

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS PROMOVIDO  
PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO EM  
RATAS OOFORECTOMIZADAS, NORMOTENSAS E  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS**

**Walckiria Garcia Romero**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

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

**VITÓRIA- ES, AGOSTO 2007**

WALCKIRIA GARCIA ROMERO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E RENAIIS PROMOVIDOS PELO  
TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO EM RATAS  
OOFORECTOMIZADAS, NORMOTENSAS E ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSAS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Rodrigues de Abreu.

VITÓRIA  
2007

**DEDICO ESTE TRABALHO**

*À minha família, em especial a meu Pai, a Profª Gláucia, ao Gustavo, aos meus amigos, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista.*

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, maravilhoso em nossas vidas.

A meus pais, pela educação e exemplo de vida. Pela compreensão de minha ausência nesses anos.

Aos meus irmãos, pelo afeto e determinação.

Aos meus sobrinhos, pela alegria de viver.

Ao Gustavo e sua família, pelo amor, companheirismo e incentivo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia, pela amizade e confiança que depositou em mim.

Aos Professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento.

As minhas amigas e professoras participantes da banca examinadora, Maria Helena C. Amorim e Sônia Alves Gouvêa, disponibilizando tempo e contribuindo para o resultado final deste trabalho.

Ao grande amigo Enildo, por acreditar e contribuir me auxiliando no desenvolvimento de minhas idéias.

Aos meus amigos, pela existência em minha vida.

À Andressa e Mariana, pioneiras comigo neste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que foram muito importantes na execução deste experimento: Rafael, Delaine, Soniara, Cristian Keny, Viviane, Carin, Leila, Geovana e Luciana.

Aos meus grandes amigos de laboratório: Patrick, Karina, Edineuza e Cíntia.

Aos funcionários Fonseca, Cláudia e Maria pela presença diária.

E a todos que, mesmo no anonimato participaram para esta grande realização em minha vida.

*“Mais do que máquinas,  
precisamos de humanidade;  
Mais do que inteligência,  
precisamos de afeição e  
ternura. Sem essas virtudes a  
vida será de violência e tudo  
será perdido”.*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

No Brasil, tanto as doenças cardiovasculares como o câncer de mama são patologias que atingem grande parte da população feminina, principalmente na pós-menopausa. Coincidentemente, a faixa etária de risco para estas patologias (cardiovasculares e neoplásicas) é a mesma, havendo necessidade de avaliação conjunta em mulheres com câncer de mama e riscos cardiovasculares. Apesar de estar associado à redução dos riscos cardiovasculares, o estrogênio também contribui para o desenvolvimento da maioria dos cânceres de mama em mulheres. Desde 1998 o tamoxifeno foi aprovado para profilaxia do carcinoma mamário em mulheres de alto risco de desenvolvimento de câncer na mama contra lateral. Esta droga age como agonista dos receptores de estrogênio em alguns tecidos, e antagonista em outros, sendo por esta razão, conhecida como modulador seletivo dos receptores de estrogênio - SERMs. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tamoxifeno sobre o metabolismo corporal, função renal, sistema cardiovascular, lipoproteínas e função hepática. O experimento foi composto por 36 ratas, castradas cirurgicamente, divididas em 4 grupos (n=9): Wistar controle (WC) e tratado com tamoxifeno (WT); ratos espontaneamente hipertensos-SHR controle (SC) e tratado com tamoxifeno (ST). Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 90 dias com livre acesso a ingestão de água e ração. O tamoxifeno foi administrado sobre a ração moída na concentração de 0.1 mg/dia/100g de peso corporal do animal. Diariamente, o volume ingerido de água, diurese e consumo de ração foram verificados e anotados. O peso corporal foi verificado semanalmente para ajuste da droga. Após o término do tratamento, as ratas foram anestesiadas com ketamina (10 mg/kg) e xilasina (50 mg/kg), foram feitas cateterizações da artéria femoral e artéria carótida (com introdução da cânula até o ventrículo esquerdo-VE) e, após 24 h deste procedimento, com o animal acordado, foram feitas as verificações de pressão arterial média (PAM) e índice de contratilidade miocárdica através da velocidade máxima de desenvolvimento de pressão durante a fase isovolumétrica ( $dP/dt_{max}$ ). Os resultados encontrados em nosso estudo demonstram que o ganho de peso corporal dos ratos tratados com tamoxifeno foi substancialmente menor em relação ao grupo controle, apesar do consumo de ração entre os grupos não apresentarem diferença. A relação da ingestão de líquidos/excreção urinária não mostrou diferenças entre os grupos. Em relação ao peso renal, o grupo ST apresentou redução significativa do mesmo. Os níveis séricos de sódio, potássio e creatinina, assim como o sódio urinário, não sofreram alteração ao final do tratamento. A análise histopatológica da lâmina renal não demonstrou alteração entre os grupos normotensos e hipertensos. A frequência cardíaca e pressão arterial média sofreram redução significativa no grupo ST seguido por redução na  $dP/dt_{max}$ . O peso úmido do VE também foi significativamente menor no grupo ST em relação ao controle (SC), porém sem alterações entre o grupo Wistar. O tratamento com tamoxifeno promoveu aumento do HDL colesterol no grupo ST se comparado ao SC, porém sem alterações no grupo Wistar. O LDL colesterol e o colesterol total tiveram redução significativa nos animais tratados, normotensos e hipertensos. Níveis sanguíneos elevados de transaminases glutâmico pirúvico (TGP) e maior peso úmido hepático foram encontrados nos grupos WT e ST, em relação a seus controles. Com subsídios nos resultados adquiridos neste trabalho podemos concluir que o tratamento com tamoxifeno, em ratas, contribuiu para a redução de alguns fatores de risco de doença cardiovascular, durante o período de tratamento.

O presente estudo abre possibilidades para que novos estudos clínicos possam confirmar os reais efeitos cardiovasculares e renais da terapia com tamoxifeno no tratamento do câncer de mama.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases and breast cancer strike a large proportion of Brazilian women, especially at the post-menopause period. As both conditions afflict the same age group with corresponding health risks, there is a need for testing women with breast cancer for potential heart problems. Although estrogen is associated with a decrease in cardiovascular risks, it has also been identified as a contributor to the development of breast cancer in women. Tamoxifen was approved in 1998 for the treatment of breast cancer and is used for women at high risk of contralateral breast cancer. The drug acts as an estrogen receptor agonist in some tissues and as an antagonist in others and is part of a class of medication known as SERMs - selective estrogen receptor modulators. This study aimed at evaluating the effects of tamoxifen on body metabolism, renal function, cardiovascular system and hepatic function. The experiment was done with 36 female rats, surgically castrated, divided into 4 groups (n=9): Wistar control (WC), Wistar treated with tamoxifen (WT); spontaneous hypertensive rats – SHR control (SC), SHR treated with tamoxifen (ST). Rats were kept in metabolic cages for 90 days with free access to water and chow. Tamoxifen was administered at a concentration of 0.1 mg/day/100 g the rats' body weight. Ingestion of water, diuresis and chow consumption were monitored and recorded on a daily basis, while body weight was weekly checked to adjust the drug regimen. Following treatment, rats were anesthetized with ketamine, (10 mg/kg) and xylozine (50 mg/kg) and catheterization of both the femoral artery and carotid artery (with the cannula until to the left ventricle) was performed 24 hours later, with rats awake, mean arterial pressure (MAP) and myocardial contractility index were measured in maximum developed pressure during the isovolumetric phase ( $dP/dt_{max}$ ). Our findings suggest that the body weight gain in tamoxifen-treated rats was significantly lower than in the control group, despite the fact that there was no difference in chow consumption. There was also no difference in the relation between liquid intake and urinary excretion in the groups. As to renal weight, the ST group showed a marked loss. Serum levels of sodium, potassium and creatinine remained unaltered after treatment. Histopathological analysis of the renal blade revealed no differences between hypertensive and normotensive groups. Heart rate (HR) and MAP decreased significantly in the ST group, followed by a decrease in  $dP/dt_{max}$ . The humid weight of the left ventricle was also significantly lower in the ST group as compared to the control group, but there were no alterations in the Wistar group. Treatment with tamoxifen increased HDL cholesterol in the ST group when compared to the SC group, but again there were no alterations in the Wistar group. LDL cholesterol and total cholesterol were significantly reduced in the animals treated, both in the normotensive and the hypertensive. High levels of glutamic-pyruvic transaminase and liver humid weight were found in the WT and the ST groups, when compared to their control groups. The findings in our study show that tamoxifen-treated female rats presented a lower risk of cardiovascular diseases for the duration of the treatment. Further research might confirm the cardiovascular and renal benefits of tamoxifen therapy in the treatment of breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Demonstração Cirúrgica de procedimento de ooforectomia.....	33
<b>Figura 2</b> – Gaiola metabólica utilizada durante experimento.....	34
<b>Figura 3</b> – Demonstração histológica da região cortical do rim, mostrando os glomérulos e túbulos renais de ratas WC.....	44
<b>Figura 4</b> – Demonstração histológica da região cortical do rim, mostrando os glomérulos e túbulos renais de ratas WT.....	44
<b>Figura 5</b> – Demonstração histológica da região cortical do rim, mostrando os glomérulos e túbulos renais de ratas SC.....	45
<b>Figura 6</b> – Demonstração histológica da região cortical do rim, mostrando os glomérulos e túbulos renais de ratas ST.....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Avaliação quinzenal da variação do ganho ponderal expresso em gramas, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno(ST) durante 90 dias de experimento.....40
- Gráfico 2** – Avaliação quinzenal do consumo de ração expressos em g/100 g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno(ST) durante 90 dias de experimento.....41
- Gráfico 3** – Avaliação quinzenal da relação ingestão hídrica/ excreção urinária expresso por ml/ml, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias de experimento.....41
- Gráfico 4** – Avaliação quinzenal da Excreção Urinária de Sódio (Na) expresso em mEq/dia/100g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias de experimento.....42
- Gráfico 5** – Peso Úmido dos rins expresso em mg/100g de peso corporal, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....43
- Gráfico 6** – Níveis séricos de Sódio, Creatinina e Potássio expressos em mEq/l, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....43
- Gráfico 7** – Frequência Cardíaca (FC) e Pressão Arterial Média (PAM) expressos em b.p.m e mmHg respectivamente, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas

com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....46

**Gráfico 8** – Índice de Contratilidade Miocárdica em mmHg/seg em animais acordados expresso pela velocidade máx. de desenvolvimento de pressão durante a fase isovolumétrica ( $dP/dt_{max}$ ), de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....46

**Gráfico 9** – Peso Úmido de Ventrículo Direito (C) e Ventrículo Esquerdo (D) expressos em mg/100g de peso corporal, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....47

**Gráfico 10** – Níveis séricos de HDL-colesterol, Triglicerídeo, LDL-colesterol e Colesterol Total expressos em mg/dl, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....48

**Gráfico 11** –Níveis séricos de TGO (A) e TGP (B) expressos em U/l, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....49

**Gráfico 12** – Peso úmido do Fígado expresso em mg/100g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento.....49

## LISTA DE ABREVIACOES

**AI** - Angiotensina I

**AI** – Angiotensina II

**A (1-7)** – Angiotensina (1-7)

**AT1** - Receptor de Angiotensina II

**BKca** - canais de potássio ativados por cálcio voltagem dependente

**b.p.m** - batimentos por minuto

**Ca<sup>+2</sup>** – Cálcio

**CMLV** - Células do músculo liso vascular

**CT** - Colesterol total

**DCV** - Doença cardiovascular

**DIC** - Doença isqumica do corao

**dP/dt** – Taxa de variao da pressão no tempo.

**dP/dt<sub>max</sub>** – Velocidade máxima de desenvolvimento de pressão durante a fase isovolumétrica

**ECA** - Enzima conversora de Angiotensina

**eNOS** - óxido nítrico sintase endotelial

**EDCFs** - Fatores constrictores derivados do endotélio vascular

**EDRFs** - Fatores relaxantes derivados do endotélio vascular

**EPM** - Erro padrão da média

**ET-1** - Endotelina-1

**FC** - Freqncia cardíaca

**FDA** - Food Drog Administration

**GMPc**- Guanina monofosfato cíclico

**HAS** - Hipertensão arterial sistmica

**HDL** - Lipoproteína de alta densidade

**IP3** – Trifosfato de inusitol

**IL-1** - Interleucina 1

**IL-6** - Interleucina 6

**LDL**- lipoproteína de baixa densidade

**LDLox** - lipoproteína de baixa densidade oxidada ou modificada

**MAPK** - proteína quinase ativadora de mitognese

**mEq/l** – Miliequivalente por litro

**mg/g** - Miligramas por grama  
**ml** – Mililitros  
**ml/ml** – Mililitros por mililitros  
**mmHg** - Milímetros de mercúrio  
**MS** - Ministério da Saúde  
**Na<sup>+</sup>** - Sódio  
**NO** - Óxido nítrico  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Superóxidos  
**ONOO<sup>-</sup>** - Peróxinitrito  
**PA** – Pressão arterial  
**PAM** - Pressão arterial média  
**PAS** - Pressão arterial sistólica  
**PGI<sub>2</sub>** - Prostaciclina  
**RE** - Receptor de estrogênio  
**RE $\alpha$**  - Receptor de estrogênio alfa  
**RE $\beta$**  - Receptor de estrogênio beta  
**RNA<sub>m</sub>** – Ácido ribonucleico mensageiro  
**ROS** - Espécies reativas de oxigênio  
**SC** - Grupo SHR controle  
**SOD** - superóxido dismutase  
**SERMs** - Moduladores seletivos de receptores de estrogênio  
**SHR** - Ratos espontaneamente hipertensos  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**SNS** – Sistema nervoso simpático  
**SRA** - Sistema renina-angiotensina  
**ST** - Grupo SHR tratado com tamoxifeno  
**TGF- $\beta$**  – Fator transformante de crescimento beta  
**TGO** - Transaminase glutâmico-oxalacética  
**TGP** - Transaminase glutâmico-pirúvica  
**TNF $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa  
**VE** - Ventrículo direito  
**VD** - Ventrículo esquerdo  
**WC** - Grupo wistar controle  
**WT** - Grupo wistar tratado com tamoxifeno

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 – Objetivo Geral.....	31
2.2 – Objetivos específicos.....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. Animais Experimentais.....	32
3.2. Grupos Experimentais.....	32
3.3. Castração dos animais (Ooforectomia).....	32
3.4. Protocolo Experimental.....	33
3.4.1. Ratas normotensas (WT) e espontaneamente hipertensas (ST), ooforectomizadas, tratadas com tamoxifeno.....	34
3.4.2. Ratas normotensas (WC) e espontaneamente hipertensas (SC), ooforectomizadas, sem tratamento com tamoxifeno.....	34
3.5. Tratamento com Tamoxifeno.....	35
3.6. Dosagem de Sódio.....	35
3.7. Cateterização da Artéria Carótida.....	35
3.8. Cateterização da Artéria Femoral.....	36
3.9. Medida direta da Pressão Arterial e da $dP/dt_{max}$ .....	36
3.10. Preparo das amostras de sangue.....	37
3.10.1. Dosagem do Colesterol Total (método enzimático).....	37
3.10.2. Dosagem do HDL – colesterol (método enzimático).....	37
3.10.3. Dosagem de Triglicérides (método enzimático).....	37
3.10.4. Dosagem de LDL – colesterol (método enzimático).....	38
3.10.5. Dosagem de Creatinina Sérica.....	38
3.11. Retirada do fígado, rins e coração.....	38
3.12. Preparação das lâminas para análise histológica.....	39

3.12.1. Análise histológica e morfométrica das lâminas.....	39
3.14. Análise Estatística.....	39
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Efeitos do tratamento com Tamoxifeno sobre Ganho de Peso Corporal e Consumo de Ração.....	40
4.2. Efeitos do tratamento com Tamoxifeno sobre o Sistema Renal.....	41
4.3. Efeitos do tratamento com Tamoxifeno sobre o Sistema Cardiovascular.....	45
4.4. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre o Perfil Lipídico.....	47
4.5. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre a Função Hepática.....	48
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## 1- INTRODUÇÃO

A relação entre doença cardiovascular (DCV) e mulheres, vem aumentando no decorrer dos anos. Há pouco tempo atrás, começaram a associar, principalmente mulheres pós - menopausa, com risco de desenvolvimento de cardiopatias. Os sintomas de precordialgia, que sugeririam o diagnóstico de doença coronária no homem, eram subestimados se apresentados por uma mulher. Os estudos de prevenção de doenças cardiovasculares e os ensaios clínicos com medicamentos excluía as mulheres, ou elas constituíam minoria (em geral 10%). Os métodos diagnósticos para a doença coronária, não-invasivos e invasivos, são mais freqüentemente indicados na avaliação dos homens que nas mulheres (LUZ e SOLIMENE, 1999).

A doença cardiovascular, quando se torna clinicamente manifesta na mulher, segundo Lerner e Kannel (1986), em geral dez anos após a menopausa, ela coexiste com várias outras doenças, o que torna o seu prognóstico mais desfavorável. Também relatam que é fato conhecido que a mulher está "protegida" contra a doença cardiovascular durante a idade fértil, pelo possível papel dos estrógenos, porém se sofrerem ooforectomia, o risco coronário aumenta significativamente (KITLER, 1994). Apesar do efeito benéfico do estrogênio no sistema cardiovascular, Welty (2001), relatou que em relação aos homens, as mulheres apresentam pior prognóstico e morrem mais frequentemente após o seu primeiro evento cardíaco. Em geral, o infarto do miocárdio não costuma ser a primeira manifestação da doença na mulher, e nela ocorre 20 anos mais tarde que no homem.

Uma das doenças que aflige as mulheres na pós menopausa, junto com o aparecimento de DCV é o câncer de mama, que segundo o Ministério da Saúde (MS), no Espírito Santo em 2006, acometeu 44 a cada 100.000 mulheres. Representa um dos principais problemas de saúde no mundo ocidental. É considerada doença complexa e multifatorial que sofre fortes influências de fatores genéticos e ambientais. Sua incidência cresce e atinge mulheres cada vez mais jovens (MARTIN e WEBER, 2000). No estado do Espírito Santo, em 2002, as

neoplasias ocuparam o segundo lugar dos óbitos, seguindo as doenças cardiovasculares, e em 3º lugar as causas externas (COELHO et al., 2003).

Os efeitos biológicos do estrogênio foram descritos pela primeira vez por Jensen e Jacobson em 1962, propondo que esses efeitos eram mediados por receptores protéicos. Em 1986, Green et al. e Greene et al., relataram a clonagem de receptores de estrogênio (RE), conhecido como RE $\alpha$ . Por muito tempo, acreditava-se na existência de um só tipo de receptor, porém Kuiper et al., em 1996, clonaram um receptor proveniente da próstata de ratos, que foi denominado RE $\beta$ .

A distribuição tecidual e a afinidade relativa dos ligantes são diferentes para estes receptores podendo dessa maneira explicar a ação seletiva do estrogênio sobre diferentes tecidos (PAECH et al., 1997). Estudos indicam que o RE $\beta$  pode antagonizar ou controlar a atividade do RE $\alpha$  em vários tecidos, incluindo útero, e mediar efeitos estrogênicos independente da ação do RE $\alpha$  em alguns tecidos, tais como osso e sistema imune (KUIPER et al., 1997).

Os RE $\alpha$  e RE $\beta$  são expressos em células do músculo liso vascular (CMLV) em humanos (KARAS et al., 1994), células endoteliais (MENDELSON e KARAS, 1997; VENKOV et al., 1996) e células miocárdicas (GROHÉ et al., 1997) sugerindo efeitos vasculares diretos do estrogênio (LOBO, 1990; CLARKSON et al., 1994) que podem ser dependentes deste hormônio (LIEBERMAN et al., 1994; HAN et al., 1995), contribuindo assim para o efeito cardioprotetor do estrogênio.

A importância dos receptores estrogênicos no vaso sanguíneo foi mostrada por Losordo et al. (1994), através de métodos imunohistoquímicos da parede arterial coronariana de mulheres que faleceram por causas cardíacas e não-cardíacas; esses autores demonstraram que a presença de receptores estrogênicos na parede arterial coronária em mulheres pré-menopausa, associou-se à ausência de aterosclerose; em contrapartida, as mulheres em idade fértil, com ausência desses receptores, tiveram maior ocorrência de doença coronária (BELCHETZ, 1994).

A ação do estrogênio no sistema cardiovascular pode ocorrer por mecanismo genômico ou não-genômico. De acordo com Mendelson e Karas (1999) na ação

genômica, a resposta depende de mudanças na expressão do gene. Neste caso, o estrogênio entra na célula alvo, une-se aos receptores localizados no citoplasma e mudam sua conformação; esse complexo é translocado para o núcleo, ligando-se a regiões específicas do DNA, onde irá desencadear a ativação do complexo transcricional e conseqüente formação das proteínas (JORDAN, 1998; BARBIKER et al., 2001; KATZENELLENBOGEN e KATZENELLENBOGEN, 2002; DUTERTRE e SMITH, 2000). Isso explica os mecanismos genômicos do estrogênio que necessitam de horas ou dias para ocorrerem e requerem transcrição gênica com subsequente modulação na expressão de proteínas (KLEIN-HITPASS et al., 1986).

No mecanismo não-genômico, Russel et al. (2000), propõe que alguns dos efeitos do estrogênio são mediados por receptores localizados na superfície da célula, uma vez que as formas do estrogênio impermeáveis à membrana celular inibem a mitose pelo bloqueio da proteína quinase ativadora de mitogênese (MAPK), assim como a estimulação na produção de GMPc e liberação de óxido nítrico (NO), que pode retardar a aterogênese e limitar os efeitos adversos da aterosclerose por modular o tônus vascular, além de inibir a agregação plaquetária.

Neste mecanismo, o estrogênio promove a inibição do crescimento de células do músculo liso vascular (CMLV) na camada íntima e adventícia (OPARIL, 1999) por meio de ligação direta do estradiol na parede vascular (ORSHAL et al., 2004; GEBARA e ALDRIGHI, 1996; SARREL, 1996). Dessa forma, o estrogênio estaria modulando a expressão de diversos genes de fatores de crescimento vascular que, por sua vez, modulam a resposta vascular ao dano causado pela proliferação muscular no vaso (GEBARA e ALDRIGHI, 1996).

O estrogênio induz também a vasodilatação aguda na parede do vaso interferindo, assim, na produção de substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio. O endotélio é uma camada epitelial unicelular que reveste todo sistema circulatório. É metabolicamente ativo, considerado um verdadeiro órgão endócrino pela liberação de fatores de relaxamento (NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e de fatores de constrição (endotelina, angiotensina). Em 2000, Vanhoute descreveu que o desequilíbrio na liberação desses fatores (EDRFs e EDCFs) caracteriza a disfunção endotelial, que contribui para o aumento da resistência

vascular, propiciando o início e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão e a aterosclerose.

O NO é uma das substâncias vasodilatadoras mais importantes produzidas pelo endotélio. O estrógeno é capaz de estimular a síntese de NO em diferentes leitos vasculares, como artéria uterina, microvasos da circulação mesentérica e muscular esquelética e na aorta. Seqüências de reconhecimento do complexo estrógeno/receptor têm sido detectada na região promotora do gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), sugerindo que o estrógeno codifica a expressão gênica dessa enzima (ORSHAL et al., 2004; TOSTES et al., 2003). Forstermann et al (1991) propôs que a localização da eNOS em invaginações especializadas da membrana plasmática, denominadas cavéolas, tem sido necessária para a máxima atividade dessa enzima.

As cavéolas são altamente enriquecidas em colesterol. O RNAm da caveolina (proteína presente nas cavéolas e que interage com a eNOS) é hiper-regulado quando a entrada de colesterol livre da LDL-colesterol para a célula endotelial é aumentada (FIELDING et al., 1997).

Os estudos experimentais de Mansur & Ramires (1996), demonstraram que os estrógenos diminuem a captação de LDL oxidada (LDL-ox) pela parede arterial, possuem atividade antioxidante e vasodilatadora, por aumento da produção local de prostaciclina e da síntese de NO, pelo estímulo da enzima eNOS.

Hirata et al. (1995) e Gesquiere et al. (1997) observaram em estudos in vitro que, após 24 horas de exposição das células endoteliais a baixas concentrações de LDL-ox, observa-se aumento do RNAm da eNOS, porém em altas concentrações de LDL-ox, esse efeito é revertido. Há redução da eNOS, via caveolina, induzido pelo aumento da concentração de colesterol plasmático e conseqüentemente caveolar, e pelo aumento da concentração da LDL-ox. Essas observações mostram que existe correlação entre a produção de NO, a hipercolesterolemia e a peroxidação lipídica.

Já em células musculares lisas e células endoteliais, canais de potássio ativados por cálcio voltagem dependente (BKca) são ativados rapidamente pelo estrogênio

através de uma fosforilação dependente do GMPc, causando hiperpolarização da célula, que por sua vez reduz a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo “L” levando ao relaxamento da musculatura lisa vascular. O caminho é dependente do NO e GMPc (WHITE et al., 1995; VALVERDE et al., 1993; MENDELSONH e KARAS, 1997).

Ações antioxidantes do estrogênio têm sido propostas em estudos como os de Madamanchi et al. (2005), através da redução da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) produzido pelas enzimas NAD(P)H-oxidase, e de seus efeitos deletérios sobre NO. Na presença de ROS, o NO sintetizado pela célula endotelial transforma-se em peroxinitrito, causando disfunção endotelial. Também promove aumento dos níveis plasmáticos de substâncias antioxidantes como glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (SOD), importante na degradação do  $\text{O}_2^-$  em diferentes tecidos do sistema cardiovascular (SI et al., 2001).

Os estrógenos também modificam o metabolismo hepático das lipoproteínas, aumentando o catabolismo das LDL e a produção de HDL (em particular de HDL-2) e apo A1; por outro lado, há um aumento moderado dos níveis de triglicérides (BELCHETZ, 1994; MANSUR e RAMIRES, 1996).

Aumentam, também, o fluxo de colesterol da dieta para o fígado, por meio de sua incorporação aos quilomícrons e remanescentes de quilomícrons. Subsequentemente ocorre o fluxo de colesterol para as células do tecido periférico, pela VLDL e LDL, e o retorno para o fígado pelo transporte reverso do colesterol, via HDL. O colesterol, nas células hepáticas, é transformado em ácidos biliares que por sua vez são excretados na bile. Sob influência dos estrógenos, ocorrem os seguintes eventos: os triglicérides plasmáticos aumentam devido ao aumento na produção de VLDL; a concentração de LDL é reduzida devido ao aumento da expressão do receptor para LDL; a HDL é aumentada por dois mecanismos: maior secreção de apolipoproteína A-1 e menor remoção de seus lipídeos, pois os estrógenos levam a remoção da atividade da lipase hepática (ZHU et al., 1999).

Com o decorrer dos anos, ocorre a cessação fisiológica na produção do estrogênio e progesterona pelo ovário, conhecida como climatério que segundo Gebara e Aldrighi

(1999), inicia-se por volta dos 40 anos e culmina com o surgimento da última menstruação, conhecida como menopausa, e o aparecimento de sintomas desconfortáveis e aumento na incidência de doenças. Entre elas destaca-se a doença cardiovascular, que de acordo com Wenger (1996) e Rossi et al. (2002), é de fato mais prevalente, quando comparada com a fase pré-menopausa.

O climatério promove redução estrogênica favorecendo o surgimento da obesidade central que pode desencadear complicações metabólicas, dentre as quais dislipidemias (COLDITZ et al., 1987; BONDUKI et al., 2001). Período este, onde normalmente são descobertos os tumores mamários.

Estudos epidemiológicos demonstraram que com a idade as mulheres apresentam aumento progressivo na incidência da doença isquêmica do coração (DIC); assim, após a menopausa, o risco da DIC se eleva, aproximando-se ao dos homens em torno dos 65 anos (KANNEL, 1976).

Em 1987, Kannel relatou em seu estudo que os níveis de lipídeos aterogênicos aumentam com a idade na pós-menopausa. As moléculas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 também aumentam, promovendo um correspondente aumento na incidência de doenças cardiovasculares (PFEILSCHIFTER et al., 2002)

Apesar de seu provável efeito cardioprotetor e inibidor da reabsorção da massa óssea, o estrogênio pode causar aumento da incidência de câncer de mama e câncer de colo de útero, devido seu efeito citoproliferativo nesses locais (BURCKHARDT, 1999).

Há evidências na literatura que apontam para a existência de uma associação entre estrogênios e câncer de mama, onde os seguintes fatores de risco foram detectados: menopausa tardia, menarca precoce, idade mais avançada na primeira gestação, presença de receptores hormonais em tumor de mama e resposta tumoral à manipulação hormonal (BARGMANN et al., 1986). O paradigma atual mais aceito da carcinogênese mamária concebe um processo em várias etapas, desde a

transformação de uma célula normal em maligna, até o seu crescimento desordenado, que leva à formação de um tumor.

Neste processo complexo podem participar oncogenes (CYP17, EDH 17B<sub>2</sub>, ER, HER2/neu), genes supressores de tumores (p53, BRCA1, BRCA2), fatores de crescimento (TGF- $\alpha$ , EGF, IGF), fatores inibidores de crescimento (TGF- $\beta$ ) e hormônios (estrógeno, progesterona, prolactina, hormônios tireoidianos).

Segundo Bargmann et al. (1986), acredita-se que o processo de transformação celular dependa, fundamentalmente, da ocorrência de alterações moleculares que desregulam a ação de oncogenes, de genes supressores de tumor e a produção de fatores de crescimento pelo estroma circunjacente ao tumor. Tais fatores de crescimento, produzidos pela própria célula tumoral (autócrinos) ou pelo estroma (parácrinos), estimulariam positivamente o processo de proliferação celular. A atuação dos hormônios estrogênicos, entretanto, parece estar mais restrita a um fator que influencia, predominantemente, a etapa subsequente do crescimento do tumor e não ao processo inicial de transformação.

Utsumi et al. (1996), relatou que em pacientes com câncer mamário existe uma freqüente alteração no gene que determina a expressão da aromatase em tecidos adiposos. Essa alteração pode causar uma superprodução local de estrogênio e resultar numa proliferação de células mamárias cancerígenas estrogênio-dependente, via ativação de receptores RE $\alpha$ .

Desde 1973, Jensen e Desombre identificaram receptores de estrogênio no lóbulo mamário humano, impulsionando a pesquisa de medicamentos que pudessem proporcionar efeito antiproliferativo nesta glândula.

Desta forma surgiram os moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) que são uma classe de compostos que podem agir como agonista de receptor de estrogênio em alguns tecidos e antagonista em outros (MUCHMORE, 2000), dos quais o tamoxifeno foi o primeiro a ser estudado, sendo utilizado como contraceptivo, mas sem sucesso. Mais tarde foi identificado como antiestrogênico (JORDAM, 1998) e hoje é utilizado nos protocolos de tratamento do câncer de

mama sensível a estrogênio (TAN-CHIU, 2000; TAKANISHI e 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).

Em 29 de outubro de 1998, a instituição americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o tamoxifeno para profilaxia do carcinoma mamário em mulheres de alto risco. Esta resolução foi baseada nos resultados do estudo americano *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study* (NSABP P-1), trabalho prospectivo e aleatorizado que comparou grupos de mulheres consideradas de risco elevado para a doença, que receberam placebo e tamoxifeno na dose de 20 mg/dia, durante cinco anos. Os autores concluíram que o tamoxifeno reduziu o risco de carcinoma invasivo em 49%. A diminuição do risco ocorreu em todas as faixas etárias. De acordo com Fournier et al. (1999), desde então, é considerado a droga padrão no tratamento hormonal do câncer de mama metastático. Além disso, o uso adjuvante (pós-operatório) do tamoxifeno está associado a um ganho significativo, tanto em sobrevida livre de doença, quanto em sobrevida global, para as mulheres com tumores que apresentam receptores hormonais positivos ou desconhecidos (EARLY BREAST CÂNCER TRIALIST COLLABORATIVE GROUP, 1998; NATIONAL INSTITUTE CÂNCER, 2001). Facina, em 2003, concluiu através deste estudo que as mulheres de alto risco deveriam utilizar tamoxifeno por, no mínimo, cinco anos (FISHER et al., 2000).

Cuzick e Baum (1985) foram os primeiros autores a referir menor incidência do carcinoma contralateral em usuárias de tamoxifeno (apud Facina, 2003). Em estudos realizados por Tan-Chiu e Wickerhan (2000), o tamoxifeno reduziu de 49% a 50% o risco de câncer de mama invasivo e não invasivo, respectivamente. Para os SERMs agirem como agonistas do estrogênio em alguns tecidos e antagonistas em outros, dependem principalmente da interação entre os RE (BIAN et al., 2001). Estes RE são denominados de  $\alpha$  e  $\beta$ , descritos anteriormente, onde a diferença entre estes subtipos é em relação à afinidade de ligação e distribuição nos tecidos podendo contribuir para explicar a ação seletiva dos agonistas ou antagonistas do RE em diferentes órgãos e sistemas. O tamoxifeno apresenta ação agonista em determinados tecidos, como o endometrial (aumentando o risco de câncer de endométrio), o osso (prevenindo a osteoporose pré e pós-menopausa) e o hepático

(metabolismo lipoprotéico), e apresenta ação antagonista na mama (GEBRIM e LIMA, 2003; PELLETIER, 2000; LEWIS et al., 2000; BIAN et al., 2001).

A maior parte dos receptores de câncer de mama são estrogênio dependente, com cerca de 87% na proporção de mulheres com receptores positivos (FINK et al., 2004). Portanto, a quantidade de pacientes que necessitam do uso de tamoxifeno é maior do que a de pacientes que não necessitam de seu uso.

Inicialmente *in vitro*, demonstrou-se que o tamoxifeno induz a secreção autócrina em fibroblastos humanos fetais desprovidos de receptores estrogênicos, do fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ). Este pertence a uma família de três peptídeos regulatórios multifuncionais com importante função inibitória no controle de proliferação e diferenciação da maioria dos tecidos humanos epiteliais, incluindo células normais e tumorais. O aumento do TGF-  $\beta$ , promove diferenciação de músculo liso, previne a migração e proliferação de células musculares na parede de vaso sanguíneo, protege o endotélio por reduzir adesão de células inflamatórias e reduz a habilidade de células da parede do vaso em captar LDL-colesterol, reduzindo os riscos de aterosclerose (ARTEAGA et al., 1988; GRAIGER, 2004). Posteriormente, Butta et al. (1992) demonstraram indução de TGF-  $\beta$  extracelular no estroma de tumores de mama humanos após três meses de uso do tamoxifeno, implicando este peptídeo como um potencial mediador na ação terapêutica desta droga.

De acordo com Jordan (1999) e Arteaga et al. (1996), o tamoxifeno também estimula a expressão do gene que controla a produção do fator de crescimento insulinóide tipo I, também conhecido como somatomedina-C, reduzindo sua síntese. Da mesma maneira que pode estimular a secreção do TGF- $\beta$  também pode inibir a secreção dos fatores de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e epidermal, ambos capazes de se ligarem a receptores de membrana e promoverem proliferação celular.

Grainger e Metcalfe (1996) observaram em seu estudo com animais, vários efeitos biológicos e relevantes do tamoxifeno para o câncer, osteoporose, doença cardíaca e doenças autoimunes, sugerindo que este medicamento: a) inibe a formação de lesões lipídicas arteriais em ratos e b) aumenta a produção de TGF-  $\beta$  e mudanças

na parede do vaso sanguíneo associada com a ocorrência de aterosclerose onde a atividade do TGF-  $\beta$  é baixa.

Outros mecanismos de ação antiproliferativa propostos para o tamoxifeno é o antagonismo à calmodulina, promovendo redução intracelular de cálcio, e outros processos dependentes da proteína C quinase (FANIDI et al., 1989; HOELTING et al., 1995).

Uma preocupação que nos despertou a presente pesquisa foi o fato de que as mulheres que fazem tratamento com hormonioterapia por 5 anos para câncer de mama, pós-mastectomia, são avaliadas somente quanto ao risco de recidiva de tal neoplasia. Porém, há um intenso questionamento no que se refere à investigação cardiovascular durante o período de tratamento, que geralmente é longo e que além dos medicamentos que lhe são atribuídos, também não podemos esquecer de todo estresse sofrido por esta paciente apreensiva pela cura.

McDonald e Stewart (1991) também sugeriram que o tamoxifeno além destas atividades descritas, tem efeitos protetores no sistema cardiovascular, com redução de 60% em infartos de miocárdio fatais e 50% a 70% nos infartos de miocárdio não fatais em estudos contemplando mais de 1000 mulheres. Outros trabalhos confirmam a hipótese de redução nos fatores de risco de DIC, tais como os de Rutqvist e Mattson (1993), Constantino et al. (1997), Hong et al. (1992), Taddei et al. (1996) e Zoma et al.(2002).

Porém, outros trabalhos relataram que o tamoxifeno pode exercer efeitos antagonistas do estrogênio em vasculatura coronariana, podendo contribuir para o desenvolvimento de isquemia cardíaca miocárdica. Willians et al. (1997), demonstrou que quando administrado cronicamente em ratas ovariectomizadas leva a vasoconstrição inapropriada de artérias coronárias em resposta a acetilcolina, um vasodilatador dependente do endotélio, e inibição da vasodilatação apropriada em resposta à nitroglicerina. Além disso, Fischer et al. (1998), descreve que o tamoxifeno tem propriedades pró-trombóticas que são clinicamente manifestadas por um aumento dos riscos de eventos tromboembólicos.

Já os estudos realizados por Figtree et al. (2000) demonstraram efeitos opostos ao estudo citado anteriormente, onde o tamoxifeno induziu significativo o relaxamento em artérias coronárias de coelhos, sugerindo que este relaxamento seria em parte dependente do endotélio, confirmado pela inibição por L-NAME e por antagonista de receptores de estrogênio ICI 182,780. Também descreve ação direta do tamoxifeno em miócitos vasculares pelo relaxamento de anéis desnudados de endotélio a partir de curvas de contração dependente de concentrações de cálcio, sugerindo bloqueio dos canais de cálcio, demonstrando que o tamoxifeno tem ação eficaz no relaxamento em anéis epicárdicos de artéria coronariana de animais machos e fêmeas, via endotélio e diretamente no músculo liso vascular.

Jiang et al. (1992) e Mugge et al. (1993), já descreviam ação do tamoxifeno no relaxamento agudo e crônico de artérias coronárias “*in vivo*” e “*in vitro*”, sendo que o mecanismo envolvendo este relaxamento pode contribuir para os efeitos cardioprotetores desta droga.

Em mulheres na pós-menopausa o NO tem sua atividade reduzida; entretanto não está claro se isto ocorre devido a sua menor produção pela óxido nítrico sintase, ou, se o NO é inativado pela reação com o radical superóxido, também gerado pelas células endoteliais, formando ânion peróxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é um forte agente oxidante. O peróxinitrito se decompõe em outras espécies reativas de oxigênio (LANCASTER, 1996) e reage com resíduos de tirosina de proteínas para formar nitrotirosina (BEECKMAN et al., 1992). Beeckman em 1994 relata ainda, que embora pouco se saiba sobre os efeitos da nitração de tirosinas na função de proteínas *in vivo*, tem sido mostrado que o peróxido nitrito e seus produtos de decomposição induzem a peroxidação dos lipídeos das membranas (RADI, 1991) e podem iniciar a peroxidação lipídica da LDL humana (DANLEY et al., 1992), provocando lesão endotelial a aumento da permeabilidade vascular. Estudos indicam que a deficiência no relaxamento vascular dependente do endotélio, está associada à inativação do NO pela formação de peróxinitrito (DEWITT et al., 2001; STRUNK et al., 2001).

Medina et al., 2004, relatou que o tamoxifeno atua como protetor das doenças coronarianas em humanos, bem como em diferentes modelos de aterosclerose em animais, através do bloqueio da formação da placa de ateroma. Segundo Morales et

al. (1996) e Willians et al. (1997), as propriedades anti-ateroscleróticas do tamoxifeno, sugerem que seu uso está associado à redução dos riscos cardiovasculares.

Quanto a incidência de doença cardiovascular (DCV), não houve diferença significativa em mulheres com história de DCV e sem história de DCV nos estudos de Fisher et al., 1998; e Reis et al., 2001 que relatam ainda um substancial aumento no risco de acidente vascular encefálico em mulheres que ingeriram tamoxifeno, especialmente após os 50 anos.

Dados da literatura demonstram alguns benefícios do tamoxifeno, também, sobre o sistema cardiovascular em homens com doenças da artéria coronária, reduzindo os fatores de risco por reduzir os níveis de colesterol e triglicerídios, além do combate do envelhecimento arterial. Clarke et al. (2001) concluíram em seu estudo que a administração de tamoxifeno em homens teve algumas, mas não todas as ações benéficas encontradas em mulheres na redução dos fatores de risco cardiovascular, demonstrando que o tratamento com tamoxifeno por 56 dias com dosagens de 40 mg/dia, melhorou substancialmente a dilatação dependente do endotélio em artérias coronárias de homens com doença de artéria coronária pré-existente.

Em recente meta-análise, contendo vários estudos sobre tamoxifeno com a participação de cerca de 25000 mulheres, Braithwaite et al. (2003), concluíram que o uso do tamoxifeno está, de fato, associado com uma significativa redução de 30% a 40% nos riscos de morte por infarto de miocárdio. Todos esses resultados podem ser atribuídos pela redução da formação ou ruptura de placas de gordura, pela redução do colesterol e LDL colesterol.

Segundo Love et al. (1994), o tamoxifeno, assim como o estrogênio, possui efeitos benéficos nos lipídios plasmáticos e lipoproteínas. Dewar et al. (1992) descreveu em seu estudo que os efeitos benéficos na redução dos níveis séricos de colesterol parece terminar rapidamente com a cessação do uso do tamoxifeno, levantando uma preocupação após 5 anos de tratamento em relação ao risco subsequente de doença de artéria coronária, mortalidade e morbidade entre estas mulheres.

De acordo com Gebrim e Lima (2003), o tamoxifeno apresenta ação agonista em tecidos como o hepático o que justificaria a redução do nível sérico do colesterol total em até 15% devido à diminuição do LDL-colesterol, reduzindo assim as doenças secundárias cardiovasculares.

Estudos com o tamoxifeno, demonstram redução do colesterol total (KE et al., 1997; CUSHMAN et al., 2001), diminuição LDL-colesterol, sem efeito sobre o HDL-colesterol e triglicérido (SCHUSSHEIN e SIRIS, 1998; SEXTON e GHERMAN, 2001; CUSHMAN et al., 2001). Reduzem ainda, o fibrinogênio (CUSHMAN et al., 2001; MORELLO et al., 2002) e inibem a oxidação do LDL-colesterol (SEXTON e GHERMAN, 2001). Sendo assim, o uso do tamoxifeno está associado com uma redução em 48% no risco de infarto do miocárdio e 15% na incidência de doença coronariana associada com mortalidade.

Os resultados adquiridos pelo *Breast Câncer Primary Prevention Trial*, nos mostra um claro papel do tamoxifeno na redução dos níveis de colesterol total (CT), onde houve redução de cerca de 18 mg comparada com placebo (CUSHMAN et al., 2001).

A importância do HDL-colesterol na proteção da mulher contra a doença coronária ficou bem estabelecida nos estudos de *Framingham* (KANDEL,1987), *Lipid Research Clinics* (BUSH et al., 1987) e *Donolo-Tel-Aviv* (LIVSHITS et al.,1989); onde a redução do HDL-colesterol mostrou-se o maior preditor de risco em mulheres, superando os outros fatores , incluindo o CT.

Reis et al. (2001), demonstraram que em estudos com animais, o tamoxifeno está associado com redução do acúmulo arterial de produtos de degradação de LDL e inibição de hiperplasia da íntima de artérias.

Grainger et al. (1996), relataram em suas pesquisas reversão de formação de lesão lipídica em ratos apo-E knockout, que após 24 semanas de nascidos, foram tratados por 12 semanas com tamoxifeno. Houve uma redução significativa de cerca de 30% de área de lesão lipídica comparada com o grupo controle.

Efeitos antiinflamatórios em humanos foram propostos por Bonanni et al. (2003) e Cushman et al. (2001) e Grainger et al. (1995), propondo que estes efeitos são em parte pela *upregulation* das citocinas antiinflamatórias TGF- $\beta$ .

Outro efeito antiinflamatório proposto por Bonanni et al. (2003), através da utilização de tamoxifeno inclui a redução dos níveis de proteína C reativa, mesmo com baixas doses de bloqueadores de receptores de estrogênio. Esta proteína serve como importante marcador associado a risco aumentado de infarto agudo de miocárdio.

Porém existem efeitos colaterais com a utilização dos SERMs. O Teste de Prevenção do Câncer de Mama (BCPT) iniciado em 1992 pelo Instituto Nacional do Câncer confirmou que o uso do tamoxifeno está associado à alta incidência de tromboembolismo venoso, câncer endometrial e derrame cerebral, devido sua atividade agonista nos dois primeiros e antagonista no último (TAN-CHIU, 2000; ROSENDAL et al., 2002; KONKLE, 2001).

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, somente em mulheres pós-menopausa e com tumores positivos para receptores hormonais (CONSENSO BRASILEIRO DE CÂNCER DE MAMA, 2004).

Com o aumento da expectativa média de vida da população, a incidência tanto de DCV e câncer de mama torna-se mais preocupante. No início deste século, apenas 6% das mulheres atingiam a menopausa e estima-se que no ano 2025, 23% da população dos países desenvolvidos estarão com mais de 60 anos (BYNY e SPEROFF, 1996).

Observamos que vários trabalhos demonstram os efeitos da terapia medicamentosa com hormonioterapia, principalmente com o Tamoxifeno, no sistema cardiovascular. Porém, existem algumas controvérsias sobre tais resultados. Através de nossos estudos experimentais esperamos ter subsídios científicos para poder colaborar de

forma determinante com o desenvolvimento de um estudo clínico de acompanhamento de mulheres em uso deste medicamento.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

-Avaliar os efeitos do tratamento com tamoxifeno sobre o metabolismo corporal, sistema cardiovascular e renal e função hepática de ratas castradas, normotensas (wistar) e espontaneamente hipertensas (SHR).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos do tratamento com tamoxifeno a cada 15 dias até o 90º dia sobre o metabolismo corporal através do peso corporal e consumo de ração;

- Avaliar os efeitos do tratamento com tamoxifeno a cada 15 dias até o 90º dia sobre a ingestão/excreção de líquidos, excreção de sódio urinário e após 90 dias sobre os níveis séricos de sódio, potássio e creatinina, peso úmido dos rins e histologia renal;

- Avaliar os efeitos do tratamento de 90 dias com tamoxifeno sobre o sistema cardiovascular através da frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), velocidade máxima de desenvolvimento de pressão durante fase isovolumétrica ( $dP/dt_{max}$ ), peso úmido de ventrículo direito (VD) e de ventrículo esquerdo (VE).

- Avaliar os efeitos do tratamento de 90 dias com tamoxifeno sobre o perfil lipídico através da HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos e colesterol-total (CT).

- Avaliar os efeitos do tratamento de 90 dias com tamoxifeno sobre a função hepática verificados pelo peso úmido do fígado e dosagens de enzimas hepáticas transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP).

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais experimentais**

Os animais utilizados no presente estudo foram ratas normotensas (Wistar) e ratas com hipertensão espontânea (SHR), jovens, com peso corporal variando de 100 a 200 gramas, fornecidas pelo Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Após castração cirúrgica, os animais foram mantidos em gaiolas individuais (gaiolas metabólicas), que permitiam livre acesso dos mesmos a ingestão de água e ração, em ambiente de temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para os biotérios de pesquisa (FINEP). O manuseio dos animais está de acordo com as normas de tratamento de animais adotadas pela Sociedade Brasileira de Fisiologia.

#### **3.2. Grupos experimentais**

Os animais foram subdivididos em quatro grupos (n = 9) da seguinte forma:

- Ratas Wistar tratadas por 90 dias com tamoxifeno (WT) na dose 0,1mg/100g de peso corporal (via oral);
- Ratas Wistar controle (WC) – sem tratamento com tamoxifeno;
- Ratas SHR tratadas por 90 dias com tamoxifeno (ST) na dose 0,1mg/100g de peso corporal (via oral);
- Ratas SHR controle (SC) – sem tratamento com tamoxifeno.

#### **3.3. Castração dos animais (Ooforectomia)**

Após anestesia com ketamina (10 mg/kg) e xilasina (50 mg/kg), as fêmeas foram submetidas a uma incisão cirúrgica de 1 a 1,5 cm na camada muscular da pele da região dorsal, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana, abrindo a cavidade peritoneal para posterior ligadura da tuba uterina e retirada dos ovários (ooforectomia bilateral), seguida de sutura da musculatura e pele. Ao

final do procedimento, os animais receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,5% (Flotril®), por via intramuscular. Após 7 (sete) dias de recuperação pós-operatória, os animais foram colocados em gaiola metabólica para início do tratamento.

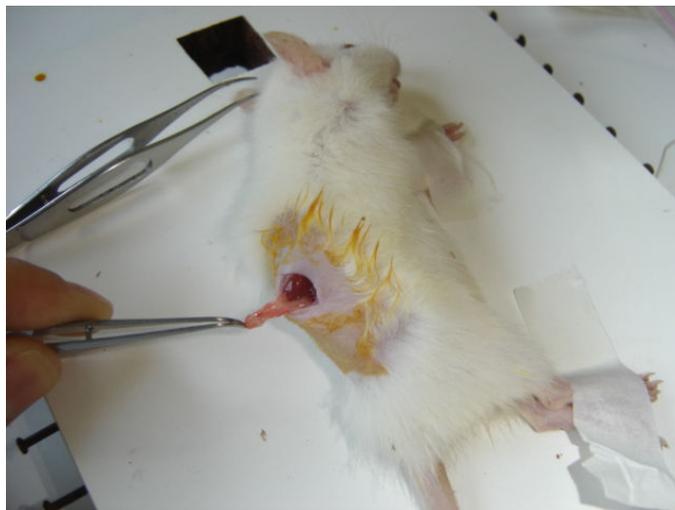


Fig. 1 - Procedimento cirúrgico de ooforectomia

### 3.4. Protocolo experimental

Após 7 dias da cirurgia de ooforectomia, os animais foram colocados individualmente em gaiola metabólica (fig. 2) com água e ração *ad libidum* e ficaram por mais 7 dias para adaptar-se, antes de iniciarmos o experimento. Em seguida, iniciamos os protocolos onde os animais permaneceram em gaiola metabólica até o fim do experimento (90 dias) sendo retiradas a cada 7 dias para verificação do peso corporal de cada rata (balança Toledo com precisão de 0,01g) para o reajuste da quantidade de ração e de medicamento administrado diariamente para cada animal. Ao final dos 90 dias, as ratas foram retiradas aleatoriamente das gaiolas metabólicas, pesadas e anestesiadas com ketamina (10 mg/kg) e xilasina (50 mg/kg). A artéria carótida e a artéria femoral foram cateterizadas. Após 24 horas de recuperação cirúrgica os valores de  $dP/dt_{max}$  e da PAM foram verificados. Em seguida, 2 ml de sangue foram retirados pelo catéter de artéria carótida, para análise laboratorial. Depois, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e os órgãos (fígado, rins e coração) foram retirados, lavados, secados e pesados. Amostras do tecido renal foram encaminhadas para análises histológicas.

**3.4.1. Ratas normotensas (WT) e espontaneamente hipertensas (ST), ooforectomizadas, tratadas com tamoxifeno:**

Protocolo diário: a ração foi administrada moída e peneirada, sendo verificado peso da mesma antes da colocação em gaiola metabólica, assim como sua sobra no dia seguinte, que retornava à gaiola para garantir o consumo diário do medicamento. Doses diárias de tamoxifeno foram administradas, colocadas sobre a ração em pó na concentração de 0,1 mg/100g de peso corporal do animal. O volume de água ingerido e o volume excretado de urina também foram quantificados diariamente, assim como, uma amostra diária e individual de 0,25ml de urina, recolhida para posterior verificação de sódio urinário.

**3.4.2. Ratas normotensas (WC) e espontaneamente hipertensas (SC), ooforectomizadas, sem tratamento com tamoxifeno:**

Protocolo diário: a ração foi administrada moída e peneirada, sendo verificado peso da mesma antes da colocação em gaiola metabólica, assim como sua sobra no dia seguinte. O volume de água ingerido e o volume de urina excretado foram quantificados diariamente, assim como, uma amostra diária e individual de 0,25ml de urina, recolhida para posterior verificação de sódio urinário.



Fig. 2 - Gaiola metabólica utilizada durante experimento

### **3.5. Tratamento com Tamoxifeno**

Comprimidos de 20 mg de cloridrato de tamoxifeno foram triturados e misturados com 200g de ração em pó (pesados em balança da marca Marte com precisão de 0,025 mg), sendo que para cada 1g de ração, obtínhamos 0,1mg de tamoxifeno. Doses diárias de Tamoxifeno foram dadas aos animais sobre a ração pura previamente moída e peneirada. Calculou-se a dose de medicação, bem como a quantidade de ração através do peso dos ratos, sendo que a dose de tamoxifeno administrada foi de 0,1mg/ 100g de peso corporal do animal (correspondendo a 20 mg/dia de tamoxifeno utilizado em mulheres) e a ração moída e peneirada (sem medicamento) foi administrada na quantidade de 10g/ 100g de peso corporal do animal.

### **3.6. Dosagem de sódio**

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais por todo o tratamento, uma amostra diária de urina de cada rato foi armazenada em Ependorff, as quais eram mantidas em refrigeração até a realização da dosagem da concentração sódio, que ocorria a cada 7 dias. As concentrações de sódio foram quantificadas através de um Fotômetro de Chama (Instrumental Laboratories, modelo 943). A unidade de medida foi mEq/dia. Ao final, a dosagem do sódio obtida foi reajustada por 100g de animal.

### **3.7. Cateterização da Artéria Carótida**

A artéria carótida foi isolada através de uma incisão na região cervical e nela introduzida uma cânula de polietileno PE50. Previamente, a extremidade livre da cânula foi preenchida com solução salina (NaCl 0.9%) e ocluída com um pino inoxidável. A cânula, então, foi heparinizada com solução salina a 2% como medida profilática para a formação de coágulos, o que poderia amortecer o sinal da aferição direta do índice de contratilidade pela  $dP/dt_{max}$ , alterando assim o resultado final. A seguir, a extremidade livre da cânula foi conduzida por meio de um trocáter, sob a pele da região cervical

anterior, até à região médio cervical posterior do animal, onde por meio de uma nova incisão foram exteriorizadas. A cânula foi fixada por um fio de sutura, a fim de evitar que o animal pudesse arrancá-la ou mordê-la. Tal procedimento permitiu que esse estudo fosse realizado com o animal acordado e com o mínimo de manuseio e perturbação possível. Os cateteres foram confeccionados medindo 10 cm de comprimento.

### **3.8. Cateterização da Artéria Femoral**

Após a cateterização da carótida, a artéria femoral foi isolada através de uma incisão na região inguinal e nela introduzida cateteres que foram confeccionados pela conexão de duas cânulas de polietileno PE10 e PE50, medindo 3 e 15 cm de comprimento, respectivamente, montadas sobre um mandril de aço inoxidável e soldadas por aquecimento. A extremidade da cânula PE10 foi introduzida na artéria femoral. Previamente, a extremidade livre da cânula PE50 foi preenchida com solução salina (NaCl 0,9%) e ocluída com um pino inoxidável. A cânula então foi heparinizada com solução salina a 2% como medida profilática para a formação de coágulos, o que poderia amortecer o sinal para aferição da PAM modificando assim o resultado final. A seguir, a extremidade livre da cânula também foi conduzida por meio de um trocáter, sob a pele do dorso, até à região média cervical posterior do animal, e por meio de uma nova incisão foram exteriorizadas e fixadas por fio de sutura. Tal procedimento permitiu que esse estudo fosse realizado com o animal acordado após 24 horas do procedimento cirúrgico e com o mínimo de manuseio e perturbação possível, e sem influência anestésica. A cateterização de artéria femoral permitiu verificação direta da PAM.

### **3.9. Medida da pressão arterial média e da $dP/dt_{max}$**

Na última fase do estudo, 24 horas após a cateterização, com o animal acordado e com um mínimo de perturbação e manuseio do mesmo, os cateteres de polietileno (cânula) localizados na artéria femoral e na artéria carótida, foram conectados a um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados de PAM e da  $dP/dt$ , foram digitalizadas

(Chart 5.0 for Windows, PowerLab, AdInstruments) e armazenados em disco rígido do computador para serem feitas as análises.

### **3.10. Preparo das amostras de sangue**

As amostras de sangue destinadas à avaliação foram obtidas dos animais em jejum alimentar não hídrico, *ad libitum*, por cerca de 8-10 horas. Os animais foram submetidos à coleta de cerca de 2 mL de sangue pelo cateter inserido na artéria carótida e após, sacrificados por deslocamento cervical. O sangue coletado, em um tubo sem anticoagulante, foi centrifugado utilizando uma centrífuga de bancada não refrigerada da marca Sigma 2-3 à  $1.500 \text{ min}^{-1}$ , durante 10 minutos. Após, o sobrenadante (plasma) foi colhido com auxílio de uma pipeta automática e enviado para análise laboratorial.

#### **3.10.1. Dosagem do colesterol total (método enzimático)**

Após uma hidrólise prévia dos ésteres de colesterol pela colesterol esterase, o colesterol é oxidado pela colesterol oxidase, formando peróxido de hidrogênio. Este, através de uma reação de acoplamento oxidativo, reage com fenol e 4-aminoantipirina, produzindo uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorbância medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol. A unidade de medida foi mg/dl.

#### **3.10.2. Dosagem do HDL-colesterol (método enzimático)**

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas com ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado às proteínas de alta densidade (HDL) foi determinado no sobrenadante pelo sistema colesterol enzimático. A unidade de medida foi mg/dl.

#### **3.10.3. Dosagem de triglicérides (método enzimático)**

Após a hidrólise prévia dos triglicerídeos pela lipase lipoprotéica, o glicerol foi fosforilado pelo glicerol quinase, formando glicerol fosfato que é oxidado em dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Em

reação de acoplamento oxidativo catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio reagiu com o 4-clorofenol e 4-aminoantipirina, produzindo antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja absorbância medida em 510 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra. A unidade de medida foi mg/dl.

#### **3.10.4. Resultado de LDL-colesterol.**

O resultado do LDL-colesterol foi obtido através dos seguintes cálculos:

$VLDL = \text{Triglicérideo}/5$ .

$LDL = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$ .

#### **3.10.5. Dosagem de creatinina sérica**

A creatinina e outros componentes do soro reagiram com o picrato alcalino, formando um complexo de cor vermelha que foi medido fotometricamente. A edição de um acidificante abaixa o pH para 5.0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina. A diferença entre a leitura fotométrica antes e após a acidificação, permitiu quantificar a creatinina verdadeira.

### **3.11. Retirada do fígado, rins e coração**

Após os 90 dias de tratamento, após as cateterizações e retirada de amostras de sangue para análise, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, e uma incisão cirúrgica de aproximadamente 5 centímetros na região tóraco-abdominal foi realizada para a retirada dos rins, do fígado e do coração, que foram lavados com solução fisiológica. O excesso de líquido foi removido com papel filtro e em seguida foram pesados. O índice de hipertrofia do ventrículo direito (VD) e esquerdo (VE), dos rins e do fígado foram estimados e corrigidos em mg de tecido úmido/100g de peso corporal do animal.

### **3.12. Preparação das lâminas para análise histológica**

Cada amostra de tecido renal foi submetida à fixação em formol 10% por 48 horas, seguida da desidratação em várias etapas de uma hora cada (álcool 70%, 90%, 96% e 100%). O material sofreu um processo de substituição de álcool por xilol, com três banhos de xilol por 30 minutos cada. Posteriormente foram montadas em blocos de parafina com três banhos de 30 minutos cada, cortadas em micrótomo American Optical a 10 micrometros.

Foram utilizadas as colorações tipo Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômico de Masson.

Após a coloração as lâminas passaram novamente pelo processo de desidratação seguindo-se a montagem com Bálsamo do Canadá e cobertura com lamínula para posterior análise histológica.

#### **3.12.1. Análise histológica e morfométrica das lâminas**

A análise do tecido renal foi realizada em microscópio ótico ano 1996. Os dados morfométricos foram obtidos através do programa Leica EWG 2100 e um computador Pentium.

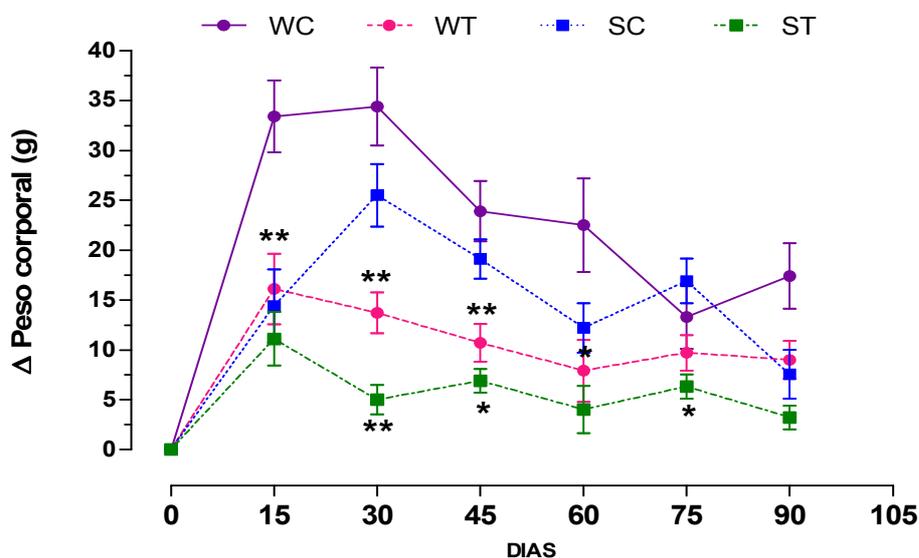
### **3.14 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para todos os grupos estudados, comparando-se os grupos das ratas normotensas e hipertensas, castradas, tratadas ou não com tamoxifeno por 90 dias. Para análise estatística das variáveis estudadas, foi efetuada análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias pelo teste post-hoc Tukey/ Kramer. Os níveis de significância estabelecidos foram  $p < 0,01$  % e  $p < 0,05$ %.

## 4 – RESULTADOS

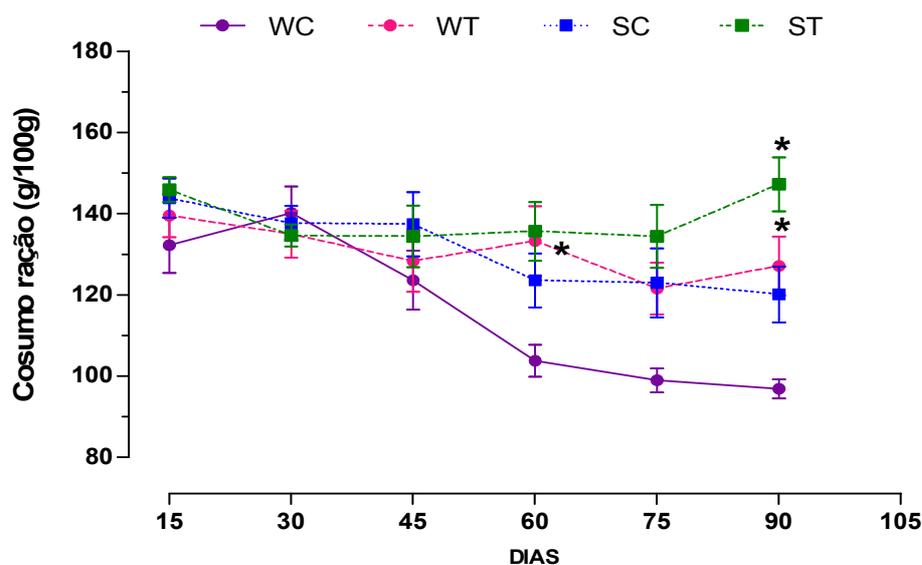
### 4.1. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre Ganho de Peso Corporal e Consumo de Ração.

Os valores de ganho de peso corporal a cada 15 dias de tratamento com tamoxifeno estão demonstrados no gráfico 1. Foram observados redução no ganho de peso corporal entre os grupos WT quando comparados ao WC, principalmente nos primeiros 45 ( $p < 0,01$ ) e 60° dias de experimento ( $p < 0,05$ ). No grupo ST, encontramos no 30° dia de tratamento uma redução de ganho de peso ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo SC, que se manteve ao longo dos 45° e 75° dia ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 1-** Avaliação quinzenal da variação do ganho de peso corporal expresso em gramas, em ratos Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias experimento,  $n = 9$ . Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  vs. WC e SC.

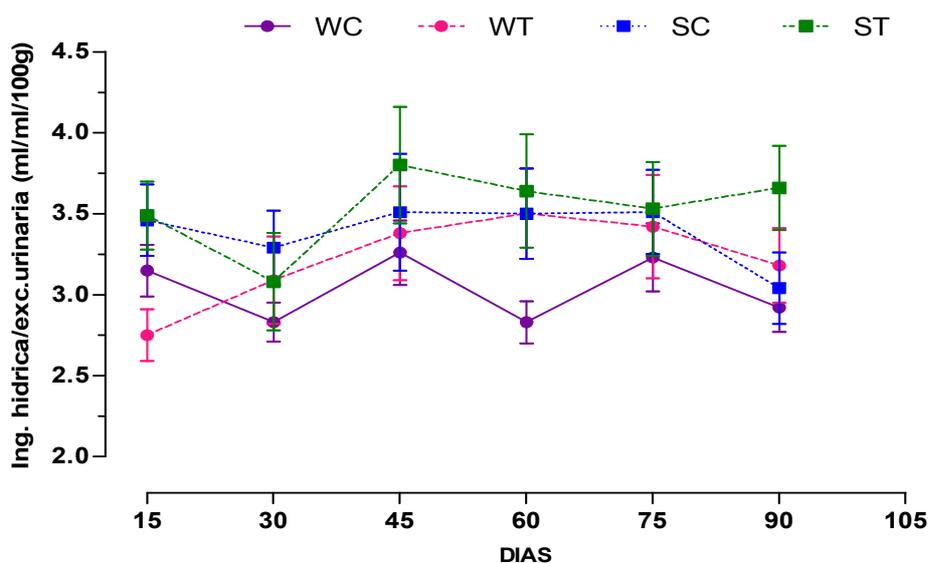
Apesar da redução de ganho de peso dos animais tratados, observa-se no gráfico 2 que os animais do grupo WT tiveram consumo de ração significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao WC no 60° dia (WT  $133,3 \pm 8,58$  g/100g de peso; WC  $103,7 \pm 3,9$  g/100g de peso) e no 90° dia de tratamento (WT  $127,1 \pm 7,21$ g/100g; WC  $96,8 \pm 2,35$  g/100g). O mesmo aconteceu em relação ao grupo ST em relação ao SC no 90° dia de tratamento (ST  $147,2 \pm 6,62$  g/100g; SC  $120,1 \pm 6,9$  g/100g). Os valores de consumo de ração foram reajustados por 100 g de peso corporal do animal.



**Gráfico 2** – Avaliação quinzenal de Consumo de ração expressos em g/100 g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média ± EPM. \* p < 0,05 vs. WC e SC.

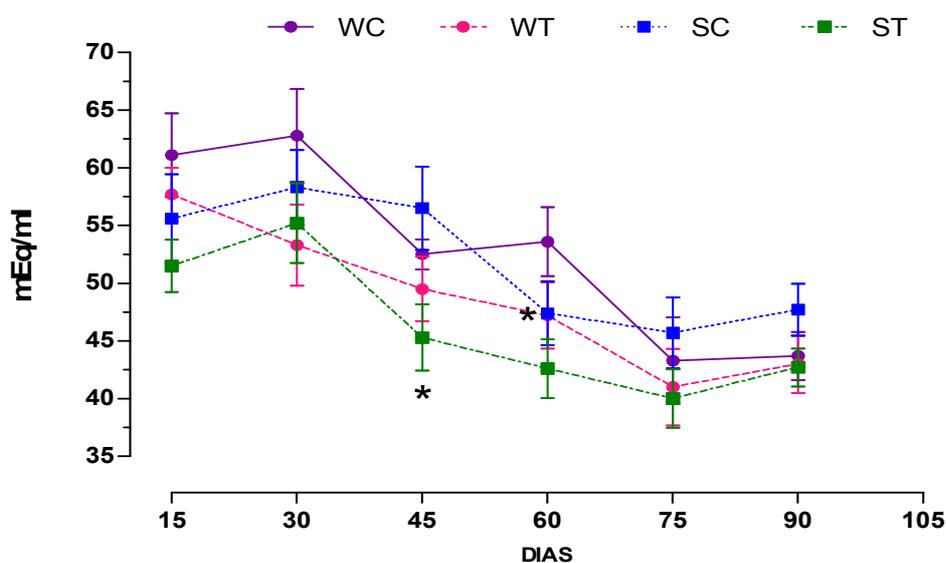
#### 4.2. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre o Sistema Renal.

As médias quinzenais de volume ingerido de água sobre volume urinário demonstram que não houve diferença entre os grupos durante todo tratamento de 90 dias com tamoxifeno, como mostra o gráfico 3.



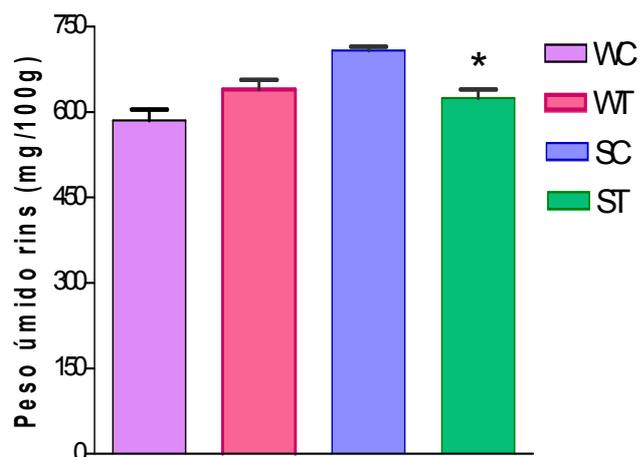
**Gráfico 3** – Avaliação quinzenal da Relação Ingestão Hídrica/ excreção urinária expresso por ml/ml, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média ± EPM.

A partir das coletas diárias de diurese, até o final do experimento, os valores de sódio urinário foram verificados. Os dados obtidos e demonstrados no gráfico 4, sugerem que em ratas normotensas e espontaneamente hipertensas, o tratamento com tamoxifeno durante 90 dias promoveu redução na eliminação do sódio urinário ( $p < 0,01$ ) em ratas ST somente no 45º dia de tratamento (ST  $45,3 \pm 2,87$  mEq/l; SC  $56,5 \pm 3,62$  mEq/l) e em ratas WT somente no 60º dia de tratamento (WT  $43,2 \pm 2,87$  mEq/l; WC  $53,7 \pm 2,98$  mEq/l) em relação a seus controle. Após, não encontramos retenção de sódio nos grupos tratados.



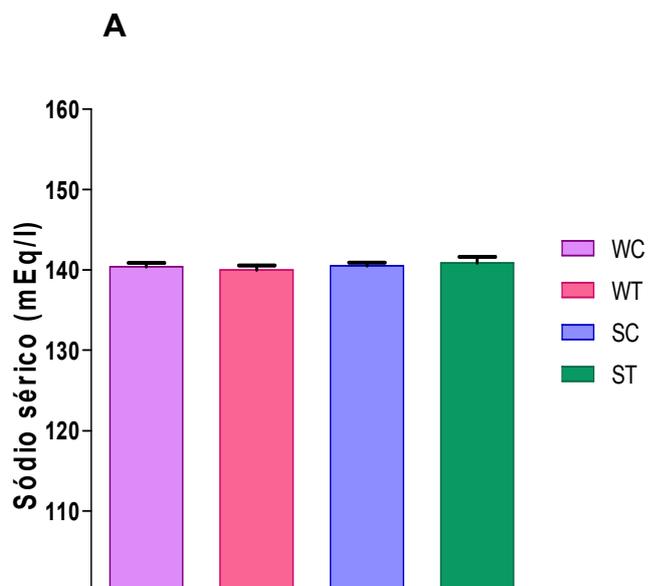
**Gráfico 4** – Avaliação quinzenal da Excreção Urinária de Sódio (Na) expresso em mEq/dia/100g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) durante 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. WC e SC.

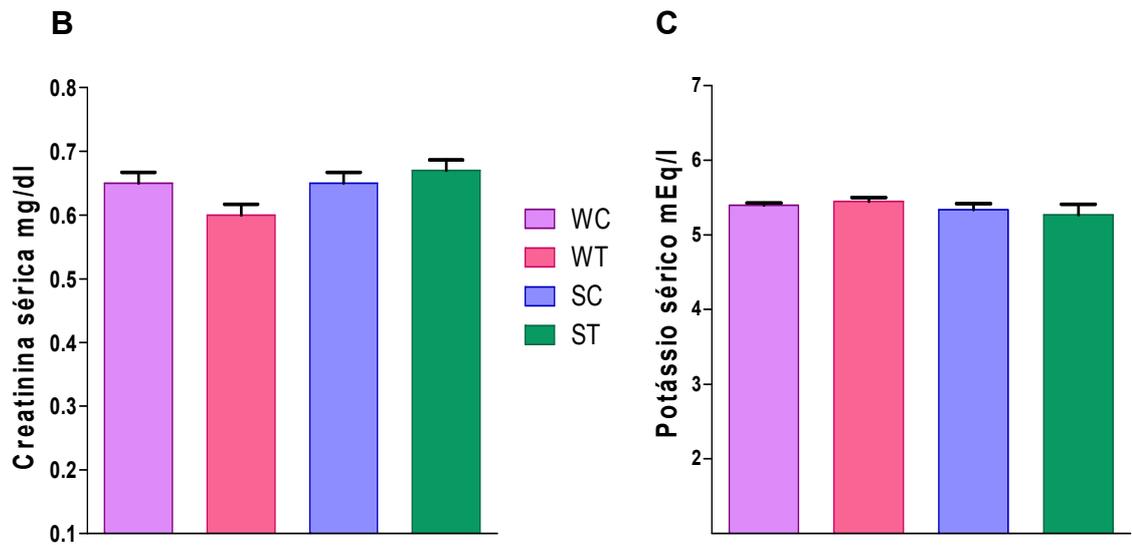
Apesar dos grupos não apresentarem alteração na relação ingestão hídrica/volume urinário, o gráfico 5 demonstra que o peso úmido dos rins em ratas ST foi estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle (ST  $624,7 \pm 15,35$ ; SC  $708,6 \pm 6,93$  mg/100g de peso do animal).



**Gráfico 5** – Peso Úmido dos rins expresso em mg/100g de peso corporal, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \* p < 0,05 vs. ST.

Os valores sanguíneos de sódio (A), creatinina (B) e potássio (C) não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratado e controle, normotenso e hipertenso, sugerindo, então, que o tratamento com tamoxifeno não altera em ratos a função renal (gráfico 6).





**Gráfico 6** –Níveis séricos de Sódio, Creatinina e Potássio expressos em mEq/l, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM.

As figuras abaixo demonstram a lâmina para análise histológica dos rins, onde cada lâmina abaixo representa respectivamente ratas wistar controle, wistar tratado, SHR controle e SHR tratado.

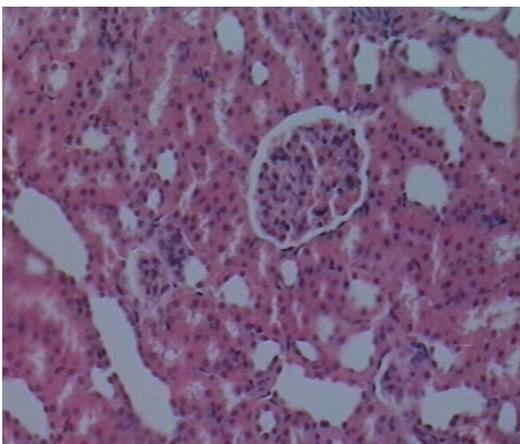


Fig.3-Região cortical do rim, mostrando os Glomérulos e túbulos renais de ratas WC. Objetiva de 20x

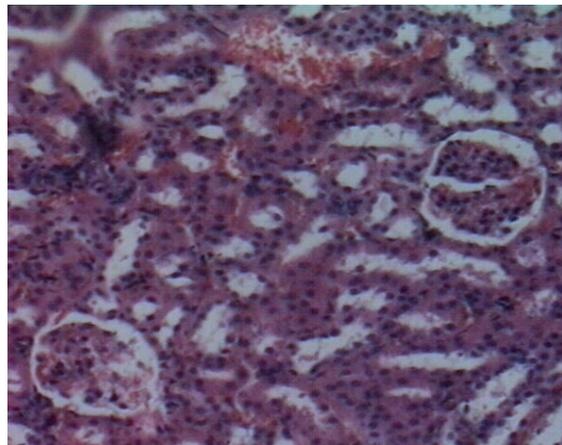


Fig.4-Região cortical do rim, mostrando os Glomérulos e túbulos renais do WT. Objetiva de 20x.

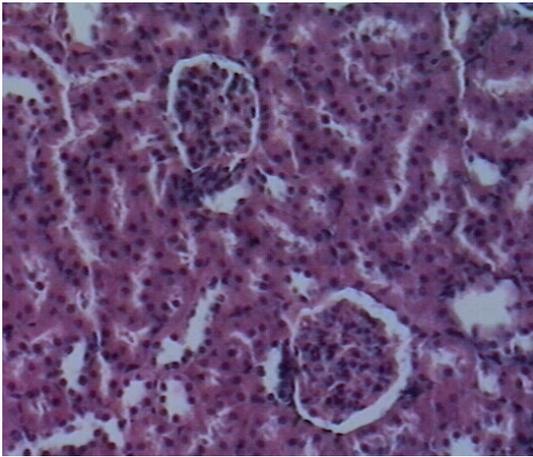


Fig.5-Região cortical do rim, mostrando os Glomérulos e túbulos renais de ratas SC. Objetiva de 20x

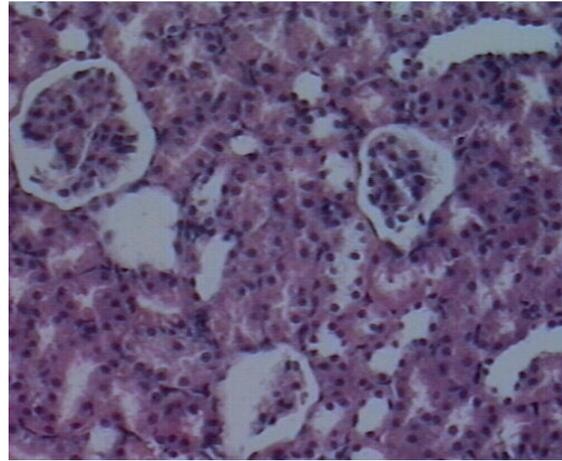
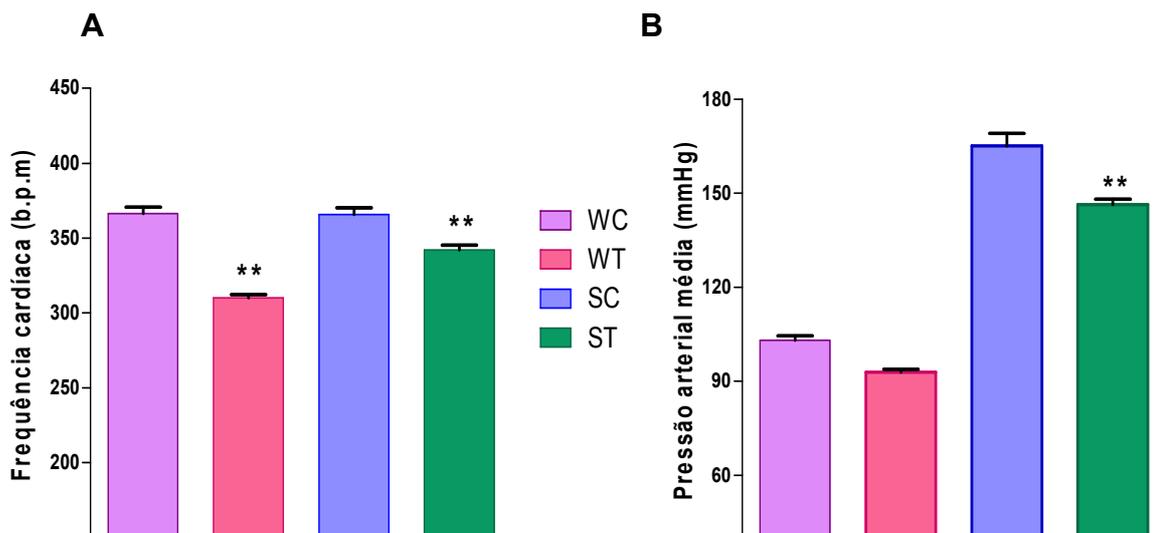


Fig.6-Região cortical do rim, mostrando os Glomérulos e túbulos renais de ratas ST. Objetiva de 20x.

De acordo com o laudo da patologia, realizado no serviço de anatomia patológica do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) pela Prof. Dra. Maria Carmen L. F. Silva Santos, a avaliação histológica dos rins pelos métodos de HE e Tricrômio de Masson revelou apenas presença de discreta nefrosclerose benigna nos grupos hipertenso (tratados ou não tratados). Glomérulos túbulos e interstício renal não apresentaram alterações histológicas nos grupos estudados.

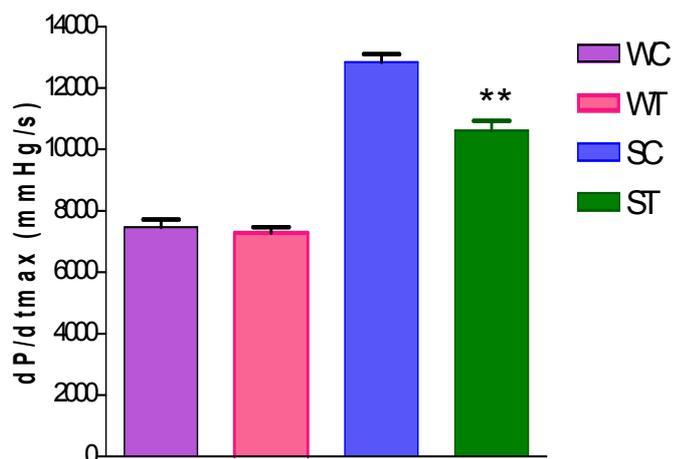
#### **4.3. Efeitos do tratamento com Tamoxifeno sobre o Sistema Cardiovascular.**

O gráfico 7 demonstra as alterações de frequência cardíaca (A) e de pressão arterial média (B). Observamos uma redução significativa ( $p < 0,01$ ) da frequência cardíaca em ratas WT (WT  $310,1 \pm 2,1$ ; WC  $366,4 \pm 4,34$  b.p.m) e ST ( $342 \pm 3,31$ ; SC  $365,7 \pm 4,52$  b.p.m) em relação a seus controles. Porém, redução na PAM só foi encontrada nas ratas ST ( $146,4 \pm 1,75$  mmHg) comparadas às SC ( $165,1 \pm 3,95$  mmHg).



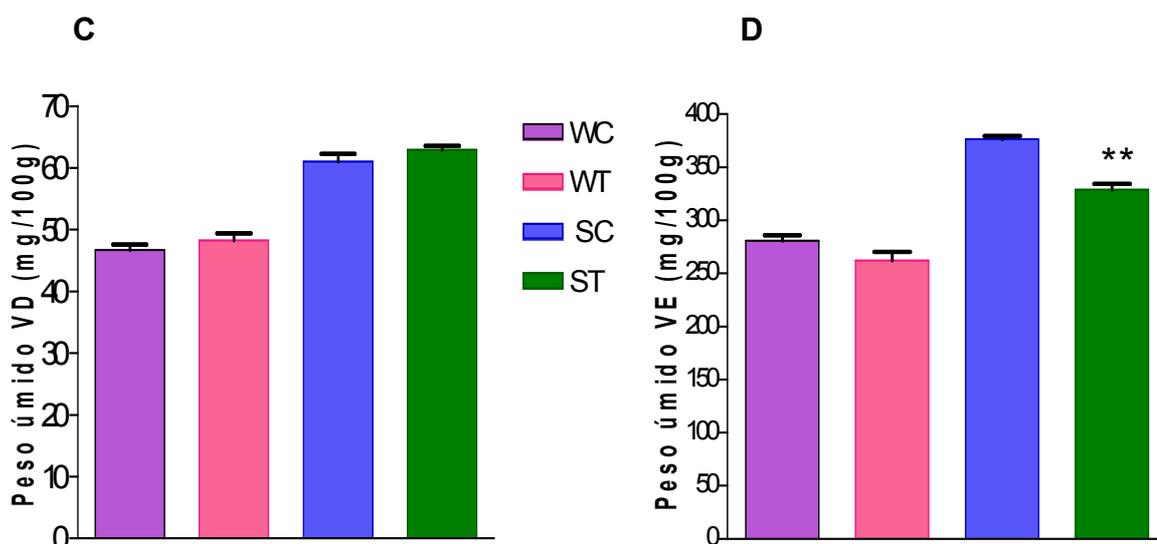
**Gráfico 7** – Frequência Cardíaca (FC) e Pressão Arterial Média (PAM) expressos em b.p.m e mmHg respectivamente, de ratos Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0,01 vs. WC e SC.

Na verificação do índice de contratilidade miocárdica, expresso pela  $dP/dt_{max}$  no gráfico 8, as ratas ST (10623,2  $\pm$  316,1 mmHg/seg) apresentaram redução significativa na contratilidade miocárdica (p < 0,01) em relação às ratas SC (12854,3  $\pm$  253,8 mmHg/seg).



**Gráfico 8** – Índice de Contratilidade Miocárdica em mmHg/seg expresso pela derivada de pressão sobre a derivada de tempo ( $dP/dt_{max}$ ), de ratos Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\* p < 0,01 vs. SC.

No gráfico 9, o peso úmido do ventrículo direito (C) e ventrículo esquerdo (D) foram corrigidos por 100g de peso corporal das ratas. O peso úmido do VD não apresentou diferença entre os grupos. Já o peso úmido de VE apresentou redução significativa nas ratas SHR tratadas com tamoxifeno ( $p < 0,01$ ) em relação a seu controle (ST  $329 \pm 5,63$  mg/100g; SC  $376,4 \pm 3,26$  mg/100g).

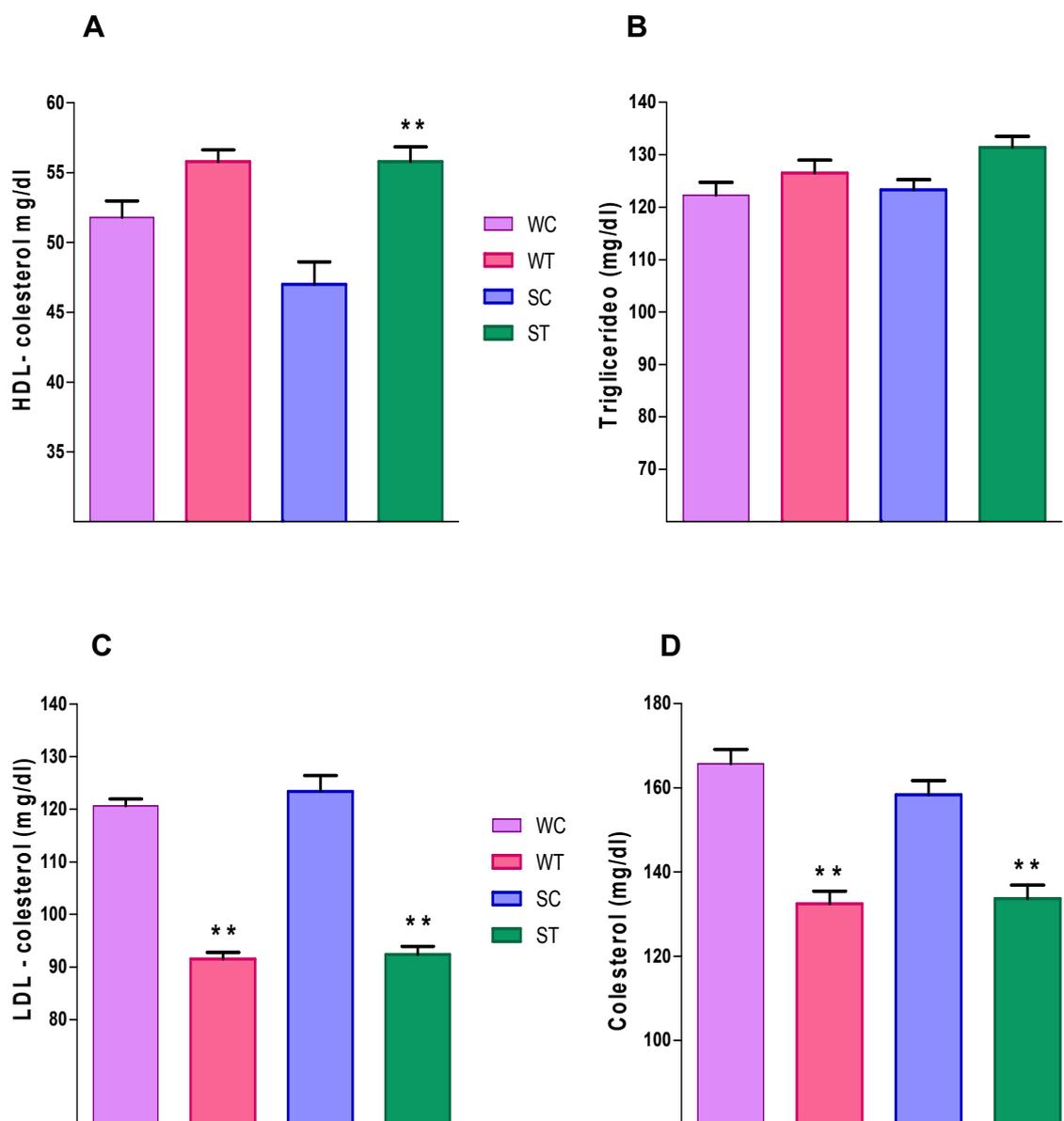


**Gráfico 9** – Peso Úmido de Ventrículo Direito (C) e Ventrículo Esquerdo (D) expressos em mg/100g de peso corporal, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento,  $n = 9$ . Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  vs. SC.

#### 4.4. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre o Perfil Lipídico

Testes bioquímicos de HDL-colesterol (A), triglicerídeo (B), LDL-colesterol (C) e colesterol-total (D) foram realizados ao final do experimento, onde a coleta de 2 ml de sangue foi feita via catéter carotídeo. Os resultados de HDL-colesterol demonstram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) somente no grupo ST (ST  $55,8 \pm 1,06$  mg/dl) em relação ao controle (SC  $47 \pm 1,62$  mg/dl), não apresentando diferença no grupo Wistar controle (WC  $51,7 \pm 1,18$ ) e tratado (WT  $55,8 \pm 0,83$ ). Em relação aos níveis de triglicerídeos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos wistar tratado (WT  $126,6 \pm 2,49$ ) e wistar controle (WC  $122,3 \pm 2,44$ ); SHR tratado (ST  $131,4 \pm 2,15$ ) e SHR controle (SC  $123,3 \pm 2,01$ ). Já os resultados de LDL-colesterol apresentaram redução significativa ( $p < 0,01$ ) nos grupos tratados normotensos (WT  $91,5 \pm 1,26$  mg/dl, controle  $120,7 \pm 1,26$  mg/dl) e tratados

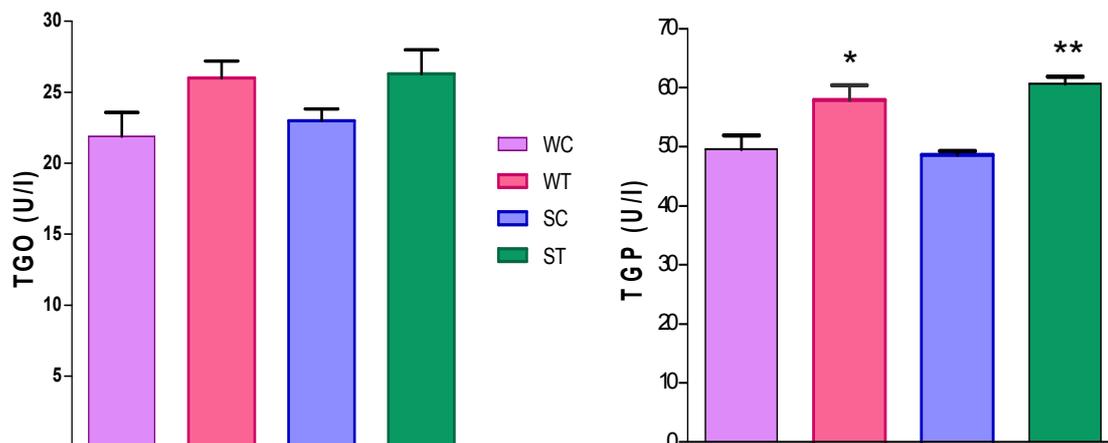
hipertensos (ST  $92,4 \pm 1,55$  mg/dl) quando comparado a seus controles (SC  $123,4 \pm 2,99$  mg/dl). Padrão estatístico semelhante foi encontrado com o colesterol-total que também apresentou redução significativa ( $p < 0,01$ ) nos grupos tratados normotensos (WT  $132,6 \pm 2,96$  mg/dl) quando comparado a seus controles (WC  $165,7 \pm 3,46$ mg/dl) e tratados espontaneamente hipertensos (ST  $133,7 \pm 3,13$ mg/dl) em relação a seus controles (SC  $158,4 \pm 3,32$ mg/dl).



**Gráfico 10** – Níveis séricos de HDL-colesterol (A), Triglicérides (B), LDL-colesterol (C) e Colesterol Total (D), expressos em mg/dl, de ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média ± EPM. \*\* p < 0,01 vs. WC e SC.

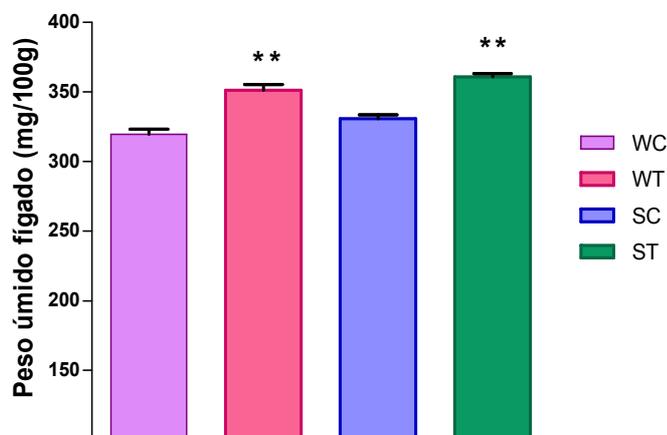
#### 4.5. Efeito do tratamento com Tamoxifeno sobre a Função Hepática.

Os valores de TGO e TGP estão expressos no gráfico 11. Os níveis de TGO não apresentaram diferença entre os grupos, porém os níveis de TGP tiveram alteração significativa ( $p < 0,01$ ) nos grupos WT (WT  $57,9 \pm 2,49$  U/l; WC  $49,6 \pm 2,22$  U/l) e ST (ST  $60,7 \pm 1,14$  U/l; controle  $48,5 \pm 0,69$  U/l) em relação aos controles.



**Gráfico 11** –Níveis séricos de TGO (A) e TGP (B) expressos em U/l, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  vs. WC e SC.

O peso úmido do fígado também foi mensurado e está demonstrado na figura 9. Encontramos diferenças significantes ( $p < 0,01$ ) entre os grupos Wistar (WT  $351,3 \pm 3,96$  mg/100g peso corporal; WC  $319,6 \pm 3,63$  mg/100g peso corporal) e SHR (ST  $360,8 \pm 2,26$  mg/100g peso corporal; SC  $330,8 \pm 2,79$  mg/100g peso corporal).



**Gráfico 12** – Peso úmido do Fígado expresso em mg/100g de peso, em ratas Wistar controle (WC), Wistar tratadas com tamoxifeno (WT), SHR controle (SC) e SHR tratadas com tamoxifeno (ST) após 90 dias de experimento, n = 9. Os valores são fornecidos como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  vs. WC e SC.

## 5 – DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos alguns efeitos promovidos pelo tratamento crônico com tamoxifeno em animais experimentais normotensos e naqueles onde um importante fator coadjuvante para doenças cardiovasculares estava presente (hipertensão arterial).

Durante todo tratamento, observamos redução importante no ganho ponderal em animais tratados com tamoxifeno, sendo que o consumo de ração entre os grupos controle e tratados não apresentou diferença, inclusive com consumo maior de ração pelas ratas WT na última quinzena de experimento, sugerindo que o tratamento com tamoxifeno altera o metabolismo corporal em ratos. A presença de receptores de estrogênio na glândula tireóide sugere uma ação direta de estrogênio e de drogas que simulam efeitos estrogênicos na glândula (CHAUDHURI et al., 1986; ZAYED et al., 1998). Araújo et al., 2006, demonstram que a glândula tireóide foi significativamente afetada pelo tratamento com estrogênios ou tamoxifeno, com aumento no tamanho de células foliculares e redução das áreas coloidais comparadas ao controle. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que os efeitos dos estrogênios e do tamoxifeno na glândula tireóide pode ser indiretos em consequência do aumento dos níveis séricos de globulina tiroxina (TGB) associadas a mudanças na função tireóide (ZIDAN e RUBENSTEIN, 1999; BOTTIGLIONI et al., 1983). Outros estudos sugerem ação direta na hipófise, através da liberação do TSH, responsável pela liberação de hormônios tireoidianos (WATANOBE E TAKEBE, 1987; D'ANGELO, 1968). Donda et al., 1990, também demonstraram que o estrogênio tem efeito estimulatório na função da hipófise e liberação do TSH. Em estudo experimental, Bruhn e Jackson, 1992, relataram que os animais tratados com tamoxifeno tiveram níveis de TSH reduzidos, podendo ser devido a um feedback negativo exercido pelos aumentos dos níveis de T3 e de T4 sanguíneos.

Corroborando com nossos resultados, Pelsler et al., 2005, em seu estudo com ratas SHR também verificou menor ganho do peso corporal nos animais ao longo do tratamento com o tamoxifeno: Ratas sham  $197 \pm 5$ g, ratas ooforectomizadas  $244 \pm 5$ g e ratas ooforectomizadas tratado com tamoxifeno  $195 \pm 2$ g. Estes resultados demonstram que o peso corporal de ratas tratadas com tamoxifeno, é semelhante à

de ratas sham. Desta forma, podemos supor que a ação desta droga é semelhante à ação estrogênica no tecido adiposo.

Outra hipótese para a redução de peso corporal pode ser devido à influência do tamoxifeno no metabolismo lipídico diminuindo o LDL-colesterol, lipoproteínas e colesterol total, além de aumentar o HDL-colesterol. Ferrara et al. (2002) demonstraram que no período da menopausa ocorre aumento da lipase lipoprotéica e diminuição da lipólise, podendo ser estes os mecanismos que ocasionam aumento de peso nas ratas castradas cirurgicamente na ausência do tratamento com tamoxifeno (animais controle). Wade e Heller (2003) relataram que o tamoxifeno age de modo similar ao estrogênio, diminuindo o peso corporal de ratas ooforectomizadas por diminuição do peso úmido do tecido adiposo branco parametrial e aumento da lipólise.

A retenção hídrica poderia ser mais uma possível causa de aumento de peso em ratas controle, verificada pela relação ingestão de água e excreção urinário sendo importante índice de avaliação de função renal. Porém, os resultados encontrados em nosso estudo demonstram que ao longo do tratamento, a relação volume de ingestão de água e volume urinário não sofreu alteração entre os grupos controle e tratado com tamoxifeno, normotenso e SHR. A eliminação de sódio urinário só apresentou redução no grupo ST, no 45º dia de experimento, porém não houve novamente retenção de sódio no decorrer do tratamento. No grupo WT foi observado que só houve retenção de sódio somente no 60º dia de experimento, porém não houve permanência do quadro.

O peso úmido dos rins de ratas SHR tratadas foi menor quando comparado ao peso úmido dos rins de ratas controle. Esta redução de peso renal pode ser devido a uma redução da síntese de proteínas renais, redução da formação de fibrose ou redução do tamanho de células renais causadas pelo tratamento, não confirmada pela análise histológica renal na qual não foram encontradas alterações significantes entre os grupos. Corroborando com nossa hipótese, em estudos clínicos o uso do tamoxifeno foi associado à redução de fibrose retroperitoneal idiopática (FRI) onde sua eficácia deve-se a estimulação da produção de TGF- $\beta$ , citocina com atividade moduladora supressiva da atividade de fibroblastos (MARCOLONGO et al., 2004).

Em recente pesquisa Pereira et al., 2006, relatam efeito renoprotetor da monoterapia com tamoxifeno, em ratos, diminuindo significativamente a albuminúria, glomeruloesclerose, isquemia glomerular, fibrose intersticial, número de macrófagos, miofibroblastos e atividade de células em proliferação.

A HAS em ratas SHR pode exarcebar a lesão dos glomérulos e demais vasos sanguíneos renais sendo, portanto, importante causa de insuficiência renal do estágio terminal. Da mesma forma, alterações na função renal podem causar HAS, sustentando um ciclo vicioso. Portanto, a atenuação da PAM pode ser outra justificativa para a redução do peso renal em ratas ST. Estudos anteriores também demonstraram ações positivas da terapia de reposição de estrogênio e tratamento com tamoxifeno sobre o rim de ratas ooforectomizadas, no que tange alterações glomerulares (POTIER et al., 2002) sugerindo ação deste medicamento em receptores estrogênicos presentes no glomérulo renal. Relatam ainda que a incidência de doença renal em estágio avançado é maior em mulheres pós-menopausadas sugerindo que o déficit de estrogênio pode representar um acúmulo da matriz extracelular por células mesangiais, que são primariamente responsáveis pela síntese e degradação dessa matriz.

Outro importante resultado encontrado em nosso estudo foi redução significativa da FC em animais normotensos e hipertensos tratados com tamoxifeno. Em condições fisiológicas e patológicas o sistema nervoso autônomo (SNA) exerce efeito modulador sobre o sistema cardiovascular. Essa redução da FC pode ser explicada por uma maior atividade vagal e menor atividade simpática no coração, provavelmente pelo tamoxifeno exercer atividade agonista do estrogênio através da diminuição da expressão de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos no nodo-sinusal (LIU et al., 2003). Outra hipótese para a redução da FC foi proposta por O'Malley et al., 1987, que pode ser explicada pela ação do tamoxifeno, via receptores estrogênicos, na modulação barorreflexa atuando como droga cardioprotetora, sugerindo papel facilitador na neurotransmissão colinérgica no sistema nervoso central (SNC). A conclusão de que o tamoxifeno atua centralmente pode ser dada pela presença de receptores estrogênicos em RNAm de neurônios do núcleo do trato solitário (NTS), a primeira sinapse central de baroaferências arteriais (TALMAN et al., 1984), e também no bulbo ventrolateral caudal, uma área do cérebro envolvida nos processos

centrais de informações barorreflexas (LAWRENCE e JARROTT, 1996). Além disso, o tamoxifeno pode estar envolvido com estimulação de neurotransmissores glutamatérgicos (WONG e MOSS, 1992), inibição de neurotransmissores GABAérgicos (KELLY et al., 1992), e aumento central da quantidade de adrenoreceptores- $\alpha_2$ , ambos essenciais para a modulação de barorreflexos centrais (LAWRENCE e JARROT, 1996).

Observamos também, PAM em níveis significativamente mais baixos em ratas ST quando comparada às ratas SC, sendo que o tratamento teve início em ratas com 30 dias de idade onde provavelmente a hipertensão ainda não tinha se desenvolvido nesse grupo de animais (SHR). Acreditamos que o tamoxifeno possa ter ação preventiva e atenuadora da elevação dos níveis pressóricos em animais SHR, atuando via receptores de estrogênio presentes nos vasos sanguíneos. Assim como no nodo sinusal, o tamoxifeno pode reduzir a reatividade vascular pela inativação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ou redução dos mesmos, por regulação da atividade simpática (LIU et al., 2003). Outra provável hipótese é que o tamoxifeno possa atenuar a PAM do grupo ST via receptores do estrogênio no leito vascular e renal através do sistema renina-angiotensina (SRA) que participa da regulação do tônus e crescimento da parede vascular. Estudos têm mostrado que o estrógeno estimula o SRA, aumentando os níveis plasmáticos de renina e Angiotensina-I (Angio I) tecidual e circulante. A Angio-I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Angiotensina-II (Angio-II), potente agente vasoconstritor e indutor da proliferação da musculatura lisa vascular. O estrógeno atua reduzindo a atividade da ECA, com conseqüente redução na produção de Angio-II, provável ação do tamoxifeno. Também pode modular os efeitos da Angio-II ao inibir a expressão gênica de seus receptores ( $AT_1$ ) (TOSTES et al., 2003). Além disso, podem exercer proteção cardiovascular por aumentar as ações da angiotensina 1-7 (Angio-1-7), que atua antagonizando os efeitos cardiovasculares promovidos pela Angio-II, promovendo vasodilatação e inibição da proliferação celular (BROSNIHAN et al., 1999).

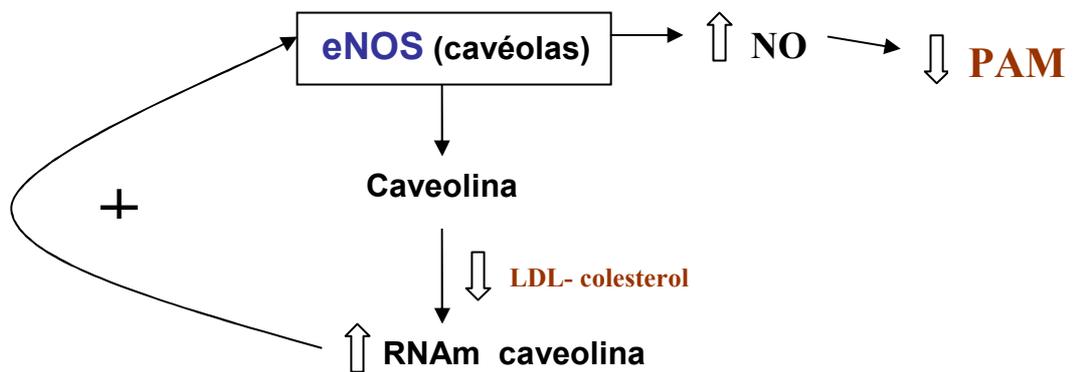
Além disso, Dantas et al. (1999) relataram que em ratas hipertensas, a síntese de prostaglandina vasoconstrictora ( $PGH_2$ ) induzida por agentes vasodilatadores (acetilcolina), é inibida por estrógenos. Tostes et al., (2003), também descreveu

redução nos níveis de endotelina-1 (ET-1), potente agente vasoconstritor, por ação de estrógenos na regulação dos receptores ETa e ETb.

Outros estudos como os de Figtree et al. (2000), demonstraram que o tamoxifeno induz significativo relaxamento em artérias coronárias de coelhos, sugerindo que este relaxamento seria em parte dependente do endotélio confirmado pela inibição por L-NAME e por antagonista de receptores de estrogênio (ICI 182,780), e que a participação do NO no relaxamento arterial, envolve receptores de estrogênio. O mecanismo mais provável para explicar o aumento da produção do NO seria maior atividade pela eNOS decorrente da indução da expressão gênica dessa enzima pelo tamoxifeno. Este mecanismo é conhecido como genômico, onde o tamoxifeno pode se ligar a receptores de estrogênio nucleares se transformar em fator de transcrição gênica, que é reconhecido por regiões promotoras no DNA que codifica a eNOS, aumentando expressão gênica dessa enzima (ORSHAL e KHALIL, 2004; TOSTES et al., 2003). Em vias não-genômicas, o tamoxifeno pode se ligar a receptores estrogênicos na membrana plasmática cuja ativação desencadeia a cascata de segundos mensageiros que levam à ativação rápida da eNOS. Forstermann et al. (1991), propôs a localização da enzima eNOS em invaginações especializadas da membrana plasmática, denominadas cavéolas. O RNAm da caveolina (proteína presente nas cavéolas e que interage com a eNOS) é hiper-regulado quando a entrada de colesterol livre da LDL-colesterol para a célula endotelial é aumentada (FIELDING et al., 1997). Os valores de LDL-colesterol encontrado em nosso estudo foi significativamente menor em ratas tratadas em relação a seus controles, sendo assim, a ação do tamoxifeno pode ser semelhante a dos estrógenos, diminuindo a captação de LDL oxidada (LDL-ox) pela parede arterial, exercendo atividade antioxidante e vasodilatadora, por aumento da produção local de prostaciclina e síntese de NO, pelo estímulo da enzima eNOS. Hirata et al. (1995) e Gesquiere et al. (1997) observaram em estudos in vitro que, após 24 horas de exposição das células endoteliais a baixas concentrações de LDL-ox, observa-se aumento do RNAm da eNOS, porém em altas concentrações de LDL-ox, esse efeito é revertido.

A molécula de colesterol também pode ser oxidada com conseqüente formação de óxidos de colesterol (oxisteróis). O colesterol oxidado na posição 7 pode reduzir o relaxamento dependente do endotélio e a produção de óxido nítrico por células endoteliais (DEKERT et al., 1997). Os óxidos de colesterol são encontrados em

concentrações elevadas nas artérias arteroscleróticas e em lipoproteínas de pacientes hipercolesterolêmicos (VAYA et al., 2001). Já foi demonstrado que, principalmente o 7-cetocolesterol, possuem atividade anti-estrogênica (MURPHY et al., 1985; HWANG e MARTIN, 1989). Essas observações mostram que existe correlação entre a produção de NO, a hipercolesterolemia e a peroxidação lipídica, e que em nosso estudo a redução dos níveis de LDL-colesterol e de CT podem ser traduzidos em redução de PAM em ratas ST e, conseqüentemente, benefícios cardiovasculares.



Atuando também como agonista do estrogênio, o tamoxifeno também pode apresentar ação direta em miócitos vasculares, promovendo relaxamento de anéis de endotélio desnudado a partir de curvas de contração dependente de concentrações de cálcio, sugerindo bloqueio dos canais de cálcio, demonstrando que esta droga tem ação eficaz no relaxamento em anéis epicárdicos de artéria coronariana de animais machos e fêmeas, via endotélio e diretamente no músculo liso vascular, através da ativação dos canais de potássio ativados por cálcio voltagem dependente (BKca), pela fosforilação dependente do GMPc, causando hiperpolarização da célula, que por sua vez reduz a abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  tipo "L" levando ao relaxamento da musculatura lisa vascular. O caminho é dependente do NO e GMPc (WHITE et al., 1995; VALVERDE et al., 1993; MENDELSON e KARAS, 1999).

Neves, et al, em 2004, descreveu que o tamoxifeno também pode atuar na redução de 30% dos níveis séricos de homocisteína, aminoácido formado exclusivamente à partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo, que pode participar da etiopatogenia da doença vascular.

Paralelo ao resultado de redução de PAM, as ratas hipertensas tratadas com tamoxifeno (ST), apresentaram em nosso estudo redução significativa no índice de contratilidade cardíaca verificada através velocidade máxima de desenvolvimento de pressão durante a fase isovolumétrica ( $dP/dt_{max}$ ). Normalmente, a  $dP/dt_{max}$  não é afetada pela pós-carga, e sim pela pré-carga cardíaca. Porém os aumentos da pós-carga são seguidos de redução do volume ejetado nas sístoles subseqüentes, e o montante de sangue residual que permanece na cavidade ventricular acarreta dilatação da câmara cardíaca, onde a força de contração miocárdica é alterada diretamente pelo comprimento dos sarcômeros em repouso e volume intravascular diastólico final (pré-carga), sendo esta uma clássica via de acionamento do mecanismo de Frank-Starling (GILL et al., 2006). É provável que a acentuação da capacidade contrátil promovida pelo estiramento miocárdico inclua modificações da cinética celular do íon cálcio assim com da afinidade de sua ligação com as proteínas contráteis, caracterizando uma intervenção inotrópica (ALLEN e KENTISH, 1985). Esta é a provável justificativa do aumento da  $dP/dt_{max}$  em ratas SC quando comparados as ratas ST. Com atenuação da PAM, encontrada nas ratas ST, a necessidade de acionamento deste mecanismo torna-se reduzida com conseqüente redução da força de contratilidade, sem provavelmente afetar o desempenho cardíaco, já que os valores de  $dP/dt_{max}$  encontrado em ratas ST ainda são maiores que os encontrados em ratas wistar. Em estudos de Bregagnollo et al., 2000, ficou evidenciado que as elevações sustentadas de pressão arterial foram acompanhadas por aumentos significantes nas dimensões diastólicas do VE, caracterizando manobra de aumento do volume ventricular com conseqüente estiramento miocárdico e aumento da  $dP/dt_{max}$ , resultado encontrado no grupo SC de nosso experimento.

Os resultados mostram que o peso úmido de ventrículo esquerdo (VE) foi menor em ratas ST, quando comparada a SC. Como citado anteriormente, o tratamento com tamoxifeno teve início no 1º mês de vida destes animais, onde provavelmente a hipertensão ainda não tinha se instalado. Com o desenvolvimento de níveis pressóricos mais baixos em ratas ST, passou-se a exigir menor desempenho cardíaco com provável prevenção da hipertrofia cardíaca. Maron (2002), relata que à longo prazo a HAS traz como conseqüência à hipertrofia cardíaca ventricular. Esta hipertrofia encontrada em ratas SHR é caracterizada pelo aumento do tamanho das células miocárdicas, alto grau de organização dos sarcômeros, reativação do

programa de genes fetais e alteração da transcrição e translação gênica, resultando no incremento da síntese protéica (SUGDEN e CLERK, 1998). A hipertrofia decorrente de situações patológicas, tais como sobrecarga pressórica aumentada, pode ser mal adaptada e induzir miocardiopatia, insuficiência cardíaca e morte súbita (LORREL e CARABELLO, 2000).

Ogita et al (2004), relatam que os SERMs podem agir de forma similar ao estrogênio reduzindo massa cardíaca. Dessa forma o tamoxifeno pode estar atuando através da estimulação da liberação do fator natriurético atrial, que por sua vez age sobre a guanilato ciclase, inibindo a hipertrofia cardíaca (BARBIKER et al., 2004). Dodds, em 2001, relatou que em ventrículos caninos, o tamoxifeno inibiu a saída de cálcio do retículo sarcoplasmático via um mecanismo de receptores independente do estrogênio. Desde 1980, Sutherland descreveu um modo de ação exclusivo para os SERMs com a identificação de um receptor não reconhecido pelo estrogênio. Possivelmente, estes receptores podem mediar à ação antiproliferativa induzida pelo tamoxifeno em vários tecidos celulares sem expressão de receptores de estrogênio (LEE et al., 2000; ERCOLI et al., 1998). Mercier, 2003, demonstrou em estudos experimentais, que a síntese de DNA em células cardíacas de ratos neonatais foi influenciada pelos SERMs e por antagonistas de receptores de estrogênio, ICI 182,780, ocorrendo uma redução da síntese de DNA em células cardíacas em resposta a 4-OH tamoxifeno e ICI 182,780 via mecanismos independentes de receptores estrogênio.

A redução da massa de VE em ratas ST também pode ser dada pela possível redução da atividade da ECA, com conseqüente redução na produção de Angio-II e modulação dos efeitos da Angio-II ao inibir a expressão gênica de seus receptores AT<sub>1</sub>. A Angio-II também apresenta atividade inotrópica e cronotrópica diretas sobre o coração (FERRARIO et al., 1991). Além disso a Angio-II estimula a migração, proliferação, hipertrofia e síntese protéica das células musculares lisas, dos miócitos cardíacos e dos fibroblastos, por ativar diretamente proto-oncogenes das classes *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* e *erg-1*. A Angio-II também aumenta a expressão de genes que codificam proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e outros (BHAT et al., 1994) e pode aumentar a liberação de catecolaminas como a

noradrenalina e provocar a ativação de receptores  $\alpha$ -1 determinando a hipertrofia cardíaca (KNOWLTON et al., 1993).

Alguns trabalhos descrevem os efeitos benéficos do tamoxifeno no perfil lipídico, em pacientes com câncer de mama, podendo contribuir com o papel desta droga na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Confirmando este dado, encontramos níveis séricos alterados de lipoproteínas ao final de 90 dias de experimento. Encontramos aumento significativo de HDL-colesterol nos grupos tratado com tamoxifeno, normotensos e hipertensos, em relação a seus controles, com aumento de seus níveis séricos de cerca 17,5 % no grupo WT e de 19% no grupo ST. Os níveis de LDL-colesterol e colesterol total (CT) tiveram redução significativa de cerca de 24% e 18% respectivamente, em ambos grupos tratados, normotensos e hipertensos. Apesar da maioria dos estudos demonstrarem hipertrigliceridemia, não encontramos em nosso experimento alterações de triglicerídeos ao final do tratamento. Uma provável justificativa para estas alterações, provocadas pelo uso crônico do tamoxifeno, seria o efeito agonista em receptores de estrógeno no fígado alterando o metabolismo e transporte das lipoproteínas tendo assim um importante papel nas alterações do perfil lipídico, desencadeando a redução do colesterol total e LDL-colesterol, bem como o aumento do HDL-colesterol (MILIONIS et al., 2001). Contribuindo com essa hipótese, Gebrim e Lima (2003) concluíram que o tamoxifeno apresenta ação agonista nos receptores de estrogênio em tecidos como o hepático o que justificaria a redução do nível sérico do colesterol total em 18% devido à diminuição do LDL-colesterol, reduzindo assim as doenças secundárias cardiovasculares.

Sendo assim, o tamoxifeno pode estar atuando via receptores de estrogênio aumentando o fluxo de colesterol da dieta para o fígado, por meio de sua incorporação aos quilomícrons e remanescentes de quilomícrons. Subsequentemente ocorre o fluxo de colesterol para as células do tecido periférico, pela VLDL e LDL, e o retorno para o fígado pelo transporte reverso do colesterol, via HDL. O colesterol, nas células hepáticas, é transformado em ácidos biliares que por sua vez são excretados na bile. O tamoxifeno pode atuar da seguinte forma: a concentração de LDL-colesterol é reduzida devido ao aumento da expressão do receptor para LDL e pela inibição da oxidação da LDL por macrófagos e aumento da

resistência da LDL à oxidação; a HDL-colesterol é aumentada por dois mecanismos: maior secreção de apolipoproteína A-1 que promove aumento na produção de quilomícrons, que por sua vez, participa da formação do HDL-colesterol e menor remoção de seus lipídeos, pois os estrógenos levam a remoção da atividade da lipase hepática (ZHU et al., 1999).

Corroborando com nossos resultados, Cuzick et al. (1993), demonstraram em mulheres uma redução de 12% nos níveis de CT, 22% de redução nos níveis de LDL-colesterol e 14% de redução nos níveis de HDL-colesterol e 19% de aumento nos níveis de triglicédeos. Observaram também um aumento significativo dos níveis de globulinas e redução dos níveis de fibrinogênio sanguíneo. Outros estudos também encontraram resultados semelhantes aos nossos com redução do colesterol total (KE et al, 1997; CUSHMAN et al, 2001), diminuição do LDL-colesterol sem efeito sobre o HDL-colesterol e triglicérido (SCHUSSHEIN e SIRIS, 1998; SEXTON e GHERMAN, 2001; CUSHMAN et al., 2001). Reduzem ainda, o fibrinogênio (CUSHMAN et al., 2001; MORELLO et al., 2001) e inibem a oxidação do LDL-colesterol (SEXTON e GHERMAN, 2001). Relatam ainda que, sendo assim, o uso do tamoxifeno está associado com uma redução em 48% no risco de infarto do miocárdio e 15% na incidência de doença coronariana associada com mortalidade. Mastroanni et al. (2000), observaram resultados semelhantes com mulheres (com idade variando de 44 a 70 anos) que fizeram uso de tamoxifeno.

A importância do HDL-colesterol na proteção da mulher contra a doença coronária ficou bem estabelecida nos estudos de *Framingham* (KANNEL,1987), *Lipid Research Clinics* (BUSH et al., 1987) e *Donolo-Tel-Aviv* (LIVSHITS et al.,1989); onde a redução do HDL-colesterol mostrou-se o maior preditor de risco em mulheres, superando os outros fatores, incluindo o CT. Em particular, a relação  $CT/HDL > 5.0$  associa-se a alto risco de eventos coronários; se o  $CT/HDL > 7.5$ , o risco da mulher fica semelhante ao do homem e admite-se que a relação  $CT/HDL$  é a única dentre as relações entre lípidos que se valoriza como preditor de mortalidade coronária em mulheres (MORENO e MANSON, 1993). Nossos resultados demonstram relação  $CT/HDL$  reduzida no grupo tratado com tamoxifeno ( $WC=3,3$ ;  $WT=2,38$ ;  $SC=3,37$ ,  $ST=2,40$ ) contribuindo assim para a redução dos riscos de eventos cardiovasculares em ratas tratadas com este medicamento.

Os estudos apresentados no *Writing Group for de Womens Health Initiative Investigator*, 2000, demonstram que redução de 1% de LDL e aumento de 1% nos níveis de HDL, reduzem o risco de doença cardíaca em cerca de 2% a 3%. Se levarmos em consideração que a redução de 1% nos níveis plasmáticos de LDL-colesterol reduzem o risco de DCV em 2%, podemos considerar que em nosso estudo os grupos tratados com tamoxifeno tem uma redução nos fatores de risco cardiovascular de cerca de 48%, corroborando com os estudos citados acima. O aumento nos níveis plasmáticos de HDL-colesterol nos grupos tratados reforçam esta hipótese.

Os níveis plasmáticos de transaminases glutâmico-pirúvica (TGP) também sofreram alteração em nosso estudo após o tratamento com tamoxifeno, onde os grupos WT e ST apresentaram elevação desta enzima. O peso úmido do fígado também foi maior em ratas tratadas com tamoxifeno, WT e ST. Estes resultados podem ser justificados por uma provável lesão hepática e possível comprometimento da síntese protéica provocados pelo tratamento crônico com tamoxifeno, uma vez que a biotransformação deste medicamento ocorre a nível hepático e seus metabólitos, os quais possuem perfil farmacológico semelhante ao da droga original, poderiam causar lesão do DNA, já que são indicados como sendo genotóxico e hepatocarcinogênico para o uso em animais (KARKI et al., 2001; WILLIAMS et al., 1993; HAN e LIEHR, 1992; TANNENBAUM, 1997). Dano celular hepático induzido por medicamentos, induzindo um aumento das transaminases glutâmico oxalacética e pirúvica (TGO e TGP). O aumento da TGP em nosso estudo, sem alterações da TGO, provavelmente deve-se ao fato de que a TGP é uma enzima específica hepática servindo como melhor marcador de lesão neste órgão. Já a TGO apresenta atividade também em outros órgãos.

Um dos mecanismos sugeridos por Lim et al., 1994, para a genotoxicidade do tamoxifeno envolve o metabolismo oxidativo. O tamoxifeno é uma droga facilmente absorvida por via oral na forma do sal citrato, metabolizada pelo citocromo P450 no sistema microssomal hepático, resultando em vários metabólitos (JORDAM, 1994; FURR e JORDAM, 1984). A metabolização pelo citocromo P-450 pode levar a alteração da homeostase do cálcio intracelular, produzindo ruptura das fibrilas de actina na superfície do hepatócito, culminando com a lise celular e

consequentemente, aumento de enzimas hepáticas e acúmulo de fibrina (LEE, 2003).

Estudo sobre tamoxifeno utilizando microsossomos hepáticos de roedores tem identificado dois metabólicos primários, alfa-hidroxitamoxifeno ( $\alpha$ -OHTAM) e 4-hidroxitamoxifeno (4-OHTAM) ambos capazes de levar a via do metabolismo secundário, acarretando alterações no DNA mitocondrial (POTTER et al., 1994; DAVIES et al., 1997). Esta via envolve oxidação da 4-OHTAM, que pode se ligar ao DNA mitocondrial promovendo alteração deste, desregulando a oxidação dos ácidos graxos e a produção de energia celular, resultando em estresse oxidativo com aparecimento de metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicérides nas células causando lesão celular e possível esteatose hepática (MOORTHY et al., 1996).

Apesar de estudos demonstrarem que o tratamento com tamoxifeno pode estar associado com aumento do risco de câncer endometrial, trombose, embolia pulmonar e esteatose hepática (SHARMA et al., 2003; LEWS et al., 2000; CAI et al., 2000), observamos alguns alterações relacionados ao uso deste medicamento.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que o tratamento de 90 dias com tamoxifeno promove:

- redução no ganho de peso corporal nos grupos WT e ST, por provável alteração nos hormônios da tireóide e modificação no metabolismo corporal;
- redução no peso úmido dos rins no grupo ST, sugerida pela redução na formação de fibrose pelo aumento do TGF- $\beta$  e redução da PAM;
- redução da FC nos grupos WT e ST por provável estimulação barorreflexa e diminuição da atividade simpática no nodo sinoatrial; redução da PAM e  $dP/dt_{max}$  no grupo ST por aumento da produção da eNOS, inibição da ECA, com suposto aumento da ANGIO 1-7 e redução da atividade simpática;
- redução no peso úmido do VE, por inibição da ECA e consequentemente da ANGIO-II, e por consequência da redução da PAM, sendo sugerido também pelo provável aumento na produção do PNA;
- aumento na produção da HDL-colesterol no grupo ST sugerida pelo aumento da produção de Apolipoproteína-1; redução do LDL-colesterol e CT no grupo WT e ST,

pelo suposto efeito agonista do tamoxifeno em RE no fígado alterando o metabolismo e transporte de lipoproteínas;

- aumento de enzima hepática (TGP) e peso úmido dos rins nos grupos WT e ST, por provável lesão hepática, visto que este medicamento é metabolizado pelo citocromo P-450 no sistema microsomal hepático, podendo causar hepatotoxicidade e hepatocarcinogênese, em animais.

Após estes resultados, podemos concluir que o uso do tamoxifeno em ratas, trouxe benefícios metabólicos, renais e cardiovasculares, porém acompanhados de alterações hepáticas, sugerindo a realização de um estudo clínico para desmistificar os efeitos desta droga no metabolismo corporal, sistema cardiovascular, renal e hepático de mulheres que fazem uso deste medicamento para profilaxia câncer de mama contralateral.

## 6 – REFERÊNCIAS

ALLEN, D.G.; KENTISH, J.C. The cellular basis on the length-tension relation in cardiac muscle. *J Moll Cell Cardiol.* 1985; 17: 821-840.

ARAUJO, L.F.B.; SOARES JUNIOR, J.M.; OLIVEIRA FILHO, R.M.; et al. Effects of conjugated equine estrogens and tamoxifen administration on thyroid gland histomorphology on the rat. *Clinics.* 2006; 61:321-26.

ARTEAGA, C.L.; DUGGER, T.C.; HURD, S.D. The multifunctional role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ s on mammary epithelial cell biology. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 38: 49-56.

ARTEAGA, C.L.; TANDON, A.K.; VON HOFF, D.D.; OSBORNE, C.K. Transforming growth factor  $\beta$ : potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor negative human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1988; 48: 3898-904.

BARBIKER, F.A.; DE WINDT, L.J.; EICKLES, M.V.; GROHE, C.; et al. Estrogenic hormone action in heart: regulatory network and function. *Cardiovascular Research.* 2001; 53: 709-719.

BARBIKER, F.A.; DE WINDT, L.J.; EICKLES, M.V.; GROHE, C.; et al. 17  $\beta$ -estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation.* 2004; 109: 269-276.

BARGMANN, C.I.; HUNG, M.C.; WEINBERG, R.A. The new oncogene encodes an epidermal growth receptor-related protein. *Nature.* 1986; 319: 226-230.

BARRETT-CONNOR, E.; GRADY, D.; SASHEGYI, A.; ANDERSON, P.W.; et al. Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *JAMA.* 2002; 287: 847-857.

BECKMAN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G.; et al. Extensive nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1992; 288: 438-444.

BEEKMAN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G.; et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoop-Seyler*. 1994; 375: 81-88;

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

BHAT, G.J.; THEKKUNIKARA, T.J.; et al. Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor start91 and/or a related protein. *J Biol Chem*. 1994; 26: 31443-31449.

BIAN, Z.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Selective estrogen receptor modulators and coronary heart disease. *Trends Cardiovascular Medicine*. 2001; 11: 196-202.

BONANNI, B.; JOHANSSON, H.; GANDINI, S.; GUERRIERI-GONZAGA, A.; et al. Effect of tamoxifen at low doses on ultrasensitive C-reactive protein in healthy women. *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 2149-2152.

BONDUKI, C.E.; BARACAT, E.D.; HAIDAR, M.A.; LIMA, G.R. Climatério e doenças cardiovasculares. 2001.

BOTTIGLIONI, F.; ALOYSIO, D.; NICOLETTI, G.; MAULONI, M.; MANTUANO, R.; CAPELLI, M. A study of thyroid function in the pre and pos-menopause. *Maturitas*. 1983; 5: 105-114.

BRAITHWAITE, R.S.; CHLEBOWSKI, R.T.; LAU, J.; GEORGE, S.; HESS, R.; COL, N.F. Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. *J Gen Intern Med*. 2003; 18: 937-947.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle do câncer de mama: documento do Consenso 2004. Disponível em <http://www.inca.br/publicações/consensointegra>. Acesso em 21 de abril de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA/Comprev. Incidência de câncer no Brasil em 2006. Rio de Janeiro. 2007.

BREGAGNOLLO, E.A.; OKOSHI, K.; et al. A elastância sistólica final do ventrículo esquerdo determinada durante elevações transitórias e elevações sustentadas da pressão arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2000; 75: 19-25.

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

BROSNIHAN, K.B.; SENANAYAKE, P.S.; LI, P.; FERRARIO, C.M. Bidirectional actions of estrogen on the renin-angiotensin system. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32: 373-381.

BRUHN, T.O.; JACSON, I.M. Abnormalities of the thyroid hormone negative feedback regulation of TSH secretion in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept.* 1992; 38: 221-230.

BURCKHARDT, P. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM): New substances for hormone replacement therapy. 1999.

BUSH, T.L.; BARRET-CONNOR, E.; COWAN, L.D.; CRIQUI, M.H.; WALLACE, R.B.; SUCHINDRAN, C.M.; et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation.* 1987; 75: 1102-1109.

BUTTA, A.; MACLENNAN, K.; et al. induction of transforming growth factor beta in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res.* 1992; 52:4261-4264.

BYYNY, R.L.; SPEROFF, L. The rectangularization of life. In: Byyny, R.L.; Speroff, L. editors. A clinical guide for the care of older women: primary and preventive care. 2nd ed. *Baltimore: Williams & Williams*, 1996. p.1-19.

CAI, Q.; BENSEN, M.; GREENE, R.; KIRCHNER, J. Tamoxifen-induced transient multifocal hepatic fatty infiltration. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 277-279.

CARLSON, R.W. Scientific review of tamoxifen. Overview from a medical oncologist. *Semin Oncol.* 1997; 24: Suppl 1: S1-151-S1-157.

CHAUDHURI, P.K.; PATEL,N.; SANDBERG, L.; PRINZ, R.A. Distribution and characterization of steroid hormone receptors in human thyroid tissue. *World J Surg*. 1986; 10: 737.

CLARKE, S.C.; SCHOFIELD, P.M.; GRACE, A.A.; METCALFE, J.C.; KIRSCHENLOHR, H.L. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation*. 2001; 103: 1497-1502.

CLARKSON, T.B.; ANTHONY, M.S.; KLEIN, K.P. Effects of estrogen treatment on arterial wall structure and function. *Drugs*. 1994; 47 (Suppl 2): 42-51.

COELHO, A. R. B. et al. Estudo Epidemiológico para Processo de Regionalização no Estado do Espírito Santo segundo os princípios da Norma Operacional da Assistência NOAS/2002/Portaria 737/GM em 27/02/02. Vitória, 2003.

COLDITZ, G.; WILLET, W.C.; et al. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1105-1110.

CONSTANTINO, J.P.; KULLER, L.H.; IVES, D.G.; FISHER, B.; DIGNAM, J. Coronary heart disease mortality and adjuvant tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89: 776-782.

CUSHMAN, M.; CONSTANTINO, J.P.; TRACY, R.P.; SONG, K.; BUCKLEY, L.; ROBERTS, J.D.; KRAG, D.N. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 255-261.

CUZICK, J.; BAUM, M. Tamoxifen and contralateral breast cancer. *Lancet*. 1985; 2:282-284.

CUZICK, J.; POWLES, T.; VERONESI, U.; FORBES, J.; EDWARDS, R.; ASHLEY, S.; BOYLE, P. Overview of the main outcomes in breast cancer prevention trials. *Lancet*. 2003; 361: 296-300.

CUZICK, J.; ALLEN, D.; BAUM, M.; BARRET, J.; CLARK, G.; KAKKAR, V.; ET AL. Long term effects of tamoxifen. Biological effects of Tamoxifen Working Party. *Eur J Cancer*. 1993; 29A: 15-21.

D'ANGELO, S.A. Simultaneous effects of estradiol on TSH secretion and adrenocortical function in male and female rats. *Endocrinology*. 1968; 82: 1035-1041.

DARLEY –USMAR, V.M.; HOGG, N.; et al. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 1992; 17: 9-20.

DANTAS, A.P.V.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z.B. et al. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34: 914-919.

DARLEY-USMAR, V.M.; HOGG, N.; O' LEARY, V.J.; MONCADA, S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radc Res Commun*. 1992; 17: 9-20.

DAVIES, R.; OREFFO, V.I.; MARTIN, E.A.; FESTING, M.F.; WHITE, I.N.; SMITH, L.L.; STYLES, J.A. Tamoxifen causes gene mutations in the livers of lambda/lacI transgenic rats. *Cancer Res*. 1997; 57: 1288-1293.

DEKERT, V.; PERSEGOL, L.; VIENS, L.; et al. Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins: cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation*. 1997; 95: 723-731.

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; 305: 225-226.

DEWITT, D.S.; MATHEW, B.P.; CHAISSON, J.M.; PROUGH, D.S. Peroxynitrite reduces vasodilatory responses to reduced intravascular pressure, calcitonin gene-related peptide, and cromakalim in isolated middle cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21: 253-261.

DODDS, M.L.; KARGACIN, M.E.; KARGACIN, G.J. Effects of anti-estrogens and  $\beta$ -estradiol on calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum. *Br J Pharmacol*. 2001; 132: 1374-1382.

DONDA, A.; REYMOND, 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: 577-584.

DUTERTRE, M.; SMITH, C.L. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERMS) action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000; 294: 431-437.

EARLY BREAST CANCER TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. *Lancet*. 1992; 339: 1-15.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer : an overview of the randomized trials. *Lancet*. 1998; 351: 1451-1467.

ERCOLI, A.; SCAMBIA, G. FATTOROSSI, A. Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182,780 and Tamoxifen in an estrogen receptor-negative ovarian cancer cell line. *Int J Cancer*. 1998; 76: 47-54.

FACINA, G.; BARACAT, E.C.; LIMA, G.R.; GEBRIM, L.H. Efeitos de diferentes doses de tamoxifeno sobre a proliferação celular do epitélio mamário. *Rev Bras Ginecol Obstetr*. Rio de Janeiro; 2003.vol. 25, n.3.

FANIDI, A.; COURION-GUICHARDAZ, C.; et al. effects of tamoxifen, tamoxifen metabolites, and nafoxidine on adenosine 3'5' monophosphate phosphodiesterase: correlations with growth inhibitory activities but not estrogen receptor affinities. *Endocrinology*. 1989; 125(3): 1187-1193.

FERRARA, C.M.; LYNCH, N.A.; NICKLAS, B.J.; RYAN, A,S.; BERMAN, D.M. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *The Journal of Clinic Metabolism*. 2002; 87(9): 4166-4170.

FERRARIO, C.M.; JAISWAL, N.; YAMAMOTO, K.; DIZ, D.I.; SCHIAVONE, M.T. Hypertensive mechanisms and converting enzyme inhibitors. *Clin Cardiol*. 1991; 14: 56-62.

FIELDING, C.J.; BIST, A.; FIELDING, P.E. Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 3753-3758.

FIGTREE, G.A.; WEBB, C.M.; COLLINS P. Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium, nitric oxide, and estrogen receptor –dependent mechanism. *J Pharmacol and Experim Therap*. 2000; 295: 519-523.

FINK, A.K.; GURWITZ, J.; RAKOWSKI, W.; GUADAGNOLI, R.; SILLIMAN, R.A. Patient beliefs and tamoxifen discontinuance in older women with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncology*. 2004; v-22, n-16: 3309-3315.

FISHER, B.; CONSTANTINO, J.P.; WICKERHAM, D.L.; REDMOND, C.K.; et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1371-1388.

FISHER, B.; POWLES, T.J.; PRITCHARD, K.J. Tamoxifen for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 142-150

FORSTERMANN, U.; POLLOCK, J.S.; SCHMIDT, H.H.; HELLER, M.; MURAD, F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/ nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 1788-1792.

FOURNIER, M; MUNSTER, P.; SEIDMAN, A.D. Update on the management of advanced breast cancer. *Oncology (Huntingt)*. 1999; 13: 647-658.

FURR, B.J.; JORDAN, V.C. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther*. 1984; 25: 127-205.

GEBARA, O.C.E.; ALDRIGHI, J.M. Terapêutica de reposição hormonal em cardiologia. In: BATLOUNI, M; RAMIRES J.A.F. – (orgs). *Farmacologia e Terapêutica Cardiovascular*. São Paulo: Atheneu, 1999. p.567.

GEBRIM, L.H.; LIMA, G.R. Quimioprevenção primária e secundária do carcinoma de mama. In: Prado, F.C.; Ramos, J.; Valle, J.R. *Atualização Terapêutica*. São Paulo: Artes Médicas .2003. 21 ed.

GESQUIERE, L.; LOREAU, N.; BLANCHE, D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterolenriched high density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23: 541-547.

GILL, R.M.; JONES, B.D.; et al. Exhaustion of the Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure induced by chronic coronary microembolization. *Elsevier*. 2006; 79: 536-544.

GOLDHIRSH, A.; GLICK, J.H.; GELBER, R.D.; et al. Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3817 -3827.

GRAIGER, D.J. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 399-404.

GRAINGER, D.J.; METCALFE, J.C. Tamoxifen: teaching and old drug new tricks. *Nat Med*. 1996; 2: 381-385.

GRAINGER, D.J.; SCHOFIELD, P.M. Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence. *Circulation*. 2005; 112:3018-3924.

GRAINGER, D.J.; WITCHELL, C.M.; METCALFE, J.C. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med*. 1995; 1: 1067-1073.

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

GREENE, G.L.; GILNA, P.; WALTERFIELD, M.; BAKER, A.; HORT, Y.; SHINE, J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986; 231: 1150-1154.

GROHÉ, C.; KAHLERT, S.; LOBBERT, K; STIMPEL, M.; KARAS, RH.; VETTER, H.; NEYSES, L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *Febs Lett.* 1997; 416: 107-112.

HAN, S.Z.; KARAKI, H.; OUCHI, Y.; AKISHITA, M.; ORIMO, H. 17 $\beta$ -estradiol inhibits Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release induced by tromboxane A2 in porcine coronary artery. *Circulation.* 1995; 91: 2619-2626.

HAN, X.L.; LIEHR, J.G. Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res.* 1992; 52: 1360-1363.

HIRATA, K.; MIKI, N.; KURODA, Y.; SAKODA, T.; KAWASHIMA, S.; YOKOYAMA, M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1995; 76: 958-962.

HISHIKAWA, K.; NAKAKI, T.; MARUMO, H.; et al. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 1995; 360: 291-293.

HOELTING, T.; SIPERSTEIN, A.; DUH, Q.; CLARK, O.H. Tamoxifen inhibits growth, migration, and invasion of human follicular and papillary thyroid cancer cell in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(1): 308-313.

HONG, MK; et al. Effects of estrogen replacement therapy on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *American Journal Cardiology.* 1992; 69: 176- 178.

HOZUMI, Y.; KAWANO, M.; SAITO, T.; MIYATA, M. Effect of tamoxifen on serum lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 8: 1633-1635.

HWANG, P.I.; MATIN, A. Interactions of sterols with antiestrogen-binding sites: structural requirements for high-affinity binding. *J Lipid Res.* 1989; 30: 239-245.

JENSEN, E.V.; DESOMBRE, E.R. Estrogen-receptor interaction. *Science.* 1973; 182; 126-134.

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

JIANG, C.; SARREL, P.M.; POODLE-WISON, P.A.; COLLINS, P. Acute effect of 17 $\beta$ -estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol.* 1992; 263: H271-H275.

JORDAM, V.C. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; 31: 41-52.

JORDAM, V.C. Tamoxifen- for the treatment and prevention of breast cancer. 1<sup>a</sup> ed. Chicago: *Northwestern University Medical School.* 1999; p.30.

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

KANNEL, W. B. Menopause and risk of cardiovascular disease: Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1976; 85: 447-52.

KANNEL, W.B. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. *Am Heart J.* 1987; 114: 413-419.

KARAS, R.H.; PATTERSON, B.L.; MEDELSONH, M.E. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation.* 1994; 89: 1943-1950.

KARKI, A.; MANTYLA, E.; et al. Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on rat hepatocarcinogenesis. *Arch Toxicol.* 2000; 74: 249-256.

KATZENELLENBOGEN, B.S.; KATZENELLENBOGEN, J.A. Defining the "S" in SERMS. *Science.* 2002; 295: 2380-2381.

KE, H.Z.; CHEN, H.K.; SIMMONS, H.A.; et al. Comparative effects of droloxifene, tamoxifen, and estrogen on bone, serum cholesterol, and uterine histology in the ovariectomized rat model. *Bone.* 1997; 20: 31-39.

KELLY, M.; LOOSE, M.D.; RONNEKLEIV, O.K. Estrogen suppresses  $\mu$ -opioid- and GABAB-mediated hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons. *J Neurosci.* 1992; 12: 2745-2750.

KIM, H.P.; LEE, J.Y.; JEONG, J.K.; et al. Nongenomic stimulation of nitric oxid release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263: 257-262.

KIM, Y.D.; CHEN, B.; BEAUREGARD, J.; et al. 17- $\beta$  estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1996; 94: 2901-2908.

KITLER, M.E. Coronary disease: are there gender differences. *Eur Heart*. 1994; 15: 409-417.

KLEIN-HITPASS, L.; SCHORPP, M.; WAGNER, U.; RYFFEL, G.U. An: estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in the transfected human cells. *Cell*. 1986; 46:1053-1061.

KNOWLTON, K.U.; MICHEL, M.C.; et al. The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1993; 268: 15374-15380.

KONKLE, B.A. Thrombophilic states in women- special concerns. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2001; 325-330.

KUIPER, G.G.; ENMARK, E. PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 93: 5925-5930.

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

LANCASTER, J.J.R. Nitric Oxide: principles and actions. *Academic Press*. 1996.

LAWRENCE, A.J.; JARROT, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol*. 1996; 48: 21-53.

LEE, T.H.; CHUANG, L.Y.; HUNG, W.C. Induction of p21 expression via Sp1-binding sites by tamoxifen in estrogen receptor-negative lung cancer cells. *Oncogene*, 2000; 19: 3766-3773.

LEE, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 2003; 349: 474-485.

LERNER DJ, KANNEL WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986; 111: 383-390.

LEWIS, J.; JORDAN, V.C. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Elsevier*. 2005; 591: 247-263.

LEWIS, L.S.; BROWN, K.; CARTHEW, P.; LIM, C.; MARTIN, E.A.; STYLES, J.; WHITE, I. Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen: risk on opportunities. *Crit Rev Toxicol*. 2000; 30: 571-594.

LIEBERMANN, E.H.; GERHARD, M.D.; UEHATA, A.; WALSH, B.W.; et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated, vasodilatation in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1994; 121: 936-941.

LIM, C.K.; YUAN, Z.X.; LAMB, J.H.; WHITE, I.N.; DE MATTEIS, F.; SMITH, L.L. A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse and human liver chromosomes. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 589-593.

LIU,C.C.; KUO, T.B.; YANG, C.C.H. Effects of estrogen on gender-related autonomic differences in humans. *Am J Physiol*. 2003; 285: 188-193.

LIVSHITS, G.; WEISBORT, J.; MESHULAM, N.; BRUNNER, D. Multivariate analysis of the 20-year follow-up of the Donolo-Tel-Aviv Prospective Coronary Artery Disease Study and the usefulness of high density lipoprotein cholesterol percentage. *Am J Cardiol*. 1989; 63: 676-681.

LOBO, R.A. Estrogen and cardiovascular disease. *Ann NY Acad Sci*. 1990a; 592: 286-294.

LORELL, B.H.; CARABELLO, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000; 102: 470-479.

LOSORDO, D.W.; KEARNEY, M.; KIM, E.A.; et al. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994; 84: 1501-1510.

LOVE, R.R.; WIEBE, D.A.; FEYZI, J.M.; NEWCOMB, P.A.; CHAPPELL, R.J. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 1534-1539.

LOVE, R.R.; WIEBE, D.A.; NEWCOMB, P.A.; CAMERON, L.; LEVENTHAL, H.; JORDAM, V.C.; FEYZI, J.; DEMETS, D.L. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 1991; 115: 860-864.

LOVE, R.R.; MAZESS, R.B.; BARDEN, H.S.; ET AL. Effects of tamoxifen on bone mineral content in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med*. 1991; 326: 852-856.

LUZ, P. L.; SOLIMENE, M.C. Peculiaridades da doença arterial coronária na mulher. Artigo de revisão. *Associação Médica Brasileira*. 1999;

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 29-38.

MANSUR, A.P.; RAMIRES, J.A.F. Doença arterial coronária na mulher. In Sousa AGM, Mansur A.J. SOCESP. *Cardiologia*. São Paulo. Ed Atheneu. 1996, 2º v: p448-451.

MARCOLONGO, R., TAROLINI, I., LAVEDER, F., et al. Immunosuppression therapy of idiopathic retroperitoneal fibrosis: a retrospectively analysis of 26 cases. *Amer J Med*. 2004; 116: 194-197.

MARON BJ: Hipertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA*. 2002; 287: 1308.

MARTIN, A.M.; WEBER, B.L. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1126-1135.

MASTROANNI, A.; BELLATI, C. Increased plasma HDL-cholesterol and apo A-1 in breast cancer patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Can Soc Clin Chem.* 2000; 33: 513-516.

MCDONALD, C.C.; STEWART, H.J. Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial: the Scottish Breast Cancer Committee. *BMJ.* 1991; 303:435-437.

MEDINA, P.; PAYRE, B.L.; BERNARD, J. et al. Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 308; 1165-1173.

MENDELSONH, M.E.; KARAS, R.H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1997; 340: 1801-1811.

MERCIER, I.; MADER, S.; CALDERONE, A. Tamoxifen and ICI 182,780 negatively influenced cardiac cell growth via an estrogen receptor-independent mechanism. *Elsevier.* 2003; 59: 883-892.

MILIONIS, H.J.; LIBEROPOULUS, E.N.; ELISAF, M.S. Tamoxifen-induced hypertriglyceridemia in association with diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 2001; 27:160-163.

MOORTHY, B.; SRIRAM, P.; PATHAK, D.N.; BODELL, W.J. Randerath, tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed in vivo. *Cancer Res.* 1996; 56: 53-57.

MORALES, M.; SANTANA, N.; SORIA, A.; MOSQUEIRA, A. et al. Effects of tamoxifen on serum lipid and apolipoprotein levels post menopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 40: 265-270.

MORELLO, K.C.; WURZ, G.T.; DE GREGORIO, M.W. SERMs: current status and future trends. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology.* 2002; 43: 63-73.

MORENO, G.T.; MANSON, J.E. Cholesterol and coronary heart disease en women: an overview of primary and secondary prevention. *Cor Art Dis*. 1993; 4:580-587.

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

MUGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M.; KUHN, M.; LICHTLEN, P.R. Endothelium independent relaxion of human coronay arteries by 17 $\beta$ -estradiol in vitro. *Cardiovasc Res*. 1993; 27: 1939-1942.

MUGGE, A.; RIEDEL, M.; BARTON, M.; KUHN, M.; LICHTLEN, P.R. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 $\beta$ -estradiol in vitro. *Cardiovas Res*. 1999; 27: 1939-1942.

MURPHY, P.R.; BRECKENRIDGE, W.C.; LAZIER, C.B. Binding of oxygenated cholesterol metabolites to antiestrogen binding sites from chicken liver. *Biochem Bioph Res Commun*. 1985; 127: 786-792.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: Consensus development statement: Adjuvant therapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93: 979-989.

NEVES, L.B.; MACEDO, D.M.; LOPES, A.C. Hemocisteína. Artigo de revisão. *J Bras Patol Med Lab*. V.40. 2004; 5: 311-320.

NOGUEIRA JUNIOR, F.C.; COELHO, D.A; ALMEIDA, M.M.C.; et al. Efeito do tamoxifeno no perfil lipídico de ratos diabéticos por streptozotocina. *Acta Cir Bras*. 2005; vol 20.

O'BRIEN, T.; NGUYEN, T.T. Lipids and lipoproteins in women. *Mayo Clin Proc*. 1997; 72: 235-244.

OGITA, H.; NODE, K.; et al. Raloxifene prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in pressure-overloaded mice. *Hypertension*. 2004; 43: 237-242.

O'MALLEY, C.A.; HAUTAMAKI, R.D.; KELLEY, M.; MEYER, E.M. Effects of ovariectomy and estradiol benzoate on high affinity choline uptake, ACh syntesis, and release from rat cerebral cortical synaptosomes. *Brain Res*. 1987; 403:389-392.

OPARIL, S. Hormone and vasoprotection. *Hypertension*. 1999; 33: 170-176.

ORSHAL, J.M.; KHALIL, R.A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: 233-249.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G.G.; NILSON, S.; GUSTAFFSON, J.A.; KUSHNER, P.J.; SCALAN, T.S. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. 1997; 277: 1508-1510.

PARK, W.C.; JORDAM, V.C. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in the breast cancer prevention. *Trends Mol Med*. 2002; 8: 82-88.

PASQUALI, R.; CASIMIRRI, F.; PASCAL, G.; et al. Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution and hormonal milieu. Virgilio Menopause Health Group. *Jornal Inter Med*. 1997; 241: 195-203.

PELLETIER, G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol*. 2000; 15: 1261-1270.

PELZER, T, et al. The estrogen receptor- $\alpha$  agonist 16 $\alpha$ -LE2 inhibits hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascula Researsh*. 2005; 67: 6004-6012,

PFEILSCHIFTER, J.; KODITZ, R.; PFOHL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 2002; 23: 90-119.

POTIER, M, et al. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and pro-sclerotic response to estrogens. *American Journal of Pathology*. 2002. 160 (5): 1877-85.

POIROT, M.; CHAILLEUX, C.; FARGIN, A. A potent and selective photoaffinity probe for the anti-estrogen binding site of rat liver. *J Biol Chem*. 1990; 265: 17039-17043.

POTTER, G.A.; MCCAGUE, R.; JARMAN, M. A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism. *Carcinogenesis*. 1994; 15: 439-442.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; ROSSOUW, J.E.; SISCOVICK, D.S.; MOUTON, C.P.; et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. 2002; 288: 980-987.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biop Hys*. 1991; 288: 481-487.

REIS, E.S.; CONSTANTINO, J.P.; WICKERHAM, D.L.; TAN-CHIU, E.; WANG, J.; KAVANAH, M. Cardiovascular effects of tamoxifen in women with and without heart disease: breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Instit*. 2001; 93: 16-21.

ROSENDAL, F.R.; HELMERHOST, F.M.;VANDEBROUCKE, J.P. Female hormones and trombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Bil*. 2002; 22: 210-218.

ROSSI, R.; GRIMALDI, T.;ORIGLIANI, G.; et al. Menopause and cardiovascular risk. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002; 32: 325-328.

RUSSEAL, 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.

RUTQVIST, L.E.; MATTSSON, A. Cardiac and thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of adjuvant tamoxifen. The Stockholm Breast Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1993; 85: 1398-1406.

SARREL, P.M. Cardiovascular disease in women: implication of hormone replacemente therapy. *International Journal of Fertility*. 1996; 41: 90-93.

SCHUSSHEIM, D.H.; SIRIS, E.S. Osteoporosis: update on prevention and treatment-selective receptor hormone modulators are latest option. *Women Health Primary Care*. 1998; 1: 133-140.

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

SHARMA, M.; SHUBERT, D.E.; SHARMA, M.; LEWIS, J.; MCGARRIGLE, B.P.; et al. Biotransformation of tamoxifen in a human endometrial explant culture model. *Chem. Biol Interact*. 2003; 146: 237-249.

SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: as enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissues sections. *J Histochem Cytochem*. 1991; 39: 741-748.

SI, M.L.; AL-SHARAFI, B.; LAI, C.C.; KHARDORI, R.; CHANG, C.; SU, C.Y. Gender difference in cytoprotection induced by estrogen on female and male bovine aortic endothelial cells. *Endocrine*. 2001; 15: 255-262.

STONE, N.J. Secondary causes of hiperlipidemia. *Med Clin N Am*. 1999; 78: 117-141.

STRUNK, V.; HAHNENKAMP, K.; et al. Selective eNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium- dependente vasodilatation. *Anesth Analg*. 2001; 92: 681-687.

SUGDEN, P.H.; CLERK, A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 1998; 76: 725-746.

SUTHERLAND, R.L.; MURPHY, L.C.; MING, S.F. High affinity anti-estrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature*. 1980; 288: 273-275.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension*. 1996; 28: 576-582.

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

TALMAN, W.T.; GRAMATA, A.R.; REIS, D.J. Glutamatergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius in blood pressure control. *Federation Proc*. 1984; 43: 39-44.

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

TANNENBAUM, S.R. Comparative metabolism of tamoxifen and DNA adduct formation and in vitro studies on genotoxicity. *Semin Oncol*. 1997; 24: S1-1-S1-6.

THE WRITING GROUP FOR THE PEPI TRIAL. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA*. 1995; 273: 199-208.

TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36:1143-1158.

UTSUMI, T.; HARADA, N.; MARUTA, M. TAKAGI, Y. Presence of alternative spliced transcripts of aromatase gene in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 2344-2349.

VALVERDE, M.A.; ROJAS, P.; AMIGO, J; COSMELLI, D.; ORIO, P.; BACHAMONDE, M.I.; et al. Acute activation of Maxi-kchannels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*. 1993; 285: 1929-1931.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction an inhibition of converting enzyme. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2000; 7(1): 14-23.

VAYA, J.; AVIRAM, M.; MAHMOOD, S.; et al. Selective distribution of oxysterols in atherosclerotic lesions and human plasma lipoproteins. *Free Radic Res*. 2001; 34: 485-497.

VENKOV, C.D.; RANKIN, A.B.; VAUGHAN, D.E. Identification of authentic estrogen receptor in culture endothelial cells: a potential mechanisms for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*. 1996; 94: 727-733.

WADE, G.H.; HELLER, H.W. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. 2003.

WATANOBE, H.; TAKEBE, K. Role of postnatal gonadal function in the determination of thyrotropin (TSH) releasing hormone-induced TSH response in adult male and female rats. *Endocrinology*. 1987; 120: 1711-1718.

WELTY, F.K. Women and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*. 2001; 88: 48J-52J.

WENGER, N.K. Coronary heart disease: older woman's major health risk. In: Barrett-connor, E.; Cox, D.A; Anderson, P.W. The potential of SERMs for reducing the risc of coronary hearth disease. *TEM*. 10(8):320-325.

WHITE, R.E.; DARKOW, D.J.; LANG, J.L. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a GMPc-dependet mechanism. *Circ Res*. 1995; 77: 936-942.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J.; DJORDJEVIC, M.V.; KALTENBERG, O.P. The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 315-317.

WILLIAMS, J.K.; HONORE, E.K.; ADAMS, M.R. Contrasting effects of conjugated estrogens and tamoxifen on dilator responses of atherosclerotic epicardial coronary arteries in nonhuman primates. *Circulation*. 1997; 96: 1970-1975.

WILLIAMS, J.K.; WAGNER, J.D.; LI, Z.; GOLDEM, D.L.; ADAMS, M.R. Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 403-408.

WONG, M.; MOSS, R.L. Long-term and short-term electro-physiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci*. 1992; 12: 3217-3225.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progesterone in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2000; 288: 321-333.

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: 730-741.

ZHU, X.; BONET, B.; GILLENWATER, H.; KNOPP, R.H. Opposing effects of estrogen and progestins on LDL oxidation and vascular wall cytotoxicity: implications for atherogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222: 214-221.

ZIDAN, J.; RUBENSTEIN, W. Effect of adjuvant tamoxifen therapy on thyroid function in postmenopausal woman with breast cancer. *Oncology*. 1999; 56: 43-45.