

Efeitos do tratamento com tamoxifeno sobre o peso e composição corporal de ratas normotensas e hipertensas

ANDRESSA BOLSONI LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA – ES, MARÇO 2009

ANDRESSA BOLSONI LOPES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO E
COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATAS NORMOTENSAS E
HIPERTENSAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a: Dr^a. Gláucia Rodrigues Abreu.

VITÓRIA
2009

ANDRESSA BOLSONI LOPES

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO E
COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATAS NORMOTENSAS E
HIPERTENSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 16 de março de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Gláucia Rodrigues Abreu
Departamento de Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientadora

Prof^a. Dr^a Sônia Alves Gouvêa
Departamento de Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof^a. Dr^a. Leida Maria Botion
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus queridos pais, Edésio e Angela, aos meus irmãos Anderson e Caroline e a tia Glória, indispensáveis nesta minha conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e força.

À minha família, meu alicerce.

À tia Glória e Caroline, pelo apoio e suporte.

Ao Pedro, pelo amor e compreensão.

Aos meus amigos, pelo incentivo.

À minha querida orientadora, Prof^ª. Glaucia, pelos ensinamentos, dedicação, confiança e paciência.

À Prof^ª. Sônia, pelo carinho, confiança e por toda ajuda oferecida nestes anos.

Aos queridos amigos do laboratório: Mariana, Cíntia, Walckiria, Edineuza, Patrick, Washington e Lázaro.

À Mariana, pelo apoio e por sempre torcer para que esta vitória fosse alcançada.

Às alunas Amanda, Marília e Vanessa pela contribuição.

À Walckria, pelas oportunidades.

À prof^ª Ciciline, pela orientação e suporte durante a realização deste trabalho.

Ao Fernando e demais funcionários do laboratório de análises bioquímicas do HUCAM.

À Prof. Dr Leida Maria Botion, por ter aceito nosso convite para compor a banca avaliadora.

A todos os professores, colegas e funcionários da Pós-Graduação que contribuíram direta e indiretamente para elaboração deste trabalho.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

“... o importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria justificativa racional pra existir.”

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

O tamoxifeno, um agente antiestrogênico não esteroide, classificado como Modulador Seletivo dos Receptores de Estrogênio (SERMs), tem sido utilizado na prática clínica desde 1970 no tratamento adjuvante para o câncer de mama. Controversamente este SERM possui ações estrogênicas agonistas em diferentes tecidos, como útero, ossos e fígado, e ainda sobre o metabolismo lipídico. As ações agonistas ou antagonistas dos SERMs dependem de sua interação com receptor de estrogênio α and β . Mudanças ponderais e metabólicas têm sido observadas em mulheres durante tratamento para o câncer de mama. O estrogênio, por sua vez, é capaz de modular o tecido adiposo em seus diferentes sítios. Estudos em humanos e em animais experimentais mostram que a reposição com estrogênio leva a redução da deposição de tecido adiposo visceral e ganho de tecido adiposo subcutâneo. Tais evidências apontam para um importante papel do estrogênio na modulação do tecido adiposo branco via lipólise e/ou lipogênese. O objetivo deste estudo foi investigar as causas e mecanismos responsáveis pela perda ponderal promovido pelo tratamento crônico com tamoxifeno em ratas normotensas e hipertensas, ooforectomizadas e não ooforectomizadas. Para este estudo utilizamos ratas Wistar e SHR, com 4 semanas de idade, divididas nos seguintes grupos: ratas normotensas controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); e ratas SHR controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT). O tratamento foi iniciado no 47^o dia de vida, sete dias após cirurgia para ooforectomia. O Tamoxifeno foi administrado uma vez por dia, por via oral (gavage) (1mg/Kg), durante 90 dias consecutivos. Nos grupos controle o veículo administrado foi salina a 0,9 %. O peso corporal foi monitorado semanalmente. E ao fim do tratamento com tamoxifeno os animais foram sacrificados por decapitação e imediatamente removidos os seguintes tecidos: sangue, adiposo visceral, músculo soleus e fêmur. Nossos resultados demonstram que o tamoxifeno promoveu menor ganho de peso corporal provavelmente devido à redução tecido adiposo visceral (NC 49,39±0,9 mg/g; NT 41,5±1,77 mg/g; NOC 73,8±2,61 mg/g e NOT 28,2±1,61 mg/g). As modificações da massa adiposa possivelmente ocorrem por ações agonistas diretas

nos receptores de estrogênio do tecido adiposo visceral e indiretamente por aumento do metabolismo via hormônios tireoidianos. Não observamos alterações no peso seco e a concentração protéica do músculo sóleo, bem como, nas proteínas séricas totais e frações. O peso do fêmur de animais ooforectomizados tratados foi superior ao peso do grupo ooforectomizados controles por ações agonistas nos receptores de estrogênio dos ossos. Foi observado elevação dos níveis de TG nos animais ooforectomizados e tratados. Níveis séricos elevados de T4 total por ações diretas nos receptores de estrogênio da glândula tireóide foram encontrados. Futuros estudos deverão esclarecer especificamente o sítio de ação do tamoxifeno responsável pela alterações no tecido adiposo visceral apontados nesse estudo.

Palavras-chave: Tamoxifeno, Estrogênio, Metabolismo Corporal, Tecido Adiposo.

ABSTRACT

The tamoxifen, a nonsteroidal antiestrogenic agent classified like selective estrogen receptor modulator (SERM), has been widely used since the 1970s in adjuvant hormonal treatment of primary breast cancer. Paradoxically this SERM is known for produce agonistic effects against the estrogen in uterus, bone, liver and fat metabolism. The actions agonist or antagonists of the SERMs depends of its interaction with α and β estrogen receptor. Changes on the body weight and metabolism have been observed in women during the treatment of the cancer of breast. The estrogen, it is able to modulate the adipose tissue in its different stages. Studies in women and in experimental animals show that the replacement with estrogen is responsible for the reduction of the visceral adipose deposition and the stimulation of the subcutaneous adipose tissue. This evidence indicates an important paper of the estrogen in the modulation of the lipolytic and / or lipogenic effects in this adipose tissue. The objective of the present study was to investigate the causes and mechanisms responsible for the loss of body weight promoted by the chronic treatment with tamoxifen in normotensive and hypertensive, ooforectomized and non ooforectomized rats. Female normotensive (Wistar) and spontaneously hypertensive rats (SHR), 4-week-old were used in this study. Both, Wistar and SHR were classified in 8 different groups: normotensive control (NC), normotensive treated (NT), normotensive ovariectomized control (NOC), normotensive ovariectomized treated (NOT), SHR controls (SC), SHR treated (ST), SHR ovariectomized controls (SOC) and SHR ovariectomized treated (SOT), n=10 in each group. The treatment began in the 47^o day of life of the rats, seven days after gonadectomy. The Tamoxifen was administered once a day by gavage (1mg/Kg) during 90 days. In the control groups was done 0,9% of saline, as vehicle. Weekly the body weight was monitored. On the final of the treatment the animals were sacrificed by decapitation. Immediately samples were removed the blood, visceral fat, muscle Soleus and femur. The Tamoxifen promoted a minor gain of body weight specifically due to the reduction on the visceral adipose tissue. Its possible that the modifications of the adipose mass was caused directly by agonist actions on the estrogen receptors, or indirectly for increase of the metabolism because of the thyroid hormones.

We did not observe alteration on the dry weight of the proteins concentration in the muscle Soleus. Also did not occurred modification in the serum total proteins or its fractions. The major weight of femur in the animals treated was consequent to estrogenic agonist effect of this drug. We did not observe modify in the serum levels of the LPL, but the levels of TG in the ooforectomized and treated animals were significantly major. It's possible that the Tamoxifen promotes like-estrogens actions in the hepatic tissue. This explains its alterations on the lipoproteins and serum lipids. The elevated serum levels of T4 in the Tamoxifen groups could be by direct or indirect actions of tamoxifen on thyroid gland. Furthermore news studies probably will clarify the specific action of the Tamoxifen on the adipose visceral tissue demonstrated in this study.

Key words: Tamoxifen; Estrogen; Corporal metabolism; Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Corte histológico do tecido adiposo branco.....	21
Figura 2- Modelo de sinalização da lipólise no tecido adiposo.....	24
Figura 3- Estrutura e mecanismos de ação do receptor de estrogênio alfa e beta....	26

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Peso corporal (g) com 0, 30, 60 e 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); (B)- ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....42
- Gráfico 2- Peso da gordura visceral (mg/g de peso corporal) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); (B)- ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....45
- Gráfico 3- Peso seco do fêmur (mg/g de peso corporal) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). (B)- ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....46
- Gráfico 4- Glicemia capilar periférica com 0, 45 e 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (WOT). (B)- ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....48
- Gráfico 5- Valores de tiroxina sérica total –T4 ($\mu\text{g/dL}$) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). (B)- ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....50
- Gráfico 6- Níveis do Hormônio Estimulante da Tireóide - TSH ($\mu\text{IU/ml}$), após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- ratas normotensas: controles (NC), tratadas

(NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). (B)-
ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e
ooforectomizadas tratada (SOT).....51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Avaliação das proteínas do músculo sóleo e sanguíneas. Nos grupos normotensos: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT).....34
- Tabela 2 – Avaliação das proteínas do músculo sóleo e sanguíneas. Nos grupos SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controle (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....34
- Tabela 3 – Influência do tratamento crônico com tamoxifeno sobre os níveis séricos de triglicérides (TG) e lípase lipoproteica (LPL). Nos grupos: normotensas controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT).....47
- Tabela 4 - Influência do tratamento crônico com tamoxifeno sobre os níveis séricos de triglicérides (TG) e lípase lipoproteica (LPL). Nos grupos SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT).....47

LISTA DE SIGLAS

ACBP - Proteína ligadora de acilCoA

ATGL- Lipase de triglicerídeos do adipócito

AF-1 - Função de Ativação de Transcrição independente de hormônios

AGL - Ácidos graxos livres

ATP - Adenosina trifosfato

cAMP - Monofosfato de adenosina cíclico

CD36 - Proteína de membrana apresentadora de ácidos graxos livres

cGMP - Monofosfato de guanosina cíclica

CoA - Coenzima A

DBD - Domínio Ligante do DNA

DG- Diacilglicerol

E2 - Estradiol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EPM - Erro padrão da média

ERE - Elementos de resposta ao estrogênio

FA-2 - Função de ativação de Transcrição dependente de hormônios

FABP - Proteína ligadora de ácidos graxos livres

FATP - Proteína transportadora de ácidos graxos livres

GLUTs - Proteínas transportadoras de glicose

HDL- Lipoproteína de alta densidade

Hsp90 - Proteína heat shock 90

IL-6 – Interleucina 6

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LBD - Domínio Receptor Ligante

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LHS – Lipase hormônio sensível

LPL - Lipase lipoproteica

MG - Monoglicerídeos

MGL - Lípase de monoglicerídeos

mL - Mililitros

NTx - N-Telopeptídeo do Colágeno tipo 1

PAI 1- Inibidor do ativador do plasminogênio

PGC1 - Co-ativador para processos transcripcionais 1

PINP- Pró-Peptídeo Amino-Terminal do Colágeno tipo 1

PKA - Proteína quinase A

PKG - Proteína quinase G

RE - Receptores de estrogênio

RE α - Receptor de estrogênio alpha

RE β - Receptor de estrogênio beta

rpm - Rotações por minuto

RT- Receptores para hormônios tireoidianos

RT α - Receptores para hormônios tireoidianos alpha

RT β - Receptores para hormônios tireoidianos beta

SERMs - Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio

T3 - Triiodotironina

T4 – Tireoxina

TAG - Triacilgliceróis

TAS - Tecido adiposo subcutâneo

TAV - Tecido adiposo visceral

TCA - Ácido Tricloroacético

TG - Triglicerídeos;

TGF α - Fator de transformação e crescimento

TGF- β - Fator transformador do crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha

TSH - Hormônio tireoestimulante

U/L - Unidades por litro

UCP1- Proteína termogenina

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	35
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	36
3.4 CASTRAÇÃO DOS ANIMAIS.....	37
3.5 TRATAMENTO COM TAMOXIFENO.....	37
3.6 CONTROLE DO PESO CORPORAL.....	37
3.7 GLICEMIA CAPILAR.....	38
3.8 RETIRADA DOS ÓRGÃOS E AMOSTRA SANGUÍNEA.....	38
3.8.1 Soro sanguíneo	38
3.8.2 Gordura visceral	38
3.8.3 Músculo sóleo	39
3.8.4 Fêmur	39
3.9 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS E ENSAIO DE PROTEÍNAS DO MÚSCULO SÓLEO.....	39
3.10 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PESO SECO DO MÚSCULO SÓLEO.....	40
3.11 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	40
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS	42
4.1 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO CORPORAL.....	42

4.2 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE PESO E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO SÓLEO E CONCENTRAÇÃO PROTEICA SANGUÍNEA.....	43
4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL.....	45
4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO DO FÊMUR.....	46
4.5 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE OS TRIGLICERÍDEOS E LPL.....	47
4.6 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A GLICEMIA CAPILAR.....	48
4.7 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE OS NÍVEIS HORMONAIS DE T4 E TSH.....	49
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERENCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um importante problema de saúde. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a região Sudeste lidera o número de casos de câncer de mama no Brasil e a estimativa de sua incidência para esta região em 2008 é de 68,12 novos casos a cada 100.000 mulheres.

Mudanças ponderais e metabólicas têm sido observadas em mulheres realizando tratamento do câncer de mama (HOSKIN; ASHLEY; YARNOLD, 1992; ALI et al., 1998). Estas alterações metabólicas, principalmente envolvendo a massa adiposa visceral estão fortemente relacionadas a doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (KISSEBAH et al., 1982; FOLSOM et al., 1993). A alta incidência destas doenças na sociedade desperta o interesse para o estudo de fármacos que possam intervir no metabolismo do tecido adiposo (HEINE et al., 2000).

Por definição, metabolismo, do grego *metabolismos* que significa mudança, troca, é um conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos. Envolvem basicamente dois mecanismos: o anabolismo (síntese e armazenamento) e o catabolismo (quebra e decomposição) (MURRAY, 2006, p.15).

Para garantir a sobrevivência de todas as espécies, mesmo em condições de escassez de nutrientes, os mamíferos são capazes de estocar o excesso de calorias consumidas e não requisitadas para suprir necessidades metabólicas imediatas, como carboidratos (glicogênio), lipídios e proteínas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilgliceróis (TAG) em seu citoplasma sem que isso seja nocivo para célula, uma vez que, os TAG estão envoltos por proteínas chamadas pirilipinas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Este tecido é constituído pelo Tecido Adiposo Marrom (Multilocular) e pelo Tecido Adiposo Branco (Unilocular). O tecido adiposo marrom é especializado na produção de calor (termogênese), seus depósitos estão praticamente ausentes em humanos

adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. O adipócito marrom pode atingir 60 μm de diâmetro, possui um tamanho médio de 90100 μm , além de conter grande número de mitocôndrias. A termogênese ocorre porque a proteína desacopladora-1 (UCP-1, termogenina), atua como um canal de próton que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso das mitocôndrias durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs, desviando esses prótons do complexo F_1F_0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, permitindo assim, que se dissipe em calor a energia estocada na mitocôndria (CANNON; NEDERGAARD, 2004). O adipócito branco maduro, por sua vez, armazena os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. É interessante ressaltar que, durante seu desenvolvimento, a célula jovem contém múltiplas gotículas de lipídios, que coalescem para formar uma inclusão lipídica unitária com o amadurecimento celular. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que hemácias, fibroblastos e células do sistema imune, e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada (LANGIN, 2006).

Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), fibras nervosas, estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (REXFORD, 2006).

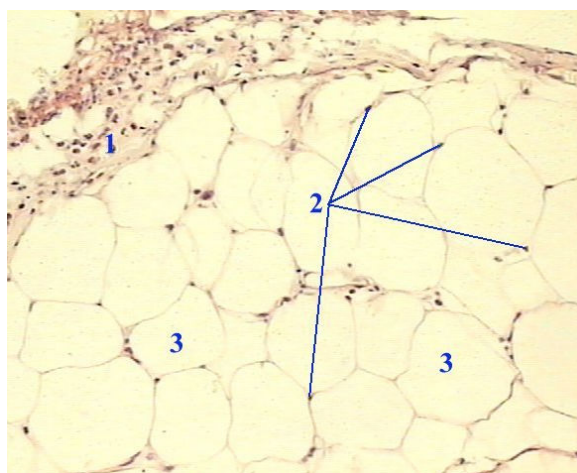


Figura 1: Corte histológico do tecido adiposo branco de ratos. Coloração: Hematoxilina e Eosina Aumento 40x. 1- tecido conjuntivo; 2- Núcleo; 3- Espaço ocupado por triacilgliceróis.

O tecido adiposo branco se deposita no tecido subcutâneo (TAS) e no tecido visceral (TAV). A gordura visceral é mais sensível ao balanço energético que a gordura subcutânea, pois apresenta maior sensibilidade a eventos lipolíticos, é mais irrigada, mais inervada e possui maior densidade de receptores (WAJCHENBERG, 2000).

Durante muito tempo, pensou-se que o tecido adiposo branco era somente uma estrutura secundária cuja característica mais marcante era capacidade de armazenar grandes quantidades de gordura na forma de TAG e realizar lipólise e lipogênese em momentos oportunos. Pouco se atentou para outro aspecto funcional: a sua participação no controle do peso corporal e da ingestão alimentar. Pistas sobre essa particularidade funcional existem na literatura em trabalhos da década de 1950, quando Kennedy propôs uma teoria metabólica para explicar o controle do comportamento alimentar denominada de Teoria Lipostática. Em 1994, com a descoberta da leptina por Zhang e colaboradores inaugurou-se uma nova era de estudos sobre o tecido adiposo como órgão endócrino. Todos os diferentes hormônios liberados pelos adipócitos são denominados adipocinas (FRÜBECK, 2006).

A estrutura protéica, assim como a função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento, é altamente variada e compreendem proteínas relacionadas ao sistema imune, como as citocinas clássicas, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), fatores de crescimento (fator transformador de crescimento TGF- β) e proteínas da via complemento alternativa (adipsina). Outras adipocinas estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio), homeostase vascular (inibidor do ativador de plasminogênio 1), homeostase glicêmica (adiponectina) e angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular VEGF). Entretanto, a adipocina que tem chamado atenção em especial é a leptina, um hormônio descoberto em 1994, produto do gene *ob* do camundongo obeso (*ob/ob*), tendo como função principal a saciedade (REXFORD, 2006).

As principais ações metabólicas do tecido adiposo podem ser divididas em atividades lipogênicas que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento de TAG na gotícula de gordura intracitoplasmática, ao passo que atividade lipolítica se refere às ações que resultam na hidrólise do TAG armazenado e na liberação de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol (MURRAY, 2006).

Para a biossíntese de TAG, o adipócito necessita de uma fonte de glicerol-3-fosfato e de AGL complexado com coenzima A (CoA), constituindo o composto acilCoA. O primeiro é obtido como um produto da via glicolítica, e o segundo provem da biossíntese a partir de acetilCoA ou da captação de AGL proveniente de lipoproteínas circulatórias (quilomícrons e VLDL) que no tecido adiposo sofrem a ação da lipase lipoproteica (LPL), que hidrolisa o TAG nelas contido, liberando os AGL, que são transportados para o citoplasma dos adipócitos ou de outras células para serem oxidados (ciclo do ácido cítrico) e ou reesterificados e armazenados (FRUHBECK et al, 2001).

A produção de glicerol-3-P requer a captação de glicose, o que envolve proteínas transportadoras de glicose a GLUT1 e GLUT4, e este processo é controlado pela insulina. Assim, a insulina secretada durante o período prandial, estimula a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando o transporte de glicose. Além disso, o ritmo de metabolização da hexose é acelerado pela insulina, gerando mais glicerol-3-P (OSBORNE, 2000).

Parte do fluxo de metabólitos da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato que, transportado para o interior da mitocôndria, é transformado em acetilCoA pela ação da *piruvato desidrogenase*. Este é acoplado a oxalacetato pela ação da *citrato sintase*, gerando citrato. Parte do citrato é transportado de volta ao citoplasma, onde sofre a ação da enzima *ATP-citrato liase*, gerando novamente acetilCoA. Esta sofre a ação da enzima *acetilCoA carboxilase* transformando-se em malonilCoA. Este último produto entra em uma complexa via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima *ácido graxo sintase*, que culmina na formação de acilCoA, que é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG, que é finalmente incorporado à gotícula citoplasmática de gordura (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Embora o tecido adiposo seja capaz de sintetizar AGL, este é fornecido ao adipócito em maior quantidade pelas lipoproteínas. Estas são submetidas à ação da LPL por ocasião da passagem desse material pela microcirculação do tecido adiposo. Desta forma, a maior proporção da captação se dá por difusão facilitada através de transportadores. A proteína de membrana CD36 apresenta a molécula de AGL para uma outra proteína, Proteína Transportadora de AGL (FATP). Uma vez no citosol, o

AGL se liga a Proteína Ligadora de Ácidos Graxos (FABP), que transporta o produto para ser acilado com coenzima A. Este processo é executado por outra proteína integral da membrana, a AcilCoA sintase. Finda esta etapa, a acilCoA é levada pela Proteína Ligadora de AcilCoA (ACBP) para os locais de esterificação com glicerol-3-P. Uma vez concluída a síntese dos TAG, estes são transferidos para a gotícula de óleo citoplasmática (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

A outra habilidade importante do adipócito é a de realizar a lipólise dos TAG, liberando AGL e glicerol (figura 2). A mobilização dos estoques de TAG dos adipócitos ocorre por três reações consecutivas e é catalisado por enzimas, incluindo: lipase hormônio sensível (LHS) e lipase de monoglicerídeos, descobertas há 40 anos e mais recentemente inclui a lipase de triglicerídeos do adipócito (ATGL) (ZECHNER et al., 2009). A ATGL é altamente expressada no tecido adiposo de humanos e ratos e possui alta especificidade para hidrólise de TAG (ZIMMERMANN et al., 2004), enquanto que, a LHS hidrolisa triglicerídeos em diglicerídeos e estes em monoglicerídeos, a lipase de monoglicerídeos é capaz de hidrolisar monoglicerídios em AGL e glicerol. A ativação da LHS se dá por meio de fosforilação em serina, pela ação da *proteína quinase A* (PKA) (LANGIN, 2006).

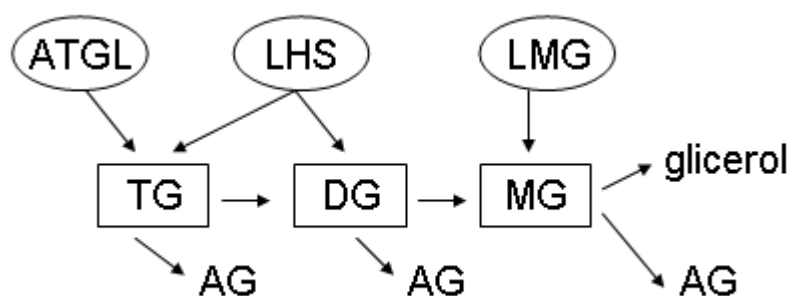


Figura 2: Modelo de sinalização da lipólise no tecido adiposo. LHS, lipase hormônio sensível; ATGL, lipase de triglicerídeos do adipócito; LMG, lipase de monoglicerídeos; TG, triglicerídeos; DG, diglicerídeos; MG, monoglicerídeos; AG, ácidos graxos.

Em razão da destacada atuação do tecido adiposo, aliada à importância que adquiriu nos últimos tempos, passou a ser considerado um órgão central do controle metabólico. Reforça essa impressão a imensa lista receptores e de hormônios que

agem sobre este tecido, seja regulando seu metabolismo ou influenciando sobre produção hormonal e adipogênese (BJORNTORP, 1997).

Estes hormônios podem ser classificados como lipogênicos, como a insulina e catecolaminas (via receptores α -adrenérgicos) e lipolíticos como catecolaminas (via receptores β -adrenérgicos), hormônio do crescimento, peptídeos natriuréticos, leptina, hormônios tireoidianos, testosterona e estrogênio (BJORNTORP, 1997; MCMURRAY; HACKNEY, 2005).

O estrogênio, um hormônio esteróide, presente em quantidades significantes no plasma da mulher sob as formas: β -estradiol, estrona e estriol. Os receptores de estrogênio (REs) são detectados em diversos tecidos podendo ser expressos em níveis similares ou diferentes (HALL, 2004). Em 1962 foi detectada a existência de um receptor ligante para o 17 β - estradiol por Jensen e Jacobson. Em 1986, Green e colaboradores clonaram o primeiro receptor de estrogênio, chamado RE α (NR3A1). Já em 1996 foi clonado o segundo receptor para o estrogênio, conhecido como RE β (NR3A2) (KUIPER; NILSSON; GUSTAFFSON, 1996). Os receptores de estrogênio são proteínas intracelulares, membros de uma superfamília dos receptores hormonais nucleares, que inclui receptores de progesterona, glucocorticóides, andrógenos, hormônios tireoidianos e vitamina D. (EVANS, 1988). Outros efeitos do estrogênio são mediados por receptores localizados na superfície da célula. A ativação dos receptores de superfície de membrana está relacionada a mecanismos não genômicos do estrogênio que envolve vias de sinalização rápida tais como acoplamento com proteínas G e geração de segundos mensageiros (RUSSEL et al., 2000). A proteína GPR30 quando ativada pelo estrogênio também dispara respostas rápidas (HEWITT; DEROO; KORAC, 2005).

Os RE α são encontrados principalmente no endométrio, próstata, ovário, mama, ossos, cérebro, tecido adiposo, fígado, dentre outros. Já os RE β são principalmente expressos no cólon, próstata, ovário, glândula salivar, endotélio vascular, rim, bexiga, sistema nervoso central, dentre outros (MAYES; WATSON, 2004).

A estrutura do RE nuclear (figura 3) é composta por 6 domínios (A a F): o domínio A/B corresponde a porção amino-terminal e codifica a Função de Ativação de Transcrição Independente de Hormônios (AF-1), região que envolve interação

proteína-proteína. O domínio C é conhecido como Domínio Ligante do DNA (DBD), local de interação do receptor com porções específicas da fita de DNA, os chamados Elementos de Resposta ao Estrogênio (ERE). O domínio E/F é a porção carboxi-terminal denominada Domínio Receptor Ligante (LBD), possui conformação de 12 α hélice, em 3 camadas, com uma cavidade hidrofóbica onde se ligam os hormônios, este domínio também abriga a Função de ativação de Transcrição Dependente de Hormônios (AF-2) (KUIPER et al.,1997).

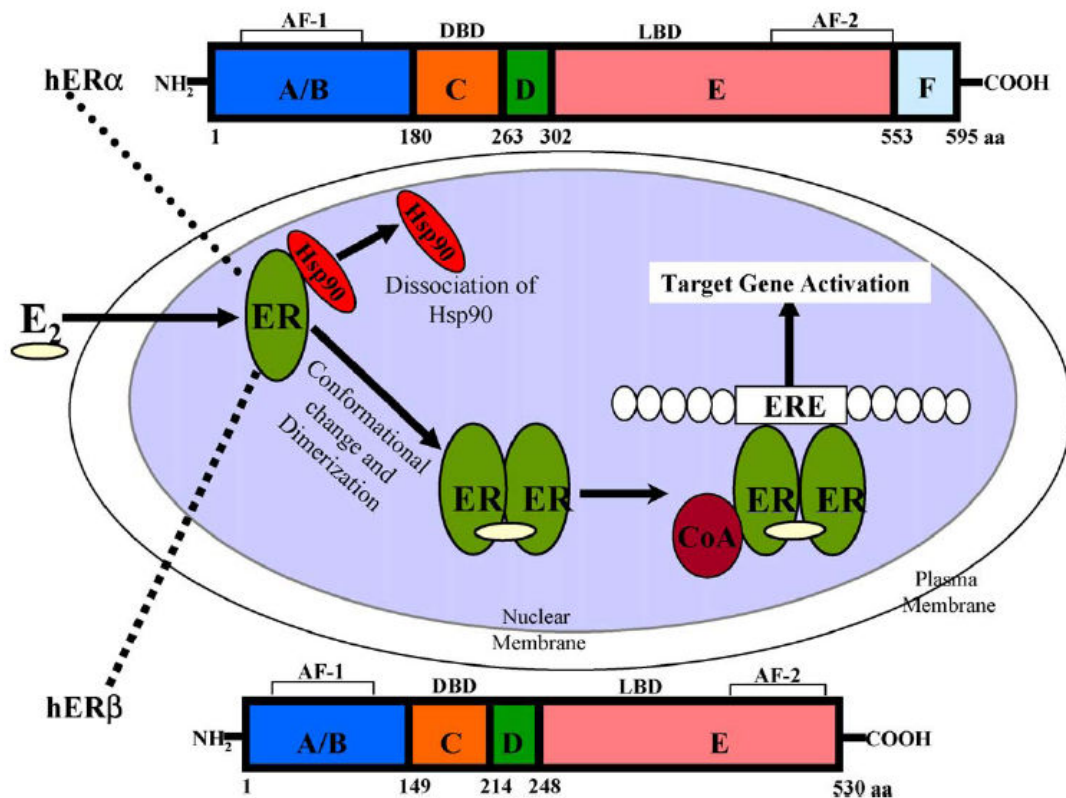


Figura 3: Estrutura e mecanismos de ação do RE α e RE β . AF-1, Função de Ativação de Transcrição independente de hormônios; AF-2, Função de ativação de Transcrição dependente de hormônios; DBD, Domínio Ligante do DNA; LBD, Domínio Receptor Ligante; E₂, estradiol; ER, receptor de estrogênio; Hsp90, proteína heat shock 90; CoA, coativadores; ERE, elementos de resposta ao estrogênio. Fonte: (LEWIS; JORDAM, 2005)

Os RE α e RE β divergem quanto a suas estruturas, possuindo 97% de similaridade no domínio C (DBD), 56% na região de LBD e somente 24% de similaridade no

domínio A/B. O domínio A/B parece ser mais ativo no RE α do que no RE β (LEWIS; JORDAN, 2005).

Semelhante aos demais receptores nucleares hormonais, o RE atua como dímero para ativação da transcrição e requer interação com proteínas correguladoras ativadoras ou repressoras da expressão gênica (KLINGE, 2000).

Os estrógenos e seus agonistas iniciam a ativação de transcrição por induzir mudanças conformacionais no LBD. Um rearranjo na estrutura 12 hélices leva a ativação de AF-2 e permite a ligação de coativadores nessa estrutura. Uma vez ativado o complexo hormônio-receptor, ocorre dissociação da proteína Hsp90, formação de dímeros, e em seguida liga-se a regiões específicas do DNA (ERE), assim, está iniciada a transcrição (figura 3) (KLINGE, 2000; BRZOZOWSKI et al., 1997; LEWIS; JORDAN, 2005).

Têm-se estudado e identificado mutações do REs. Sítios de polimorfismo do RE α estão associados às condições patológicas como câncer de mama, câncer de próstata, osteoporose, Alzheimer e doenças cardiovasculares. Mutações do RE β estão associadas à alteração da pressão arterial, doenças ósseas e bulimia (BRANDI et al, 1999; OGAWA et al., 2000).

Evidências verificadas em animais e humanos sugerem que o estrogênio tem um papel importante na regulação do tecido adiposo branco e esta modulação seria sítio-específica (TCHERNOF et al., 2000; ELBERS et al., 1999, HEINE et al., 2000).

A ovariectomia e a menopausa estão associadas com ganho de peso corporal, ganho de gordura visceral e perda do tecido adiposo subcutâneo (TOTH et al., 2000). Mulheres e ratas que recebem a reposição do estrogênio apresentam redução da deposição de tecido adiposo visceral e maior deposição de tecido adiposo subcutâneo (PEDERSEN et al., 2004; ELBERS et al., 1999 ; OHLSSON et al., 2000). Tais evidências apontam para um importante papel do estrogênio na modulação do tecido adiposo via lipólise e/ou lipogênese (PEDERSEN et al., 2004; HEINE et al., 2000).

Mattiasson e colaboradores (2002) mostraram através da tomografia computadorizada que o tratamento de mulheres com estradiol, em um ano, foi capaz de reduzir a gordura intra-abdominal e intra-pélvica.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que os adipócitos femorais são menos lipolíticos do que adipócitos abdominais, consequência do aumento na sensibilidade à insulina e à epinefrina atuando em receptores α -adrenérgicos (ELBERS et al., 1999; PEDERSEN et al., 2004)

Pedersen e colaboradores (2004) também demonstraram que o tratamento com estradiol promove efeitos antilipolíticos na massa adiposa subcutânea por ser capaz de elevar a expressão do receptor α -adrenérgico neste local e toda essa modulação do receptor α -adrenérgico seria promovida pelo RE α . O mesmo não é encontrado no tecido adiposo visceral.

Por muitos anos não se conhecia a presença do RE no tecido adiposo. A primeira indicação da sua presença no tecido adiposo foi mostrada por Wade e Gray, em 1978. Gray, Dudley e Wade, em 1981, identificaram a ligação do estrogênio em receptores nucleares de adipócitos. Echeverria e colaboradores, em 1994, demonstraram a presença de RE no núcleo e membrana celular dos adipócitos. A presença do RE no tecido adiposo leva a crer que a modulação da massa adiposa feita pelo estrogênio seja um mecanismo direto (PEDERSEN et al., 1996).

Dessa forma, o tecido adiposo expressa ambos os subtipos do RE, RE α e RE β , em sua membrana celular e núcleo (CRANDALL et al., 1998). Anwar e colaboradores (2001) identificaram que os subtipos do RE estão expressos em pré-adipócitos e nos adipócitos maduros, bem como, observaram que a expressão e regulação desses receptores é dose-dependente de estrogênio. Essa observação tem importantes implicações para explicação das diferenças encontradas na distribuição de gordura corporal após a deficiência de estrogênio.

O fato de o animal knockout para RE α apresentar hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo demonstra uma influencia do estradiol, via RE α , sobre o ciclo celular do adipócito (HEINE et al., 2000).

O RE α está envolvido com muitos aspectos do metabolismo lipídico por ações mediadas pelos co-ativadores para processos transcricionais: PGC1 α e β (RODRIGUEZ-CALVO et al., 2006; SONODA et al., 2007). No intestino de ratas o RE α controla a Apolipoproteína A-4, o que reduz a absorção de gordura durante a digestão (LUO et al., 2003; CARRIER et al., 2004). Defeitos no metabolismo oxidativo tem sido visto em animais knockout para RE α no intestino, músculo esquelético, coração e tecido adiposo (VILLENA et al., 2007 e ALAYNICK, 2007).

Em nível celular o estrogênio regula a produção do RNAm de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico. No tecido adiposo o estrogênio tem efeito direto sobre a LPL e LHS. A alteração sobre a LPL ocorre a curto prazo, enquanto a alteração sobre a LHS é lenta. Este hormônio também atua indiretamente sobre o tecido adiposo estimulando hormônios lipolíticos como catecolaminas, hormônio do crescimento, glucagon e hormônios tireoidianos (SZAFRAN; SMIELAK-KOROMBEL, 1998).

Muitos estudos têm demonstrado influências do estrogênio no desenvolvimento, fisiologia e fisiopatologia da glândula tireóide (KAWABATA et al, 2003, BANU et al., 2001). A presença de receptores de estrogênio na tireóide sugere uma ação direta dos estrógenos sobre a glândula (ZAYED; ESCH; MCCONNELL, 1998; KAWABATA et al., 2003, CORREA et al., 2001). Após a menopausa é comum identificar mulheres com desequilíbrio do feedback de triiodotironina (T3), tireoxina (T4) e hormônio tireoestimulante (TSH). Mulheres pós-menopausadas demonstram uma crescente prevalência de altos níveis de TSH e maior índice de câncer de tireóide (SCHINDLER, 2003).

Estudos experimentais demonstram que o estrogênio é capaz de realizar um upregulation dos próprios receptores na tireóide e por meio disso influenciar no crescimento e proliferação dos tireócitos, assim como, a função glandular (MANOLE et al., 2001; MACNAB; TALLARIDA; JOSEPH, 1997). Embora outras pesquisas sugiram um efeito indireto do estrogênio promovendo o aumento dos níveis de globulina fixadora de tireoxina (TBG) (ZIDAN; RUBENSTEIN, 1999) ou mesmo um efeito sobre a glândula pituitária e conseqüentemente alteração do TSH (DONDA et al., 1990). Banu e colaboradores (2001) concluíram que os hormônios sexuais

influenciam o crescimento da tireóide por intervir na secreção de TSH bem como regular o número de receptores deste hormônio na glândula.

Os receptores para hormônios tireoidianos (RT) fazem parte da super família dos receptores nucleares e são produtos de dois genes: C-ErbA α que originam RT α 1, RT α 2 e RT α 3 e o gene C-ErbA β que originam RT β 1 e RT β 2. Os hormônios tireoidianos aumentam a taxa metabólica e lipólise do tecido adiposo por estimular a transcrição de proteínas e influenciar a PKA, e assim, levam à redução do peso corporal (PSARRA; SOLAKID; SEKERIS, 2006).

Os estrógenos, da mesma forma, são capazes de influenciar o metabolismo hepático das lipoproteínas, promovendo os eventos: os triglicerídeos plasmáticos aumentam devido ao aumento da produção de VLDL, a concentração de LDL é reduzida devido a um upregulation na expressão do seu receptor, a HDL é aumentada por dois mecanismos: maior secreção de apolipoproteína A-1 e menor remoção de seus lipídios, pois os estrógenos levam a redução da atividade da lipase hepática (ZHU et al., 1999).

A deficiência de estrogênio, causada pelo processo natural da menopausa ou mesmo através da intervenção cirúrgica (ooforectomia), é a maior causa de remodelação óssea e conseqüentemente leva a osteoporose em mulheres (KRUM; MIRANDA-CARBONI; HAUSCHKA, 2008). Existem evidências da expressão RE α e RE β em células do estroma da medula óssea e osteoblastos (ZHANG et al., 1995; KOMM et al., 1988). O estrogênio atua mantendo uma apropriada proporção entre a formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea dos osteoclastos, em parte, através da indução da apoptose dos osteoclastos e um upregulation dos osteoblastos (KRUM ; MIRANDA-CARBONI ; HAUSCHKA, 2008).

Apesar de seus diversos benefícios, o estrogênio pode causar aumento da incidência de câncer de mama devido ao seu efeito citoproliferativo nesse local (BURCKHARDT,1999). Cerca de 87% dos receptores de câncer de mama são estrogênio dependente (FINK et al., 2004).

Drogas capazes de modular os REs têm sido utilizadas na prática clínica todos os dias (JORDAN, 2001). Elas são denominadas Moduladores Seletivos de Receptor

de Estrogênio (SERMs) por sua capacidade de ativar e modular diferentes ações nestes receptores, desenvolvendo atividade agonista ou antagonista. (MUCHMORE, 2000).

O Tamoxifeno foi o primeiro SERM a ser estudado, sendo utilizado como contraceptivo, mas sem sucesso. Mais tarde foi classificado como um agente não esteroideal antiestrogênico (JORDAN, 1998). E desde 1970 é utilizado na prática clínica como terapia adjuvante no tratamento do câncer de mama sensível à estrogênio (TAN-CHIU; WICKERHAM, 2000; TAKANISHI; BORST, 2001). Sua principal ação conhecida se dá pelo bloqueio dos receptores de estrogênio no tecido mamário e estímulo dos mesmos no tecido uterino (BRINCAT et al., 1999).

Estudos indicam que o citrato de tamoxifeno tem sua principal atividade no bloqueio competitivo em nível do receptor de estrogênio do tecido mamário tumoral, inibindo dessa forma, a síntese de RNA-m, parece haver também, um efeito inibidor sobre o fator de transformação e crescimento (TGF α) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), ambos fatores de proliferação de células tumorais e normais. Além de ser um potente inibidor da proteína quinase C (BUTTA et al., 1992).

De acordo com Tan-Chiu e Wickerham (2000), o tamoxifeno reduz em 49% e 50% o risco de câncer de mama invasivo e não invasivo, respectivamente.

A hipótese de que o tratamento com tamoxifeno altera os níveis das proteínas séricas ainda geram controvérsias na literatura (HEMIEDA, 2007; SILVA et al., 2005). Com relação à musculatura estriada, já foi descrito, em pesquisa experimental, que a droga leva à redução expressiva do peso absoluto e relativo do coração (PELZER et al, 2005), porém suas ações sobre o metabolismo de proteínas da musculatura esquelética ainda não foram descritas.

Segundo Romero, 2007, ratas SHR ooforectomizadas e tratadas com tamoxifeno apresentaram redução da frequência cardíaca, redução pressão arterial média, redução do peso úmido do ventrículo esquerdo e do índice de contratilidade do miocárdio (derivada de pressão sobre derivada de tempo- DP/DT máxima).

Casos clínicos de indução hepatotóxica pelo tamoxifeno têm sido descritos, incluindo hepatite tóxica, esteatose hepática não alcoólica e necrose hepática em mais de

30% dos pacientes que fazem uso dessa droga (EL- BESHISHY, 2005). Essa hepatotoxicidade também tem sido encontrada em roedores. Pesquisadores associam esses danos à metabolização da droga que ocorre no fígado e envolve neste processo a oxidação de ácidos graxos e principalmente a geração de espécies reativas de oxigênio e depleção de ATP (ELEFSIONISTIS et al., 2004).

O Teste de Prevenção do Câncer de Mama (BCPT) iniciado em 1992 pelo Instituto Nacional do Câncer confirmou que com o uso do tamoxifeno estão associados: alta incidência de tromboembolismo venoso e câncer endometrial devido a sua atividade agonista nos RE e derrame devido a sua atividade antagonista nos mesmos receptores (TAN-CHIU; WICKERHAM, 2000).

Nos casos de contra-indicação para o uso do tamoxifeno, como a ocorrência de doença tromboembólica, doença cerebrovascular, ou carcinoma de endométrio e naqueles tumores iniciais ou que se desenvolvam durante o uso do tamoxifeno, sugere-se inibidor de aromatase como terapia adjuvante, mas, somente em mulheres pós-menopausadas e com tumores positivos para receptores hormonais (CONSENSO BRASILEIRO DE CÂNCER DE MAMA, 2004).

Apesar de ser fortemente reconhecido como um agente anti-estrogênico, o tamoxifeno, controversamente, possui ações agonistas sobre receptores de estrogênio em diferentes tecidos e sobre o metabolismo lipídico (HOZUMI et al., 1998; KARIMIAN et al., 2008; CHRISTIE et al., 2008; CZERNY et al., 2003).

Clinicamente foi demonstrado que o tamoxifeno, promove diminuição do colesterol total, reduz o colesterol LDL (KUSAMA et al., 2004; SAWADA et al., 2005; Jordan, 2001), promove elevação dos triglicerídeos (HOZUMI et al., 1998, SAWADA et al., 2005; NTUKIDEM et al., 2007) e redução da massa e/ou atividade da LPL no tecido adiposo (HOZUMI et al., 1998; HOZUMI et al., 2000). Seus efeitos sobre as lipoproteínas e lipídios plasmáticos podem ser explicadas por uma ação agonista ao estrogênio nos receptores do fígado (SAWADA et al., 2005; MILIONIS; LIBEROPOULOS; ELISAF, 2001).

Ainda não é claro porque os SERMs podem ser agonistas ou antagonistas nos diversos tecidos. Sugere-se que possam induzir mudanças específicas e únicas de

conformação do RE, o que conta para suas características farmacológicas em cada tecido (LEWIS; JORDAN, 2005).

Com relação às alterações ponderais, pesquisas experimentais (CZERNY et al., 2003; PELZER et al., 2005; WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2002; ROMERO., 2007), demonstram que o tratamento crônico com tamoxifeno promove redução do peso corporal. Pelser et al (2005), demonstraram em estudos experimentais que o peso uterino aumentou significativamente em ratas SHR ooforectomizadas e tratadas com tamoxifeno quando comparada ao grupo ooforectmizado não tratado. O mesmo estudo mostrou que o peso corporal de ratas que receberam a droga é significativamente menor que os das ratas não tratadas.

Entretanto, estudos clínicos ainda divergem quanto os efeitos do tamoxifeno sobre as alterações ponderais, algumas pesquisas mostram que mulheres com câncer de mama e em uso do tamoxifeno ganham peso corporal (HOSKIN; ASHLEY; YARNOLD, 1992; NGUYEN et al., 2001). Contrariamente, outras pesquisas mostram que estas mulheres não alteram o peso nem o índice de massa corporal (SAQUIB et al, 2007; OZET et al., 2001).

Apesar de associações do tamoxifeno com peso corporal, a identificação dos tecidos responsáveis por essa perda e o mecanismo de ação promovido por esse SERM ainda não está totalmente esclarecido na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a perda de peso promovida pelo tamoxifeno com alterações da massa protéica, óssea e lipídica, assim como, propor os mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com tamoxifeno sobre:

- peso corporal;
- peso tecido adiposo visceral, peso da musculatura esquelética e peso ósseo;
- níveis séricos proteínas sanguíneas;
- níveis séricos de triglicerídeos e lípase lipoproteica;
- glicemia capilar;
- níveis hormonais de T4 e TSH.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas normotensas (Wistar) e com hipertensão arterial espontânea (SHR), pesando entre 50 e 80 gramas e com 30 a 40 dias de vida, fornecidas pelo Biotério de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais permaneceram em ambiente de temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para os biotérios de pesquisa (FINEP). Tiveram acesso à água e ração *ad libidum*. O manuseio dos animais foi de acordo com as normas de tratamento de animais adotadas pela Sociedade Brasileira de Fisiologia.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ratas foram divididas randomicamente nos seguintes grupos (n=10):

Normotensas:

- 1) Controles (NC)
- 2) Tratadas (NT)
- 3) Ooforectomizadas (NOC)
- 4) Ooforectomizada e tratadas (NOT)

Hipertensas:

- 5) Controles (SC)
- 6) Tratadas (ST)
- 7) Ooforectomizadas (SOC)
- 8) Ooforectomizadas e tratadas (SOT)

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1° dia do protocolo:

- randomização e separação dos animais em grupos.
- castração (ooforectomia bilateral).

6° dia do protocolo:

- verificação de peso corporal.
- os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais por 8 horas diurnas em jejum alimentar, não hídrico. Em seguida os animais foram colocados novamente em gaiolas coletivas.
- dosagem da glicemia capilar em jejum.

7° dia do protocolo:

- início do tratamento com tamoxifeno.

52 ° dia do protocolo (45 dias de tratamento):

- os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais por 8 horas diurnas em jejum alimentar, não hídrico. Em seguida os animais foram colocados novamente em gaiolas coletivas.
- dosagem da glicemia capilar.

97° dia do protocolo (após 90 dias de tratamento):

- os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais por 8 horas diurnas em jejum alimentar, não hídrico. Em seguida os animais foram colocados novamente em gaiolas coletivas.
- dosagem da glicemia capilar.

98° dia do protocolo (fim do tratamento):

- sacrifício e retirada das amostras de tecido do animal.

3.4 CASTRAÇÃO DOS ANIMAIS

Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg), as fêmeas foram submetidas a uma incisão bilateral na pele e camada muscular dorsal, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura da tuba uterina e retirada dos ovários (ooforectomia), seguida de sutura da musculatura e pele. Ao final do procedimento, os animais receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,5%, via intramuscular. Permaneceram 7 dias em recuperação pós-operatória.

3.5 TRATAMENTO COM TAMOXIFENO

Os grupos tratados receberam doses diárias de citrato de tamoxifeno, 0.1mg/ 100g de peso corporal, por via oral (método de gavagem) durante 90 dias. Para isso, a droga era dissolvida diariamente em água destilada e utilizada imediatamente. Os grupos não tratados receberam diariamente, pelo mesmo método, água destilada, 0,1ml/100g de peso corporal.

3.6 CONTROLE DO PESO CORPORAL

Todos os animais foram pesados a cada sete dias para controle ponderal e ajuste da dose do medicamento.

3.7 GLICEMIA CAPILAR

Um dia antes de iniciar o tratamento com tamoxifeno, assim como, no 45º. e 90º. dias de tratamento, após 8 horas de jejum alimentar diurno, realizamos uma leve perfuração, com agulha 13x4,5, na região terminal da cauda das ratas para gotejamento de sangue. Os valores de glicemia capilar foram mensurados por aparelho de hemogluco teste (Prestige 2000).

3.8 RETIRADA DOS ÓRGÃOS E AMOSTRA SANGUÍNEA

Ao final dos 90 dias de tratamento, no período vespertino, os animais foram anestesiados com halotano e decapitados com uso de guilhotina. Em seguida os tecidos foram removidos, consecutivamente: sangue, gordura visceral, músculo sóleo direito e esquerdo e fêmur direito.

3.8.1 Soro sanguíneo

Todo sangue disponível foi coletado em tubos de ensaio, colocados em banho maria a 37º C por 15 minutos e centrifugados (Eppendorf - 5804 R) a 1000xg, 4ºC, por 10 minutos. O soro foi armazenado a -20ºC e posteriormente utilizado para quantificação da proteína total sérica; albumina, globulina, TG, LPL e dosagem hormonal.

3.8.2 Gordura visceral

Para retirada da gordura intra-abdominal, o fígado e o baço foram primeiramente removidos. Retirou-se então a gordura ao redor do útero e bexiga. Para remover a gordura mesentérica, realizou-se um corte transversal no esôfago, e o tubo digestivo

tracionado para fora do abdômen. A gordura mesentérica foi desprendida do intestino. Uma vez que a gordura mesentérica e o tubo gastro-intestinal foram removidos, foi possível remover a gordura retroperitoneal e perirenal. A gordura foi pesada imediatamente.

3.8.3 Músculo sóleo

Após incisão cirúrgica nas patas direita e esquerda, o músculo sóleo de cada pata foi dissecado, removido e refrigerado a -20°C em recipientes contendo salina (0,9%).

3.8.4 Fêmur

O osso fêmur da pata direita foi extraído, todo tecido conectivo foi removido e o osso foi mantido em estufa a 98°C por um período de 24 horas, ao término, verificamos o peso seco.

3.9 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS E ENSAIO DE PROTEÍNAS DO MÚSCULO SÓLEO

O músculo sóleo direito foi retirado da refrigeração e pesado. Em seguida, o tecido foi colocado em uma placa de Petri sobre banho de gelo e triturado com auxílio de um bisturi, a amostra foi vertida em um homogeneizador de vidro contendo solução com EDTA (5mM) (1:5). As amostras foram centrifugadas a $1000\times g$, $+4^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos. O sobrenadante foi então diluído em água destilada (1:20) e utilizado para medida da concentração protéica através do Método de Bradford (1976) em triplicata,

usando soro albumina bovina (BSA) como padrão. A leitura foi realizada no aparelho Espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado em 595 mn.

3.10 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PESO SECO DO MÚSCULO SÓLEO

O músculo sóleo esquerdo foi retirado da refrigeração e pesado. O tecido foi colocado em uma Placa de Petri sobre banho de gelo e triturado com auxílio de um bisturi, a amostra foi vertida em um homogeneizador de vidro em diluição 1:10 de água destilada. As proteínas totais foram extraídas de acordo com o método descrito por Bány et al (1965):

- 1- Foi acrescido ao homogeneizado TCA 10% por uma hora, após, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, +4°C, por 10 minutos;
- 2- O precipitado foi diluído com de TCA a 10 % (1:1) e centrifugado a 4000 rpm, +4°C, por 10 minutos;
- 3- O precipitado foi diluído com etanol a 95% (1:1) e centrifugado a 4000 rpm, +4°C, por 10 minutos (repetiu-se o processo 2 vezes);
- 4- O precipitado foi diluído com uma mistura de etanol e éter etílico (3:1) e centrifugado a 4000 rpm, +4°C, por 10 minutos (repetiu-se o processo por 2 vezes);
- 5- O precipitado foi diluído com éter etílico (1:1) e centrifugado a 4000 rpm, +4°C, por 10 minutos (repetiu-se o processo por 2 vezes).
- 6- A amostra foi colocada em banho maria por 30 minutos a 37°C para remover o éter e, em seguida, colocou-se a amostra em estufa 98°C por 24 h. Ao final, foi realizado o peso seco da proteína utilizando balança de precisão 0,001mg.

3.11 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Parte do soro extraído foi encaminhado ao Laboratório de análises bioquímicas do HUCAM (Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes) para dosagem da proteína sérica total e suas frações (albumina e globulina), dos triglicerídeos e LPL, bem como, hormônios TSH e T4 total.

A determinação da concentração das proteínas totais foi realizada utilizando o método do Biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas (-HN-CO-) reagem com íons cúpricos em meio alcalino (Reagente do Biureto) formando um complexo de coloração violeta, cuja absorbância foi medida em 545 nm (aparelho espectrofotômetro).

A quantificação das frações protéicas Albumina e Globulina foi realizada através de eletroforese em acetato de celulose, utilizado tampão Tris-Veronal (Biomidi) pH 8,6 - 8,8.

Os triglicerídeos foram quantificados pelo método enzimático colorimétrico (Kit Bioclin, K055), a LPL foi mensurada pelo método colorimétrico (Bioclin Kit ,K025).

TSH e T4 foram quantificados pelo automated chemiluminescence system, ACS:180 (SIEMENS e Bayer, respectivamente).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos com média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida do teste post-hoc Tukey/Kramer Procedure. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO CORPORAL

Os resultados apresentados no gráfico 1 demonstram que os animais tratados com tamoxifeno, normotensos (NT e NOT) e hipertensos (ST e SOT), obtiveram ao longo de todo tratamento, menor ganho ponderal quando comparado aos animais sem tratamento.

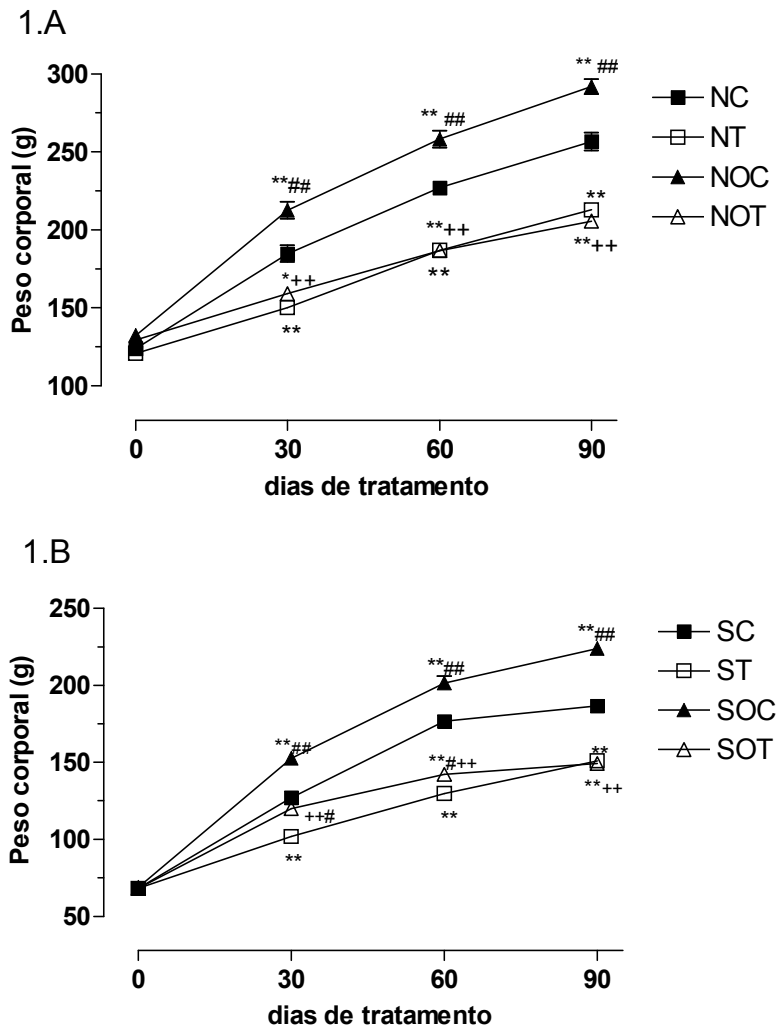


Gráfico 1: Peso corporal (g) com 0, 30, 60 e 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); dados expressos em média \pm EPM . * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. NC, ### $p < 0,01$ vs. NT, ++ $p < 0,01$ vs. NOC. (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT); dados expressos em média \pm EPM ** $p < 0,01$ vs. SC, # $p < 0,05$ e ### $p < 0,01$ vs. ST, ++ $p < 0,01$ vs. SOC. N= 10 ratas em cada grupo.

Nos grupos normotensos (gráfico 1.A), antes do início do tratamento, os animais apresentavam peso corporal semelhantes: NC ($123,9 \pm 3,1$ g); NT ($121 \pm 3,1$ g); NOC ($132,3 \pm 2,1$ g) e NOT ($129,4 \pm 2$ g), 30 dias após o início do tratamento os grupos NT e NOT apresentaram peso corporal significativamente menor ($150,2 \pm 3,6$ e $159,2 \pm 4,1$ g, respectivamente) que NC e NOC ($184,2 \pm 5,3$ e $212,7 \pm 5,6$ g, respectivamente). Diferente do grupo NC, o grupo NOC apresentou valores ainda maiores no peso corporal ($p < 0,01$). Todas essas diferenças sustentam-se ao longo dos 60 dias (NC: $227,2 \pm 3,8$ g; NT: $187 \pm 3,5$ g; NOC: $258,3 \pm 5,4$ g; NOT: $186,7 \pm 3,8$ g) e 90 dias de tratamento (NC: $256,8 \pm 5,7$ g; NT: $212,8 \pm 3,2$ g; NOC: $292 \pm 4,9$ g; NOT: $205,7 \pm 3,7$ g).

Nos grupos SHR, antes do início do tratamento não existia diferença com relação ao peso corporal: SC ($68 \pm 2,2$ g); ST ($68,2 \pm 2,4$ g); SOC ($68,9 \pm 1,84$ g) e SOT ($68,2 \pm 2$ g). A partir do 30º dia de tratamento, identificamos que SOC ($152,6 \pm 4,1$ g) possuía peso corporal superior aos demais grupos em estudo: ST ($101,9 \pm 3,6$ g); SC ($127 \pm 2,8$ g) e SOT ($120,1 \pm 3,7$ g), enquanto que o peso corporal de ST também foi menor que SC e SOT. Essas diferenças sustentaram - se ao longo dos 60 dias (SC $176,7 \pm 2,2$ g; ST 129 ± 2 g; SOC $201,6 \pm 4,3$ g e SOT $142,3 \pm 1,9$ g) e 90 dias do tratamento (SC $186,7 \pm 2,7$ g; ST $151 \pm 2,3$ g; SOC $224 \pm 3,7$ g e SOT $149,4 \pm 2,11$ g), com exceção dos grupos ST e SOT que aos 90 dias passam a ter médias de peso corporal semelhantes.

4.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO E A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NO MÚSCULO SÓLEO E CONCENTRAÇÃO PROTEICA SANGUÍNEA.

Como apresentado nas tabelas 1 e 2, o peso seco e a concentração protéica do músculo sóleo, assim como, a concentração de proteína sérica total e suas frações (albumina e globulina), foram semelhantes entre os grupos normotensos e entre os grupos hipertensos.

Tabela 1 – Peso seco de proteínas totais do músculo sóleo (mg/g de músculo), concentração de proteínas no músculo sóleo (mg/ml/g de músculo), concentração da proteína sérica total (g/dL), albumina (g/dL) e globulina séricas (g/dL), após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. Nos grupos normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). N=10 em cada grupo.

	NC	NT	NOC	NOT
Peso seco do sóleo	136,2±5,1	139,3±4,7	147±4	130,4±3,5
Concentração de proteína do sóleo	113,6±6,7	99,7±2,7	99±4,4	107±5,8
Proteína sérica total	6,98±0,1	6,58±0,2	6,73±0,1	7,1±0,07
Albumina	3,65±0,04	3,5±0,05	3,4±0,08	3,5±0,07
Globulina	3,3±0,04	3,2±0,06	3,4±0,05	3,5±0,07

Dados expressos em média ± EPM.

Tabela 2 – Peso seco de proteínas totais do músculo sóleo (mg/g de músculo), concentração de proteínas no músculo sóleo (mg/ml/g de músculo), concentração da proteína sérica total (g/dL), albumina (g/dL) e globulina séricas (g/dL) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. Nos grupos SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controle (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT). N=10 em cada grupo.

	SC	ST	SOC	SOT
Peso seco do sóleo	109,7±5,1	101,4±2,9	107,6±3	107,2±3
Concentração de proteína do sóleo	120,5±5	121±4,2	124±5,4	123±6,2
Proteína sérica total	7,37±0,09	7,25±0,07	7,27±0,06	7,1±0,06
Albumina	3,9±0,04	3,7±0,02	3,6±0,05	3,7±0,04
Globulina	3,4±0,06	3,5±0,07	3,6±0,04	3,4±0,07

Dados expressos em média ± EPM.

4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO DO TECIDO ADIPOSEO VICERAL

Os resultados demonstrados no gráfico 2.A e 2.B, apontam para menores valores do peso da gordura visceral nos animais normotensos e hipertensos tratados com tamoxifeno quando comparados aos grupos sem tratamento.

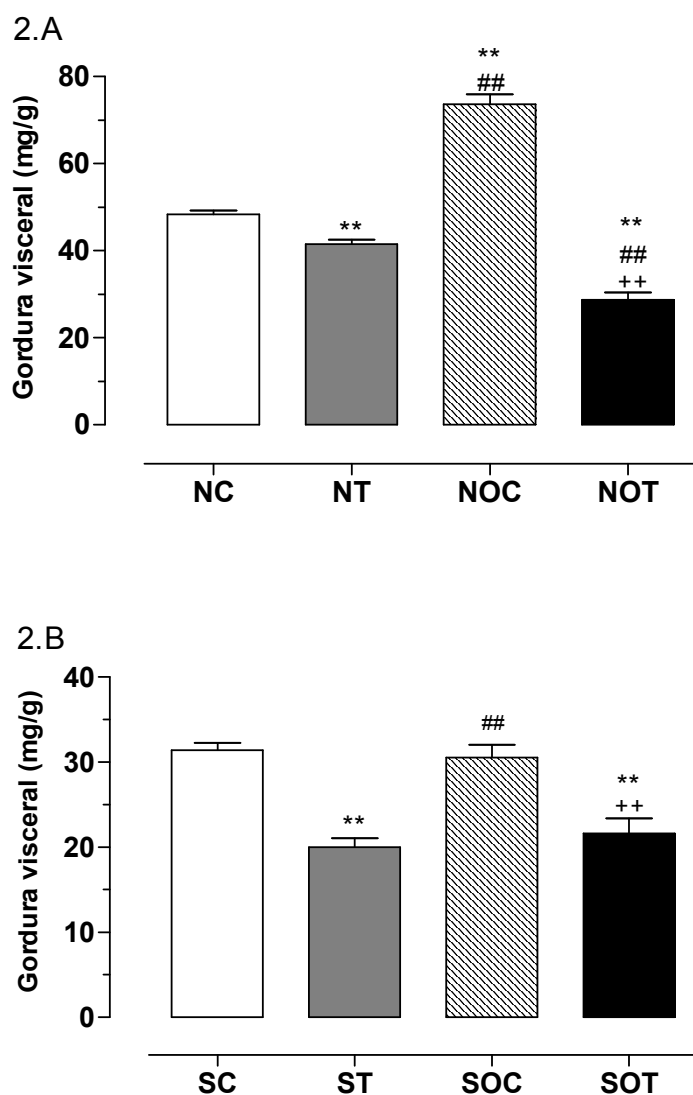


Gráfico 2: Peso da gordura visceral (mg/g de peso corporal) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); dados expressos em média \pm EPM, ** $p < 0,01$ vs. NC, ## $p < 0,01$ vs. NT, ++ $p < 0,01$ vs. NOC. (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT); dados expressos em média \pm EPM ** $p < 0,01$ vs. SC, ## $p < 0,01$ vs. ST, ++ $p < 0,01$ vs. SOC. N= 10 ratas em cada grupo.

Assim, NT ($41,5 \pm 1,77$ mg/g) possui valores médios para peso da gordura visceral menores que NC e NOC ($49,39 \pm 0,9$ mg/g e $73,8 \pm 2,61$ mg/g, respectivamente), bem como, NOT ($28,2 \pm 1,61$ mg/g) apresentam valores menores que NC e NOC e NT.

Dentre os animais hipertensos, os grupos ST e SOT apresentaram menor peso da gordura visceral ($19,6 \pm 1,04$ mg/g e $21,4 \pm 1,81$ mg/g, respectivamente) quando comparados aos grupos e SC e SOC ($31 \pm 0,85$ e $30 \pm 1,5$ mg/g, respectivamente).

4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE O PESO DO FÊMUR

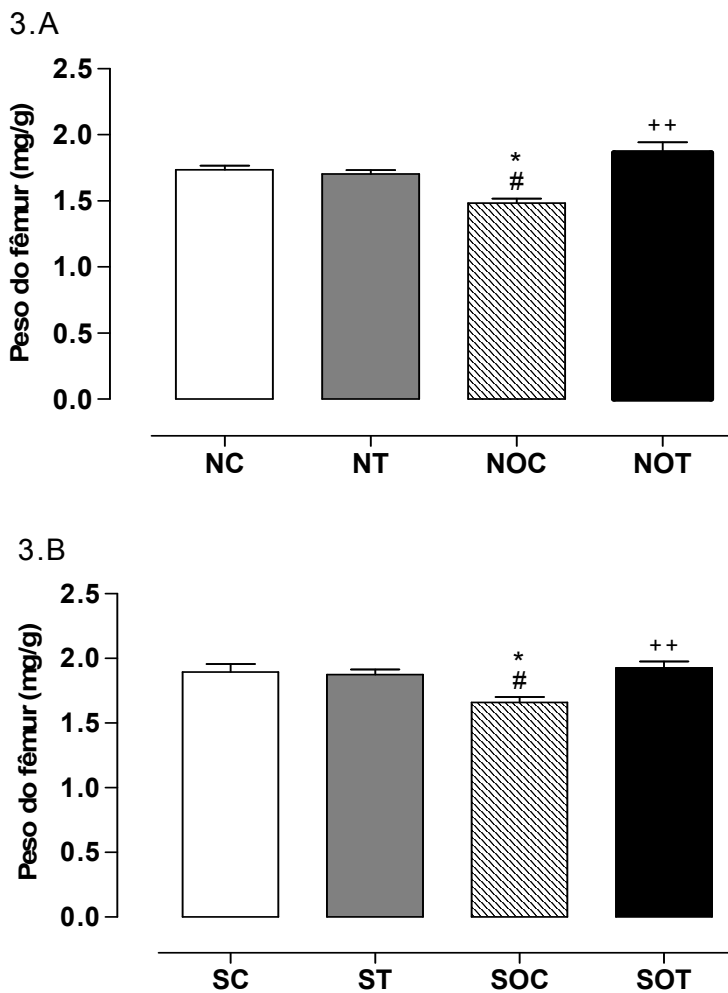


Gráfico 3: Peso seco do fêmur (mg/g de peso corporal) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); dados expressos em média \pm EPM *p <0,05 vs NC; #p <0,05 vs NT e **p < 0,01 vs NOC. (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT); dados expressos em média \pm EPM *p <0,05 vs SC; #p <0,05 vs ST e **p < 0,01 vs SOC. N= 10 ratas em cada grupo.

Com relação ao peso do fêmur (gráfico 3.A e 3.B), podemos observar que os grupos ooforectomizados NOC e SOC apresentaram redução significativa do peso ósseo ($1,48 \pm 0,03$ e $1,65 \pm 0,04$ mg/g, respectivamente). Os animais ooforectomizados e tratados mostraram significativa recuperação do peso do fêmur (NOT: $1,86 \pm 0,07$ mg/g e SOT: $1,92 \pm 0,05$ mg/g).

Nossos dados também demonstram que valores de peso do fêmur são semelhantes quando comparamos os grupos NC e NT, ($1,73 \pm 0,03$ mg/g e $1,7 \pm 0,03$ mg/g, respectivamente) e entre os hipertensos SC e ST ($1,89 \pm 0,06$ mg/g e $1,87 \pm 0,038$ mg/g, respectivamente).

4.5 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE OS TRIGLICERÍDEOS E LPL.

Tabela 3 – Influência do tratamento crônico com tamoxifeno sobre os níveis séricos de triglicerídeos (TG) e lipase lipoproteica (LPL). Nos grupos: normotensas controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). N=10 em cada grupo.

	NC	NT	NOC	NOT
TG (mg/dL)	$91,5 \pm 4,3$	$92,6 \pm 4$	$85,8 \pm 1$	$101,2 \pm 1,3$ +
LPL (U/L)	$16,3 \pm 0,8$	$16,6 \pm 0,8$	$18,8 \pm 1,3$	$20,2 \pm 0,4$

Dados expressos em média \pm EPM, +p<0,05 vs.NOC.

Tabela 4 - Influência do tratamento crônico com tamoxifeno sobre os níveis séricos de triglicerídeos (TG) e lipase lipoproteica (LPL). Nos grupos: SHR controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT). N=10 em cada grupo.

	SC	ST	SOC	SOT
TG (mg/dL)	$122,8 \pm 2$	$125,3 \pm 2,1$	$123,3 \pm 2$	$133,3 \pm 2,1$ **+
LPL (U/L)	$20 \pm 0,6$	$20,25 \pm 0,6$	$19,8 \pm 0,4$	$21,3 \pm 0,37$

Dados expressos em média \pm EPM, **p <0,01 vs. SC e +p< 0,05 vs. SOC.

Quanto as dosagem de TG, observamos que o grupo NOT possui níveis estatisticamente superiores quando comparado ao grupo NOC, todavia, não foram observadas diferenças com relação aos demais grupos (tabela 3). Dentre os animais

hipertensos, SOT apresentou valores de TG significativamente superiores a SC e SOC. Os níveis séricos de LPL não foram diferentes entre os grupos estudados o (tabela 4).

4.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE A GLICEMIA CAPILAR.

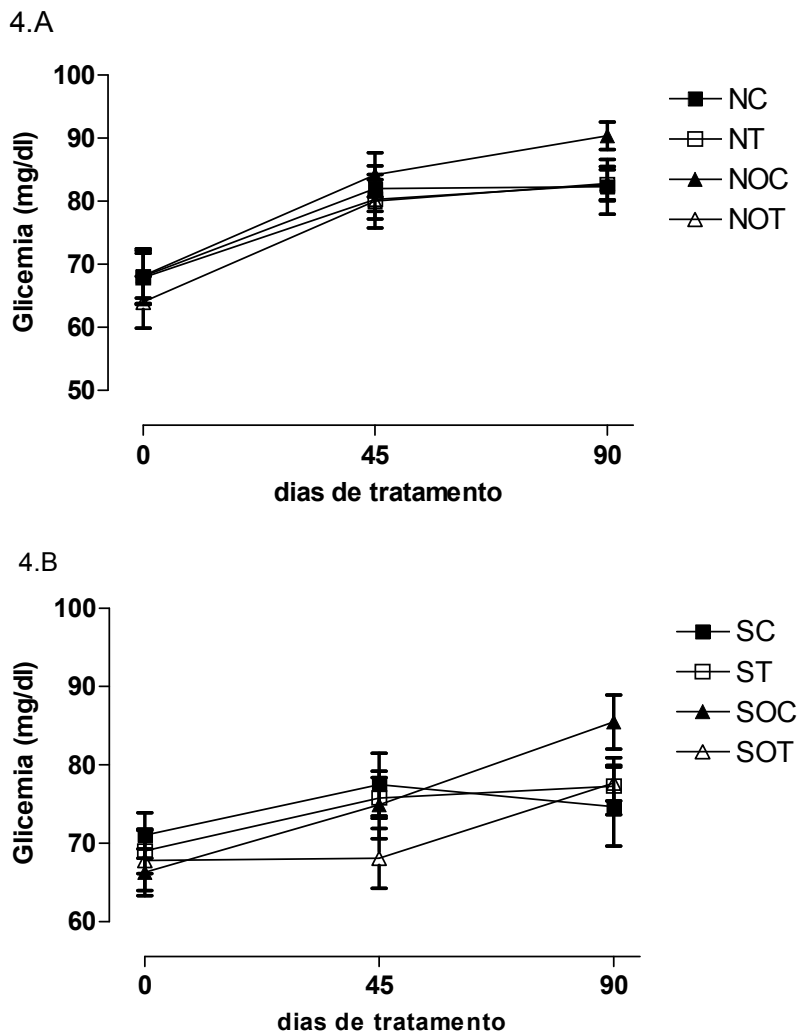


Gráfico 4: Glicemia capilar periférica com 0, 45 e 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (WOT). (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT). N=10 em cada grupo. Dados expressos em média \pm EPM.

Como podemos visualizar no gráfico 4 (A e B), o tratamento crônico com tamoxifeno não foi capaz de alterar a glicemia capilar de ratas normotensas nem tampouco de ratas com hipertensão espontânea. Entre os grupos normotensos, antes do início do tratamento, observamos: NC ($68,1 \pm 4,3$ mg/dl), NT ($67,9 \pm 4,25$ mg/dl), NOC ($68,2 \pm 3,54$ mg/dl) e NOT ($64 \pm 4,09$ mg/dl). Com 45 dias: NC ($83 \pm 3,05$ mg/dl), NT ($80,3 \pm 3,16$ mg/dl), NOC ($85,2 \pm 4$ mg/dl) e NT ($80 \pm 4,2$ mg/dl). Aos 90 dias de tratamento: NC ($82,3 \pm 4,34$ mg/dl), NT ($84 \pm 2,61$ mg/dl), NOC ($90,4 \pm 2,17$ mg/dl) e NOT ($82 \pm 2,7$ mg/dl).

Para os grupos hipertensos, antes do início do tratamento temos: SC ($71 \pm 2,89$ mg/dl), ST ($69 \pm 2,83$ mg/dl), SOC ($66,3 \pm 2,97$ mg/dl) e SOT ($67,8 \pm 3,83$ mg/dl). Com 45 dias: SC ($77,5 \pm 2,89$ mg/dl), ST ($75,8 \pm 2,6$ mg/dl), SOC ($74,9 \pm 4,31$ mg/dl) e SOT ($68,1 \pm 3,81$ mg/dl). E aos 90 dias de tratamento: SC ($75,7 \pm 4,24$ mg/dl), ST ($77,3 \pm 3,66$ mg/dl), SOC ($85 \pm 3,45$ mg/dl) e SOT ($77,7 \pm 2,25$ mg/dl).

4.7 EFEITOS DO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO SOBRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE T4 E TSH.

Conforme demonstrado no gráfico 5.A e 5.B, os animais tratados, tanto normotensos (NT: $3,03 \pm 0,18$ µg/dL e NOT: $3,66 \pm 0,2$ µg/dL) quanto hipertensos (ST: $2,87 \pm 0,05$ µg/dL e SOT: $2,61 \pm 0,06$ µg/dL), apresentaram maior concentração de T4 total quando comparado aos grupos não tratados normotensos (NC: $2,15 \pm 0,1$ µg/dL e NOC: $2,42 \pm 0,11$ µg/dL) e hipertensos (SC: $2,27 \pm 0,09$ µg/dL e SOC: $2,11 \pm 0,04$ µg/dL).

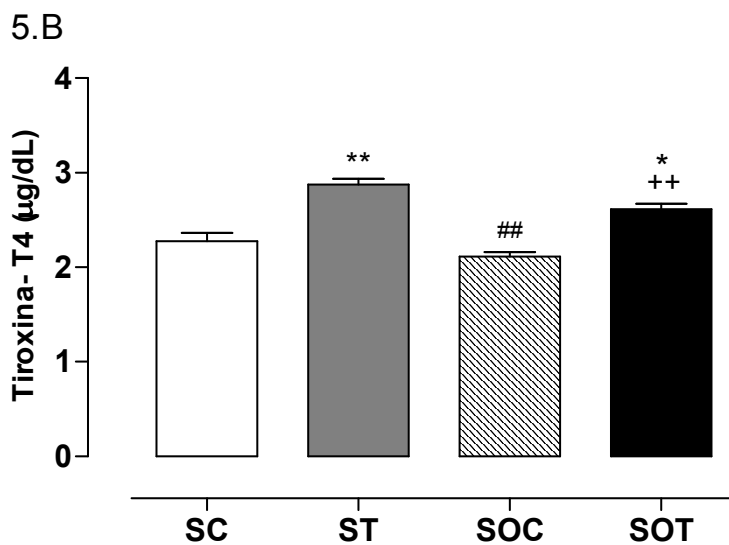
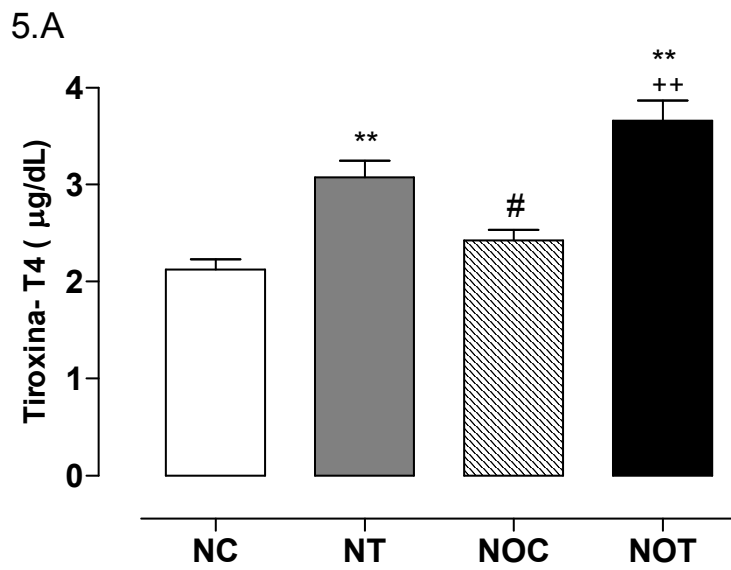


Gráfico 5: Valores de tiroxina sérica total –T4 (µg/dL) após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT); dados expressos em média ± EPM. **p <0,01 vs. NC; #p <0,05 vs. NT; ++p <0,01 vs. NOC. (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratadas (SOT). *p <0,05 vs. SC, **p <0,01 vs. SC; ##p <0,01 vs. ST e ++p <0,01 vs. SOC; dados expressos em média ± EPM. N=10 em cada grupo.

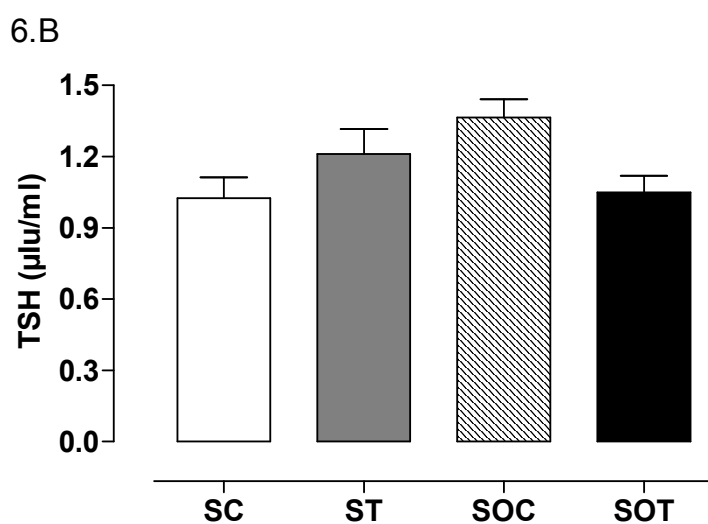
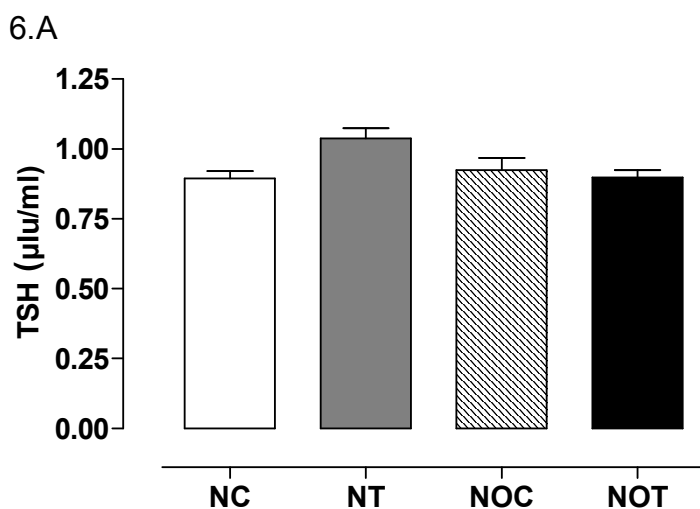


Gráfico 6: Níveis do Hormônio Estimulante da Tireóide - TSH ($\mu\text{IU/ml}$), após 90 dias de tratamento com tamoxifeno. (A)- de ratas normotensas: controles (NC), tratadas (NT), ooforectomizadas controles (NOC) e ooforectomizadas tratadas (NOT). (B)- de ratas SHR: controles (SC), tratadas (ST), ooforectomizadas controles (SOC) e ooforectomizadas tratada (SOT). N=10 em cada grupo. Dados expressos em média \pm EPM.

Em nenhum dos grupos estudados foi detectado diferenças significativas para a concentração sérica de TSH: NC ($0,89 \pm 0,02 \mu\text{IU/ml}$), NT ($1,03 \pm 0,03 \mu\text{IU/ml}$), NOC ($0,92 \pm 0,04 \mu\text{IU/ml}$) e NOT ($0,89 \pm 0,03 \mu\text{IU/ml}$) foram semelhantes. O mesmo foi constatado entre os grupos de animais hipertensos: SC ($1,02 \pm 0,08 \mu\text{IU/ml}$), ST ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{IU/ml}$), SOC ($1,36 \pm 0,07 \mu\text{IU/ml}$) e SOT ($1,05 \pm 0,07 \mu\text{IU/ml}$).

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou nítido efeito do tratamento com tamoxifeno sobre peso corporal de animais normotensos e hipertensos, assim como localizou o tecido alvo responsável pela esta redução do peso corporal, especificamente pela redução no tecido adiposo visceral (gráfico 2). Outros trabalhos apontaram essa perda sem, entretanto, apontar o tecido responsável (CZERNY et al, 2003; PELZER et al, 2005; [WALLEN](#); [BELANGER](#); [WITTNICH](#), 2002).

Romero, em 2007, demonstrou que ratas ooforectomizadas normotensas e hipertensas tratadas cronicamente com tamoxifeno apresentam menor ganho de peso corporal sem redução na ingestão de alimentos. Este mesmo estudo verificou que os animais não tiveram alterações no balanço hídrico.

No entanto pesquisas clínicas ainda divergem quanto ao efeito do tamoxifeno sobre o peso corporal (NGUYEN et al., 2001). HOSKIN e colaboradores (1992) relatam em seus estudos que mulheres em tratamento para câncer de mama primário e fazendo uso do tamoxifeno apresentaram maior ganho de peso corporal.

Contudo Saquib e colaboradores (2007) acompanharam 3088 mulheres com diagnóstico de câncer de mama para monitoramento de alterações do peso corporal após início do tratamento para o câncer. Assim, verificou-se que mulheres que receberam quimioterapia tiveram ganho ponderal significativo, o qual não foi identificado em mulheres que receberam somente tratamento com tamoxifeno. No entanto, quando associado à quimioterapia o tamoxifeno não foi capaz de modificar os efeitos da quimioterapia sobre o ganho de peso corporal.

Da mesma forma, pesquisa clínica realizada por KUMAR e colaboradores, em 1997, não mostrou efeitos do tamoxifeno sobre o ganho de peso corporal em mulheres realizando tratamento para o câncer de mama. O ganho ponderal moderado observado nesta população de pacientes é comparável com a população geral sem doenças no período pós-menopausal e em processo de envelhecimento e não pode ser relacionado com o tratamento.

Segundo Chagpar e colaboradores (2007) mulheres que fazem uso do tamoxifeno não alteram o índice de massa corporal. Outros pesquisadores (ALI et al, 1998)

verificaram que mulheres que recebem tamoxifeno não alteram a massa magra além reduzirem a massa de tecido adiposo. Apontando este efeito como uma possível ação agonista desta droga sobre a massa adiposa.

É nitidamente reconhecido o importante papel do estrogênio na modulação do tecido adiposo (TCHERNOF et al., 2000; ELBERS et al., 1999; HEINE et al., 2000). Mulheres pós-menopausadas tratadas com estrogênio demonstram atenuação no acúmulo de gorduras quando comparado a mulheres sem tratamento. Essa redução dos depósitos de gordura é detectada predominantemente no tecido adiposo visceral, uma vez que, este efeito não é percebido no tecido adiposo subcutâneo (principalmente o femoral) (KRISTENSEN et al., 1999; GAMBACCIANI et al., 2001), reforçando a idéia de papéis específicos do estrogênio sobre os adipócitos das diferentes regiões corporais (VAN PELT et al., 2006).

O tecido adiposo expressa os dois subtipos do receptor de estrogênio, RE α e RE β , em sua membrana celular e núcleo, de forma que ambos poderiam modular a massa adiposa. (CRANDALL et al., 1998). Os achados que camundongos knock-out para RE α demonstram aumento do peso corporal, da massa de tecido adiposo branco e redução do gasto energético sugerem um papel predominante do RE α , embora o RE β possa apresentar algum papel sobre a lipólise (JANSSON et al., 2006). Um aumento da reposição com estrogênio em ratos knock-out para RE α mostra pequenos efeitos no tecido adiposo via RE β , porém, em menor significância (HEINE et al., 2000).

Nilsson e colaboradores (2007) verificou que os níveis de RNAm do RE α no tecido adiposo de mulheres obesas estavam reduzidos quando comparados com mulheres não obesas, reforçando o papel do estrogênio através do RE α no controle do peso corporal.

A forma pela qual o estrogênio e os SERMs poderiam modular a massa adiposa ainda é obscura. Pesquisas apontam que o estrogênio pode levar a redução do tecido adiposo pelos seguintes mecanismos: redução da ingestão alimentar (LIANG et al., 2002), redução na atividade da LPL no tecido adiposo (PEDERSEN et al., 2004), aumento da lipólise (DARIMONT et al., 1997) e aumento do gasto energético (PEDERSEN, 2001; HEINE et al., 2000).

Estudos prévios demonstram que a ooforectomia aumenta a ingestão alimentar e este efeito é invertido pela reposição com estrogênio (WADE; GRAY; BARTNESS, 1985; ROY; WADE, 1977). Estas ações foram mais tarde justificadas pela presença de RE α e Re β em áreas do sistema nervoso central envolvido com o controle alimentar, como hipotálamo ventro-medial, área pré-óptica, núcleo arqueado e núcleo paraventricular (OSTERLUND et al., 1998). Através de infusões cérebro-ventriculares de estradiol, Liang e colaboradores (2002) demonstram que este efeito anoréxico ocorre via Re β . Entretanto, Heine e colaboradores, em 2000, relatam não perceber em seus experimentos este efeito anoréxico gerado pelo estrogênio.

Outras pesquisas demonstram que a ooforectomia eleva a atividade do LPL (GOLDBERG; MERKEL, 2001; PICARD et al., 2000), portanto, o tratamento com estrogênio reduz a atividade da LPL no tecido adiposo visceral, sendo este, um dos principais mecanismos para redução da massa adiposa visceral causada por este hormônio (PRICE et al., 1998; MAYES; WATSON, 2004; HOZUMI et al., 2000). Mostrou-se que na região promotora do gene para LPL existem Elementos de Resposta ao Estrogênio (ERE). Estes Elementos podem ser os responsáveis pelo efeito inibitório direto do estrogênio na expressão do RNAm da LPL e seus metabólitos (HOMMA et al., 2000). Mas o estrogênio também poderia influenciar a atividade da LPL por mecanismos pós-transcricionais ou mesmo através de outros hormônios ou ainda atuar sobre a ativação do Sistema Nervoso Simpático (LAZZARINI; WADE, 1991).

Por outro lado, a influência do estrogênio em propriedades lipolíticas sobre o tecido adiposo parametrial foi estudada em experimentos *in vivo/in vitro*. Todos eles apontam para mecanismos indiretos implicados na potencialização da lipólise estimulada por catecolaminas (DARIMONTE et al., 1997, REBUFFÉ-SCRIVE., 1987) ou a regulação da atividade da adenilil ciclase (PASQUIER; PECQUERY; GIUDICELLI, 1988).

De acordo com Van Pelt e colaboradores(2006), parte da perda de tecido adiposo provocada pelo estradiol, deve-se ao aumento na atividade do sistema nervoso simpático direta e indiretamente. O estrogênio atuaria no cérebro regulando a atividade dos nervos simpáticos e também estimularia um upregulation de

receptores β -adrenérgicos no tecido adiposo visceral, via epinefrina que é altamente lipolítica quando atua via receptor β -adrenérgicos (LINDBERG et al., 1990).

A redução do gasto energético e da taxa metabólica basal são fatores importantes e contribuem para o aumento do peso corporal. O estrogênio via $RE\alpha$ é capaz de aumentar diretamente o gasto energético e metabolismo (HEINE et al., 2000). Estudos em humanos mostram que a taxa metabólica sofre redução após a menopausa e este efeito é revertido, em grande parte, pela reposição com estrogênio (WADE; GRAY; BARTNESS, 1985).

Os hormônios sexuais podem regular o metabolismo lipídico também por ações não genômicas (FALKENSTEIN et al., 2000). A presença de $RE\alpha$ e $Re\beta$ na membrana celular do tecido adiposo subcutâneo e omental foram demonstradas (ANWEAR et al., 2001). Estudos sugerem que o estrogênio eleva o AMPc no tecido adiposo via receptores de membrana, resultando na estimulação da lipase hormônio sensível e da lipólise (MAYES; WATSON, 2004).

Dessa forma, o presente estudo sugere um efeito agonista do tamoxifeno sobre os receptores de estrogênio do tecido adiposo visceral como um possível mecanismo para justificar o menor ganho de tecido adiposo e peso corporal. As ações agonistas ou antagonistas do tamoxifeno parecem depender de sua interação com ambos os subtipos de receptores de estrogênio (KIAN et al., 2004). Algumas hipóteses têm sido levantadas em torno de mudanças na estrutura do receptor, ativação de proteínas co-reguladoras e diferenças na expressão gênica (LEWIS; JORDAN, 2005).

Quando o tamoxifeno atua sobre o domínio TAF1 (Função de Ativação de Transcrição Independente de Hormônios) do receptor de estrogênio exerce efeitos agonistas, sendo capaz ativar o domínio DNA-ligante. Entretanto ele é capaz de bloquear o domínio TAF2 (Função de Ativação de Transcrição Dependente de Hormônios) (BERRY; METZGER; CHAMBON, 1990). Isso pode explicar os efeitos agonistas e antagonistas desta droga (DIPIPO et al., 1995).

Brzozowski e colaboradores (1997), assim como, Shiau e colaboradores (1998), referem que os SERMs, em sua ação antagonista, ligam-se ao sítio LBD e impedem

o remodelamento da 12 hélice, com isso, impedem a ligação de coativadores no sítio de AF-2.

É conhecido que o tamoxifeno é capaz de recrutar co-repressores, N-Cor, em receptores de estrogênio na mama e recruta co-ativadores, SRC-1, para receptores de células endometriais. Essas observações demonstram que o principal mecanismo pelo qual os SERMs são capazes de produzir seus efeitos está ligado ao recrutamento das proteínas co-reguladoras (SHANG; BROWN, 2002).

Com relação a LPL, nosso trabalho não identificou alterações dos níveis séricos desta enzima entre os grupos experimentais. Entretanto, estudos mostram que o tamoxifeno é capaz de reduzir a massa e ou a atividade da LPL no tecido adiposo. (WADE; HELLER, 1993; HOZUMI et al, 1998; HOZUMI et al, 2000).

O tratamento de ratas ooforectomizadas com tamoxifeno simulou os efeitos do estradiol e causou reduções significantes no peso corporal, tecido adiposo parametrial e atividade da LPL, além de elevar o gasto energético. Quando dado concorrentemente com estradiol, o tamoxifeno não mostrou nenhuma evidência da atividade antiestrogênica em alguma dessas medidas (WADE; HELLER, 1993).

O presente estudo verificou que os grupos castrados e tratados (NOT e SOT) apresentaram maiores níveis de TG séricos que os grupos controles. Pesquisas demonstram que o tamoxifeno modifica o metabolismo dos lipídios e lipoproteínas, aumentando o catabolismo das LDL e reduzindo o colesterol total (KUSAMA et al., 2004; SAWADA et al., 2005; JORDAN, 2001), por outro lado, aumentam os níveis de TG (HOZUMI et al., 1998; SAWADA et al., 2005; NTUKIDEM et al., 2008; BELCHETZ, 1994).

Hozumi e colaboradores (1998), em estudo experimental, mostraram que o aumento dos níveis circulantes de TG pode ser resultado da redução da atividade da LPL. De forma semelhante, tem-se verificado que pacientes com hiperlipidemia apresentam baixos níveis da LPL (MASSUNO et al., 1995).

O estrogênio induz mudanças no metabolismo das lipoproteínas incluindo queda do colesterol total e LDL, aumento do colesterol HDL, maior síntese de TG e VLDL e redução da atividade da LPL no tecido adiposo visceral (ZHU et al., 1999). O

tamoxifeno apresenta ação agonista no tecido hepático o que justificaria suas alterações sobre as lipoproteínas e lipídios plasmáticos (SAWADA et al., 2005; MILIONIS; LIBEROPOULOS; ELISAF, 2001).

Os mecanismos de proteção cardiovascular exercido pelo tamoxifeno estão envolvidos principalmente com seu efeito sobre a redução do colesterol total e LDL (LOVE et al., 1994). O tamoxifeno promoveu diminuição dos níveis de colesterol total mesmo na condição de *Diabetes mellitus*, sugerindo um efeito favorável da utilização de tamoxifeno em mulheres diabéticas (NOGUEIRA et., 2005). Entretanto sua capacidade de elevar os TG plasmáticos não pode ser ignorada, pois atua como fator de risco para pancreatite aguda e doenças coronarianas (GAZIANO et al., 1997).

Dewar e colaboradores (1992) descreveram que os efeitos benéficos do tamoxifeno sobre o metabolismo das lipoproteínas parecem terminar rapidamente com a interrupção no uso do medicamento, levando a uma preocupação após 5 anos de tratamento em relação ao risco subsequente de doenças coronarianas.

Em nossos dados, verificamos que o tratamento com tamoxifeno elevou significativamente os níveis séricos de T4 total sem, entretanto, gerar influencias sobre os níveis de THS. Sugerindo um efeito agonista direto desta droga nos receptores de estrogênio presentes na glândula tireóide.

Foi descrito que o tratamento com tamoxifeno é capaz de alterar a histologia e função da glândula tireóide (ZIDAN; RUBENSTEIN, 1999). Resultados demonstram que ele é capaz de estimular a proliferação das células da tireóide, promover hipertrofia das células foliculares, reduzir a área coloidal, assim como, aumentar os níveis séricos de T3 e T4 (ARAUJO et al., 2006).

Os efeitos do estrogênio e do tamoxifeno sobre a glândula tireóide tem sido objeto de grandes investigações, pois muitos aspectos ainda não obscuros. A presença de receptores de estrogênio na glândula tireóide sugere uma ação direta do estrogênio e do SERMs sobre esta glândula (ZAYED; ESCH; MCCONNELL, 1998; KAWABATA et al., 2003).

Sugere-se, também, que o estrogênio e tamoxifeno possam influenciar a glândula tireóide indiretamente, por aumentar os níveis da proteína ligadora de tireoxina no plasma ou aumentar os níveis de TSH, devido ação do estrogênio sobre o hipotálamo e hipófise (ZIDAN; RUBENSTEIN, 1999; BANU et al., 2001).

Nossos dados não demonstram modificações nos níveis de TSH dos animais tratados, o que pode ser explicado por um controle de feedback negativo entre T3, T4 e o TSH.

Em estudo clínico, Zidan e Rubenstein (1999) demonstram que mulheres em tratamento com tamoxifeno há 3 meses alteram reversivelmente os níveis de TSH, mas não demonstram alterações nos níveis de T3 e T4 livre. Contudo [Kostoglou-Athanassiou](#) e colaboradores, em 1998, demonstraram que mulheres após 6 meses de tratamento com tamoxifeno têm níveis de T3 e T4 significativamente aumentados.

Os hormônios tireoidianos são importantes fatores para regulação do metabolismo, crescimento e desenvolvimento (DE FEO, 1996). São capazes de modular o metabolismo energético por regular a capacidade oxidativa da mitocôndria, além de elevar os níveis da PKA (ADAMO et al., 2008).

Receptores de estrogênio e hormônios tireoidianos são encontrados na mitocôndria de diversas células (CAMMARATA et al., 2004; YANG et al., 2004; WRUTNIAK et al., 1995), a influência da ativação destes receptores na regulação da produção energética, transcrições da mitocôndria e de enzimas da cadeia respiratória têm sido demonstradas ([PSARRA; SEKERIS](#), 2008).

Portanto o aumento do hormônio tireoidiano T4 seria mais um possível mecanismo pelo qual o tamoxifeno estaria promovendo redução do tecido adiposo visceral e consequentemente do peso corporal.

Este trabalho também verificou que o tamoxifeno não modificou o metabolismo das proteínas da musculatura esquelética, pois não houve alterações do peso seco nem da concentração protéica do músculo sóleo dos animais tratados, tampouco, identificamos modificações da proteína total sérica e suas frações (albumina e globulina).

As alterações protéicas gerados pelo uso do tamoxifeno parecem não estar elucidadas. Hemeida, em 2007, demonstrou redução na concentração plasmática de proteínas totais e albumina associado com o uso do tamoxifeno, bem como, identificou um aumento nos níveis séricos de creatinina.

No estudo experimental realizado por Silva e colaboradores (2005) o tratamento de ratas por 30 dias com tamoxifeno (0,3mg/Kg/dia) foi capaz de diminuir significativamente os níveis séricos de albumina e elevar os níveis de *a* e *g* globulinas. A albumina é classificada como uma proteína de fase aguda negativa, já o aumento das globulinas caracterizam o processo de reação de fase aguda positiva. Essas alterações foram justificadas por um possível processo inflamatório causado pelo tratamento com tamoxifeno principalmente sobre o tecido hepático. O leve aumento das *g* globulinas indica o início de um processo de defesa.

No estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2000) verificou-se que os animais tratados por 60 dias com tamoxifeno (0,3mg/Kg/dia) apresentaram aumento significativo de proteínas séricas totais, mas, não foi verificada diferença nos níveis séricos de albumina, creatinina e uréia. Nogueira também afirma que o aumento dos níveis de proteína total sérica deve-se a um processo inflamatório gerado pelo tamoxifeno e conseqüentemente gerando uma reação protéica de fase aguda.

Nosso trabalho não detectou alterações dos níveis de proteína total sérica e suas frações, possivelmente em função do maior período de tratamento e diferenças na dosagem da droga oferecida diariamente.

Com relação ao peso do fêmur, o tamoxifeno reproduziu os efeitos agonistas do estrogênio sobre o metabolismo e remodelamento ósseo, uma vez que os grupos ooforectomizados e tratados apresentaram peso do fêmur maior que os grupos ooforectomizados controles e peso semelhante aos não ooforectomizados. Além disso, o tratamento não influenciou o peso do fêmur dos animais não castrados e tratados.

Dados clínicos da literatura corroboram com nossos resultados (KARIMIAN et al., 2008; CZERNY et al., 2003). O tamoxifeno tem um efeito agonista do estrogênio no metabolismo ósseo de mulheres pós-menopausadas em tratamento para o câncer

de mama. E este efeito associa-se principalmente com a preservação da densidade mineral da coluna lombar, coluna cervical e região femoral (ZIDAN et al., 2004; LOVE et al., 1992; GRAY et al., 1995).

De acordo com Merja e colaboradores (1998) o tratamento com tamoxifeno de mulheres com câncer de mama, em 1 ano, aumentou significativamente a densidade da espinha lombar e região sacral, outros sítios também mostraram uma tendência clara em direção ao aumento do peso ósseo, como perna e região femural. Este aumento foi precedido por quedas significantes na eliminação urinária de N-Telopeptídeo do Colágeno Tipo1 (NTx) e dos níveis séricos de osteocalcina e do Pró-Peptídeo Amino-Terminal do Colágeno Tipo 1 (PINP), 6 meses antes. Assim, o efeito restaurador do tamoxifeno sobre os ossos causa modificações bioquímicas pelo menos 6 meses antes que a melhora na densidade óssea seja detectada. Da mesma forma, Love e colaboradores, em 1992, estudando os efeitos de tamoxifeno na densidade de mineral dos ossos da espinha lombar de 140 mulheres pós-menopausadas, detectou queda dos níveis séricos de osteocalcina e fosfatases alcalinas, sem alterar hormônios da paratireóide.

Os mecanismos pelos quais tamoxifeno influi na preservação e síntese óssea não são claros. Acredita-se que assim como o estrogênio ele atue mantendo uma apropriada proporção entre a formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea dos osteoclastos além de induzir apoptose em pré-osteoclastos (ZIDAN et al., 2004; WARD et al., 1993; POWLES et al., 1996).

Por todo período do experimento o tamoxifeno não trouxe alterações sobre a glicemia capilar. Outros estudos corroboram com nossos dados (NOGUEIRA et al., 2000; JONES et al., 2007).

A ovariectomia em roedores leva a alterações da tolerância a glicose e da secreção de insulina glicose-dependente, embora a reposição com estrogênio possa reverter parcialmente ou totalmente estes efeitos (BAILEY; AHMED-SOROUR, 1980). Heine e colaboradores (2000) referem que camundongos knockout para RE α desenvolveram resistência insulínica. Estudos clínicos também mostram redução da sensibilidade à insulina em mulheres pós-menopausadas (LINDHEIM et al., 1994). Adicionalmente, a falta ou mutação do RE α em humanos levam à resistência

insulínica (SMITH et al., 1994; MORISHIMA et al., 1995). Os estrógenos melhoram a tolerância a glicose e responsividade à insulina, em parte, por efeitos diretos nos receptores para insulina dos adipócitos (PEDERSON et al., 1992).

Finalmente, este estudo aponta mais um sítio específico de ações do tamoxifeno, ou seja, o tecido adiposo visceral, que é responsável diretamente pela perda de peso corporal observada nos animais tratados. Sugerimos que as ações do tamoxifeno sobre o tecido adiposo sejam por vias direta, enquanto agonista dos receptores de estrogênio do tecido adiposo visceral e, indiretamente por aumento do metabolismo via hormônios tireoidianos.

7 REFERENCIAS

ALAYNICK, W.A.; KONDO, R.P.; XIE, W.; HE, W.; DUFOUR, C.R., DOWNES, M., JONKER, J.W., GILES, W., NAVIAUX, R.K., GIGUERE, V., EVANS, R.M., **ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart.** Cell Metab. 2007; 6 (1), 13–24.

ALI, P.A; AL-GHORABIE, F.H.; EVANS, C.J.; EL-SHARKAWI, A.M.; HANCOCK, D.A. **Body composition measurements using DXA and other techniques in tamoxifen-treated patients.** Appl Radiat Isot. 1998; 49(5-6):643-5.

ANWAR, A.; MCTERNAN, P.G.; ANDERSON, L.A.; ASKAA, J.; MOODY, C.G; BARNETT, A.H.; EGGO, M.C.; KUMAR, S. **Site-specific regulation of oestrogen receptor-a and -b by oestradiol in human adipose tissue.** Diabetes Obes Metab. 2001; 3: 338–349.

ARAUJO, L.F.B.; SOARES, J.R.; SIMÕES, R.S.; CALIÓ, P.L.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; SIMÕES, M.J.; HAIDAR, M.A.; BARACAT, E.C. **Effect of conjugated equine estrogens and tamoxifen administration on thyroid gland histomorphology of the rat.** Clinics. 2006;61(4):321-26.

BAILEY, C. J.; AHMED-SOROUR, H. **Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Effects of insulin secretion.** Diabetologia. 1980; 19, 475–481.

BANU, S.K.; AROSH, J.A.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M.M. **Testosterone and estradiol differentially regulate thyroid growth in Wistar rats from immature to adult age.** Endocr Res. 2001;27:447-63.

BÁRÁNY, M.; BÁRÁNY, K.; RECKARD, T.; VOLPE, A. **Myosin of Fast and Slow Muscles of the Rabbit.** Archives of Biochemistry and Biophysics. 1965; 109, 185-191.

BELCHETZ, P.E. **Hormonal treatment of postmenopausal women.** N Engl J Med 1994; 330: 1.062-1.071.

BERRY, M.; METZGER, D.; CHAMBON, P. **Role of two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonist activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen..** EMBO. 1990; 9:2811-2818.

BJORNTORP, P. **Hormonal Control of regional Fat Distribution.** Hum. Reprod. 1997; 12 Suppl 1: 21-5.

BRADFORD, M.M. **A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Analytical Biochemistry, 1976; 72, 248- 254.

BRANDI, M.L.; BECHERINI, L.; GENNARI, L.; RACCHI, M.; BIANCHETTI, A.; NACMIAS, B.; SORBI, S.; MECOCCI, P.; SENIN, U.; GOVONI, S. **Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease.** Biochem Biophys Res Commun. 1999; 19; 265(2):335-8.

BRASIL. **Controle do câncer de mama: documento do Consenso 2004.** Disponível em <<http://www.inca.br/pulicações/consensointegra>> . Acesso em 15 de dezembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA. **Estimativa da Incidência de câncer no Brasil em 2008.** www.INCA.gov.br . Acesso em: 10/02/2009.

BRINCAT, M.P.; GALEA, R.; BARON, M. **Selective estrogen receptor modulations.** Currement Obstetrics & Gynecology. 1999; 9 229-234.

BRZOZOWSKI, A.M.; PIKE, A.C.; DAUTER, Z.; Hubbard, R.E.; BONN, T.; ENGSTRÖM, O.; OHMAN, L.; GREENE, G.L.; GUSTAFSSON, J.A.; CARLQUIST, M. **Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor.** Nature. 1997; 16;389(6652):753-8.

BURCKHARDT, P. **Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM): New substances for hormone replacement therapy.** Schweiz Med Wochenschr. 1999; Dec 11;129(49):1926-30.

BUTTA, A.; MACLENNAN, k.; FLANDERS, K.C.; SACKS, N.P.M.; et al. **Induction of transforming growth factor beta in human breast cancer in vivo following Tamoxifen treatment.** Cancer Res. 1992; 52:4261-4.

CAMMARATA, P.R.; CHU, S.; MOOR, A.; WANG, Z.; YANG, S.H.; SIMPKINS, J.W. **Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes.**Exp. Eye Res. 2004; 78, 861–71.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. **Brown adipose tissue: function and physiological significance.** Physiol Rev. 2004; 84:277-359.

CARRIER, J.C.; DEBLOIS, G.; CHAMPIGNY, C.; LEVY, E.; GIGUERE, V. **Estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) is a transcriptional regulator of apolipoprotein A-IV and controls lipid handling in the intestine.** J. Biol. Chem. 2004; 279 (50), 52052–52058.

CHAGPAR, A.B; MCMASTERS, K.M; SAUL, J.; NURKO, J.; MARTIN, R.C.; SCOGGINS, C.R.; EDWARDS, M.J. **Body mass index influences palpability but not stage of breast cancer at diagnosis.** Am Surg. 2007; 73(6):555-60 560.

CHRISTIE, D.B.; DAY, J.D.; MOORE, A.B.; CHAPMAN, J.R.; NAKAYAMA, D.K; CONFORTI, A.M. **Endometrial stromal sarcoma development after hysterectomy and tamoxifen therapy.** Am Surg. 2008; 74 (8):726-8.

CORRÊA DA COSTA, V.M.; MOREIRA, D.G.; ROSENTHAL, D. **Thyroid function and aging: gender-related differences.** Journal of Endocrinology. 2001; 171, 193–198.

CRANDALL, D.L.; BUSLER, D.E.; NOVAK, T.J.; WEBER, R.V.; KRAL, J.G. **Identification of estrogen receptor β RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue.** Biochem Biophys Res Commun.1998; 248:523–526.

CZERNY, B.; PAWLIK, A.; JUZYSZYN, Z.; MYŚLIWIEC, Z. **Effect of tamoxifen on bone mineral density and blood lipids in ovariectomized rats.** Pol J Pharmacol. 2003; 55 (6):1137-42.

DARIMONT, C.; DELANSORNE, R.; PARIS, J.; AILHAUD, G.; NEGREL, R. **Influence of estrogenic status on the lipolytic activity of parametrial adipose tissue in vivo: an in situ microdialysis study.** *Endocrinology*. 1997;138:1092–1096.

DE FEO, P. **Hormonal regulation of human protein metabolism.** *Eur. J. Endocrinol.* 1996; 135, 7–18.

DEWAR, J.A.; HOROBIN, J.M.; PREECE, P.E.; TAVENDALE, R.; TUNSTALL-PEDOE, H.; WOOD, R.A. **Long term effects of tamoxifen on blood lipid values in breast cancer.** *BMJ*. 1992; 25;305(6847):225-6.

DIPIPPO, A.V.; LINDSAY, R.; POWERS, A.C. **Estradiol and Tamoxifen Interactions with Thyroid Hormone in the Ovariectomized-Thyroidectomized Rat.** *Endocrinology*. 1995; 136: 1020-1033, 1.

DONDA, A.; REYMOND, F.; REY, F.; LEMARCHAND-BERAUD, T. **Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat.** *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990; 122:577-84.

ECHEVERRIA, O.M.; GONZALEZ-MACIEL, A.; TRAISH, A.M.; WOTSIZ, H.H.; UBALDO, E.; VAZQUEZ-NIN, G.H. **Immuno-electron microscopic localization of estradiol receptor in cells of male and female reproductive and non-reproductive organs.** *Biol Cell*. 1994; 81: 257– 265.

EL- BESHISHY, H.A. **Hepatoprotective effect of de green tea extract against tamoxifen-induced liver injury in rats.** *J Biochem Mol Biol*. 2005; 38:563-57

ELBERS, J.M.; ASSCHEMAN, H.; SEIDELL, J.C.; GOOREN, L.J. **Effects of sex steroid hormones on regional fat depots as assessed by magnetic resonance imaging in transsexuals.** *Am J Physiol*. 1999; 276(2 Pt 1):E317–E325.

ELEFSIONISTIS, I.S; PANTAZIS, K.D.; ILIAS, A.; PALLIS, L.; MARIOLIS, A.; GLYNOU, I.; KADA, H.; MOULAKAKIS, A. **Tamoxifen induced hepatotoxicity in breast cancer patients with pre-existing liver steatosis: the role of glucose intolerance.** *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*. 2004; 16,593-598.

EVANS, R.M. **The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.** Science Review. 1988; 13;240(4854):889-95.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. **Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects.** Pharmacol Rev. 2000; 52: 513–556.

FINK, A.K.; GURWITZ, J.; RAKOWSKI, W.; GUADAGNOLI, E.; SILLIMAN, R.A. **Patient beliefs and tamoxifen discontinuance in older women with estrogen receptor--positive breast cancer.** J Clin Oncol. 2004; Aug 15;22(16):3309-15.

FOLSOM, A.R.; KAYE, S.A.; SELLERS, T.A.; HONG, C.P.; CERHAN, J.R.; POTTER, J.D.; PRINEAS, R.J. **Body fat distribution and 5-year risk of death in older women.** JAMA. 1993; 269, 483-487.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. **O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo.** Arq. Brás Endocrinol Metab. Vol 50 n°2 2006.

FRÜBECK, G. **Intracellular signalling pathways activated by leptin.** Biochem J. 2006; 393:7-20.

FRUHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZABAL, J.; BURREL, M.A. **The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation.** Am J Physiol Endocrinol Metabol. 2001; 280:E827-47.

GAMBACCIANI, M.; CIAPONI, M.; CAPPAGLI, B.; et al. **Prospective evaluation of body weight and body fat distribution in early postmenopausal women with and without hormonal replacement therapy.** Maturitas. 2001; Aug 25;39(2):125-32.

GAZIANO, J.M.; HENNEKENS, C.H.; O'DONNELL, C.J.; BRESLOW, J.L.; BURING, J.E. **Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction.** Circulation. 1997; 21;96(8):2520-5.

GOLDBERG, I.J.; MERKEL, M. **Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology.** Front Biosci. 2001; 6: D388–D405.

GRAY, J.M.; DUDLEY, S.D.; WADE, G.N. **In vivo cell nuclear binding of 17 β -[3H]-estradiol in rat adipose tissues.** Am J Physiol. 1981; 240: E43–E46.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J.M.; ARGOS, P.; CHAMBON, P. **Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A.** Nature. 1986; 320: 134-139.

GREENE, G.L.; et al. **Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA.** Science. 1986; 320: 1150-1154.

GREY, A.B.; STAPLETON, J.P.; EVANS, M.C.; TATNELL, M.A.; AMES, R.W.; REID, I.R. **The effect of the antiestrogen tamoxifen on bone mineral density in normal late postmenopausal women.** Am J Med. 1995; 99:636–641.

HALL, J.E. **Neuroendocrine physiology of the early and late menopause.** Endocrinol Metab Clin North Am. 2004; 33 (4): 637-59.

HEINE, P.A.; TAYLOR, J.A.; IWAMOTO, G.A.; LUBAHN, D.B.; COOKE, P.S. **Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice.** Medical sciences. 2000; vol. 97: n^o. 23: 12729–12734.

HEMIEDA, F.A. **Influence of gender on tamoxifen-induced biochemical changes in serum of rats.** Mol Cell Biochem. 2007; Jul;301(1-2):137-42.

HEWITT, S.C.; DEROO, B.J.; KORACH, K.S. **Signal transduction. A new mediator for an old hormone?** Science. 2005; 11; 307(5715):1572-3.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; et al. **Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter.** J Biol Chem. 2000; 275:11404– 11411.

HOSKIN, P.J.; ASHLEY, S.; YARNOLD, J.R. **Weight gain after primary surgery for breast cancer-effect of tamoxifen.** Breast Cancer Res Treat. 1992; 22(2):129-32.

HOZUMI, Y.; KAWANO, M.; HAKAMATA, Y.; MIYATA, M.; JORDAN, V.C. **Tamoxifen inhibits lipoprotein activity: In vivo and in vitro studies.** Hormone Research. 2000; 53 (1):36-39.

HOZUMI, Y.; KAWANO, M.; SAITO, T.; MIYATA, M. **Effect of tamoxifen on serum lipid metabolism.** J Clin Endocrinol Metab. 1998; 8:1633-5.

JANSSON, J.O.; MOVÉRARE-SKRTIC, S.; BERNDTSSON, A.; WERNSTEDT, I.; CARLSTEN, H.; OHLSSON, C. **Leukemia inhibitory factor reduces body fat mass in ovariectomized mice.** Eur J Endocrinol. 2006; 154(2):349-54.

JENSEN, E.V.; JACOBSON, H.I. **Basic guides to the mechanisms of estrogen action.** Recent Prog Horm Res, 1962; 18:387-414.

JONES, L.W.; HAYKOWSKY, M.; PITUSKIN, E.N.; JENDZJOWSKY, N.G.; TOMCZAK, C.R.; HAENNEL, R.G.; MACKEY, J.R. **Cardiovascular reserve and risk profile of postmenopausal women after chemoendocrine therapy for hormone receptor--positive operable breast cancer.** Oncologist. 2007; Oct;12(10):1156-64.

JORDAN, V.C. **The past, present, and future of selective estrogen receptor modulation.** Ann N Y Acad Sci. 2001 Dec;949:72-9.

JORDAN, V.C. **Designer estrogens.** Scientific American. 1998; 36-43.

KARIMIAN, E.; CHAGIN, A.S.; GJERDE, J.; HEINO, T.; LIEN, E.A.; OHLSSON, C.; SÄVENDAHL, L. **Tamoxifen impairs both longitudinal and cortical bone growth in young male rats.** J Bone Miner Res. 2008; 23(8):1267-77.

KAWABATA, W.; SUZUKI, T.; MORIYA, T.; FUJIMORI, K.; NAGANUMA, H.; INOUE, S.; KINOUCI, Y.; KAMEYAMA, K.; TAKAMI, H.; SHIMOSEGAWA, T.; SASANO, H. **Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions.** Mod Pathol. 2003;16:437-44.

KENNEDY, G.C. **The hypothalamic control of food intake in rats.** Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1950; Nov;137(889):535-49.

KIAN TEE, M.; ROGATSKY, I.; TZAGARAKIS-FOSTER, C.; CVORO, A.; AN J.; CHRISTY, R.J.; YAMAMOTO, K.R.; LEITMAN, D.C. **Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta.** Mol Biol Cell. 2004; Mar;15(3):1262-72.

KISSEBAH, A.H.; VYDELINGUM, N.; MURRAY, R.; EVANS, D.J.; HARTZ, A.J.; KALKHOFF, R.K.; ADAMS, P.W. **Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity.** J Clin Endocrinol Metab, 1982; 54, 254-260.

KLINGE, C.M. **Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors.** Steroids. 2000; 65(5):227-51. Review.

KOMM, B.S.; TREPENING, C.M.; BENZ, D.J.; et al. **Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblastlike osteosarcoma cells.** Science. 1988;241:81-4.

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I.; NTALLES, K.; MARKOPOULOS, C.; ATHANASSIOU, P.; GOGAS, J.; PROUKAKIS, C. **Thyroid function in postmenopausal women with breast cancer on tamoxifen.** Eur J Gynaecol Oncol. 1998;19(2):150-4.

KRISTENSEN, K.; PEDERSEN, S.B.; VESTERGAARD, P.; MOSEKILDE, L.; RICHELSEN, B. **Hormone replacement therapy affects body composition and leptin differently in obese and non-obese postmenopausal women.** Journal Endocrinology. 1999; 163(1):55-62.

KRUM, S.A.; MIRANDA-CARBONI, G.A.; HAUSCHKA, P.V. **Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival.** The EMBO Journal. 2008; 27, 535–545

KUIPER, G.G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. **Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.** Endocrinology. 1997; 138: 863–870.

KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFFSON, J.A. **Characteristics and function of novel estrogen receptor β** . In: O'MALLEY, B.W. (ed). **Hormones and Signaling**. Academic press. 1996; 189-112.

KUMAR, N.B.; ALLEN, K.; CANTOR, A.; COX, C.E.; GREENBERG, H.; SHAH, S.; LYMAN, G.H. **Weight gain associated with adjuvant tamoxifen therapy in stage I and II breast cancer: fact or artifact**. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Jun;44(2):135-43.

KUSAMA, M.; MIYAUCHI, K.; AOYAMA, H.; et al. **Effects of toremifene (TOR) and tamoxifen (TAM) on serum lipids in postmenopausal patients with breast cancer**. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; Nov;88(1):1-8.

LAZZARINI, S.J.; WADE, G.N. **Role of sympathetic nerves in effects of estradiol on rat white adipose tissue**. *Am J Physiol.* 1991; 260(1 Pt 2):R47-R51.

LANGIN D. **Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome**. *Pharmacological Research* 53 (2006) 482-491.

LEWIS, J.S.; JORDAN, V.C. **Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance**. *Mutat Res.* 2005; Dec 11;591(1-2):247-63.

LIANG, Y.Q.; AKISHITA, M.; KIM, S.; et al. **Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen**. *International Journal of Obesity.* 2002; 26, 1103-1109.

LINDBERG, U.B.; CRONA, N.; SILFVERSTOLPE, G.; BJORNTORP, P.; REBUFFESCRIVEM. **Regional adipose tissue metabolism in postmenopausal women after treatment with exogenous sex steroids**. *Horm Metab.* 1990; Res 22:345-351.

LINDHEIM, S. R.; BUCHANAN, T. A.; DUFFY, D. M.; VIJOD, M. A.; KOJIMA, T.; STANCZYK, F. Z.; LOBO, R. A. **Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the**

frequently sampled intravenous glucose tolerance test. J. Soc. Gynecol. Invest. 1994; 1, 150–154.

LOVE, R.R.; MAZESS, R.B.; BARDEN, H.S.; EPSTEIN, S.; NEWCOMB, P.A.; JORDAN, V.C.; CARBONE, P.P.; DEMETS, D.L. **Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer.** N Engl J Med. 1992; Mar 26;326(13):852-6.

LUO, J.; SLADEK, R.; CARRIER, J.; BADER, J.A.; RICHARD, D.; GIGUERE, V. **Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha.** Mol. Cell. Biol. 2003; 23 (22), 7947–7956.

MACNAB, M.W.; TALLARIDA, R.J.; JOSEPH, R. **Effect of glucocorticoids and oestrogen on interleukin-6 production by human thyrocytes from patients with Graves' disease and toxic multinodular goitre and from HTori3 cells.** Eur J Endocrinol. 1997;137:429-32.

MANOLE, D.; SCHILDKNECHT, B.; GOSNELL, B.; ADAMS, E.; DERWAHL, M. **Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms.** J Clin Endoc Metabol. 2001; 86:1072-7.

MASUNO, H.; NAKABAYASHI, H.; KOBAYASHI, J.; SAITO, Y.; OKUDA, H. **Reduced dimerization of lipoprotein lipase in post-heparin plasma of a patient with hyperchylomicronemia.** Biochim Biophys Acta. 1995; Jan 3;1254(1):30-6.

MATTIASSON, I.; RENDELL, M.; TORNQUIST, C.; JEPPSSON, S.; HULTHEN, U.L. **Effects of estrogen replacement therapy on abdominal fat compartments as related to glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women.** Horm Metab Res. 2002; 34: 583–588.

MAYES, J.S.; WATSON, G.H. **Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity.** Obesity reviews. 2004; 5, 197–216.

MCMURRAY, R.G; HACKNEY, A.C. **Interactions of Metabolic Hormones, Adipose Tissue and Exercise.** Sports Med.2005; 35 (5): 393-412.

MERJA, B.; MARTTUNEN; HIETANEN, P.; TIITINEN, A.; YLIKORKALA, O. **Comparison of Effects of Tamoxifen and Toremifene on Bone Biochemistry and Bone Mineral Density in Postmenopausal Breast Cancer Patients.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1998; Vol. 83, N°.4-1158-1162.

MILIONIS, H.J.; LIBEROPOULOS, E.N.; ELISAF, M.S. **Tamoxifen-induced hypertriglyceridemia in association with *Diabetes mellitus*.** Diabetes Metab. 2001; 27: 160-3.

MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M. M.; SIMPSON, E. R.; FISHER, C.; QIN, K. **Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80, 3689–3698.

MUCHMORE, B.D. **Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects.** The oncologist. 2000; 5(5): 388-392.

MURRAY, GRANNER, MAYES, RODWELL. HARPER - **Bioquímica Ilustrada** - 26ª Ed, 2006 Ed: Atheneu São Paulo.

NGUYEN, M.C.; STEWART, R.B.; BANERJI, M.A.; GORDON, D.H.; KRAL, J.G. **Relationships between tamoxifen use, liver fat and body fat distribution in women with breast cancer.** Int J Obes Relat Metab Disord. 2001; Feb;25(2):296-8.

NILSSON, M.; DAHLMAN, I.; RYDÉN, M.; NORDSTRÖM, E.A.; GUSTAFSSON, J.A.; ARNER, P.; DAHLMAN-WRIGHT, K. **Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females.** Int J Obes (Lond). 2007; 31(6):900-7.

NOGUEIRA, F.C.J.; COELHO, D.A.; ALMEIDA, M.M.C.; et al. **Effect of tamoxifen in lipids of diabetic rats induced by streptozotocin.** Acta Cir. Bras. vol.20 suppl.1 São Paulo 2005.

NTUKIDEM, N.I.; NGUYEN, A.T.; STEARNS, V.; REHMAN, M.; SCHOTT, A.; SKAAR, T.; JIN, Y.; BLANCHE, P.; LI, L.; LEMLER, S.; HAYDEN, J.; KRAUSS, R.M.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D.A.; HAYES, D.F.; CONSORTIUM ON BREAST

CANCER PHARMACOGENOMICS. Consortium on Breast Cancer Pharmacogenomics. **Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the lipid effects of tamoxifen.** Clin Pharmacol Ther. 2008; May;83(5):702-10. Epub 2007 , 22.

OGAWA, S.; FUJITA, M.; ISHII, Y.; TSURUKAMI, H.; HIRABAYASHI, M.; IKEDA, K.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; UEDA, M.; NAKAMURA, T.; OUCHI, Y.; MURAMATSU, M.; INOUE, S. **Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways.** J Biol Chem. 2000; Jul 14;275(28):21372-9.

OHLSSON, C.; HELLBERG, N.; PARINI, P.; et al. **Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice.** Biochem Biophys Res Commun. 2000; 278(3):640-5.

OSBORNE, T.F. **Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action.** J Biol Chem. 2000; 275:32379-82.

OSTERLUND, M.; KUIPER, G.G.; GUSTAFSSON, J.A.; HURD, Y.L. **Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain.** Brain Res Mol Brain Res. 1998; 54: 175-180.

OZET, A.; ARPACI, F.; YILMAZ, M.I.; AYTA, H.; OZTURK, B.; KOMURCU, S.; YAVUZ, A.A.; TEZCAN, Y.; ACIKEL, C. **Effects of tamoxifen on the serum leptin level in patients with breast cancer.** Jpn J Clin Oncol. 2001; Sep;31(9):424-7.

PASQUIER, Y.N.; PECQUERY, R.; GIUDICELLI, Y. **Increased adenylate cyclase catalytic activity explains how estrogens 'in vivo' promote lipolytic activity in rat white fat cells.** Biochem Biophys Res Commun. 1988; 154: 1151-1159.

PEDERSEN, S.B.; BRUUN, J.M.; KRISTENSEN, K.; RICHELSEN, B. **Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen.** Biochem Biophys Res Commun. 2001; 288:191-197.

PEDERSEN, S.B.; HANSEN, P.S.; LUND, S.; ANDERSEN, P.H.; ODGAARD, A.; RICHELSEN, B. **Identification of oestrogen receptors and oestrogen receptor mRNA in human adipose tissue.** Eur J Clin Invest. 1996; 26:262–269.

PEDERSEN, S.B.; KRISTENSEN, K.; HERMANN, P.A.; KATZENELLENBOGEN, J.; RICHELSEN, B. **Estrogen Controls Lipolysis by Up-Regulating α 2A-Adrenergic Receptors Directly in Human Adipose Tissue through the Estrogen Receptor α . Implications for the Female Fat Distribution.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004; 89(4):1869–1878.

PEDERSON, S. B.; BORGLUM, J. D.; MOLLER-PEDERSON, T.; RICHELSEN, B. **Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones.** Mol. Cell. Endocrinol. 1992; 85, 13–19.

PELZER, T.; JAZBUTYTE, V.; HU, K.; SEGERER, S.; NAHRENDORF, M.; NORDBECK, P.; BONZ, A.W.; MUCK, J.; FRITZEMEIER, K.H.; HEGELE-HARTUNG, C.; ERTL, G.; NEYSES, L. **The estrogen receptor- α agonist 16 α -LE2 inhibits hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats.** Cardiovascular Research. 2005; 67. 604-6012.

PICARD, F.; DESHAIES, Y.; LALONDE, J.; SAMSON, P.; LABRIE, C.; BÉLANGER, A.; LABRIE, F.; RICHARD, D. **Effects of the estrogen antagonist EM- 652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats.** Int J Obes. 2000; 24: 830–840.

POWLES, T.J.; HICKISH, T.; KANIS, J.A.; TIDY, A.; ASHLEY, S. **Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy X-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women.** J Clin Oncol. 1996; 14:78–84.

PRICE, T.M.; O'BRIEN, S.N.; WELTER, B.H.; GEORGE, R.; ANANDJIWALA, J.; KILGORE M. **Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase-possible mechanism of body fat distribution.** Am J Obstet Gynecol. 1998; 178 (1 Pt 1):101-7.

PSARRA, A.-M.G.; SOLAKIDI, S.; SEKERIS, C.E. **The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid**

and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 246: 21–33.

PSARRA, A.M.; SEKERIS, C.E. **Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria.** *IUBMB Life*. 2008; Apr;60(4):210-23.

REBUFFÉ-SCRIVE, M. **Sex steroid hormones and adipose tissue metabolism in ovariectomized and adrenalectomized rats.** *Acta Physiol Scand*. 1987; 129:471–477

REXFORD, S. A. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ.** *Obesity*. 2006;14(Suppl 5):242S–249S.

RODRIGUEZ-CALVO, R.; JOVE, M.; COLL, T.; et al. **PGC-1beta down-regulation is associated with reduced ERRalpha activity and MCAD expression in skeletal muscle of senescence-accelerated mice.** *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*. 2006; 61 (8), 773–780.

ROY, E.J.; WADE, G.N. **Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats.** *Horm Behav*. 1977; 8: 265-274.

ROMERO, Walckiria Garcia. **Efeitos cardiovasculares e renias promovido pelo tratamento crônico com tamoxifeno em ratas ooforectomizadas normotensas e espontaneamente hipertensas.** 2007. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo.

RUSSEL, K.S.; HAYNES, M.P.; SINHA, D.; CLERISME, E.; BENDER, J.R. **Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol. Which mediate rapid intracellular signaling.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 5930-5935.

SAQUIB, N.; FLATT, S.W.; NATARAJAN, L. **Weight gain and recovery of pre-cancer weight after breast cancer treatments: evidence from the women's**

healthy eating and living (WHEL) study. Breast Cancer Res Treat. 2007; ;105(2):177-86.

SAWADA, S.; SATO, K.; KUSUHARA, M.; et al. **Effect of anastrozole and tamoxifen on lipid metabolism in Japanese postmenopausal women with early breast cancer.** Acta Oncol. 2005; 44(2):134-41.

SCHINDLER, A.E. **Thyroid function and postmenopause.** Gynecol Endocrinol. 2003;17:79-85.

SEXTON, M.J; GHERMAN, R.B. **Selective estrogen receptor modulators: the ideal estrogen replacement?** Elsevier Scienc. 2001; 8: 25-30.

SHANG, Y.; BROWN. M. **Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs.** Science. 2002; 29;295(5564):2465-8.

SHIAU, A.K.; BARSTAD, D.; LORIA, P.M.; et al. **The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen.** Cell. 1998; 23;95(7):927-37.

SILVA, T.C.P.; MOTA, S.B.; ALMEIDA, M.M.C.; et al. **Effect of tamoxifen on plasma proteins in diabetes mellitus type 1.** Acta cir. Brás. 2005; 20(supl.1):131-138.

SMITH, E. P.; BOYD, J.; FRANK, G. R.; TAKAHASHI, H.; COHEN, R. M.; SPECKER, B.; WILLIAMS, T. C.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S. **Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man.** N. Engl. J. Med. 1994; 331, 1056–1061.

SONODA, J.; MEHL, I.R.; CHONG, L.W.; NOFSINGER, R.R.; EVANS, R.M. **PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104 (12), 5223–5228.

SZAFRAN, H.; SMIELAK-KOROMBEL, W. **The role of estrogens in hormonal regulation of lipid metabolism in women.** Przegł Lek. 1998;55(5):266-70.

TAKANISHI, G.C.; BORST, C.A. **The aromatase inhibitors.** Women' s Health in Primary Care. 2001; 4 (5): 368-372.

TAN-CHIU, E.; WICKERHAM, L. **Reduncing the risk of breast cancer entails careful risk assessment.** Women Health Primary Care, 2000; 3 (9): 675-680.

TCHERNOF, A.; POEHLMAN, E.T.; DESPRES, J.P. **Body fat distribution, the menopause transition, and hormone replacement therapy.** Diabetes & Matabolism. 2000; 26: 12-20.

TOTH, M.J.; TCHERNOF, A.; SITES, C.K.; POEHLMAN, E.T. **Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution.** Int J Obes Relat Metab Disord. 2000; 24:226–231.

VALLE, A.; SANTANDREU, F.M.; GARCÍA-PALMER, F.J.; ROCA, P.; OLIVER, J. **The Serum Levels of 17 β -estradiol, Progesterone and Triiodothyronine Correlate with Brown Adipose Tissue Thermogenic Parameters During Aging.** Cell Physiol Biochem 2008; 22:337-346.

VAN PELT, R.E.; GOZANSKY, W.S.; HICKNER, R.C.; SCHWARTZ, R.S.; KOHRT, W.M. **Acute modulation of adipose tissue lipolysis by intravenous estrogens.** Obesity a research journal. 2006; 14(12):2163-72.

VILLENA, J.A.; HOCK, M.B.; CHANG, W.Y.; BARCAS, J.E.; GIGUERE, V.; KRALLI, A. **Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104 (4), 1418–1423.

WADE, G.N.; GRAY, J.M. **Cytoplasmic 17 β -[3H] estradiol binding in rat adipose tissues.** Endocrinology. 1978; 103: 1695–1701.

WADE, G.N.; GRAY, J.M.; BARTNESS, T.J. **Gonadal influences on adiposity.** Int J Obes. 1985; 9 Suppl 1:83-92.

WADE, G.N.; HELLER, H.W. **Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats.** Am J Physiol. 1993;264(6 Pt 2):R1219-23.

WAJCHENBERG, B.L. **Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.** *Endocr Rev.* 2000; Dec;21(6):697-738.

WALLEN, W.J.; BELANGER, M.P.; WITTNICH, C. **Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats.** *J Nutr.* 2002; Aug;132(8):2246-50.

WARD, R.L.; MORGAN, G.; DALLEY, D.; KELLY, P.J. **Tamoxifen reduces bone turnover and prevents lumbar spine and proximal femoral bone loss in early postmenopausal women.** *Bone Miner.* 1993; 22:87–94.

WRUTNIAK, C.; CASSAR-MALEK, I.; MARCHAL, S.; RASCLE, A.; HEUSSER, S.; KELLER, J.M.; FLECHON, J.; DAUCA, M.; SAMARUT, J.; GHYSDAEL, J.; CABELLO, G. **A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver.** *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 16347–16354.

YANG, S.H.; LIU, R.; PEREZ, E.J.; WEN, Y.; STEVENS, S.M.; VALENCIA, T.; BRUN-ZINKERNAGEL, A.M.; PROKAI, L.; WILL, Y.; DYKENS, J.; KOULEN, P.; SIMPKINS, J.W. **Mitochondrial localization of estrogen receptor beta.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101, 4130–4135.

ZAYED, I.; ESCH, E.; MCCONNELL, R.F. **Systemic and histopathologic changes in Beagle dogs after chronic daily oral administration of synthetic (ethinylestradiol) or natural (estradiol) estrogens, with special reference to the kidney and thyroid.** *Toxicol Pathol.* 1998; 26:730-41.

ZECHNER, R.; KIENESBERGER, P.C.; HAEMMERLE, G.; ZIMMERMANN, R.; LASS, A. **Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores.** *J Lipid Res.* 2009;50(1):3-21.

ZHANG, R.W.; SUPOWIT, S.C.; XU, X.; et al. **Expression of selected osteogenic markers in the fibroblast-like cells of rat marrow stroma.** *Calcif Tissue Int.* 1995; 56:283-91.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** Nature. 1994; 372:425-32.

ZHU, X.; BONET, B.; GILLENWART, H.; KNOPP, R.H. **Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications atherogenesis.** Proc Soc Exp Biol Med. 1999; Dec;222(3):214-21.

ZIDAN, J.; KEIDAR, Z.; BASHER, W.; ISRAEL, O. **Effects of tamoxifen on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women with early-stage breast cancer.** Med Oncol. 2004; 21(2):117-21.

ZIDAN, J.; RUBENSTEIN, W. **Effect of adjuvant tamoxifen therapy on thyroid function in postmenopausal women with breast cancer.** Oncology. 1999; 56:43-5.

ZIMMERMANN, R.; STRAUSS, J.G.; HAEMMERLE, G.; SCHOISWOHL, G.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; RIEDERER, M.; LASS, A.; NEUBERGER, G.; EISENHABER, F.; HERMETTER, A.; ZECHNER, R. **Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.** [Science](#). 2004. 19;306(5700):1383-6.