Trân *et al.*, 2000). Foi observado ainda que, animais que apresentam a superexpressão de um mutante de Nkx2.5 ou a expressão em heterozigose de Tbx5 possuem diminuição dos níveis de RNAm e proteína de Cx40 (Kasahara *et al.*, 2001; Bruneau *et al.*, 2001). Estes fatores transcrpcionais podem operar sozinhos ou sinergicamente de modo a ativar o promotor da Cx40 (Bruneau *et al.*, 2001). O sítio no DNA para interação do fator Tbx5 permite ainda a interação de outros fatores ativadores e inibidores da mesma família, como o fator transcrricional inibidor Tbx2 expresso no coração (Teunissen e Bierhuizen, 2004).

Os fatores transcrpcionais Sp1 e Sp3 são ubiquamente expressos em mamíferos e diferentes tipos celulares, assim, juntamente ao complexo RNA polimerase, devem prover a expressão basal da Cx40 nestes tipos celulares (Bierhuizen *et al.*, 2000). Já Nkx2.5 deve servir como ativador da expressão da Cx40 no coração, já que interferência na expressão desse fator reduz os níveis da proteína Cx40 cardíaca (Teunissen e Bierhuizen, 2004).

Além de Nkx2.5 e Tbx5, GATA4, um outro fator específico de células musculares, se faz importante na regulação da Cx40. A deleção de porções da sequência correspondente a região promotora do gene da Cx40, tornou possível a identificação dos elementos mínimos para atividade transcrricional. Ensaios de co-transfecção demonstraram que, associados a esses elementos mínimos, os fatores Nkx2.5 e GATA4 foram capazes de ativar a transcrição, ao passo que Tbx5 reprimiu a mesma (Linhares *et al.*, 2004).

Estudos observaram o aumento da expressão da Cx40 na fibrilação atrial (FA), em pacientes e em modelo de rato induzido a ritmo cardíaco não sinusal (Polontchouk *et al.*, 2001). Alguns tipos de fibrilação atrial estão associadas a um quadro inflamatório, no qual se

observa a presença de citocinas inflamatórias, entre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Um estudo observou a importância deste fator na regulação da Cx40, ao utilizar um animal geneticamente modificado que superexpressa TNF- α somente no coração. Os animais apresentaram diminuição da expressão da Cx40, o que explica, em parte, as anormalidades nas conduções atrioventriculares e arritmias atriais (Sawaya *et al.*, 2007).

O Ca²⁺ parece ser também um fator de regulação adicional para o remodelamento da Cx40 em FA. Dados de um estudo com humanos sugerem que o Ca²⁺ extracelular pode atuar através de receptores de sensor de cálcio aumentando a transferência de Cx40 do Complexo de Golgi para a membrana plasmática e melhorando o acoplamento funcional. No tecido atrial de pacientes com FA as gap-junctions parecem estar preferencialmente incorporadas na fronteira lateral da célula, isso poderia contribuir para o substrato arritmogênico em FA (Dhein *et al.*, 2008).

Estudos mais recentes com humanos sugerem que níveis reduzidos de Cx40 e a heterogeneidade da sua distribuição (em relação à Cx43) são comuns em fibrilação atrial (FA) crônica ou paroxística (Gemel *et al.*, 2014). Vários mecanismos provavelmente levam a reduções de Cx40 funcional em junções comunicantes atriais e contribuem para a patogênese da FA em diferentes pacientes, o que suporta a hipótese de que as mudanças na distribuição de Cx40 estão envolvidas no remodelamento elétrico e contribui para a fibrilação atrial sustentada.

Mutações no *GJA5*, gene que codifica a Cx40, podem predispor o coração a fibrilação atrial idiopática, ao alterar a montagem do canal juncional ou acoplamento elétrico (Gollob *et al.*, 2006). Mutações neste gene já foram identificadas em pacientes com FA (Patel *et al.*, 2014).

Estas mutações aparentemente contribuem para a FA através da redução de canais funcionais de Cx40 por mecanismos que podem incluir alterações como perda de função do canal, tráfico de Cx40 prejudicado ou ainda aumento da degradação de Cx40 (Patel *et al.*, 2014). Sun e colaboradores (2013) descreveram uma mutação em *GJA5* identificada em uma família chinesa com FA isolada. Este mutante não formou canais de junções comunicantes funcionais e prejudicou seu funcionamento quando co-expresso com Cx40 ou Cx43. Outro efeito relacionado a linhagem germinativa mutante foi a inibição seletiva da função da Conexina43. Estes resultados indicam que as mutações germinativas em *GJA5* são susceptíveis de prejudicar a função das junções comunicantes no átrio e contribuir para a FA.

O promotor da Cx40 contém variados polimorfismos de nucleotídeo único (SPN) que têm sido associados à FA e outras doenças incluindo hipertensão (Chaldoupi *et al.*, 2012). Estas variações polimórficas podem causar diminuição de transcrições correspondentes e / ou redução dos níveis de Cx40 (Wirka, *et al.*, 2011).

Estudos anteriores que examinaram os níveis de conexina por imunoblotting em átrios de pacientes com FA crônica chegaram a conclusões conflitantes, incluindo o aumento da expressão de Cx40 (Polontchouk *et al.*, 2001), redução de Cx40 (Nao *et al.*, 2003), ou diminuição da expressão de Cx43 com mudanças na Cx40, que variavam de acordo com o local da biópsia (Kostin *et al.*, 2002). Evidências crescentes demonstram que a distribuição tridimensional de junções comunicantes e a quantidade de suas isoformas constituintes são fatores determinantes da condução normal e do impulso elétrico em diferentes regiões do coração, incluindo o miocárdio atrial (Schaper *et al.*, 2001). Assim, no átrio do cão foi encontrado aumento na proteína Cx43 após estimulação rápida prolongada (Elvan, *et al.*, 1997), enquanto em um modelo semelhante de FA estudado em cabra, a quantidade de RNAm e proteína Cx43 manteve-se inalterada (Velden, *et al.*, 1998).

A expressão anormal de Cx40 está intimamente relacionado com a suscetibilidade à FA, e a normalização da expressão desta pode ser um caminho para tratamentos terapêuticos bem sucedidos. Sarrazin e colaboradores (2007) mostraram que a administração oral de n-3

ácidos graxos poliinsaturados pode resultar em redução da suscetibilidade para FA induzida em cães. Essa proteção contra FA foi principalmente relacionada à redução dos níveis de expressão da Cx40.

Vários estudos indicam que a redução da incidência de diversas doenças em mulheres na pré-menopausa é atribuída à presença de 17β -estradiol, considerado o estrógeno endógeno mais potente e predominante (Prossnitz e Barton, 2011). Diante disso, nosso trabalho tem por objetivo avaliar o papel do 17β -estradiol sobre a expressão gênica da Conexina40 (Cx40) e suas implicações na propagação da atividade elétrica cardíaca.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do 17β -estradiol sobre a expressão gênica da Cx40 e suas implicações na propagação da atividade elétrica cardíaca.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a regulação do estrogênio sobre a expressão do RNAm da Cx40, com doses fisiológicas e suprafsiológicas de BE, em experimentos *in vitro* utilizando cultura de células imortalizadas da linhagem celular A7r5.
- Avaliar a regulação do estrogênio sobre a expressão do RNAm da Cx40 atrial, com dose suprafsiológica de BE, em experimentos *in vitro* utilizando cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos.
- Investigar a regulação do 17β -estradiol sobre a região promotora do gene da Cx40 em experimentos *in vitro* utilizando técnica de transfecção transiente.
- Avaliar a regulação do 17β -estradiol sobre a expressão do RNAm da Cx40, *in vivo*, e correlacionar com possíveis alterações eletrocardiográficas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

A linhagem celular A7r5 (derivada de músculo liso aórtico de rato embrionário), foi fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0034). Estas células foram mantidas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM- (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1 % de Penicilina e Streptomicina (Gibco), em estufa umedecida (95 %), 5 % de CO₂ a 37° C.

3.1.1 Tratamento da linhagem celular com Benzoato de Estradiol

As células foram plaqueadas em uma placa de 12 poços e após 24 horas, ao atingirem um estágio de aproximadamente 70 % de confluência, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo 0,5 % de soro fetal bovino, e após 3 horas foram tratadas com benzoato de estradiol (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M por 24 horas. Após o tratamento as células foram lavadas com salina (NaCl 0,9 %) e em seguida incubadas com TRIZOL[®] (INVITROGEN) para posterior análise do RNAm da Conexina40. Este experimento foi feito em duplicata e repetido 3 vezes.

3.2 Cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos

Dezesseis animais neonatos da linhagem Wistar foram eutanasiados por decapitação, após a eutanásia os corações foram excisados e com o auxílio de uma lupa átrios e ventrículos foram separados. Inicialmente o tecido atrial foi submetido a uma dissociação mecânica (com o auxílio de um bisturi), originando pequenos fragmentos, que foram lavados em salina, para remoção de células sanguíneas. Posteriormente esses fragmentos foram submetidos a uma dissociação enzimática; sendo estes fragmentos incubados com uma salina contendo 0,01 % de colagenase (Worthington, tipo II), durante 3 períodos de 5 minutos, a 37° C. A atividade enzimática foi então interrompida pela adição de soro fetal de cavalo (Gibco). A suspensão foi então centrifugada a 1800 xg, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em meio DMEM (Sigma -Aldrich MO, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 1 % de Penicilina e Streptomicina (Gibco). Uma alíquota foi retirada para contagem de células e em seguida aproximadamente 3 x 10⁵ células/mL foram plaqueadas em lamínulas previamente colocadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa umedecida (95 %) 5 % de CO₂ a 37° C (adaptado de Costa *et al.*, 2000). No dia seguinte as células foram incubadas com benzoato de estradiol (Sigma-Aldrich) 10⁻⁶ M no seguintes tempos 2, 4 e 8 horas e após o tratamento as células foram lavadas com salina (NaCl 0,9 %) e em seguida tratadas com TRIZOL[®] para extração do RNA total para posterior análise do RNAm da Cx40.

3.3 Transfecção do segmento do promotor

Para a realização deste ensaio, utilizamos o segmento -1190/+121 da região promotora da Cx40, subclonada no plasmídeo pGl3-Basic (Promega), acima da região codificante da enzima Luciferase e denominada -1190/+121Cx40Luc (Linhares *et al.*, 2004).

As células da linhagem A7r5 foram plaqueadas em placa de 24 poços e após 24 horas ao atingirem o estágio de aproximadamente 70 % de confluência, foi realizado o ensaio de transfecção transiente utilizando LipofectAMINE 2000 (Gibco), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Quinhentos nanogramas (ng) da construção do promotor da Cx40 (-1190/+121Cx40Luc) foram adicionados a 100 µL de DMEM sem soro contendo 50 ng do vetor pRL-CMV (Promega) e 1 µL de LipofectAMINE 2000 e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos (Linhares *et al.*, 2004). Após a incubação, os 100 µL do meio de cultura contendo os complexos DNA/lipídio foram adicionados a cada poço da placa de cultura. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram tratadas com benzoato de estradiol (10^{-6} M) por 24 horas. Três horas antes do tratamento, o meio de cultura das células foi alterado para DMEM contendo 0,5 % de soro fetal bovino. Após este período, as células foram lisadas utilizando *Passive Lysis Reporter Buffer* (Promega) para obtenção do extrato protéico a ser utilizado para análise da atividade da luciferase.

A análise da atividade da luciferase foi realizada através da geração de luz medida por 30 segundos a temperatura ambiente no *TD-20/20 Luminometer* (Turner Designs), Após a adição de 100 µL do reagente de detecção *Luciferase Assay Reagent II* (Promega). Após a quantificação da atividade da luciferase a reação foi parada e a detecção da atividade da renila foi iniciada simultaneamente pela adição de 100 µL do reagente *Stop & Glo* (Promega) ao mesmo tubo. A normalização dos extratos utilizados foi realizada através da atividade da enzima renila sob o controle do promotor constitutivo CMV. Este experimento foi realizado em triplicata e repetido 3 vezes.

3.4 Animais

Todos os animais destinados ao desenvolvimento deste projeto foram acondicionados em biotério com temperatura (23 ± 2 °C) e fotoperíodo (7:00-19:00 h) controlados, recebendo ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O cuidado com os animais foi realizado de acordo com os princípios do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, após a devida aprovação pelo comitê de ética institucional (processo nº 347 CEUA/IBCCF/UFRJ).

3.4.1 Desenho experimental

Camundongos fêmeas com aproximadamente 2 meses e meio foram submetidos à ovariectomia bilateral (OVX) ou estresse cirúrgico (figura 7), e quinze dias após este procedimento os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- ◆ Fêmeas controle submetidas ao estresse cirúrgico (FO).
- ◆ OVX tratados com veículo (OVX);

- ◆ OVX tratados com benzoato de estradiol - 2 μ g (OVX+BE2).
- ◆ OVX tratados com benzoato de estradiol - 20 μ g (OVX+BE20).

Após 15 dias de tratamento os animais foram submetidos à análise eletrocardiográfica (figura 8). No dia seguinte, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca precedida de anestesia. O sangue foi coletado para posterior dosagem da concentração sérica de E2, os corações foram excisados, os átrios separados, pesados e armazenados para posterior quantificação do RNAm da Conexina40 (q-PCR). O útero dos animais foi pesado e usado como controle da eficiência da cirurgia. O comprimento da tíbia foi usado para normalizar o peso dos órgãos.

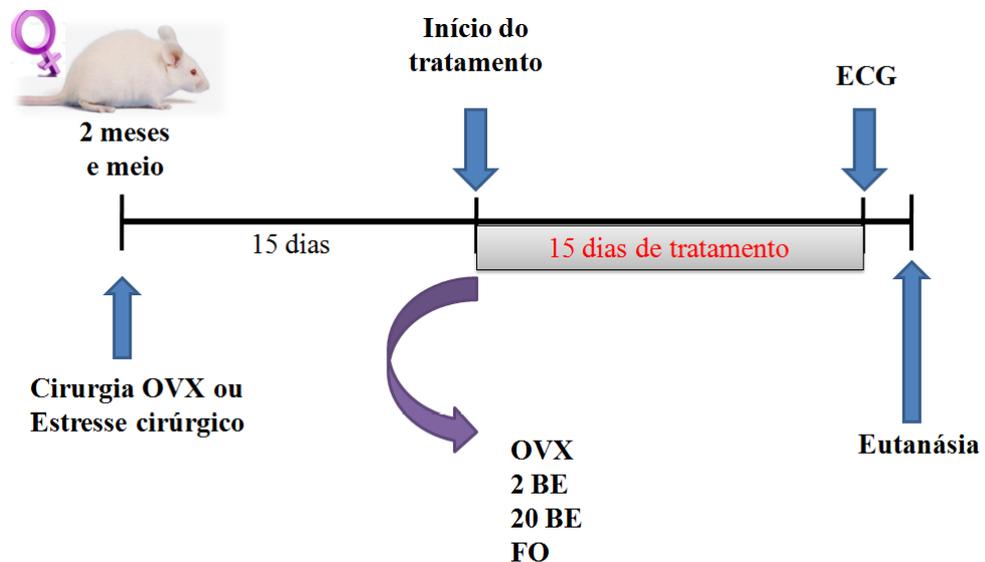


Figura 7- Esquema ilustrativo do modelo experimental. Descrição no texto. FO- Falso-operado, OVX- Ovariectomia; 2BE- 2 μ g de benzoato de estradiol por Kg de peso corporal; 20BE- 20 μ g de benzoato de estradiol por Kg de peso corporal.

3.4.2 Ovariectomia e tratamento com benzoato de estradiol

Camundongos fêmeas de *Background* genético híbrido de duas linhagens 129/Svj X C57/BL6, com aproximadamente 2 meses e meio, foram anestesiadas com uma combinação de cloridrato de dextrocetamina (Ketamin[®], Cristália) e cloridrato de xilasina (Xilasin[®], Syntec) (50 e 5 mg por kg de peso corporal (pc), respectivamente, diluídos em solução salina 0,9 % (v/v) pela via intra-peritoneal (ip). Após o estabelecimento de um bom plano anestésico, verificados pela ausência de reflexos motores e protetores, os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral (OVX) ou apenas ao estresse cirúrgico (falso operado, FO). O ciclo estral de todos os animais foi acompanhado por citologia vaginal durante uma semana antes da cirurgia, e os animais que não ciclaram regularmente foram descartados do experimento. Ao todo, foram utilizados 57 animais (FO n = 15, OVX n =12, OVX+BE2 n =

13, OVX+BE20 n = 17). Quinze dias após a cirurgia de OVX, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos:

I- FO - animais submetidos ao estresse cirúrgico, que receberam veículo (etanol/DMSO óleo de girassol, LIZA, São Paulo, Brasil), sc, durante quinze dias. O ciclo estral deste grupo continuou sendo acompanhado após a cirurgia.

II- OVX - animais ovariectomizados tratados com veículo (etanol/DMSO/óleo de girassol, LIZA, São Paulo, Brasil) durante 15 dias, por via subcutânea (sc).

III- OVX+Benzoato de estradiol (OVX+2BE) - animais ovariectomizados tratados com 2 µg/kg p.c. de benzoato de estradiol durante 15 dias, sc.

IV- OVX+Benzoato de estradiol (OVX+20BE) - animais ovariectomizados tratados com 20 µg/kg p.c. de benzoato de estradiol durante 15 dias, sc.

Após quinze dias de tratamento os animais foram submetidos à análise eletrocardiográfica (modelo adaptado de Faustino *et al.*, 2012) No dia seguinte, os animais foram pesados e em seguida eutanasiados por punção cardíaca precedida de anestesia (uma solução de cloridrato de dextrocetamina (Ketamin[®], Cristália) e cloridrato de xilasina (Xilasin[®], Syntec) ip nas doses de 100 e 5 mg/Kg de pc, respectivamente. Logo em seguida, o sangue retirado foi centrifugado a 800 xg por 15 minutos a 4° C e o soro foi armazenado a -20° C para posterior dosagem das concentrações sérica de E2. O coração dos animais foi coletado e lavado em salina (NaCl 0,9 %) para a remoção de sangue e coágulos. Em seguida, átrios e ventrículos foram separados, pesados e armazenados a -80° C para posterior quantificação do RNAm da Cx40. A razão entre a massa do útero e o comprimento da tibia foi utilizada como controle da eficiência da cirurgia.

3.4.3 Avaliação Eletrocardiográfica

Dois dias antes da realização das análises eletrocardiográficas, eletrodos foram implantados no espaço subcutâneo próximo às regiões axilares direita e esquerda, e na virilha esquerda dos camundongos, após anestesia com cloridrato de dextrocetamina (Ketamin[®], Cristália) e cloridrato de xilasina (Xilasin[®], Syntec) (50 e 5 mg por kg de pc).

Os registros eletrocardiográficos foram realizados nos animais não anestesiados, com objetivo de evitar o efeito de anestésicos sobre a eletrofisiologia cardíaca.

Os eletrodos foram conectados a um amplificador diferencial e os registros foram adquiridos digitalmente (amostragem de 1000 pontos/segundo) usando uma interface analógica-digital da AD Instrument[®] conectados ao amplificador PowerLab 4/30 (Dunedin, NZ) e com auxílio dos Software *LabChart Pro*[®] versão 7.2 da mesma firma (Almeida *et al.*, 2009). Os impulsos elétricos foram adquiridos em frequência entre 1000-0,3 Hz e amplitude com resolução de 16 bits. Registros de 3 minutos foram analisados com a finalidade de obter os seguintes parâmetros: frequência cardíaca e duração das ondas P e T, do complexo QRS e dos intervalos PR e QT utilizando-se o Software *LabChart Pro*[®] versão 7.2 (AD Instrument[®], Dunedin, NZ).

A figura 8 representa o registro de um camundongo fêmea FO aos três meses de idade. Nesse registro a primeira deflexão é positiva e representa a onda P referente a despolarização atrial esta é seguida por um longo intervalo denominado segmento PR, que corresponde a

lenta condução do impulso elétrico do átrio para os ventrículos através do nodo atrioventricular (NAV). O intervalo PR compreende a onda P e o segmento PR e indica o tempo de propagação do impulso elétrico desde o início da despolarização dos átrios até o início da despolarização ventricular. Em seguida ocorrem deflexões positivas e negativas (complexo QRS) que representa a despolarização ventricular. A última deflexão positiva observada corresponde à onda T, que representa a repolarização ventricular (adaptado de Almeida *et al.*, 2009).

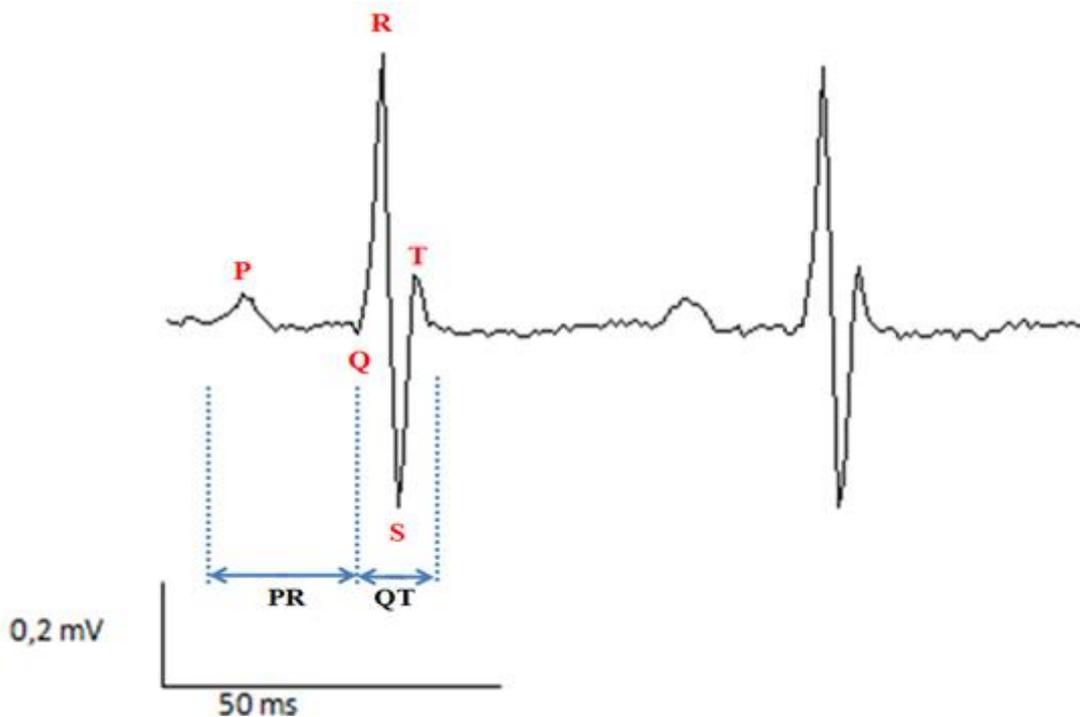


Figura 8 - Esquema representativo do registro eletrocardiográfico de um camundongo fêmea do grupo FO aos 3 meses de idade. A onda P, despolarização atrial. Complexo QRS, despolarização de ventrículo e, onda T, repolarização do ventrículo. O intervalo PR compreende a despolarização dos átrios até o início da despolarização ventricular, e o intervalo QT que corresponde ao tempo total de despolarização e repolarização ventricular.

3.5- Análise da Expressão do RNAm da Conexina40

3.5.1- Extração do RNA total

O RNA total dos átrios, assim como da cultura de células, foi obtido utilizando o reagente TRIZOL (INVITROGEN), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. No tecido, foi adicionado 1 mL de TRIZOL, em seguida este foi homogeneizado usando um processador Ultra-Turrax T25 basic (IKA Werke, Staufen, Germany) e incubado, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Para extrair o RNA total das células estas foram lavadas com salina estéril e em seguida foi adicionado 500 μ L de TRIZOL e incubadas, por 10 minutos à temperatura ambiente.

Após a incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich) a cada uma das amostras, e estas foram incubadas por 5 minutos, e então centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubos tipo *eppendorf*, novos, e o RNA precipitado com 0,5 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos a 12000 xg. O precipitado de RNA, resultante da centrifugação, foi lavado com 1 mL de etanol 70 % (Sigma-Aldrich), seco à temperatura ambiente e solubilizado em água tratada com DEPC (Sigma-Aldrich).

A concentração do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989) e sua integridade foi confirmada por visualização do RNA em gel de agarose 1 % em TAE 1x. As amostras contendo RNA íntegro foram armazenadas a -20°C para posterior obtenção do cDNA.

3.5.2 Transcrição reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen, USA) e oligo (dT) (PROMEGA, USA) em um volume final de 20 µL conforme o protocolo do fabricante. Nesta reação 1 µg do RNA total de cada amostra foi incubado com oligo(dT), dNTPs (10 mM de cada - dATP, dCTP, dGTP, dTTP- PROMEGA, USA) e água tratada com DEPC a 65°C por 5 minutos em um termociclador MWG Biotech-Primus. Foram acrescentados a reação, tampão first strand, 5 mM DTT e 50 U/µL da enzima Superscript III, e incubados novamente a 42°C por 50 minutos. A reação foi finalizada incubando a 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

3.5.3 PCR em tempo real

O cDNA foi adicionado a uma placa de reação junto com uma mistura contendo os iniciadores específicos, água deionizada autoclavada e tampão SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), que contém 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/mL Taq DNA polimerase, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I e 20 nM fluoresceína. As amostras foram analisadas em duplicata.

A quantificação da expressão dos genes foi realizada na máquina de Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA), que detecta mudanças na concentração das amostras por fluorescência. Após desnaturação inicial à 50° C por 2 minutos e à 95° C por 10 minutos, as reações de amplificação seguiram parâmetros específicos que estão descritos na tabela 1. O gene *36β4* foi utilizado como controle interno nas reações de amplificação. Os seguintes iniciadores foram usados: Cx40 direto 5' -CTCCAGTCACCATCTTGC- 3' Cx40 reverso 5' -AGAGCCTGAAGAAGCCAAC - 3', *36β4* direto 5'- CCGAGGCAACAGTTGGGTA- 3' *36β4* reverso 5'- TGTTTGACAACGGCAGCATTT - 3'.

No presente trabalho, utilizamos o método de quantificação relativa das amostras que descreve as mudanças na expressão do gene alvo no grupo experimental em relação à expressão do grupo controle, que foi considerado como 1. Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação do limiar (threshold) dos ciclos (Ct, do inglês cycle threshold) de PCR entre os grupos. A normalização pelo controle interno, cuja expressão não se altera nas diferentes manipulações do estudo, foi feita subtraindo o valor do Ct do gene em

estudo do valor do Ct do *36β4* e esses valores obtidos foram submetidos à fórmula $2\Delta Ct$ (Cordeiro *et al.*, 2013) e em seguida às análises estatísticas.

Tabela 1- Condições da reação de PCR em tempo real para os iniciadores específicos.

Iniciadores	Tecido	Diluição do cDNA	Ciclos	Condições para a amplificação					
				Desnaturação	Duração	Anelamento	Duração	Polimerização	
Cx 40	cardiomiócito	1:50	40	95°C	15''	59°C	30''	60°C	60''
Cx 40	A7r5	1:8	40	95°C	15''	59°C	30''	60°C	60''
Cx 40	átrio	1:100	40	95°C	15''	59°C	30''	60°C	60''

3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para avaliar se os dados seguem a distribuição normal, foi feito o teste de normalidade Shapiro-Wilk com o software *Past* versão 3.4 (disponível em <http://folk.uion.no/hammer/past/>).

Para análise de dois grupos experimentais foi utilizado o Teste *t* -Student e os experimentos com mais de dois grupos foi feito o teste One Way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações Student Newman-Keuls. Estas análises estatísticas foram realizadas com o Software *GraphPad Prism*[®] versão 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão do RNAm da Conexina40 em cultura de células imortalizadas (A7r5) tratadas com benzoato de estradiol

A análise da regulação do estrogênio sobre a expressão do RNAm da Cx40 foi inicialmente realizada em experimentos *in vitro* utilizando cultura de células imortalizadas da linhagem celular A7r5. Nestes experimentos, a cultura de célula foi tratada com benzoato de estradiol nas concentrações 10^{-8} e 10^{-6} M durante 24 horas. E a análise da expressão do RNAm foi realizada através da técnica de RT-PCR em tempo real.

Foi observado que a concentração 10^{-8} M de BE diminuiu os níveis de RNAm da Cx40 em 5 % quando comparado as células tratadas apenas com veículo, porém essa redução não foi estatisticamente significativa. No entanto, quando as células foram incubadas com BE na concentração 10^{-6} M, houve redução significativa, em torno de 35 % nos níveis de RNAm da Cx40 em relação ao controle ($p < 0,0001$), como demonstrado na figura 9. Esses resultados demonstraram que doses elevadas de benzoato de estradiol regulam negativamente os níveis de RNAm de Cx40 *in vitro*. Este experimento foi feito em duplicata e repetido 3 vezes.

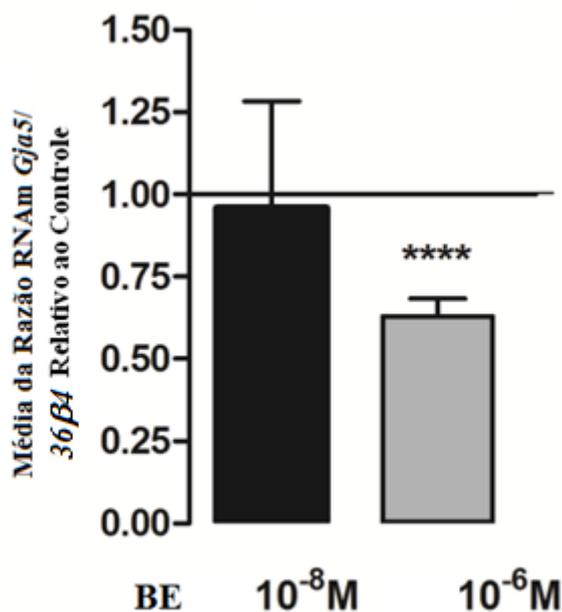


Figura 9 -Expressão do RNAm da Conexina40 em células A7r5 tratadas com BE 10^{-8} e 10^{-6} M após 24 h de incubação. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo tratado com o veículo, que foi considerado igual a 1. Dados expressos como média \pm erro padrão da média, ****p < 0,0001 (vs veículo). Teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Student Newman-Keuls.

4.2 Efeito do benzoato de estradiol sobre a expressão do RNAm da Conexina40 em cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos.

Para analisarmos se o RNAm da Cx40 atrial seria regulado pelo estrogênio *in vitro*, cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos foram tratadas com benzoato de estradiol na concentração 10^{-6} M durante 8 horas. O RNAm da Cx40 foi avaliado, através da técnica de RT-PCR em tempo real, após diferentes tempos de incubação 2, 4 e 8 horas (figura 10).

Os resultados obtidos demonstraram que após 2 horas de incubação as células tratadas com BE 10^{-6} M tiveram redução nos níveis de RNAm da Cx40 de 45 % em relação as células tratadas apenas com o veículo. Após 4 horas de incubação a redução observada nos níveis de RNAm persistiu e foi em torno de 52 %. E após 8 horas houve redução de 40 % nos níveis de RNAm da Cx40 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). O controle são as células tratadas com veículo durante 8 horas. Esses resultados demonstraram que, a dose 10^{-6} M de BE é capaz de reduzir os níveis de RNAm de Conexina40 em cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos a partir de 2 horas de incubação

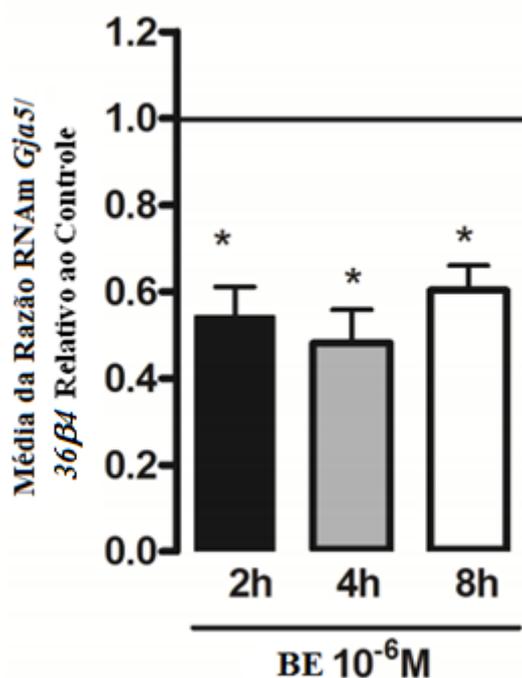


Figura 10- Expressão do RNAm da Conexina40 em cardiomiócitos atriais de ratos neonatos tratados com BE 10^{-6} M após 2 h, 4 h e 8h de incubação. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo tratado com veículo, que foi considerado igual a 1. Dados expressos como média \pm erro padrão da média, * $p < 0,05$ (vs veículo). Teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Student Newman-Keuls.

4.3 Ensaio de transfecção transiente da construção do segmento do promotor da Cx40, -1190/+121 Cx40Luc, na linhagem A7r5 tratada com benzoato de estradiol

Após verificarmos que altas doses de benzoato de estradiol é capaz de diminuir a expressão do RNAm da Cx40 em experimentos *in vitro*, experimentos de transfecção transiente foram realizados com o intuito de investigar se essa regulação seria por ação direta do estrogênio na região promotora do gene da Cx40. A abordagem sobre a influência do estrogênio na atividade transcricional do promotor da Cx40 foi realizada através de experimentos de transfecção transiente utilizando o segmento -1190/+121Cx40Luc (Linhares *et al.*, 2004) na linhagem A7r5. A análise das transfecções foi realizada 48 horas após a co-transfecção de 500 ng da construção -1190/+121Cx40Luc e 100 ng do plasmídeo controle (CMV-pRL) e 24 horas após a incubação destas células com benzoato de estradiol na concentração 10^{-6} M.

Nossos resultados demonstraram que as células transfectadas com a construção -1190/+121Cx40Luc quando incubadas com benzoato de estradiol (10^{-6} M) apresentam redução de 16,6 % na atividade transcricional do seu promotor em relação as células transfectadas com a mesma construção que foram tratadas apenas com veículo ($p < 0,05$), figura 11. Esse resultado demonstrou que o benzoato de estradiol é capaz de inibir a atividade transcricional do promotor da Cx40.

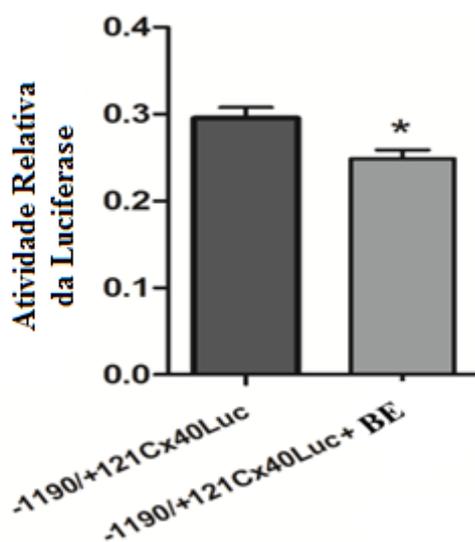


Figura 11- Células da linhagem A7r5 transfectadas com a construção -1190/+121Cx40Luc e tratadas com BE na concentração 10^{-6} M durante 24 horas. Os dados foram normalizados pela co-transfecção com o plasmídeo controle (CMV-pRL). Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo de células transfectadas com -1190/+121Cx40Luc e tratadas com veículo. Dados expressos como média \pm erro padrão da média, * $p < 0,05$. Teste *t* -Student.

4.4. Acompanhamento do peso corporal e avaliação dos tecidos, cardíaco e uterino, após o tratamento dos animais com benzoato de estradiol

Foram realizados experimentos *in vivo* com intuito de averiguar se o estrogênio seria capaz de regular a expressão do RNAm da Cx40 *in vivo* e interferir na propagação do impulso elétrico entre os cardiomiócitos atriais. Para tanto utilizamos camundongos fêmeas que foram

distribuídas em 4 grupos: fêmeas controle submetidas ao estresse cirúrgico (FO), OVX tratadas com veículo (OVX), OVX tratadas com benzoato de estradiol 2 µg (OVX+BE2), OVX tratados com benzoato de estradiol 20 µg (OVX+BE20) por 15 dias.

Comparamos o peso corporal dos animais antes e após o tratamento e observamos que os animais de todos os grupos experimentais tiveram aumento de peso significativo ao longo do experimento (tabela 2).

Os animais do grupo FO (12 animais) apresentaram aumento de 6% de peso corporal. No grupo OVX (11 animais) observamos aumento de 9 %, enquanto os grupos OVX+BE2 (10 animais) e OVX+BE20 (13 animais) apresentaram aumento de 9,2 % e 12,5 %, respectivamente ($p < 0,05$). No entanto, ao final do tratamento não observamos diferença significativa no peso corporal entre os grupos experimentais. Estes resultados demonstram que o estrogênio não influenciou o peso dos animais.

Átrio, ventrículo e útero dos animais foram pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia (tabela 3). Ao compararmos o peso dos átrios entre os diferentes grupos experimentais não observamos diferença entre eles, assim como nenhuma diferença significativa foi observada ao compararmos o peso dos ventrículos desses animais tabela 3.

O peso do útero foi utilizado como indicativo de eficiência da cirurgia e do tratamento dos animais. A média do peso do útero no grupo OVX foi 63 % menor em relação ao grupo FO indicando atrofia no útero destes animais, resultado típico em animais ovariectomizados. O grupo OVX+BE2 que foi ovariectomizado e tratado com 2 µg de BE foi capaz de restabelecer o peso do útero em relação a FO. O grupo OVX+BE20 apresentou aumento significativo de 108,5 % em relação ao grupo FO indicando que a dose de BE de 20 µg foi supra-fisiológica e acarretou em hipertrofia no útero destes animais.

Os grupos OVX e BE20 apresentaram também diferença significativa quando comparados ao grupo OVX+BE2. Esses resultados confirmaram a eficiência da cirurgia e do tratamento, como indicado na tabela 3.

Tabela 2- Média do peso Corporal do animais no início e ao final do Tratamento.

Grupos Experimentais	Média de peso corporal (g)	
	Início do tratamento	Final do tratamento
FO (n = 12)	21,94 ± 0,35	23,29 ± 0,32*
OVX (n = 6)	21,49 ± 0,43	23,22 ± 0,39*
OVX+BE2 (n = 13)	20,93 ± 0,53	23,14 ± 0,53*
OVX+BE20 (n = 10)	21,58 ± 0,25	24,21 ± 0,26*

Média do peso corporal (g). O n representa o número de animais por grupo. Dados expressos como média ± erro padrão da média, sendo * $p < 0,05$. Teste *t*-Student.

Tabela 3- Média do Peso dos Tecidos de Camundongos Fêmeas após 15 dias de tratamento.

TECIDOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	FO (n=12)	OVX (n= 11)	OVX + BE2 (n=10)	OVX +BE20 (n=13)
Átrio (g/cm)	0,00364 ± 0,00036	0,0037 ± 0,0002	0,00376 ± 0,00024	0,00343 ± 0,00023
Ventrículo (g/cm)	0,0541 ± 0,0045	0,0569 ± 0,0032	0,0544 ± 0,0027	0,0539 ± 0,0010
Útero (g/cm)	0,0448 ± 0,0094	0,0165 ± 0,0014*#	0,0475 ± 0,0033	0,0934 ± 0,0048*#

Média dos pesos corrigidos pelo comprimento da tibia (g/cm). Falso-Operadas (FO), Ovariectomizados (OVX), OVX tratados com benzoato de estradiol - 2 µg - (OVX+BE2), OVX tratados com benzoato de estradiol - 20 µg (OVX+BE20). O * indica que os grupos apresentaram diferenças significativas no peso do útero quando comparados ao grupo FO. O # indica que os grupos apresentam diferença significativa quando comparados ao grupo BE2. O n significa número de animais por grupo experimental. Dados expressos como média ± erro padrão da média, sendo $p < 0,05$. Teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Student Newman-Keuls.

4.5 Avaliação eletrocardiográfica de camundongos fêmeas após 15 dias de tratamento com benzoato de estradiol

Com o objetivo de avaliar o comprometimento na condução entre os cardiomiócitos atriais foi realizado o ECG e foram analisados parâmetros temporais como: duração da onda P, do complexo QRS e onda T; e dos intervalos PR e QT. Além disso, foi analisada a frequência cardíaca dos animais, conforme demonstrado na tabela 4 e ilustrado na figura 12.

Em relação a FC, o grupo OVX apresentou redução significativa em torno de 13 % em relação ao grupo FO. Ao compararmos a FC do grupo OVX com o grupo OVX tratado com 2µg de BE (OVX+BE2) observamos que o tratamento com BE foi capaz de induzir aumento na frequência cardíaca de 10 %, aumento similar foi observado quando animais ovariectomizados foram tratados com 20µg de BE, 11,7 %. Não observamos diferença significativa entre os grupos FO, OVX+BE2 e OVX+BE20 . Estes resultados demonstram a importância do E2 na manutenção da FC, independente da dose.

Ao analisarmos a duração da onda P observamos que os animais do grupo OVX apresentaram redução significativa de aproximadamente 21 % quando comparado ao grupo FO, indicando diminuição no tempo de propagação do potencial de ação entre os cardiomiócitos atriais.

Ocorreu aumento significativo na duração da onda P quando animais ovariectomizados tratado com 2µg de BE (OVX+BE2) foram comparados aos animais ovariectomizados sem tratamento (OVX), esse aumento foi de 28,5 %. O tratamento com 20µg de BE da mesma forma causou aumento na duração da onda P, 45 % ($p < 0,05$).

Não observamos diferença na duração da onda P entre os grupos FO e OVX+BE2 e apesar dos animais do grupo OVX+BE20 apresentarem aumento de aproximadamente 14 % neste parâmetro quando comparado ao grupo FO, essa diferença não foi considerada significativa. Estes resultados demonstraram a importância do estrogênio na duração da onda P.

Nenhuma diferença estatística foi observada nos outros parâmetros analisados, indicando que o tratamento com E2 não influenciou esses parâmetros.

Tabela 4- Análise Eletrocardiográfica de Camundongos Fêmeas após 15 dias de tratamento.

PARÂMETROS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	FO (n=12)	OVX (n= 11)	OVX+BE2 (n=10)	OVX+BE20 (n=13)
FC (bpm)	697,7 ± 14,29	604,5 ± 20,41*	665,2 ± 2,04#	675,5 ± 9,40#
Onda P (ms)	12,33± 0,65	9,63 ± 0,63*	12,03 ± 1,24#	13,96 ± 0,35#
Intervalo PR (ms)	32,13± 0,88	32,66 ± 1,14	31,91 ± 2,69	35,04 ± 0,77
Complexo QRS (ms)	8,98 ± 0,43	9,58 ± 0,11	10,18 ± 1,12	9,86 ± 0,23
Intervalo QT (ms)	29,32 ± 0,75	27,91 ± 1,27	30,56 ± 1,71	30,50 ± 0,67
Onda T (ms)	20,33± 0,61	18,33 ± 1,21	20,39 ± 1,01	20,66 ± 0,49

Parâmetros eletrocardiográficos de Camundongos Fêmeas não anestesiadas após 15 dias de tratamento. Falso-Operadas (FO), Ovariectomizados (OVX), OVX tratados com benzoato de estradiol - 2 µg - (OVX+BE2), OVX tratados com benzoato de estradiol - 20 µg (OVX+BE20). FC= Frequência Cardíaca; bpm = batimentos por minuto; ms= milissegundos. O * indica que os grupos apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo FO. O # indica que houve diferença significativa entre os grupos quando comparados ao OVX. Dados expressos como média ± erro padrão da média, sendo p<0,05. Teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Student Newman-Keuls.

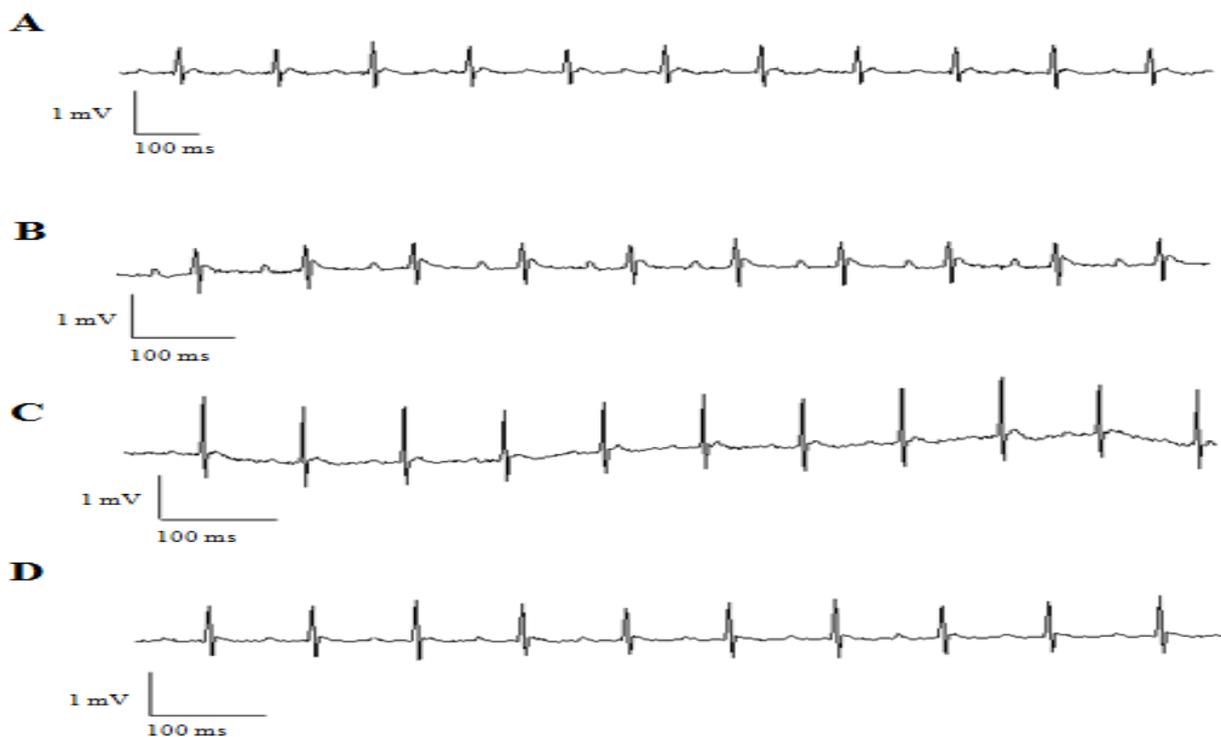


Figura 12- Eletrocardiograma representativo de camundongos fêmeas não anestesiadas. **A.** Animal falso-operado (FO). **B.** Animal ovariectomizado (OVX). **C.** OVX tratados com benzoato de estradiol - 2 µg - (OVX+BE2) e **D.** OVX tratados com benzoato de estradiol - 20 µg (OVX+BE20).

4.6 Avaliação da expressão do RNAm da Cx40 em camundongos fêmeas após 15 dias de tratamento com benzoato de estradiol

Para avaliar se o RNAm da Cx40 é regulado pelo estrogênio *in vivo*, foi analisada a expressão do RNAm da Cx40 nos átrios dos animais após 15 dias de tratamento através da técnica de RT-PCR em tempo real (figura 13). Foram analisadas amostras de RNAm do átrio de 6 animais por grupo experimental.

Não observamos diferença significativa na expressão atrial do da Conexina40 entre os grupos FO, OVX e OVX+2BE. No entanto, os resultados demonstraram que os animais ovariectomizados que receberam a dose de BE de 20 µg ao dia por 15 dias (OVX+BE20), tiveram redução significativa de 35 % na expressão do RNAm da Cx40 em relação ao controle ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que o benzoato de estradiol em altas concentrações é capaz de reduzir os níveis de expressão do RNAm da Conexina40, *in vivo*.

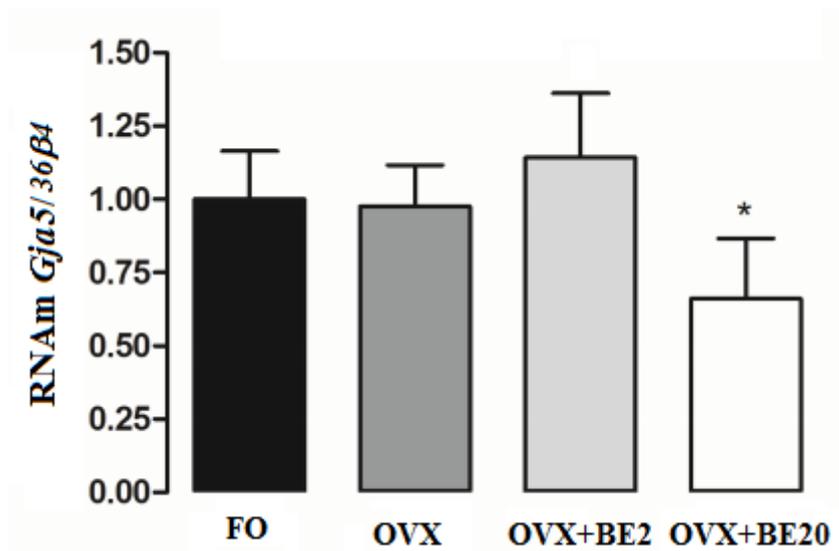


Figura 13- Expressão do RNAm da Conexina40 no átrio dos animais após 15 dias de tratamento. Foram avaliados amostras de 6 animais por grupo experimental. Os resultados são expressos em relação aos valores do grupo controle, FO, que foi considerado igual a 1. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média, * $p < 0,05$ (vs grupo FO). Teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Student Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

O 17 β -estradiol (E2) é capaz de modular a eletrofisiologia e a função cardíaca, e seus efeitos sobre o sistema cardiovascular tem atribuído a este um importante papel cardioprotetor (Hong *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 1990). Estudos com ratas ovariectomizadas demonstram que estas apresentam diminuição do débito cardíaco, da pressão sistólica e da fração de ejeção associados a alterações na expressão das isoformas α e β da cadeia pesada da miosina, e essas alterações podem ser prevenidas se houver reposição de E2 (Capasso *et al.*, 1983; Ren *et al.*, 2003).

A propagação da atividade elétrica no miocárdio depende da transferência intercelular de corrente, que ocorre via junções comunicantes (Gourdie *et al.*, 1991). Alterações na expressão e na organização das junções comunicantes podem desencadear mudanças na condução elétrica e na contração das células cardíacas, e assim, estarem associadas ao desenvolvimento de doenças cardíacas (Dupont *et al.*, 2001). Estudos em animais geneticamente modificados que não expressam a proteína Conexina40, camundongos *knockouts*, indicaram que a expressão desta conexina é fundamental para a condução de impulsos elétricos nos átrios e no sistema de condução (Simon *et al.*, 1998; Kirchhoff *et al.*, 1998). As junções formadas pela Cx40 parecem ser as principais responsáveis pela condução elétrica no átrio, com isto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do estrogênio sobre a expressão da Cx40 e suas implicações no acoplamento entre os cardiomiócitos atriais. Nosso trabalho apresenta dados inéditos sobre a regulação da Cx40 mediante altas doses de benzoato de estradiol *in vitro* e *in vivo*.

Para avaliar a regulação do estrogênio sobre a expressão do RNAm da Cx40 em células imortalizadas da linhagem celular A7r5, estas foram incubadas com benzoato de estradiol nas concentrações 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M durante 24 horas. A dose 10⁻⁸ M foi utilizada, porque este valor se aproxima da concentração média de estrogênio detectada em soro humano no período pré-ovulatório (ou seja, 2393 \pm 356 pmol / l) (Polan *et al.*, 1990) enquanto 10⁻⁶ M representou uma dose suprafisiológica.

Observamos que as células incubadas com BE na concentração 10⁻⁶ M tiveram redução significativa, em torno de 35%, nos níveis de RNAm da Cx40 em relação ao controle, indicando que doses elevadas de benzoato de estradiol regulam negativamente os níveis de RNAm de Cx40 *in vitro*.

Escolhemos utilizar uma linhagem celular derivada de músculo liso aórtico de rato embrionário, células A7r5. Esta linhagem responde ao tratamento com estrogênio (Cairrão *et al.*, 2012), sendo empregadas em diversas pesquisas que envolvem avaliação do efeito do estrogênio no sistema cardiovascular. Os receptores de estrogênio são encontrados em células do músculo liso, artérias coronárias e células endoteliais (Gruber *et al.*, 2002). Estas células foram armazenadas em estufa com 10 % de soro fetal bovino e quando utilizadas no experimento, usamos soro fetal bovino a 0,5 %, assim, as células se mantinham viáveis e as influências hormonais do soro eram reduzidas (Faustino *et al.*, 2012).

Para analisarmos se o RNAm da Cx40 no átrio seria regulado pelo estrogênio *in vitro*, utilizamos cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos. Estas células foram incubadas com benzoato de estradiol na concentração 10⁻⁶ M em diferentes tempos de incubação, 2, 4 e 8 horas, uma vez que, no experimento anterior, não observamos efeito na concentração de BE a 10⁻⁸ M.

Após 2 horas de incubação, as células tratadas com BE 10^{-6} M apresentaram redução significativa nos níveis de RNAm da Cx40 que persistiu nos tempos de 4 e 8 horas em relação as células tratadas apenas com o veículo (fig. 9). Este resultado foi capaz de demonstrar que a dose suprafisiológica de BE, 10^{-6} M, reduziu os níveis de RNAm de Conexina40 em cultura de células primárias de cardiomiócitos atriais de ratos neonatos a partir de 2 horas de incubação.

Após observarmos que altas doses de benzoato de estradiol eram capazes de diminuir a expressão do RNAm da Cx40 em experimentos *in vitro*, experimentos de transfecção transiente foram realizados com o intuito de investigar se essa regulação seria por ação direta do estrogênio na região promotora do gene da Cx40.

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que células transfectadas com a construção -1190/+121Cx40Luc, quando incubadas com benzoato de estradiol (10^{-6} M), apresentaram redução de 16,6% na atividade transcricional do seu promotor em relação as células transfectadas com a mesma construção, que foram tratadas apenas com veículo, indicando que o benzoato de estradiol é capaz de inibir a atividade transcricional do promotor da Cx40.

Para a realização dos experimentos sobre a ativação da região promotora da Conexina40 pelo 17- β -estradiol, utilizamos um sistema de transfecção transiente conhecido pelo nosso grupo. Em 2004, Linhares e colaboradores, através de ensaios de transfecção transiente utilizando a linhagem celular A7r5, identificaram a sequência mínima da região promotora do gene da Cx40 responsável por sua ativação, assim como, alguns fatores de transcrição cardíaco-específicos que interagem com esta região. A análise para a identificação da presença de sítios putativos foi realizada utilizando Genomatix Software (www.genomatix.gsf.de) e identificamos a presença de 3 sítios para ligação do RE (possíveis sequências de elementos responsivos ao estrogênio, ERE). Embora seja necessária a realização de novos experimentos sobre a regulação da expressão gênica, esses achados sugerem que a modulação negativa que o 17-beta estradiol exerce sobre a ativação do promotor do gene da Cx40 possa ser por interação do RE ativado às sequências específicas na região promotora deste gene.

Com base nos resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, nosso grupo decidiu realizar experimentos *in vivo* e avaliar se o estrogênio seria capaz de regular a expressão gênica do RNAm da Cx40 e interferir no acoplamento entre os cardiomiócitos atriais e na função cardíaca, uma vez que, a expressão de Cx40 é fundamental para a condução de impulsos elétricos nos átrios e no sistema de condução cardíaco.

Para isso utilizamos camundongos fêmeas que foram distribuídas em 4 grupos: fêmeas controle, submetidas ao estresse cirúrgico (FO), ovariectomizadas tratadas com veículo (OVX), OVX tratadas com a dose fisiológica de benzoato de estradiol, 2 μ g (OVX+BE2), OVX tratados com dose suprafisiológica de benzoato de estradiol, 20 μ g (OVX+BE20), por 15 dias (desenho experimental adaptado de Faustino *et al.*, 2012).

O peso corporal dos animais foi acompanhado e avaliamos o peso dos tecidos cardíaco e uterino. Os animais foram submetidos à análise eletrocardiográfica e foi analisada a expressão do RNAm da Cx40 nos átrios destes animais.

Ao compararmos o peso corporal dos animais, antes e após o tratamento, observamos que todos os grupos experimentais tiveram aumento de peso significativo ao longo do experimento. No entanto, ao final do tratamento não observamos diferença significativa no peso corporal entre os grupos experimentais, indicando que o estrógeno não influenciou o peso dos animais.

A privação dos hormônios ovarianos é relacionada com ganho de peso em ratas (Vasconcellos *et al.*, 2005). Após a ovariectomia, o ganho de peso pode ter relação com a supressão dos hormônios ovarianos, uma vez que, o estrogênio aumenta o consumo

energético, diminuindo o peso corporal (Shimomura *et al.*, 2002; Guyard *et al.*, 1991). Outros trabalhos também verificaram aumento no peso corporal em animais ovariectomizados (Fisher *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2003). Por outro lado, Guyard e colaboradores (1991) observaram que ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol ganhavam menos peso corporal em relação aos seus controles. Neste caso, a ovariectomia aumentou o peso corporal dos animais e a reposição com estradiol suprimiu este efeito, ou seja, o estradiol teve um efeito hipofágico.

Faustino e colaboradores (2012) não observaram variação no peso corporal entre camundongos após ovariectomia e camundongos ovariectomizados tratados com doses supra-fisiológicas de benzoato de estradiol. Assim como Faustino e colaboradores (2012), nós avaliamos o peso corporal, não verificamos se havia maior adiposidade no grupo de animais que foram ovariectomizados e não receberam tratamento com benzoato de estradiol.

O peso do útero normalizado pelo comprimento da tíbia foi utilizado como indicativo da eficiência da cirurgia e do tratamento dos animais. Os resultados confirmaram a eficiência destes parâmetros. Os animais ovariectomizados (OVX) que não receberam reposição com BE apresentaram o útero atrofiado. O grupo OVX+BE2, que foi ovariectomizado e tratado com 2 µg de BE, foi capaz de restabelecer o peso do útero em relação ao grupo controle (FO) indicando que esta dose se aproxima da dose fisiológica. O grupo OVX+BE20, ovariectomizado e tratado com 20 µg de BE, apresentou aumento significativo no peso do útero em relação ao grupo FO, demonstrando que a dose supra-fisiológica de BE acarretou em hipertrofia no útero destes animais. Apesar de não termos dosado o estrogênio sérico nestes animais, utilizamos este parâmetro que indicou a eficiência da cirurgia e do tratamento.

Na literatura é descrito que mulheres na pré menopausa têm menor prevalência de hipertrofia cardíaca patológica do que homens da mesma idade. Fato este atribuído ao efeito cardioprotetor do estrogênio (Agabiti-Rosei e Muiesan, 2002). O efeito do E2 reduz eficientemente a angiotensina II e endotelina 1, que induzem hipertrofia nos cardiomiócitos (Pedram *et al.*, 2005), além disso é capaz de diminuir a expressão do receptor AT₁ (Nickenig *et al.*, 2000). Foi visto ainda que a terapia de reposição hormonal com E2 é capaz de reverter a hipertrofia ventricular esquerda em mulheres na pós-menopausa (Miya *et al.*, 2002; Modena *et al.*, 1999).

Para avaliar se haveria hipertrofia no coração dos animais, utilizamos o peso do coração como indicativo indireto de hipertrofia, pesamos átrios e ventrículos, e normalizamos pelo comprimento da tíbia. Ao compararmos o peso dos átrios entre os diferentes grupos experimentais não observamos diferença entre eles, assim como nenhuma diferença significativa foi observada ao compararmos o peso dos ventrículos desses animais, indicando que não houve hipertrofia no coração dos mesmos.

Para avaliar o comprometimento na propagação da atividade elétrica entre os cardiomiócitos atriais foi realizado o ECG e a frequência cardíaca também foi analisada.

O grupo OVX, que não recebeu tratamento com BE, apresentou redução significativa na FC em relação ao grupo FO. Ao compararmos a FC do grupo OVX com o grupo OVX+BE2, que recebeu a dose fisiológica de BE, observamos que o tratamento foi capaz de induzir aumento na frequência cardíaca de 10 %. Aumento similar foi observado quando animais ovariectomizados foram tratados com a dose supra-fisiológica de BE, 11,7 %. Estes resultados indicam a importância do E2 na manutenção da FC independente da dose.

Estudos anteriores já demonstraram que, o avanço da idade e a queda da produção de estrogênio promovem modificações no controle autonômico da frequência cardíaca. Em mulheres, após a menopausa, pode haver redução do componente parassimpático (Brocbank *et al.*, 2000) e aumento na atividade simpática, evidenciado pela análise da variabilidade da frequência cardíaca, o qual, por sua vez, pode ser revertida com o uso crônico de terapia estrogênica (Mercurio *et al.*, 2000; Rosano *et al.*, 1997).

Dentre os parâmetros analisados no eletrocardiograma, avaliamos a duração da onda P, que indica o tempo de despolarização nos átrios. Observamos que os animais do grupo OVX apresentaram redução significativa neste parâmetro quando comparado ao grupo FO, indicando diminuição no tempo de propagação do potencial de ação entre os cardiomiócitos atriais. Nos animais tratados com a dose fisiológica de BE (OVX+BE2), ocorreu aumento significativo na duração da onda P quando foram comparados aos animais ovariectomizados sem tratamento (OVX). O tratamento com a dose suprafisiológica de BE (OVX+BE20), da mesma forma, causou aumento significativo na duração da onda P quando comparados aos animais ovariectomizados sem tratamento. Observamos então, que as fêmeas repostas com E2 apresentaram maior duração da onda P, ou seja, a reposição hormonal foi capaz de reverter o efeito provocado pela ovariectomia. Estes resultados demonstraram a importância do estrogênio na duração da onda P.

Nenhuma diferença estatística foi observada nos outros parâmetros analisados no ECG, indicando que o tratamento com E2 não influenciou esses parâmetros.

O aumento na duração da onda P nos animais tratados com BE nos levou a investigar se este estaria modulando a expressão do RNAm da Cx40, fundamental para a condução de impulsos elétricos nos átrios e no sistema de condução. Para isso, analisamos a expressão do RNAm da Cx40 no átrio de animais tratados com benzoato de estradiol, através da técnica de RT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que os animais ovariectomizados que receberam a dose suprafisiológica de BE (OVX+BE20) tiveram redução significativa na expressão do RNAm da Cx40 em relação ao grupo controle (FO), no entanto, nenhuma diferença na expressão do RNAm da Cx40 foi observada entre os grupos experimentais: FO, OVX e OVX+BE2. Estes resultados indicam que o benzoato de estradiol, em altas concentrações, é capaz de reduzir os níveis de expressão do RNAm da Conexina40, *in vivo*, assim como ocorreu nos experimentos *in vitro*.

Além da Cx40, outros fatores podem interferir no acoplamento elétrico atrial. Alterações na expressão e na organização das junções comunicantes podem desencadear mudanças na condução elétrica e na contração das células cardíacas (Dupont *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a Cx43 pode ser regulada pelo estrogênio e que a ausência do mesmo pode provocar danos e redução desta conexina. Pesquisas realizadas em ratas ovariectomizadas sujeitas a um tratamento com concentrações fisiológicas de estradiol induziram aumento na quantidade de Cx43, provavelmente através de vias dependentes de óxido nítrico e PKC (Chen *et al.*, 2010). O E2 aumenta a expressão de proteína da Cx43 e do RNAm da mesma (Chen *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que Cx43 pode ser pós-transcricionalmente regulada por microRNAs no miocárdio (Yang *et al.*, 2007) e o E2 pode exercer efeitos influenciando os perfis de expressão desses microRNA em vários tipos de células (Paris *et al.*, 2012). Wang e colaboradores (2015) observaram que o aumento do miR-23 pode reduzir a expressão de Cx43 na deficiência de estrogênio, induzindo danos as junções comunicantes no coração.

Além dos efeitos do estrogênio sobre as junções comunicantes, vários estudos indicam que este pode prevenir arritmias por efeitos diretos em alterações eletrofisiológicas modulando os níveis de vários canais de íons (Murphy e Steenbergen, 2014). Na literatura é descrito que o estrogênio possui ação inibitória sobre a corrente de cálcio do tipo L (I_{CaL}). Esse efeito também atribui ao estrogênio uma função antiarrítmica (Meyer *et al.*, 1998; Nakajima *et al.*, 1999). Outros estudos demonstraram que o tratamento com E2 resulta na ativação de canais de potássio sensíveis a ATP (Lee *et al.*, 2000). Embora não tenhamos informações sobre a modulação do estrógeno sobre os canais rápidos de sódio, responsáveis pela corrente de sódio (I_{Na+}), essa modulação também poderia ser responsável por alterações na duração da onda P.

Apesar do tratamento com benzoato de estradiol ter sido eficiente em restabelecer o tempo de propagação do potencial de ação entre os cardiomiócitos atriais, não fomos capazes de relacionar a expressão da Cx40 com a duração da onda P, no entanto, observamos que a regulação do estrogênio sobre a Cx40 parece ter importância em doses supra-fisiológicas deste hormônio.

As Conexinas 40 e 43 podem ainda ser reguladas por hormônio tireoideano (HT). O tratamento de cardiomiócitos neonatais tratados com T3 aumentou a expressão da Cx43 e acelerou a formação de junções comunicantes (Tribulova *et al.*, 2004). Além disso, o RNAm da Cx40 é regulado positivamente por HT, agindo nos átrios através do receptor de HT e pode ser um dos mecanismos que contribuem para as alterações na condução auricular em disfunções da tireoide (Almeida *et al.*, 2009), entre elas a fibrilação.

A análise para presença de sítios putativos no segmento da região promotora do gene da Cx40 identificou sítios para a ligação dos receptores de hormônio (TR), os TREs (elemento responsivo ao hormônio tireoideano). Associado ao hipertireoidismo está o aumento nos níveis séricos de estrogênio, é possível que nesta situação a diminuição ou o efeito contrário que o estrogênio exerce sobre a ativação do promotor da Cx40 em relação ao HT, exerça uma cardioproteção quanto as arritmias atriais.

Estudos demonstram que há aumento nos níveis séricos de estrogênio em situações, tais como: durante a gravidez, aumento de peso, consumo de fito e xenoestrógenos, hipertireoidismo, terapia de reposição hormonal (Day e Hawkins, 1999), tumores ovarianos (Zahid *et al.*, 2014), puberdade precoce (Alves *et al.*, 2007) e hiperestimulação ovariana (Wang *et al.*, 2011). Possivelmente nessas situações, a diminuição do RNAm da Conexina40 reduza os impactos negativos que estes quadros possam causar ao coração, sobretudo diminuindo as chances de arritmias.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o benzoato de estradiol na concentração 10^{-6} M regula de forma negativa a expressão do RNAm da Conexina40 em culturas de células imortalizadas (A7r5) e em cultura primária de cardiomiócitos atriais. Tal regulação, ocorre por ativação direta na sequência -1190 a +121 da região promotora do gene da Cx40. Assim como foi observado *in vitro*, doses suprafisiológicas de benzoato de estradiol regulam de forma negativa a expressão do RNAm da Cx40 no átrio de camundongos. No entanto, não observamos correlação entre a expressão do RNAm da Conexina40 e a duração da onda P desses animais. Estes resultados sugerem que a regulação sobre a expressão gênica da Cx40 que o estrógeno exerce possa ter importância em situações suprafisiológica deste hormônio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCIA, FILIPPO; MARINO, MARIA. **The effects of 17 β -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane.** *Frontiers in PHYSIOLOGY*, v. 2, 2011.

ADAMS MR; CLARKSON TB; KAPLAN JR; KORITNIK DR: **Ovarian secretions and arteriosclerosis.** In: JN Gutmann, AH DeCherney, PM, (Eds). *Ovarian secretions and cardiovascular and neurological function.* Raven Press, New York, 1990.

AGABITI-ROSEI, ENRICO; MUIESAN, MARIA LORENZA. **Left ventricular hypertrophy and heart failure in women.** *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, v. 20, n. 2, p. S34-8, 2002.

AIRES, M. M. **Fisiologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

ALMEIDA, NORMA AS *et al.* **Connexin40 messenger ribonucleic acid is positively regulated by thyroid hormone (TH) acting in cardiac atria via the TH receptor.** *Endocrinology*, v. 150, n. 1, p. 546-554, 2009.

ALVES, CRÉSIO *et al.* **Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças.** *Cad Saúde Pública*, v. 23, n. 5, p. 1005-14, 2007.

BAILEY, MICHAEL S.; CURTIS, ANNE B. **The effects of hormones on arrhythmias in women.** *Current women's health reports*, v. 2, n. 2, p. 83-88, 2002.

BARRETT-CONNOR, ELIZABETH; BUSH, TRUDY L. **Estrogen and coronary heart disease in women.** *Jama*, v. 265, n. 14, p. 1861-1867, 1991.

BEER, STEPHANIE *et al.* **High-dose 17 β -estradiol treatment prevents development of heart failure post-myocardial infarction in the rat.** *Basic research in cardiology*, v. 102, n. 1, p. 9-18, 2007.

BIERHUIZEN MFA, VAN AMERSFOORTH SCM, GROENEWEGEN A, VLIEX S & JONGSMA HJ. **Characterization of the rat connexin40 promoter: two Sp1/Sp3 binding sites contribute to transcriptional activation.** *Cardiovascular Research* 46: 511-522, 2000.

BLOM, MAARTEN J. *et al.* **Metabolism of estradiol, ethynylestradiol, and moxestrol in rat uterus, vagina, and aorta: influence of sex steroid treatment.** *Drug metabolism and disposition*, v. 29, n. 1, p. 76-81, 2001.

BROCKBANK CL, *et al.* **Heart rate and its variability change after the menopause.** *Exp Physiol*, v.85, p. 327-330, 2000.

BRUNEAU BG, NEMER G, SCHMITT JP, CHARRON F, ROBITAILLE L, CARON S, CONNER DA, GESSLER M, NEMER M, SEIDMAN CE & SEIDMAN JG. **A murine model of holtoram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease.** *Cell* 106: 709-721, 2001.

BUTTRICK, P. & SCHEUER, J. **Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly.** *Circulation* .v.86, p.1336-1338,1992.

CAIRRÃO, ELISA *et al.* **Non-genomic vasorelaxant effects of 17 β -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition.** *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, n. 5, p. 615-624, 2012.

CAPASSO, J. M. *et al.* **Sex differences in myocardial contractility in the rat.** *Basic research in cardiology*, v. 78, n. 2, p. 156-171, 1983.

CHALDOUPI, SEVASTI-MARIA *et al.* **Reduced connexin40 protein expression in the right atrial appendage of patients bearing the minor connexin40 allele (- 44 G \rightarrow A).** *EP Europace*, v. 14, n. 8, p. 1199-1205, 2012.

CHEN, CHIEN-CHANG; LIN, CHIH-CHAN; LEE, TSUNG-MING. **17 β -estradiol decreases vulnerability to ventricular arrhythmias by preserving Connexin43 protein in infarcted rats.** *European journal of pharmacology*, v. 629, n. 1, p. 73-81, 2010.

CHEN, HSIAO-HUEI *et al.* **Transcription enhancer factor-1-related factor-transgenic mice develop cardiac conduction defects associated with altered connexin phosphorylation.** *Circulation*, v. 110, n. 19, p. 2980-2987, 2004.

CHESKIS, BORIS J. *et al.* **Signaling by estrogens.** *Journal of cellular physiology*, v. 213, n. 3, p. 610-617, 2007.

CORDEIRO, ALINE *et al.* **Thyroid hormone regulation of Sirtuin 1 expression and implications to integrated responses in fasted mice.** *Journal of Endocrinology*, v. 216, n. 2, p. 181-193, 2013.

COSTA, P. C. S. *et al.* **Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 4, p. 439-446, 2000.

DAY, C.; HAWKINS, M. **O estrogênio através do ciclo da vida.Função e disfunção endócrinas.** *Women's Network on Health and the Environment/Rede de Mulheres-Saúde e Ambiente*.Ed.14-suplemento.2ºsemestre.1999.

DEROO, BONNIE J.; KORACH, KENNETH S. **Estrogen receptors and human disease.** *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 3, p. 561, 2006.

DHEIN, S. *et al.* **A new role for extracellular Ca²⁺ in gap-junction remodeling: studies in humans and rats.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 377, n. 2, p. 125-138, 2008.

DHILLON, PARAMDEEP S. *et al.* **The relationship between connexin expression and gap junction resistivity in human atrial myocardium.***Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, p. CIRCEP. 113.000606, 2014.

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

DONOGHUE, MARY *et al.* **Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 35, n. 9, p. 1043-1053, 2003.

DORNSTAUDER, E. *et al.* **Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon®) intended for large scale use in hormone replacement therapy.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 78, n. 1, p. 67-75, 2001.

DUPONT E, MATSUSHITA T, KABA R, VOZZI C, COPPEN SR, KHAN N, KAPRIELIAN R, YACOUB MH, SEVERS NJ. **Altered connexin expression in human congestive heart failure.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33:359-371, 2001.

ECKARDT, D. *et al.* **Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 36, n. 1, p. 101-110, 2004.

ELVAN, ARIF *et al.* **Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs.** *Circulation*, v. 96, n. 5, p. 1675-1685, 1997.

FAUSTINO, LARISSA C. *et al.* **Thyroid hormone and estradiol have overlapping effects on kidney glutathione S-transferase- α gene expression.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 303, n. 6, p. E787-E797, 2012.

FISHER, JONATHAN S.; KOHRT, WENDY M.; BROWN, MARYBETH. **Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats.** *Journal of Applied Physiology*, v. 88, n. 1, p. 265-271, 2000.

GARCIA-SEGURA, LUIS MIGUEL *et al.* **Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair.** *Journal of neurobiology*, v. 40, n. 4, p. 574-584, 1999.

GEMEL, JOANNA *et al.* **Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 76, p. 159-168, 2014.

GOLLOB, MICHAEL H. *et al.* **Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation.** *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 25, p. 2677-2688, 2006.

GOURDIE, R. G.; GREEN, C. R.; SEVERS, N. J. **Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy.** *J Cell Sci*, v. 99, n. Pt 1, p. 41-55, 1991.

GROHÉ, CHRISTIAN *et al.* **Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors.** *FEBS letters*, v. 416, n. 1, p. 107-112, 1997.

GROS, DANIEL *et al.* **Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart.** *Circulation Research*, v. 74, n. 5, p. 839-851, 1994.

GRUBER, CHRISTIAN J. *et al.* **Production and actions of estrogens.** *New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 5, p. 340-352, 2002.

GUTSTEIN, DAVID E. *et al.* **Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43.** *Circulation research*, v. 88, n. 3, p. 333-339, 2001.

GUYARD, B. *et al.* **Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet.** *Metabolism*, v. 40, n. 5, p. 529-533, 1991.

HERVÉ JC, BOURMEYSTER N & SARROUILHE D. **Diversity in protein-protein interactions of connexins: emerging roles.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1662: 22-41, 2004.

HERYNK, MATTHEW H.; FUQUA, Suzanne AW. **Estrogen receptor mutations in human disease.** *Endocrine reviews*, v. 25, n. 6, p. 869-898, 2004.

HONG, MUN K. *et al.* **Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women.** *The American journal of cardiology*, v. 69, n. 3, p. 176-178, 1992.

JIANG, CANWEN *et al.* **Endothelium independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β oestradiol in vitro.** *British journal of pharmacology*, v. 104, n. 4, p. 1033-1037, 1991.

KASAHARA H, WAKIMOTO H, LIU M, MAGUIRE CT, CONVERSO KL, SHIOI T, HUANG W-Y, MANNING WJ, PAUL D, LAWITTS J, BERUL CI & IZUMO S. **Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein.** *The Journal of Clinical Investigation* 108: 189-201, 2001.

KATZUNG, B.G., **Farmacologia básica e clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KATZENELLENBOGEN, BENITA S. **Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways.** *Journal of the society for gynecologic investigation*, v. 7, n. 1 suppl, p. S33-S37, 2000.

KIRCHHOFF S, NELLES E, HAGENDORFF A, KRÜGER O, TRAUB O & WILLECKE K. **Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice.** *Current Biology* 8: 299-302, 1998.

KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology: The basic Science of Poisons.** Estados Unidos da América: McGraw-Hill Companies, 2001.

KOEHLER, KONRAD F. *et al.* **Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor β .** *Endocrine Reviews*, v. 26, n. 3, p. 465-478, 2005.

KONHILAS, JOHN P.; LEINWAND, LESLIE A. **The effects of biological sex and diet on the development of heart failure.** *Circulation*, v. 116, n. 23, p. 2747-2759, 2007.

KOSTIN, SAWA; SCHAPER, JUTTA. **Tissue-specific patterns of gap junctions in adult rat atrial and ventricular cardiomyocytes in vivo and in vitro.** *Circulation research*, v. 88, n. 9, p. 933-939, 2001.

KOSTIN, SAWA *et al.* **Structural correlate of atrial fibrillation in human patients.** *Cardiovascular research*, v. 54, n. 2, p. 361-379, 2002.

KOVÁCS, KÁLMÁN A. *et al.* **Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (α and β) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium.** *Molecular human reproduction*, v. 7, n. 11, p. 1085-1091, 2001.

KUIPER, G. G. *et al.* **Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, 1996.

KUIPER, GEORGE GJM *et al.* **Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β .** *Endocrinology*, v. 138, n. 3, p. 863-870, 1997.

KUMAR, NALIN M.; GILULA, NORTON B. **The gap junction communication channel.** *Cell*, v. 84, n. 3, p. 381-388, 1996.

KRUGER, O. *et al.* **Defective vascular development in connexin 45-deficient mice.** *Development-Cambridge*, v. 127, n. 19, p. 4179-4193, 2000.

LANTIN-HERMOSO, REGINA L. *et al.* **Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 273, n. 1, p. L119-L126, 1997.

LARSEN, Jennifer A.; KADISH, Alan H. **Effects of gender on cardiac arrhythmias.** *Journal of cardiovascular electrophysiology*, v. 9, n. 6, p. 655-664, 1998.

LEE, TSUNG-MING *et al.* **Cardioprotective effects of 17 β -estradiol produced by activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in canine hearts.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 32, n. 7, p. 1147-1158, 2000.

LIN, XIANMING *et al.* **Connexin40 and connexin43 determine gating properties of atrial gap junction channels.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 48, n. 1, p. 238-245, 2010.

LINHARES VLF, ALMEIDA NAS, MENEZES DC, ELLIOTT DA, LAI D, BEYER EC, CAMPOS DE CRAVALHO AC & COSTA MW. **Transcriptional regulation of the murine *Connexin40* promoter by cardiac factor *Nkx2.5*, *GATA4* and *Tbx5*.** *Cardiovascular Research* 64: 402-411, 2004.

LIU, HAN; PEDRAM, ALI; KIM, JIN KYUNG. **Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β .** *Cardiovascular research*, v. 89, n. 1, p. 119-128, 2011.

MAHMOODZADEH, SHOKOUFEH *et al.* **17 β -Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts.** Cardiovascular research, p. cvp350, 2009.,

MATTHEWS, JASON; GUSTAFSSON, JAN-ÅKE. **Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β .** Molecular interventions, v. 3, n. 5, p. 281, 2003.

MEINHARDT, U. e MULLIS, P. E., 2002. **The aromatase cytochrome P-450 and its clinical impact.** Hormone Research .v. 57, p.145-152, 2002.

MERCURO, GIUSEPPE *et al.* **Evidence of a role of endogenous estrogen in the modulation of autonomic nervous system.** The American journal of cardiology, v. 85, n. 6, p. 787-789, 2000.

MEYER, R. *et al.* **Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat.** Experimental Physiology, v. 83, n. 03, p. 305-321, 1998.

MIGLIACCIO, SILVIA *et al.* **Estrogens modulate the responsiveness of osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) stably transfected with estrogen receptor.**Endocrinology, v. 130, n. 5, p. 2617-2624, 1992.

MIYA, YOSHINORI *et al.* **Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women.** Hypertension Research, v. 25, n. 2, p. 153-159, 2002.

MODENA, MARIA GRAZIA *et al.* **Effects of transdermal 17 β -estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women.** Hypertension, v. 34, n. 5, p. 1041-1046, 1999.

MOORE, John T. *et al.* **Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms.** Biochemical and biophysical research communications, v. 247, n. 1, p. 75-78, 1998.

MORKUNIENE, RAMUNE; JEKABSONE, AISTE; BORUTAITE, VILMANTE. **Estrogens prevent calcium-induced release of cytochrome c from heart mitochondria.** FEBS letters, v. 521, n. 1, p. 53-56, 2002.

MOSSELMAN, SIETSE; POLMAN, JAN; DIJKEMA, REIN. **ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor.** FEBS letters, v. 392, n. 1, p. 49-53, 1996.

MURPHY, ELIZABETH; STEENBERGEN, CHARLES. **Estrogen regulation of protein expression and signaling pathways in the heart.** Biol Sex Differ, v. 5, n. 1, p. 6, 2014.

NAFTOLIN, F. *et al.* **Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus.** Biology of reproduction, v. 42, n. 1, p. 21-28, 1990.

NAKAJIMA, TOSHIAKI *et al.* **Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17 β estradiol in cardiac myocytes.** British journal of pharmacology, v. 127, n. 2, p. 429-440, 1999.

NAO, TOMOKO *et al.* **Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm.** The American journal of cardiology, v. 91, n. 6, p. 678-683, 2003.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** Nova York: Worth Publishers, 2000.

NGUYỄN-TRẦN VTB, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB, Ruiz-Lozano P, Barrere-Lemaire S, Kondo R, Norman LW, Gourdie RG, Rahmen MM, Feld GK, Clark RB, GILES WR & Chien KR. **A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages.** Cell 102: 671-682, 2000.

NICKENIG, GEORG *et al.* **Differential effects of estrogen and progesterone on AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells.** Circulation, v. 102, n. 15, p. 1828-1833, 2000.

ÖSTERLUND, MARIE K.; HURD, YASMIN L. **Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders.** Progress in neurobiology, v. 64, n. 3, p. 251-267, 2001.

PARIS, O. *et al.* **Direct regulation of microRNA biogenesis and expression by estrogen receptor beta in hormone-responsive breast cancer.** Oncogene, v. 31, n. 38, p. 4196-4206, 2012.

PATEL, DAKSHESH *et al.* **Atrial fibrillation-associated Connexin40 mutants make hemichannels and synergistically form gap junction channels with novel properties.** FEBS letters, v. 588, n. 8, p. 1458-1464, 2014.

PEDRAM, ALI *et al.* **Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIPI1.** Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 28, p. 26339-26348, 2005.

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

PEDRAM, ALI *et al.* **Estrogen receptor- β prevents cardiac fibrosis.** Molecular Endocrinology, v. 24, n. 11, p. 2152-2165, 2010.

PELZER, T.; SHAMIM, A.; NEYSES, L. **Estrogen effects in the heart. In: Biochemical Mechanisms in Heart Function.** Springer US, p. 307-313, 1996.

PETERS, ROBERT W.; GOLD, Michael R. **The influence of gender on arrhythmias.** Cardiology in review, v. 12, n. 2, p. 97-105, 2004.

POLAN, MARY LAKE *et al.* **Cultured Human Luteal Peripheral Monocytes Secrete Increased Levels of Interleukin-1***. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 70, n. 2, p. 480-484, 1990.

POLONTCHOUK, LIOUDMILA *et al.* **Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells.** The FASEB Journal, v. 16, n. 1, p. 87-89, 2002.

POLONTCHOUK, LIOUDMILA *et al.* **Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria.** Journal of the American College of Cardiology, v. 38, n. 3, p. 883-891, 2001.

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

REN, JUN *et al.* **Impact of estrogen replacement on ventricular myocyte contractile function and protein kinase B/Akt activation.** American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 284, n. 5, p. H1800-H1807, 2003.

ROSANO, GIUSEPPE *et al.* **Effect of Estrogen Replacement Therapy on Heart Rate Variability and Heart Rate in Healthy Postmenopausal Women.** American Journal of Cardiology, v. 80, n. 6, p. 815-817, 1997.

SÁEZ JC, BERTHOUD VM, BRAÑES MC, MARTÍNEZ AD & BEYER EC. **Membrane channels formed by connexins: their regulation and functions.** Physiological Reviews 83: 1359-1400, 2003.

SAFARI, TAHEREH *et al.* **High-Dose Estradiol-Replacement Therapy Enhances the Renal Vascular Response to Angiotensin II via an AT2-Receptor Dependent Mechanism.** Advances in pharmacological sciences, v. 2015, 2015.

SALAMEH, A. *et al.* **Subchronic alpha-and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression.** The faseb journal, v. 20, n. 2, p. 365-367, 2006.

SAMBROOK, J. FRITSCH, AND E. F. MANIATIS. **"T. 1989, Molecular cloning: a laboratory manual-2 th "** Cold Spring Laboratory Press, New York (1989).

SARRAZIN, JEAN-FRANCOIS *et al.* **Reduced incidence of vagally induced atrial fibrillation and expression levels of connexins by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs.** Journal of the American College of Cardiology, v. 50, n. 15, p. 1505-1512, 2007.

SAWAYA SE, RAJAWAT YS, RAMI TG, SZALAI G, PRICE RL, SIVASUBRAMANIAN N, MANN DL & KHOURY DS. **Downregulation of connexin40 and increased prevalence of atrial arrhythmias in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of tumour necrosis factor.** American Journal of Physiology 292: 1561-1567, 2007.

SCHMIDT, JOLANTA B. *et al.* **Treatment of skin aging with topical estrogens.** International journal of dermatology, v. 35, n. 9, p. 669-674, 1996.

SEGRETAIN D & FALK MM. **Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal.** Biochimica et Biophysica Acta 1662: 3-21, 2004

SEUL KH, TADROS PN & BEYER EC. **Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis.** Genomics 46: 120-126, 1997.

SEVERS, NICHOLAS J. **Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?.** Journal of cellular and molecular medicine, v. 5, n. 4, p. 355-366, 2001.

SEVERS NJ, DUPONT E, COPPEN SR, HALLIDAY D, INETT E, BAYLIS D & ROTHERY S. **Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease.** Biochimica et Biophysica Acta 1662: 138-148, 2004.

SHIMOMURA, KENJU *et al.* **Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy?.**Endocrine journal, v. 49, n. 4, p. 417-423, 2002.

SIGNORETTI, SABINA; LODA, MASSIMO. **Estrogen receptor β in prostate cancer: Brake pedal or accelerator?.** The American journal of pathology, v. 159, n. 1, p. 13-16, 2001.

SIMON AM, GOODENOUGH DA, LI E & PAUL DL. **Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block.** Current Biology 8: 295-298, 1998.

SIMON, T.; KRAUSE, M . M.; BRENTANO, C. F.; JAILLON, P. **Sex Differences in the Prognosis of Congestive Heart Failure.** Circulation. v.103, p. 375-380, 2001.

SIMONCINI, TOMMASO *et al.* **Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase.** Nature, v. 407, n. 6803, p. 538-541, 2000.

SOSINSKY GE & NICHOLSON BJ. **Structural organization of gap junction channels.** Biochimica et Biophysica Acta 1711: 99-125, 2005.

SULLIVAN, R. *et al.* **Heart malformations in transgenic mice exhibiting dominant negative inhibition of gap junctional communication in neural crest cells.** Developmental biology, v. 204, n. 1, p. 224-234, 1998.

SUN, YIGUO *et al.* **Novel germline GJA5/connexin40 mutations associated with lone atrial fibrillation impair gap junctional intercellular communication.**Human mutation, v. 34, n. 4, p. 603-609, 2013.

SZABO, JOSEPH *et al.* **Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats.** American journal of veterinary research, v. 64, n. 3, p. 310-315, 2003.

TEUNISSEN BEJ, VAN Amersfoorth SCM, Opthof T, Jongsma HJ & Bierhuizen MFA. **Sp1 and Sp3 activate the rat connexin40 proximal promoter.** Biochemical and Biophysical Research Communications 292: 71-78, 2002.

TEUNISSEN BEJ & Bierhuizen MFA. **Transcriptional control of myocardial connexins.** Cardiovascular Research 62: 246-255, 2004.

THOMAS, SUMA A. *et al.* **Disparate effects of deficient expression of connexin43 on atrial and ventricular conduction evidence for chamber-specific molecular determinants of conduction.** Circulation, v. 97, n. 7, p. 686-691, 1998.

TRIBULOVA, NARCIS *et al.* **Enhanced connexin-43 and α -sarcomeric actin expression in cultured heart myocytes exposed to triiodo-L-thyronine.** Journal of molecular histology, v. 35, n. 5, p. 463-470, 2004.

VAN RIJEN, HAROLD VM *et al.* **Human connexin40 gap junction channels are modulated by cAMP.** Cardiovascular research, v. 45, n. 4, p. 941-951, 2000.

VASCONCELLOS, LEONARDO DE SOUZA; SABINO, KELLY RENATA; PETROIANU, Andy. **Relação entre ooforectomia e peso em modelo experimental.** Rev. Col. Bras. Cir, v. 32, n. 3, p. 132-135, 2005.

VELDEN, HUUB MW *et al.* **Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat.** Journal of cardiovascular electrophysiology, v. 9, n. 6, p. 596-607, 1998.

VERHEULE S, VAN BATENBURG CA, COENJAERTS FE, KIRCHHOFF S, WILLECKE K & JONGSMA HJ. **Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin40.** Journal of Cardiovascular Electrophysiology 10 (10): 1380-1389, 1999.

WANG, HUIHUI *et al.* **Supraphysiological estrogen levels adversely impact proliferation and histone modification in human embryonic stem cells: possible implications for controlled ovarian hyperstimulation assisted pregnancy.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 155, n. 1, p. 58-64, 2011.

WANG, MEIJING *et al.* **Estrogen receptor β mediates increased activation of PI3K/Akt signaling and improved myocardial function in female hearts following acute ischemia.** American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 296, n. 4, p. R972-R978, 2009.

WANG, NING *et al.* **MicroRNA-23a Participates in Estrogen Deficiency Induced Gap Junction Remodeling of Rats by Targeting GJA1.** International journal of biological sciences, v. 11, n. 4, p. 390, 2015.

WHITE, RICHARD E.; DARKOW, DAVID J.; LANG, JESSICA L. FALVO. **Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism.** Circulation research, v. 77, n. 5, p. 936-942, 1995.

WIRKA, ROBERT C. *et al.* **A common connexin-40 gene promoter variant affects connexin-40 expression in human atria and is associated with atrial fibrillation.** Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, v. 4, n. 1, p. 87-93, 2011.

YANG, BAOFENG *et al.* **The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2.** *Nature medicine*, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2007.

YANG, SHAO-HUA *et al.* **Mitochondrial localization of estrogen receptor β .** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 12, p. 4130-4135, 2004.

ZAHID, MUHAMMAD *et al.* **Unbalanced estrogen metabolism in ovarian cancer.** *International Journal of Cancer*, v. 134, n. 10, p. 2414-2423, 2014.

ZHAO, CHUNYAN; DAHLMAN-WRIGHT, KARIN; GUSTAFSSON, JAN-ÅKE. **Estrogen receptor β : an overview and update.** *Nuclear receptor signaling*, v. 6, 2008.

ZHOU, LI *et al.* **17β -Estradiol inhibits angiotensin II-induced collagen synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts via modulating angiotensin II receptors.** *European journal of pharmacology*, v. 567, n. 3, p. 186-192, 2007.