

Mariana Veronez Borgo

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO
CORONARIANO DE RATAS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gláucia Rodrigues de Abreu.

VITÓRIA
2009

MARIANA VERONEZ BORG

**EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DO LEITO
CORONARIANO DE RATAS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSAS**

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

Aprovada em 17 de dezembro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof.^a: Dr.^a. Margareth Ribeiro Moysés

Prof.: Dr. Tadeu Uggere de Andrade

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, Dezembro de 2009.**

DEDICO ESTE TRABALHO

*Ao meu amor Bernardo e a
minha filha do coração Larissa,
sem os quais essa conquista não
teria sentido.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de crescimento.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu por acreditar em mim, me apoiar e em alguns momentos ter sido um pouco mais que orientadora.

A meus pais Mara e Robson e meus irmãos Pablo, Lia e Eric por estarmos juntos nessa caminhada.

Ao meu amor e companheiro de vida Bernardo que me apoiou incondicionalmente sem questionar minhas ausências e me estimulou a prosseguir sempre.

À minha filha do coração Larissa por quem busco ser melhor a cada dia.

Aos colegas do laboratório Andressa, Cintia, Walckiria, Edineusa, Patrick, Washington, Lazaro e Luiz Henrique pelo apoio, e ensinamentos.

À Prof^a. Dra. Margareth por abrir as portas do laboratório e auxiliar nos momentos difíceis.

À Prof^a. Dra. Sônia Golvea por sempre apoiar e auxiliar com carinho a todos no laboratório.

A todos os professores e funcionários do departamento que direta ou indiretamente participaram dessa conquista.

Muito obrigada!

Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.

Victor Hugo

RESUMO

Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência de doença cardiovascular e fatores de risco como hipertensão arterial é menor em mulheres na pré-menopausa que em mulheres no período pós-menopausal. Esses dados podem estar relacionados, pelo menos em parte, com a deficiência de estrogênio característica da menopausa. A terapia de reposição hormonal (TRH) traz efeitos benéficos sobre fatores metabólicos e vasculares diminuindo a incidência de doenças cardiovasculares. Entretanto, ensaios clínicos são controversos quanto a esses efeitos, nesse contexto tem-se aumentado o interesse clínico por diferentes terapias de reposição de estrógenos de baixa dose.

O tamoxifeno é um agente não esteroideal classificado como Modulador Seletivo do Receptor de Estrogênio (SERM) por suas ações específicas, agindo como agonista ou antagonista dos receptores de estrogênio, em diferentes tecidos, sendo utilizado como terapia adjuvante no tratamento do câncer da mama estrogênio dependente, na maioria dos casos em pacientes na pós-menopausa. No entanto muitos efeitos que essa droga exerce sobre o sistema cardiovascular ainda não estão totalmente elucidados. Dessa forma o objetivo do presente estudo consiste em conhecer os efeitos do tratamento crônico com tamoxifeno sobre a pressão arterial, função cardíaca e reatividade vascular.

Foram utilizadas ratas SHR divididas em quatro grupos: controle (SC), tratado com tamoxifeno (ST), ooforectomizado controle (SOC) e ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT). Os animais foram tratados durante 90 dias pelo método de gavagem. Foram avaliados os seguintes parâmetros: PA, FC, $dP/dT_{\text{máx}}$ e reatividade vascular coronariana em coração isolado pelo método de Langendorff.

Os resultados demonstraram que o tamoxifeno atenua a elevação de pressão arterial presente em animais ooforectomizados (SOC), reduz da frequência cardíaca (FC) e atenua o índice de contratilidade cardíaca ($dP/dT_{\text{máx}}$). Além disso, a reatividade vascular coronariana foi alterada, mostrando menor resposta vasoconstrictora do à acetilcolina e maior resposta vasodilatadora à adenosina.

Esses resultados destacam a importância dos efeitos potencialmente benéficos do tamoxifeno sobre reatividade vascular coronariana por mecanismos que podem contribuir na proteção contra doenças cardiovasculares e seus fatores de risco, associados à terapia de reposição hormonal.

Palavras Chave: Tamoxifeno, estrogênio, hipertensão, reatividade vascular.

ABSTRACT

Epidemiologic studies have demonstrated a decreased incidence of cardiovascular disease and risk factors in pre-menopausal women when compared with post-menopausal women. These results may be related, at least in part, with a significant decrease in the release of estrogen in menopause. Hormone reposition therapy (HRT) benefits metabolic and vascular factors, reducing the incidence of cardiovascular diseases. However, clinical trials are controversial as to their effects augmenting clinical interest over different replacement therapy low dose estrogen.

Tamoxifen is a non-steroidal agent classified as a selective estrogen receptor modulator (SERM) for its specific actions, acting as an agonist or antagonist of estrogen receptors in deferent tissues. It is used as adjuvant therapy in estrogen dependent breast cancer, mostly in post-menopausal patients; however the cardiovascular effects of this drug have not been totally elucidated. The goal of this study is to identify the chronic tamoxifen effects on the blood pressure, cardiac function and coronary vascular reactivity.

SHR rats were divided in four groups: control (SC), tamoxifen treated (ST), ovariectomized control (SOC) and ovariectomized tamoxifen treated (SOT). The animals were treated during 90 days using the gavage method. BP, HR, dP/dTmax and coronarian vascular reactivity, in Langendorff method isolated hearts were evaluated.

The results demonstrated that tamoxifen attenuates the elevated blood pressure present in ovariectomized animals (SOC), reduces heart rate (HR) and the cardiac contractility index (dP/dTmax).

Coronary vascular reactivity was also affected with reduced vasoconstriction to acetylcholine and increased vasodilation to adenosine. These results show the importance of the potential benefic effects of tamoxifen over coronarian vascular reactivity through mechanisms that may contribute to the protection against cardiovascular diseases and their risk factors.

Keywords: Tamoxifen, estrogen, hypertension, vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos receptores de estrogênio α e β	18
Figura 2: Sinalização genômica e não-genômica do receptor de estrogênio em células vasculares.	20

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Medidas da Pressão arterial média nos grupos: não tratado (SC), tratado com tamoxifeno (ST), ooforectomizado não tratado (SOC) e ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT)..30
- Gráfico 2: Medidas de pressão arterial (mmHg) nos grupos não tratado (SC), tratado com tamoxifeno (ST), ooforectomizado não tratado (SOC) e ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT). (A) Pressão arterial sistólica.31
- Gráfico 3: Frequência cardíaca nos grupos hipertensos não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT).32
- Gráfico 4: Valores de pressão de perfusão coronariana basal (PPC) em corações de ratas hipertensas não tratadas (SC), hipertensas tratadas com tamoxifeno (ST), hipertensas ooforectomizadas não tratadas (SOC) e hipertensas ooforectomizadas tratadas com tamoxifeno (SOT)..33
- Gráfico 5: Valores de dP/dT máxima em corações de ratas hipertensas não tratadas (SC), hipertensas tratadas com tamoxifeno (ST), hipertensas ooforectomizadas não tratadas (SOC) e hipertensas ooforectomizadas tratadas com tamoxifeno (SOT)...34
- Gráfico 6: Valores de PPC expressos em delta de contração do leito coronariano com doses crescentes de acetilcolina nos grupos: hipertenso não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT).35
- Gráfico 7: Valores de PPC expressos em delta de dilatação do leito coronariano com doses crescentes de adenosina nos grupos: hipertenso não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT).36

LISTA DE SIGLAS

AF-1: Local do receptor de estrogênio com função de ativação de transcrição independente de hormônios

AF-2: Local do receptor de estrogênio com função de ativação de transcrição dependente de hormônios

BK⁺_{Ca}: Canais de potássio dependentes de cálcio

CMLV: Célula do músculo liso vascular

DBD: Local do receptor de estrogênio de interação com a molécula de DNA

DCV: Doenças cardiovasculares

dP/dT_{máx}: derivada de pressão / derivada de tempo, índice de contratilidade cardíaca

E₂: Estradiol

EPM: Erro padrão da média

ERE: Elementos de resposta ao estrogênio

FC: Frequência cardíaca

GPR30 ou GPER: Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HSP90: Heat shock protein 90, denominada também como chaperone protein

IAM: Infarto agudo do miocárdio

K⁺_{ATP}: Canais de potássio sensíveis a ATP

K⁺_V: Canais de potássio dependentes de voltagem

LBD: Local do receptor de estrogênio com Função de interação com o ligante

LDL: Lipoproteína de alta densidade

L-NNA: N-nitro-L-arginina

MAPK: Proteína Kinase Ativada por Mitógeno

PAM: Pressão arterial média

RE: Receptor de estrogênio

TRH: Terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	25
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	25
3.3.1	CASTRAÇÃO DOS ANIMAIS.....	25
3.3.2	TRATAMENTO COM TAMOXIFENO.....	26
3.3.3	CATETERIZAÇÃO.....	26
3.3.4	MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	26
3.3.5	CORAÇÃO ISOLADO.....	27
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL:.....	28
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA.....	30
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE AS PRESSÕES ARTERIAIS SISTÓLICA E DISTÓLICA.....	31

4.3	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A FREQUÊNCIA CARDÍACA	32
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA BASAL	33
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE O ÍNDICE DE CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA	34
4.6	EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA.....	35
5	DISCUSSÃO	37
6	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular constitui-se importante problema de saúde na maioria dos países industrializados, com uma prevalência nos Estados Unidos, de 42,7 milhões em 2005 e mortalidade de 459.000 em 2004 (AMERICAN HEART ASSOCIATION., 2008). Outros estudos demonstram que a incidência de doença cardiovascular em mulheres na pré-menopausa é menor que em mulheres na pós-menopausa (BARRET-CONNOR., 1991; WENGER et al., 1993; EWER e GLÜCK, 2009). Resultados do *Framingham Heart Study* demonstraram que as mulheres tem menor pressão arterial sistólica e diastólica, bem como pressão de pulso e pressão arterial média mais baixas do que os homens até a quarta década de vida, no entanto, essas diferenças desaparecem até os 70 anos, sendo que alguns parâmetros como pressão arterial sistólica e pressão de pulso apresentam-se invertidos. As alterações na pressão arterial e o risco de doença cardiovascular (DCV) associada podem estar relacionados, pelo menos em parte, à menopausa (FRANKLIN et al., 1997).

No período de pós-menopausa os níveis séricos de estrogênio e seus metabólitos estão muito reduzidos, associados às alterações metabólicas e vasculares importantes no aumento do risco de doenças cardiovasculares. Dentre eles a hipertensão arterial é o maior fator de risco modificável para infarto e doenças cardiovasculares, uma vez que lesa órgãos nobres da economia humana, diminuindo a expectativa de vida e aumentando a morbidade tanto em homens quanto em mulheres (DUBEY et al., 2002). Estudos epidemiológicos mostram que o aumento sustentado de 5 mmHg na pressão diastólica ou de 10 mmHg na pressão sistólica por cinco anos está associado ao aumento em 40% no risco de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) ou 25% na doença arterial coronariana (MACMAHON et al., 1990).

Apesar de estudos observacionais terem relatado que a terapia de reposição hormonal (TRH) apresenta efeitos benéficos sobre fatores metabólicos e vasculares, diminuindo a incidência de doenças cardiovasculares, (GRODSTEIN et al., 1996; BARRETT-CONNOR, 1998), ensaios clínicos randomizados são controversos quanto à eficácia da TRH na prevenção de doenças cardiovasculares primária

(WOMEN'S HEALTH, 2002) e secundária (HULLEY et al., 1998), apesar de confirmar seu efeito redutor nos níveis plasmáticos de lipídios, sendo semelhante aos estrógenos. Além disso, esses estudos confirmaram que a prolongada exposição (> 4 anos) à TRH aumentou significativamente o risco de câncer, aumentando o interesse clínico por diferentes repositores estrógenos em baixa dose (WOMEN'S HEALTH, 2002).

Os efeitos do estrogênio sobre a função cardíaca tem sido objeto de ampla investigação. A possível proteção cardiovascular conferida ao estrogênio seria exercida por diversos mecanismos, dentre os quais listam-se: as alterações no metabolismo lipoproteico, inibição da agregação plaquetária, inibição da proliferação de células do músculo liso vascular (CMLV), ação antioxidante, efeitos arteriais diretos, bem como efeitos diretos sobre os miócitos (FALUDI e ALDRIGH, 2000).

Atualmente estão descritos três categorias de receptores de estrogênio: a primeira é constituído pelos fatores de transcrição ativados por ligante denominados receptores de estrogênio (RE) caracterizados como RE α e RE β ; a segunda é caracterizada por um receptor de membrana acoplado à proteína G (GPR30 ou GPER); e a última é composta por um suposto receptor denominado ER-X, observado em estudos de tecidos cerebrais, não havendo esclarecimento quanto sua função ou mecanismo de ação (TORAN-ALLERAND, 2004).

O primeiro RE foi descrito no final da década de cinquenta e foi assim denominado até 1996 com a descrição de um segundo receptor chamado RE β (KUIPER et al., 1996). O primeiro RE descrito foi então denominado RE α . Ambas as formas estão presentes na vasculatura, tanto em células endoteliais como nas CMLV (MENDELSON E KARAS, 1999).

As primeiras idéias de efeitos não reprodutivos desses receptores foram sugeridas a partir de estudos em um homem com uma mutação no gene para RE α (SUBHIR et al., 1997a). Os sintomas eram similares ao de indivíduos com deficiência na aromatase, entre outros sintomas apresentavam aterosclerose coronariana, disfunção endotelial e prejuízo no teste de vasodilatação braquial (SUBHIR et al., 1997b). Esses achados embasaram a hipótese de que o estrogênio exerceria efeitos, via RE sobre a função arterial.

Os ER α e ER β são membros da super família de receptores hormonais nucleares e são codificados por genes distintos com diferentes localizações cromossômicas (DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006). Esses receptores funcionam como fatores de transcrição ativados por ligantes e produzem efeitos denominados efeitos genômicos, mas podem também ativar mecanismos adicionais.

Outros hormônios e fatores de crescimento também podem regular os receptores de estrogênio. Em células endoteliais alguns fatores de crescimento podem ativar ER α , na ausência do ligante, esse efeito ocorre provavelmente via ativação de proteína quinase ativada por mitógeno. (KARAS et al., 1998).

As implicações fisiológicas e fisiopatológicas relacionadas às mudanças na relação entre a expressão de ER α e ER β ainda não foram totalmente esclarecidas. Um vasto número de sítios polimórficos de ambos os loci gênicos de ER α e ER β foram identificados em humanos (ROSENKRANZ et al.,1998; GENNARI et al.,2005; DAHLMAN-WRIGHT et al.,2006).

A estrutura do RE nuclear é composta por 6 domínios (A a F): o domínio A/B corresponde a porção amino-terminal, com a Função de Ativação de Transcrição Independente de Hormônios (AF-1) , região que envolve interação proteína-proteína. O domínio C é conhecido como Domínio ligante ao DNA (DBD) é o local de interação do receptor com porções específicas da fita de DNA, chamados de Elementos de Resposta ao Estrogênio (ERE). O domínio E/F está na porção carboxi-terminal denominada Domínio Receptor do Ligante (LBD), possui conformação de 12 α hélice, com uma cavidade hidrofóbica onde se ligam os hormônios, este domínio também apresenta a função de ativação de transcrição Dependente de Hormônios (AF-2) (KUIPER et al., 1996).

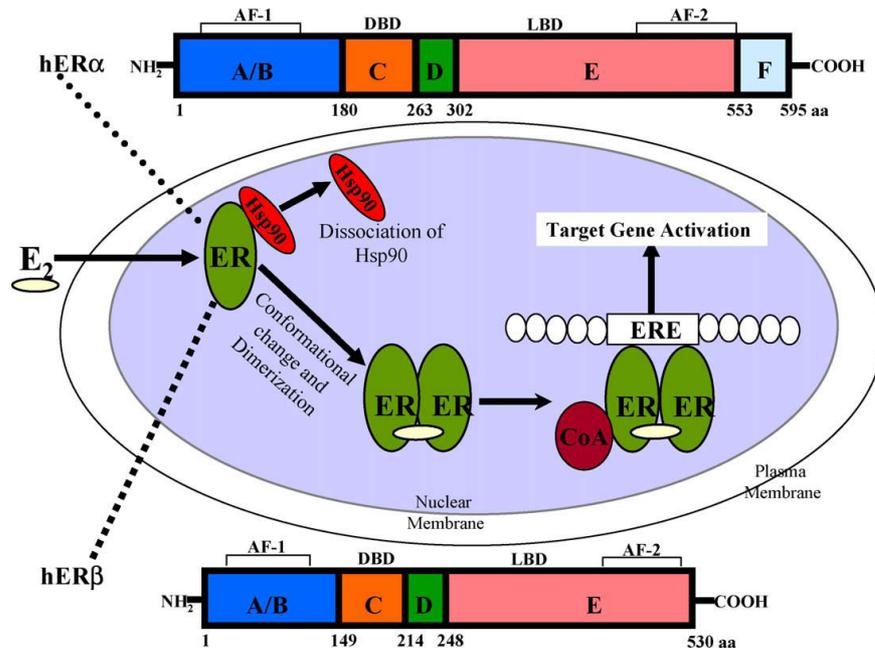


Figura 1: Estrutura dos RE α e RE β . AF-1, função de ativação de transcrição independente de hormônios; AF-2, função de ativação de transcrição dependente de hormônios; DBD, domínio ligante do DNA; LBD, domínio de ligação ao hormônio; E₂, estradiol; RE receptor de estrogênio; Hsp90, chaperona; CoA, coativadores; ERE, elementos de resposta ao estrogênio. Fonte: (LEWIS; JORDAM,2005)

Os dois domínios de ativação de transcrição, AF-1 e AF-2, tem função de recrutar uma variedade de proteínas co-regulatórias para a ligação ao DNA (DNA-bound receptor) (MATTHEWS E GUSTAFSSON, 2003). AF-2 se localiza no domínio conservado de ligação, depende de um ligante agonista que induza a mudança conformacional das proteínas. Dependendo do tipo de célula AF-1 e AF-2 podem produzir efeitos, na regulação da expressão gênica, isoladamente ou sinergicamente. Aumentando a complexidade de ação do estrogênio, o padrão de genes modulados por ER α e ER β depende também da qualidade de outras vias de sinalização celulares (HELDRING et al., 2007).

Os receptores de estrogênio, membros da superfamília dos receptores nucleares utilizam um domínio conservado de ligação ao DNA para interagir com elementos específicos de resposta hormonal no genoma, influenciando a transcrição de genes. Tais efeitos foram referidos como “genômicos” originalmente descritos para receptores nucleares, entretanto, há evidências de os outros mecanismos “não-

genômicos” para muitos membros desta família de receptores, incluindo ER α e ER β . Um dos principais pontos para a compreensão das diversas ações atribuídas a estas proteínas envolve a sua capacidade de adotar múltiplas conformações dependes da natureza do ligante. Cada ligante pode induzir a uma conformação diferente do receptor, como consequência conjuntos distintos de co-ativadores e co-receptores podem ser recrutados para o complexo transcricional-receptor, resultando em efeitos distintos (HELDRING et al., 2007).

Em contraste com as ações mediadas por mecanismos genômicos, o estrogênio também pode produzir efeitos dentro de um intervalo de tempo demasiadamente curto (segundos ou minutos) para ser mediada pelo mecanismo “clássico” envolvendo ativação transcricional de genes (REVELLI et al., 1998; HAMMES E LEVIN, 2007).

Ativação dessas vias de sinalização, além de modular as funções da proteína, pode também influenciar a expressão dos genes (figura2) e, portanto, os níveis de proteína. Dessa forma, o termo genômico não precisa descrever tais ações extra-nucleares, para esses efeitos tem sido sugeridos como alternativas; “sinalização esteróide iniciada na membrana” e “sinalização esteróide iniciada no núcleo” (HAMMES e LEVIN, 2007).

Os receptores GPER ou GPR30 foram identificados com ampla distribuição no cérebro, bem como em tecidos periféricos, localizados principalmente na membrana do retículo endoplasmático (OWMAN et al., 1996). Embora o receptor tenha sido identificado em artérias de humanos, não há conclusões quanto à relevância do GPER na função vascular (HAAS et al., 2007). A ativação do GPR30 pelo estrogênio causada mobilização de cálcio intracelular e aumento da síntese de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato no núcleo (HASBI et al., 2005; REVANKAR et al., 2005). Adicionalmente, tem sido sugerido que GPR30 apenas colabora com funções do ER α , servindo para montar um sinal complexo essencial para uma rápida sinalização de estrogênio (HAMMES e LEVIN, 2007). A atividade de adenilatociclase também foi aumentada em células transfectadas com GPER (THOMAS et al., 2005).

Estudos demonstram que receptores de estrogênio podem se associar à membrana plasmática, embora a isoforma específica do RE não esteja descrita, e pode haver

variabilidade na expressão entre diferentes tipos de células. Em diversos tipos de células, REs estão associados à cavéolas e grandes complexos de proteína. Nas cavéolas, há grande número de outras moléculas de sinalização que promovem maior eficiência na sinalização. Através destas associações, o estrogênio parece desencadear uma série de vias de sinalização intracelular, incluindo a via da proteína kinase ativada por mitógeno, a via do fosfatidilinositol (IP₃/Akt), além da ativação de fluxos de canais de iônicos, a geração de segundos mensageiros mediada por receptor acoplado à proteína G e estimulação dos receptores por fator de crescimento (MORIARTY et al., 2006).

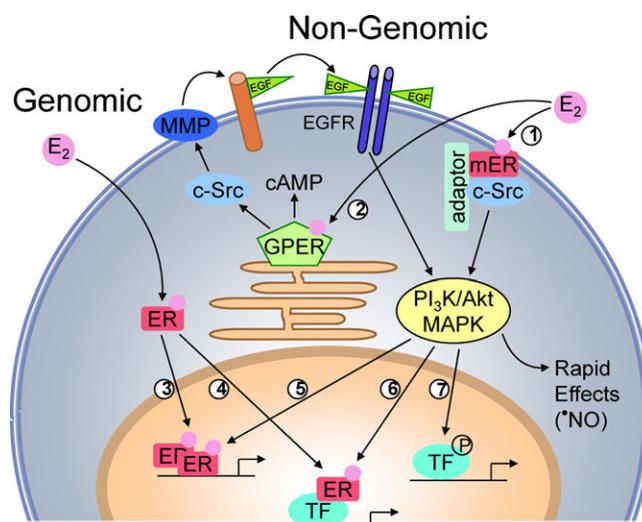


Figura 2: Sinalização genômica e não-genômica do receptor de estrogênio (ER) em células vasculares. Estrógenos (E₂) ativam uma sub-população de ER na membrana plasmática (MER) que interagem com proteínas (adaptador) e moléculas de sinalização como o c-Src (1), via de sinalização rápida PI₃K/Akt e vias MAPK. E₂ também se liga ao GPER, que é principalmente localizado no retículo endoplasmático (2). GPER ativa a produção de AMPc, e c-Src que, por sua vez, ativa a matriz metaloproteinases (MMP), que clivam o fator de crescimento epidérmico (EGF), ativando receptores de (EGF-R), ativando PI3K e MAPK, as quais induzem liberação de NO nas células endoteliais, ou, transcrição de genes. E₂ também ativa ERs nucleares, induzindo translocação nuclear, dimerização do receptor e a ligação dos dímeros de receptores dentro de regiões promotoras dos genes-alvo (3). Alternativamente, ER ativado modula a função de outras classes de fatores de transcrição (TF) através de interações proteína-proteína (4). A atividade transcricional do ER pode ser reforçada através de fosforilação (5), ou pode ser ativada por outros fatores de transcrição que interajam diretamente com ER (6), ou ligar-se à região promotora do gene alvo independentemente do ER (7). Fonte: (MEYER, 2009).

Uma das ações rápidas de estrogênio consiste na capacidade de estimular a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) em células endoteliais vasculares

(HISAMOTO e BENDER, 2005; MORIARTY et al., 2006). Este mecanismo leva aos conhecidos efeitos rápidos do estrogênio na resposta de vasodilatação endotélio-dependente mediada pelo NO, um efeito já demonstrado *in vitro* e *in vivo* (WILLIAMS et al., 1992; STIRONE et al., 2005a; LI et al., 2007).

Vias intracelulares também são ativadas por aplicação aguda de estrogênio no músculo liso vascular isolado. A consequência fisiológica na maioria dos casos é o relaxamento de anéis vasculares e inibição da proliferação em culturas de células musculares lisas. No músculo liso arterial, esses efeitos são resultado do aumento do efluxo de cálcio, envolvendo ativação de guanilato ciclase e inibição de canais de K^+ sensíveis a (K_{ATP}) e canais de potássio ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}) (KLEPPISCH e NELSON., 1995; QUAYLE et al., 1995; WHITE et al., 1995; PRAKASH et al., 1999).

Estes estudos reforçam o conceito de que há efeitos celulares imediatos do estrogênio tanto em células endoteliais quanto de músculo liso, os quais alteram o meio interno da célula, resultando na capacidade de resposta alterada aos estímulos subseqüentes (MILLER et al., 2002; HAAS et al., 2007) e levando a vasodilatação de vários leitos vasculares incluindo o leito vascular coronariano (JIANG et al., 1991; WHITE et al., 1995).

Estudos de mulheres não têm sido tão consistentes em mostrar essas relações, uma vez que nesses há uma variedade vieses, incluindo o estado pós-menopausal e uso de anticoncepcionais e terapia hormonal, tornando mais difícil a análise dos dados de mulheres e exigindo um maior número de indivíduos nas pesquisas (SHEARMAN, 2006).

Diferindo-se de outros membros da família de receptores nucleares, os receptores de estrogênio se ligam a uma ampla gama de compostos estruturalmente diferentes, incluindo os metabolitos do estrogênio e outros reguladores endócrinos (HELDRING et al., 2007).

Uma gama de compostos denominada Moduladores Seletivos de Receptor de Estrogênio (SERMs) apresentam ações específicas, agindo como agonista ou antagonista, dependendo do tipo de célula.

O tamoxifeno é um agente sintético não esteroide, cuja atividade agonista do estrogênio em ossos e endométrio foi demonstrada simultaneamente à atividade antagonista do estrogênio sobre a mama. (Burger, 2000).

A utilização do tamoxifeno para o tratamento de câncer da mama hormônio dependente foi o primeiro exemplo da aplicação clínica dos SERMs. O tamoxifeno é usado terapêuticamente na célula tumoral mamária como um antagonista do receptor de estrogênio (Love et al., 1992). Os agonistas, como o 17 β -estradiol, induzem alteração conformacional do domínio ligante que promove ligação de coativadores, os SERMs impedem a mudança conformacional induzida pelo agonista. (DAHLMAN-WRIGHT et al., 2006).

Dessa forma os SERMs, através do bloqueio de AF2, agem como antagonistas em alguns tipos de células. Entretanto, em alguns tecidos a segunda a função de ativação transcricional de AF1, pode ser ativada, e os SERMs podem agir como agonistas em neste caso. Outro fator que contribui para a especificidade tecidual das respostas dos receptores de estrogênio parece ser a variação de tecido para tecido de outras proteínas que interagem com co-ativadoras, denominadas de co-repressores (HALL e McDONNELL., 2005).

Estudos clínicos tem mostrado que o tratamento com tamoxifeno apresenta impacto favorável nos níveis séricos de colesterol total, entretanto há também diminuição dos níveis de HDL colesterol (LOVE et al., 1991). O *Scottish Adjuvant tamoxifen Trial* um estudo longitudinal que acompanhou 40 pacientes indicou diminuição significativa nos níveis de colesterol total, sem alterações nos níveis de HDL (DEWAR et al., 1992).

O maior estudo clínico já realizado avaliando o tratamento com tamoxifeno foi o *Arimidex Tamoxifen Alone or in combination (ATAC) study*, realizado pelo *Breast International Group (BIG)*, esse estudo acompanhou 6186 mulheres e comparou os impactos do tamoxifeno e dos inibidores da aromatase (droga de segunda escolha na terapia do câncer de mama), e constatou que entre as pacientes que faziam uso de tamoxifeno a incidência de hipercolesterolemia foi reduzida. O ATAC mostrou ainda menor incidência de cardiopatias isquêmicas bem como doenças ateroscleróticas coronarianas, entre as pacientes com tamoxifeno (BUZDAR et al.,

2006). Outras análises mais recentes indicaram que eventos cardiovasculares de grau 3 e 4 (angina e IAM) foram menos freqüentes nos pacientes que utilizaram tamoxifeno (ARIMIDEX PRODUCT MONOGRAPH, 1998). Da mesma forma, um estudo do *Stockholm Breast Cancer Group* mostrou significativa redução na morbidade por doenças cardiovasculares (RUTQVIST e MATTSSON, 1993). Sobre a pressão arterial, atividade da renina plasmática e excreção de sódio o tamoxifeno, não demonstrou alterações (STERGIOU et al., 2002).

Estudos experimentais também demonstram controvérsias quanto os efeitos benéficos do tamoxifeno sobre o sistema cardiovascular. O tamoxifeno reduziu drasticamente a incidência de taquicardia ventricular, em ratas normotensas castradas com injúria após a isquemia coronariana seguida de reperfusão, além disso, também diminuiu a peroxidação lipídica e reduziu os níveis séricos de creatina kinase (EK et al., 2008). Por outro lado ratas infartadas tratadas por três semanas com tamoxifeno apresentam exacerbação da área de cicatriz pós-infarto (GERALES et al., 2007).

Mulheres tratadas com tamoxifeno tem, em geral, maior expectativa de vida e são suscetíveis ao uso droga por longos períodos. O efeito do tratamento com tamoxifeno sobre a pressão arterial de mulheres na pós-menopausa permanece incerto, uma vez que os dados existentes publicados são poucos e todos baseados em observações clínicas de pressão arterial, (CONWAY et al., 1988).

Dessa forma, apesar de inúmeros estudos clínicos e experimentais apontarem para efeitos específicos do tamoxifeno sobre a doença coronariana, não existem trabalhos que elucidem as ações do tamoxifeno sobre a reatividade vascular coronariana em corações isolados, associados à redução de doença coronariana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com tamoxifeno sobre a reatividade vascular coronariana em ratas hipertensas controle e ooforectomizadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com tamoxifeno sobre:

- pressão arterial sistêmica e frequência cardíaca;
- reatividade vascular do leito coronariano isolado;
- força de contração do coração isolado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas ratas com hipertensão espontânea (SHR), com 30 dias idade, com peso corporal variando entre 80 e 100g gramas, fornecidos pelo Biotério de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (20-24°C) e iluminação artificial de acordo com o recomendado para os biotérios de pesquisa (FINEP). O manuseio dos animais esteve de acordo com as normas de tratamento de animais adotadas pela Sociedade Brasileira de Fisiologia.

Os animais ficaram em gaiolas simples com acesso a água e ração *ad libidum*, receberam tratamento com tamoxifeno por 90 dias.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ratas foram divididas em 4 grupos (n=7), sendo:

1. Controle (SC)
2. Tratado com tamoxifeno (ST)
3. Ooforectomizado (SOC)
4. Ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT)

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 CASTRAÇÃO DOS ANIMAIS

Após anestesia com ketamina (5 mg/ kg) e xylazina (10 mg/kg), as fêmeas foram submetidas a uma incisão de 1 a 1,5 cm, na pele, entre o último rebordo costal e a coxa, a um centímetro da linha mediana seguida de uma incisão na camada muscular, abrindo a cavidade peritoneal para posterior remoção dos ovários (ooforectomia) e ligadura da tuba uterina. Após a retirada dos ovários foi realizada

sutura da musculatura e pele. O mesmo procedimento foi realizado do lado oposto. Ao final do procedimento, os animais receberam 0,1 ml do antibiótico Enrofloxacina 2,55, via intramuscular. Após 7 (sete) dias de recuperação pós-operatória, os animais foram colocados em gaiolas simples e iniciado o tratamento.

3.3.2 TRATAMENTO COM TAMOXIFENO

Aos grupos tratados, administravam-se doses diárias de Citrato de Tamoxifeno 0,1mg/ 100g de peso corporal por via oral (método de gavagem) durante 90 dias. Para isso a droga era dissolvida em água destilada e utilizada imediatamente. Os animais eram pesados a cada 7 dias para ajuste da dose da droga.

3.3.3 CATETERIZAÇÃO

Após anestesia com ketamina (5 mg/ kg) e xylazina (10 mg/kg), a artéria femoral foi isolada através de uma incisão na região inguinal e nela introduzida a extremidade de menor calibre da cânula (PE10). A extremidade livre da cânula PE50 foi preenchida de 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 pressão arterial (PA) modificando assim o resultado final. Foi realizada exteriorização da cânula, por meio de um trocater, até à região médio cervical posterior do animal. Após ser exteriorizada, 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. A cânula arterial foi utilizada para verificação direta da PA. Os cateteres 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.

3.3.4 MEDIDA DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL

Após a cateterização (12 horas) com o animal acordado e com um mínimo de perturbação e manuseio do mesmo, o cateter de polietileno (cânula) foi conectado a um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados de pressão arterial média

(PAM), foram digitalizadas (Acqknowledge P23XL for Windows; Biopac Ind.) e armazenados em disco rígido do computador para análises futuras.

3.3.5 CORAÇÃO ISOLADO

Os animais foram heparinizados (200 I, ip) e anestesiados com pentobarbital posteriormente sacrificados. Foi realizada uma incisão cirúrgica no tórax, expondo os órgãos, o coração foi dissecado de suas conexões e imediatamente transferido ao aparelho de perfusão através da canulação da artéria aorta, ao nível da sua curvatura. A seguir iniciar-se-á a perfusão retrógrada pelo método de Langendorff modificado, utilizando-se para a perfusão, a solução de nutrientes modificada, composta de NaCl, 120 mM; CaCl₂.H₂O, 1,25 mM; KCL, 5,4 mM; MgSO₄.7H₂O, 2,5 mM; NaH₂PO₄.H₂O, 2,0 mM; NaHCO₃, 27,0 mM; Na₂SO₄, 1,2 mM; EDTA, 0,03 mM e glicose 11,0 mM, mantida a 37°C por um banho Maria, e continuamente aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) na câmara de saturação de O₂, mantendo o pH estável em 7.4.

O fluxo era mantido constante em 10 ml/min por meio de uma bomba de rolete (Hugo Sanchs, Germany). A pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo (PVE) foi mantida através de um balão de látex, preenchido com água, que ainda vazio será introduzido via átrio esquerdo, através da válvula mitral, no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão (Statham Transducer P23Db). O volume do balão era ajustado por seringa (2 ml), de forma a se controlar a pressão diastólica intraventricular (Pd) em torno de 10 mm Hg. A frequência dos batimentos foi avaliada através da medida do pulso de PVE por meio de um cardiômetro. A pressão de perfusão coronariana (PPC) foi avaliada por meio de um transdutor de pressão (Statham Transducer P23Db), conectado imediatamente próximo à cânula de perfusão aórtica, por meio da qual foi perfundido o leito coronariano. Uma vez que o fluxo de perfusão se mantém constante, as alterações de perfusão são relacionadas às mudanças na resistência vascular.

São necessários 40 min de estabilização funcional para se iniciar as medidas, através das quais se pode verificar a reatividade desses vasos em resposta ao agente vasoconstrictor acetilcolina (Ach), nas doses 0.2, 0.5, 2, 1, 4, 8 e 16 µg e ao agente vasodilatador adenosina, nas doses (Ado) 2, 4, 8, 16, 32 e 100 µg.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

1° dia do Protocolo:

- verificação do peso corporal;
- ooforectomia;

7° dia do protocolo 1:

- início do tratamento com tamoxifeno

90° dia do protocolo 1 (fim do tratamento):

- verificação da pressão arterial por direta.
- Isolamento do coração para estudo da reatividade vascular coronariana:

Com o objetivo de avaliar a resposta do leito coronariano a acetilcolina e a adenosina nos diferentes grupos procedeu-se como descrito a seguir:

- Heparinização e anestesia;
- Montagem da preparação isolada;
- Estabilização da preparação por aproximadamente 40 minutos;
- Determinação da pressão de perfusão coronariana basal;
- Curva dose resposta de adenosina (Ado) utilizando um volume de injeção *in bolus* de 0,1ml, nas doses 2 µg - 4 µg - 8 µg - 16 µg - 32 µg - 64 µg.
- Curva dose resposta de Acetilcolina (ach) nas doses: 0,2 µg - 0,5 µg - 1,0 µg - 2,0 µg - 4,0 µg - 8,0 µg.
- As doses foram administradas de maneira crescente e o tempo entre elas foi determinado pelo retorno à PPC basal.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados de reatividade vascular coronariana e de dP/dT utilizou-se análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de teste post-hoc Tukey/Kramer.

Para análise dos resultados de pressão arterial e frequência cardíaca utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de teste post-hoc Tukey/Kramer. Um valor de $p < 0,05$ foi estabelecido para indicar diferença entre grupos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Os resultados apresentados no gráfico 1 demonstram expressivo aumento na PAM do grupo de animais ooforectomizados (SOC) $190,7 \pm 3,2$ mmHg quando comparado os grupo controle (SC) $168,3 \pm 3$ mmHg. Esse aumento não foi observado na pressão arterial média do grupo ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT) $173,1 \pm 1,3$ mmHg, sendo portanto menor que SOC. Nas comparações entre os grupos não ooforectomizados não foi observada diferença.

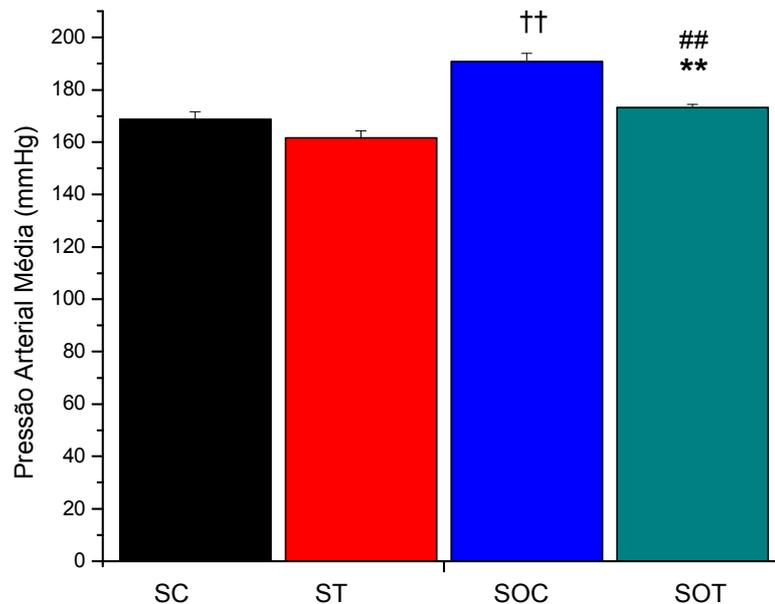
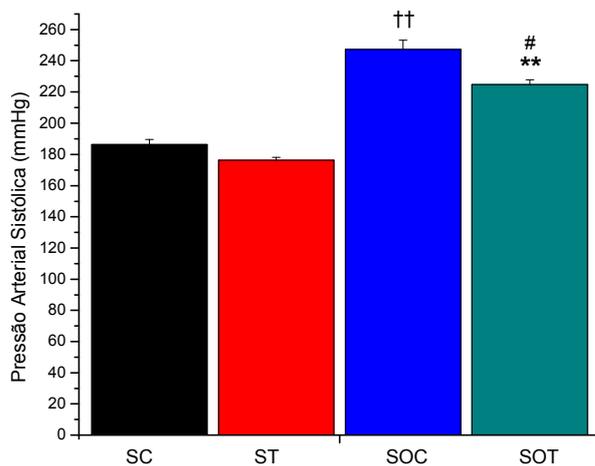


Gráfico 1: Medidas da Pressão arterial média nos grupos: não tratado (SC), tratado com tamoxifeno (ST), ooforectomizado não tratado (SOC) e ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. SC; ## $p < 0,01$ vs. SOC e †† $p < 0,01$ vs. SC. (ANOVA) N = 7 ratas por grupo.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE AS PRESSÕES ARTERIAIS SISTÓLICA E DISTÓLICA

O gráfico 2A demonstra elevação na pressão sistólica do grupo SOC $247,3 \pm 5,8$ mmHg quando comparado ao controle (SC) $186,4 \pm 3,2$ mmHg. No grupo SOT, a pressão sistólica apresentou-se significativamente menor $224,6 \pm 3,3$ mmHg que a do grupo SOC, e maior que a pressão arterial sistólica do controle (SC). O gráfico 2B demonstra a redução na pressão arterial diastólica do grupo SOT $130,8 \pm 2,5$ mmHg quando comparado ao controle (SC) $154,3 \pm 3,5$ mmHg e ao grupo ooforectomizado (SOC) $149,6 \pm 7,8$ mmHg, não foi observada diferença entre os demais grupos.

2.A



2.B

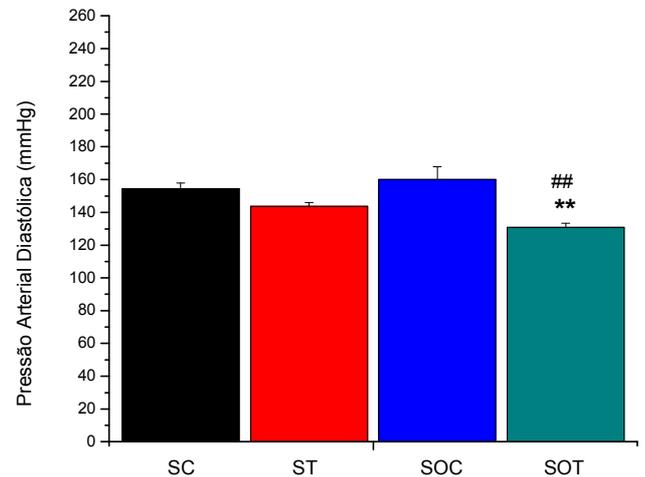


Gráfico 2: Medidas de pressão arterial (mmHg) nos grupos não tratado (SC), tratado com tamoxifeno (ST), ooforectomizado não tratado (SOC) e ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT). (A) Pressão arterial sistólica, os valores foram expressos como média ± EPM. **p<0,01 vs. SC; # p<0,05 vs. SOC e †† p<0,01 vs. SC. (ANOVA). (B) Pressão arterial diastólica, os valores foram expressos como média ± EPM. **p<0,01 vs. SC; ## p<0,01 vs. SOC (ANOVA). N = 7 ratas por grupo.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A FREQUÊNCIA CARDÍACA

No gráfico 3 observa-se os valores de frequência cardíaca mensurada nos animais acordados. Nas comparações com o grupo SOT 386 ± 7 bpm observa-se redução na frequência em relação ao grupo SOC 437 ± 9 bpm e ao SC 427 ± 9 bpm. Entre os grupos não ooforectomizados não foi observada diferença.

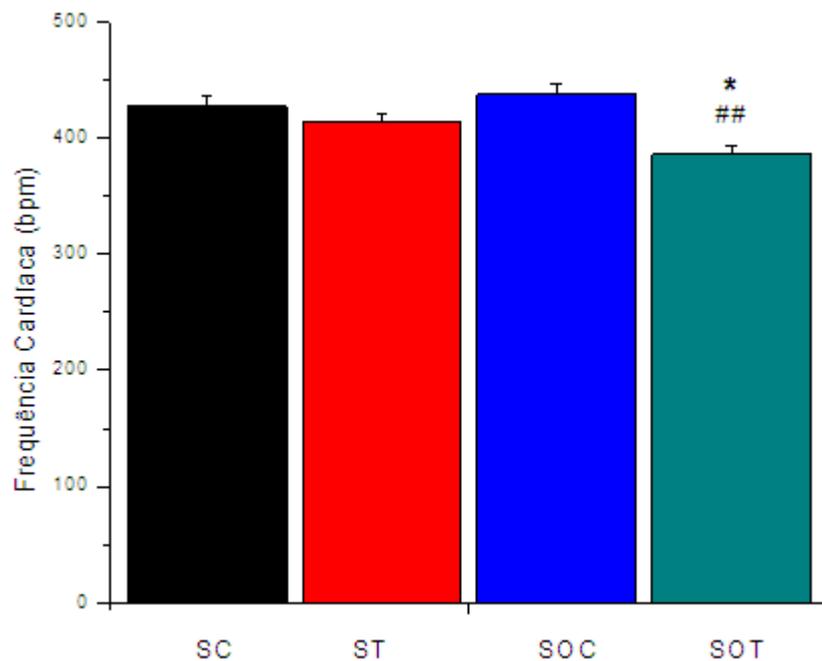


Gráfico 3: Frequência cardíaca nos grupos: hipertenso não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. (ANOVA) N = 7 ratas por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com SC e ## $p < 0,01$ quando comparado com SOC

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A PRESSÃO DE PERFUSÃO CORONARIANA BASAL

Os resultados apresentados no gráfico 4 demonstram que o grupo ooforectomizado tratado (SOT) apresentou maior pressão de perfusão coronariana basal $136 \pm 3,6$ mmHg quando comparado ao grupo ooforectomizado não tratado (SOC) 96 ± 2 mmHg, assim como quando comparado ao controle (SC) $119 \pm 2,3$ mmHg. Observa-se que o grupo ooforectomizado não tratado (SOC) teve menor PPC que o grupo controle.

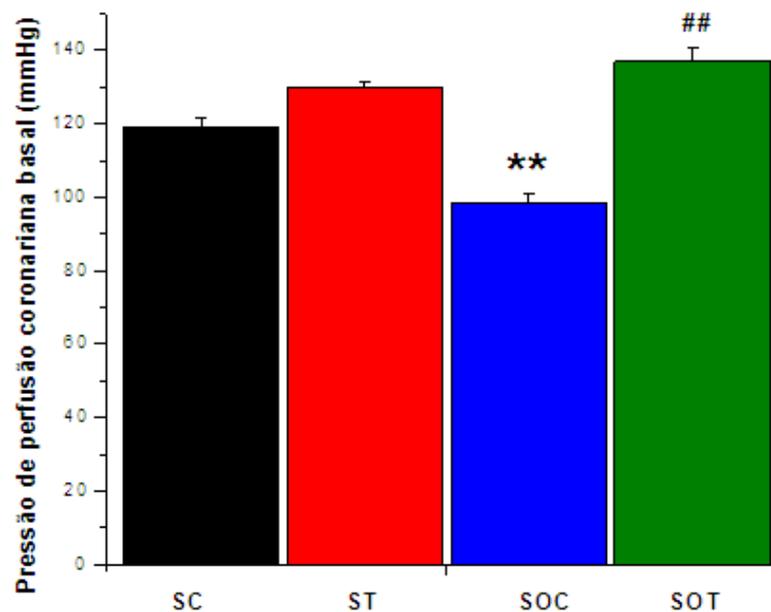


Gráfico 4: Valores de pressão de perfusão coronariana basal (PPC) em corações de ratas hipertensas não tratadas (SC), hipertensas tratadas com tamoxifeno (ST), hipertensas ooforectomizadas não tratadas (SOC) e hipertensas ooforectomizadas tratadas com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. N = 7 ratas por grupo (ANOVA). ** $p < 0,01$ quando comparado com os demais grupos e ## $p < 0,01$ quando comparado com SC.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE O ÍNDICE DE CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Na verificação do índice de contratilidade miocárdica expresso pela $dP/dT_{\text{máx}}$ observa-se que grupo ooforectomizado (SOC) apresentou aumento na contratilidade 2152 ± 70 mmHg/seg quando comparado ao grupo controle (SC) 1735 ± 64 mmHg/seg e ao ooforectomizado tratado (SOT) 1761 ± 70 mmHg/seg. Não foram observadas diferenças entre o grupo ST 1745 ± 120 e SC.

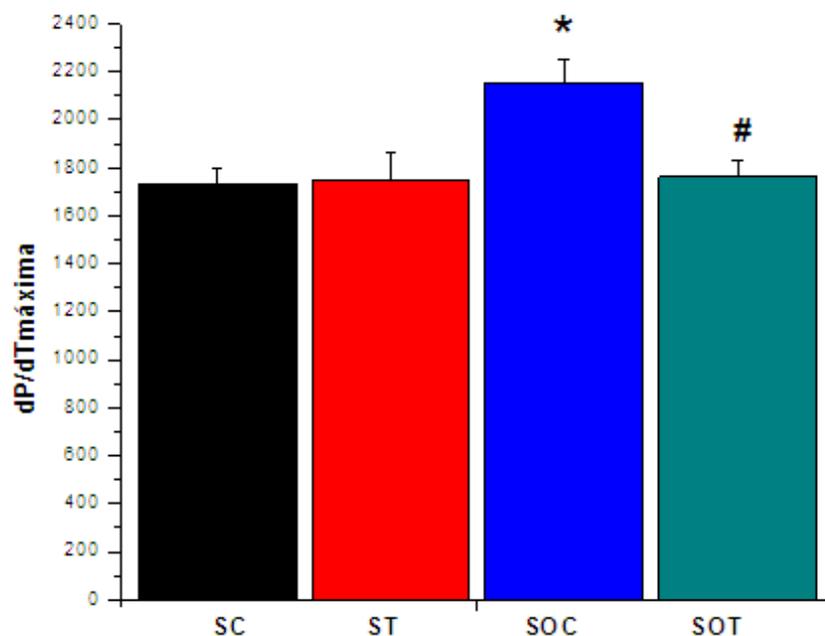


Gráfico 5: Valores de $dP/dT_{\text{máx}}$ em corações de ratas hipertensas não tratadas (SC), hipertensas tratadas com tamoxifeno (ST), hipertensas ooforectomizadas não tratadas (SOC) e hipertensas ooforectomizadas tratadas com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. N = 7 ratas por grupo. (ANOVA). * $p < 0,05$ quando comparado com os grupos SC e ST e # $p < 0,05$ quando comparado com SOC.

4.6 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TAMOXIFENO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR CORONARIANA

No gráfico 6 observa-se a resposta contrátil do leito coronariano às doses crescentes de acetilcolina. A partir da quarta dose de acetilcolina (8 μ g/ml) o grupo ooforectomizado não tratado com tamoxifeno (SOC) apresentou maior resposta contrátil quando comparado ao grupo ooforectomizado tratado (SOT) e ao grupo não ooforectomizado e não tratado (SC). A partir da quinta dose observa-se que o grupo ST apresentou maior pressão de perfusão coronariana que o seu controle (SC).

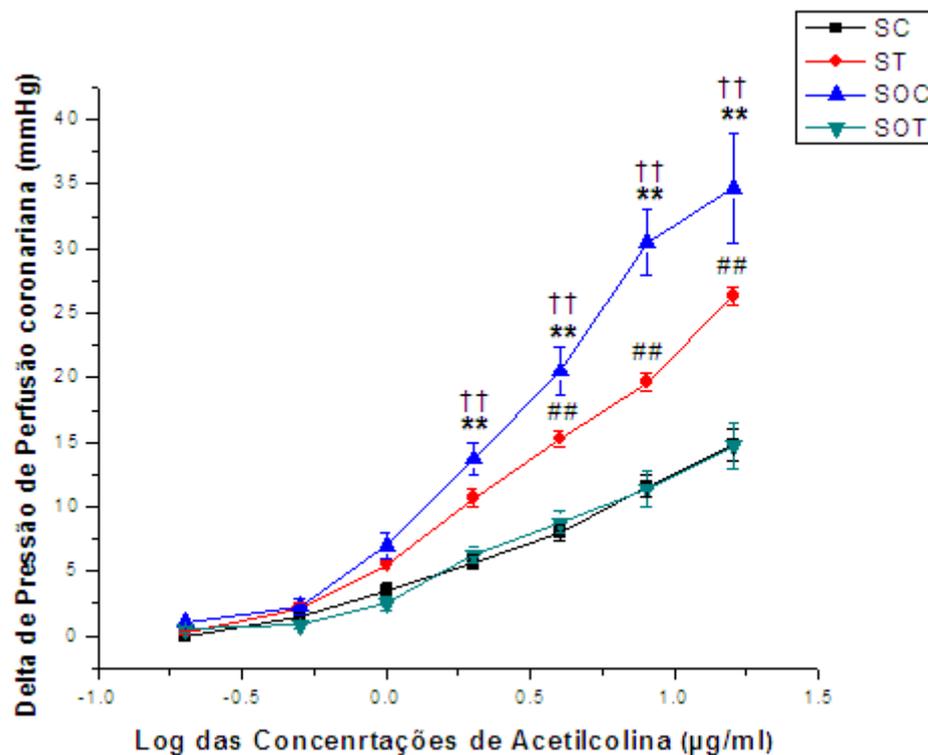


Gráfico 6: Valores de PPC expressos em delta de contração do leito coronariano com doses crescentes de acetilcolina nos grupos: hipertenso não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratada com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. N = 7 ratas por grupo (ANOVA). ** $p < 0,01$ quando comparado o SOC com os grupos SOT; †† $p < 0,01$ quando comparado ao SC e ## $p < 0,01$ quando comparado o ST com SC.

No gráfico 7 observa-se a resposta de relaxamento do leito coronariano às doses crescentes de adenosina. A partir da quinta dose de adenosina (16 μ g/ml) o grupo ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT) apresentou maior relaxamento quando comparado ao grupo ooforectomizado controle (SOC), e o grupo não ooforectomizado tratado ST apresentou maior dilatação que o grupo controle (SC).

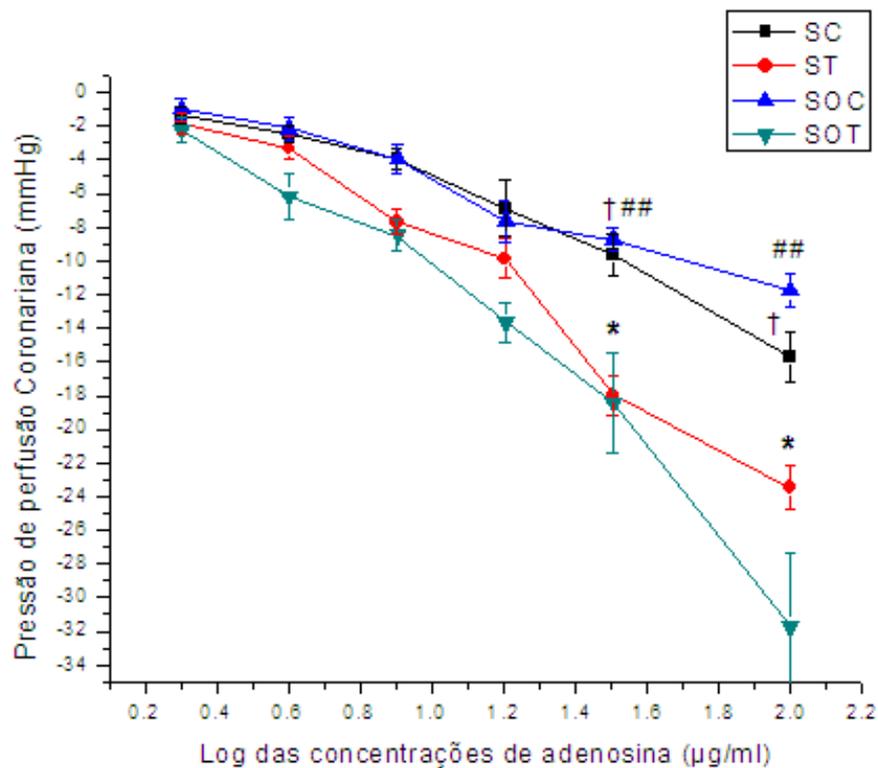


Gráfico 7: Valores de PPC expressos em delta de dilatação do leito coronariano com doses crescentes de adenosina nos grupos: hipertenso não tratado (SC), hipertenso tratado com tamoxifeno (ST), hipertenso ooforectomizado não tratado (SOC) e hipertenso ooforectomizado tratada com tamoxifeno (SOT). Os valores foram expressos como média \pm EPM. (ANOVA) N = 7 ratas por grupo.). *p<0,05 SC vs. ST; †p<0,05 SOT vs. SC e ##p<0,01 SOT vs. SOC.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou elevação da pressão arterial nos animais ooforectomizados, dado esse que corrobora com a literatura. Neste estudo, a elevação da pressão arterial observada no grupo ooforectomizado (SOC) foi revertida com tratamento com tamoxifeno, assim como outros estudos que demonstraram esse mesmo efeito utilizando outros SERMs (WASSMANN et al., 2002; CHARLES et al., 2003; THORIN et al., 2003). Esses resultados foram também demonstrados em estudos realizados no próprio laboratório em dados ainda não publicados, (ROMERO et al. 2007).

Alguns autores não relataram diferença na pressão arterial média de animais tratados com tamoxifeno, utilizando, entretanto doses e tempo de tratamento menores (MONTENEGRO. et al., 2009 e PELZER et al., 2005).

Este estudo aponta ainda a redução da frequência cardíaca (FC) no grupo SOT em relação ao SOC e SC. Tal observação é similar a dados clínicos que mostram que na ausência de estrogênio a atividade vagal está reduzida e a atividade simpática está exacerbada. Com a reposição do estrogênio esses efeitos se invertem. (LIU et al., 2003). Os mesmos resultados também foram observados anteriormente em estudos experimentais (DU et al, 1995; KUO e YANG, 2002).

Outro fator que poderia explicar a diminuição da FC pelo tamoxifeno seria sua ação como agonista do estrogênio, diretamente sobre os RE, na modulação do barorreflexo, sugerindo um papel facilitador na neurotransmissão colinérgica no SNC (O'MALLEY et al., 1987). Essa hipótese é sustentada por trabalhos que mostraram a presença de RNAm para receptores de estrogênio em 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 envolvida no processamento da informação barorreflexa, adicionalmente o tamoxifeno aumenta, em nível central, a quantidade de adrenoreceptores- α_2 , que é essencial para a modulação barorreflexa. (LAWRENCE e JARROT, 1996).

Paralelamente aos resultados de redução de PAM e FC, o grupo ooforectomizado tratado com tamoxifeno, apresentou atenuação do índice de contratilidade cardíaca

($dP/dT_{\text{máx}}$) em relação ao grupo com deficiência de estrogênio. A $dP/dT_{\text{máx}}$ é afetada diretamente pela pré-carga cardíaca, entretanto aumentos na pós-carga cardíaca são seguidos de redução do volume ejetado nas sístoles subsequentes, permanecendo um montante de sangue residual na cavidade ventricular, seguido de dilatação da câmara cardíaca e aumento da força de contração, pelo maior distanciamento no comprimento dos sarcômeros em repouso, e aumento no volume intraventricular diastólico final (pré-carga), clássica via de acionamento do mecanismo de Frank-Starling (GILL et al. 2006). É provável que a acentuação da atividade contrátil promovida pelo estiramento miocárdico inclua modificações da cinética celular do cálcio e de sua afinidade às proteínas contráteis, caracterizando uma intervenção inotrópica (ALLEN e KENTISH, 1985). Isso justificaria do aumento da $dP/dT_{\text{máx}}$ observado no grupo SOC quando comparado ao SOT, uma vez que com a atenuação da PAM, observada no grupo SOT o acionamento do mecanismo de Frank-Starling seria reduzido, por conseguinte haveria redução na força de contração. Elevações sustentadas de pressão arterial são acompanhadas por aumento nas dimensões diastólicas do VE, caracterizando aumento do volume ventricular com consequente estiramento miocárdico e aumento da $dP/dT_{\text{máx}}$ (BREGANOLLO et al. 2000.), corroborando com os dados do grupo SOC.

O presente estudo demonstrou ainda diferenças na reatividade vascular coronariana dos animais tratados cronicamente com tamoxifeno em relação aos não tratados. Tal modificação na reatividade expressou-se pela menor resposta vasoconstritora do leito coronariano à acetilcolina, bem como maior resposta vasodilatadora à adenosina no grupo ooforectomizado tratado com tamoxifeno (SOT) em relação ao grupo controle (SC). O grupo que sofreu apenas o processo de castração (SOC) demonstrou uma exacerbação da resposta contrátil e diminuição da vasodilatação, resposta essa que foi revertida pelo tratamento.

A melhora na reatividade, em outros leitos vasculares, associada à terapia com tamoxifeno foi relatada no tratamento crônico com tamoxifeno que promoveu efeitos similares a reposição com estrogênio em anéis de carótidas de ratas ooforectomizadas. Tais estudos demonstraram que o tamoxifeno atenuou a resposta vasoconstritora na deficiência de estrogênio. (HUTCHISON et al., 2001 e TSANG et al., 2007).

Da mesma forma o tratamento com tamoxifeno mostrou normalização da tensão e da resposta contrátil mediada por fenilefrina em artérias cerebrais isoladas de animais ooforectomizados (THORIN et al., 2003).

Adicionalmente, estudos clínicos apontaram alterações morfológicas dos vasos sanguíneos após um ano de terapia com tamoxifeno, observando-se redução significativa na espessura das camadas íntima e média de artérias carótidas em mulheres pós-menopausadas (SIMON et al., 2002).

MacGrecor e Jordan (1998) sugeriram que o tamoxifeno teria inúmeros efeitos no relaxamento vascular, incluindo antagonismo de vários canais iônicos e da calmodulina além da inibição da cadeia leve miosina kinase. Estudos anteriores especulavam que várias ações potencialmente importantes do tamoxifeno seriam independentes do receptor de estrogênio (O'BRIAN et al., 1986; COULDWELL et al., 1993), dessa forma seus efeitos de proteção cardiovascular sugeridos por estudos epidemiológicos (LIPTON et al., 1987), iriam além do agonismo do estrogênio nesse sistema.

Dentre as possíveis hipóteses para elucidar os mecanismos pelos quais o tamoxifeno, agudamente, produz vasodilatação em leitos isolados, foi proposto a inibição da atividade da proteína kinase C. Estudos em artérias cerebrais de coelhos demonstraram que o tamoxifeno foi eficaz em atenuar o vasoespasmo causado pela oxi-hemoglobina, concomitantemente à redução da atividade da proteína Kinase C no mesmo vaso. (WICKMAN e VOLLRATH, 2000). A atividade enzimática dessa proteína está intrinsecamente relacionada à contração do músculo liso vascular (COOK e VOLLRATH, 1995; VOLLRATH et al., 1998), sendo esse um mecanismo independente de receptores de estrogênio.

A literatura relata também ações agudas do tamoxifeno, atuando diretamente sobre células do músculo liso vascular de artérias aorta e caudais, inibindo correntes de cálcio em canais de cálcio voltagem dependentes (SONG et al. 1996).

O tamoxifeno reduziu a expressão de RNAm da subunidade α_{1C} do canal de Ca^{2+} tipo L, em aortas de ratos na ausência de estrogênio, além de aumentar a expressão do RNAm dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) de forma mais expressiva que o 17β -estradiol. (TSANG. 2004).

Outra via proposta demonstrou que o tamoxifeno promove vasodilatação por meio da ativação de canais de potássio sensíveis a ATP (K^+_{ATP}), sendo essa resposta similar a do estrogênio (relaxamento dependente de canais de K^+ e independente de endotélio), em anéis de artérias coronárias, mostrando um efeito não genômico do tamoxifeno e diretamente agonista parcial do receptor de estrogênio (HUTCHISON et al. 2001). Essa idéia encontrou sustentação em outros trabalhos que demonstraram que a vasodilatação promovida pelo estrogênio é dependente de canais de K^+ (SUDHIR et al. 1995; WHITE et al. 1995). Em alguns tipos de hipertensão crônica, os efeitos da angiotensina II e da proteína kinase C estão aumentados e estes mediadores inibem os canais de K^+ dependentes do ATP nas células de músculo liso vascular (MIYOSHI et al. 1991; CLEMENT-CHOMIENNE et al. 1996).

Mais recentemente foi proposto que atividade da Proteína Kinase Ativada por Mitógeno (MAPK) é inibida, na presença do tamoxifeno, em aortas isoladas de ratos (PARK et al. 2003). Apesar de essa inibição também ter sido observada com o estrogênio (HWANG, LEE e JANG. 2002) o trabalho de Park S et al. demonstrou que, ao bloquear o receptor de estrogênio, os efeitos tanto o relaxamento vascular quanto a inibição da MAPK promovidas pelo tamoxifeno continuavam a ser observados, demonstrando uma ação independente de receptores de estrogênio.

Foi demonstrado ainda que o tamoxifeno é capaz de inibir a despolarização induzida por pressão no músculo liso vascular pelo bloqueio de canais de cátions não seletivos (WELSH et al. 2000) além de inibir correntes de sódio e potássio em miócitos ventriculares (HE et al. 2003) sendo esse um mecanismo adicional para explicar a vasodilatação mediada por tamoxifeno.

Há controvérsia quanto à importância da participação do endotélio na resposta vasodilatadora observada na presença do tamoxifeno. Alguns trabalhos demonstraram que esse efeito é observado somente na ausência de endotélio (HUTCHISON et al., 2001), sugerindo que, na presença do endotélio, fatores endoteliais estariam sendo superexpressados, como um mecanismo compensatório à falta do estrogênio, dessa forma, na ausência de endotélio o tamoxifeno teria exercido ação agonista ao estrogênio nesse tecido. (TSANG et al. 2007). Por outro lado, com a inibição da oxido nítrico sintetase por L-NNA, os efeitos do tamoxifeno

na reatividade foram abolidos, demonstrando então a participação do endotélio na resposta vascular, após o tratamento (THORIN et al., 2003). O tamoxifeno mostrou ação tanto via endotélio quanto agindo diretamente sobre o músculo liso vascular de anéis de coronárias (FIGTREE et al., 2000).

Em 2001 Dick et al., demonstraram que o tamoxifeno agudamente aumenta a condutância de canais de K^+ dependentes de cálcio (K_{Ca} ou BK_{Ca}) através da interação com a subunidade regulatória β_1 em células de músculo liso vascular de cães. Esse talvez seja um ponto crucial para explicar a vasodilatação promovida pelo tamoxifeno na hipertensão, uma vez que, nessa condição hipertensora existe um aumento da atividade dos canais de potássio dependentes do cálcio em consequência do aumento da pressão sanguínea (JACKSON WF. 2000). O aumento da atividade destes canais nas células musculares lisas vasculares pode funcionar como mecanismo compensatório para um aumento progressivo da pressão sanguínea, podendo deste modo proporcionar um mecanismo de feedback negativo auxiliando na restrição do aumento da pressão e tônus vascular, preservando dessa forma o fluxo sanguíneo local e limitando a vasoconstrição associada ao aumento da pressão (NELSON e QUAYLE 1995; SOBEY 2001; KO 2008)

Embora os estudos citados anteriormente identifiquem efeitos, relacionados diretamente ou não aos receptores de estrogênio, todos utilizaram tratamentos agudos ou de curta duração. Dessa forma referem-se provavelmente a efeitos não genômicos do tamoxifeno, mostrando sua ação direta em receptores de membrana como já demonstrado com o estrogênio (VALVERDE et al. 1999)

O presente estudo procurou mimetizar a longa utilização terapêutica do tratamento com tamoxifeno, preconizada atualmente com duração de cinco anos (CONSENSO BRASILEIRO DE CANCER DE MAMA 2004). Para tanto, instituindo-se um protocolo de tratamento crônico de 90 dias com dose equivalente à terapêutica, visando observar a reatividade vascular no coração isolado.

Assim devemos considerar que os resultados observados se dêem por mecanismos do genômicos tamoxifeno como agonista do receptor de estrogênio. Esses resultados destacam a importância dos efeitos potencialmente benéficos do tamoxifeno sobre reatividade vascular coronariana por mecanismos que podem

contribuir para a proteção contra doenças cardiovasculares sugeridas em triagens clínicas. (MCDONALD E STEWART, 1991; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS'COLLABORATIVE GROUP, 1992; CLARKE, 2001). Entretanto, estudos complementares de natureza molecular, relacionados à expressão de receptores intracelulares de estrogênio durante o tratamento com tamoxifeno poderiam elucidar melhor o mecanismo de ação do tamoxifeno sobre a reatividade coronariana.

6 REFERÊNCIAS

ALLEN, D.G.; KENTISH, J.C. **The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle.** J Mol Cell Cardiol. 1985; 17(9):821-40.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart Disease and Stroke Statistics - 2008 Update. Dallas, Tex: American Hearth Association; 2008. http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1200078608862HS_Stats%202008.final.pdf. Acesso em: fevereiro de 2009.

ASTRA ZENECA CANADA INC. **Arimidex Product Monograph.** Mississauga, Ontario, Canada: AstraZeneca Canada Inc.; 2008. Disponível em: <http://www.astrazeneca.ca/en/search/?txtTerms=arimidex>. Acessado em julho de 2009.

BARRET-CONNOR, BUSH T. **Estrogen and coronary heart disease in women.** JAMA.1991; 265: 1861-1867.

BARRETT-CONNOR, E.; GRADY, D. **Hormone replacement therapy, heart disease and other considerations.** Annu. Rev. Public Health 1998; 19: 55 - 72.

BRASIL. **Controle do câncer de mama: documento do Consenso 2004.** Disponível em <http://www.inca.br/publicações/consensointegra> . Acesso em 27 de outubro de 2009.

BREGAGNOLLO, E.A.; OKOSHI, K.; MATSUBARA, B.B.; TUCCI, P.J. **End-systolic pressure-diameter relation of the left ventricle during transient and sustained elevations of blood pressure.** Arquivos brasileiros de cardiologia 2000; 75(1):19-32.

BURGER, H.G. **Selective oestrogen receptor modulators.** Horm Res. 2000; 53:25-29.

BUZDAR, A.; HOWELL.; A, CUZICK, J. **Comprehensive side-effect profile of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early stage breast cancer: long-term safety analysis of the ATAC trial.** Lancet Oncol. 2006; 7: 633-643.

CHARLES T. STIER, JR., PRAVEEN N. CHANDER, LOUIS ROSENFELD, AND C. ANDREW POWERS. **Estrogen promotes microvascular pathology in female stroke-prone spontaneously hypertensive rats.** American Journal Physiological Endocrinology Metabolism. 285: 232–239, 2003.

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.

CLEMENT-CHOMIENNE, O.; WALSH, M.P.; COLE, W.C. **Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K1 current in rabbit vascular myocytes.** The Journal of Physiology (Lond). 1996; 495: 689 –700.

CONWAY, J.; JOHNSTON, J.; COATS, A.; SOMERS, V.; SLEIGHT, P. **The use of ambulatory blood pressure monitoring to improve accuracy and reduce the number of subjects in clinical trials of antihypertensive agents.** J Hypertens. 1988; 6: 111–116.

COOK, D.A. e VOLLRATH, B. **Free radicals and intracellular events associated with cerebrovascular spasm.** Cardiovascular Research, 1995; 30: 493–500.

COULDWELL, W.T., WEISS, M.H., DE GIORGIO, C.M., WEINER, L.P., HINTON, D.R., EHRESMANN, G.R., CONTI, P.S., APUZZO, M.L.J. **Clinical and radiographic response in a minority of patients with recurrent malignant gliomas treated with high dose tamoxifen.** Neurosurgery 32: 485–490. 1993

DAHLMAN-WRIGHT, K.; CAVAILLES, V.; FUQUA, S.A.; JORDAN, V.C.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; KORACH, K.S; MAGGI, A.; MURAMATSU, M.; PARKER, M.G.; GUSTAFSSON, J.A. International Union of Pharmacology. LXIV. **Estrogen Receptors.** Pharmacological Reviews. 2006; 58: 773-781.

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.

DICK, G.M., ROSSOW, C.F., SMIRNOV, S., HOROWITZ, B., SANDERS, K.M. **Tamoxifen Activates Smooth Muscle BK Channels through the Regulatory β_1 Subunit.** The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276: 34594–34599.

DU, X.J.; RIEMERSMA, R.A. E DART, A.M. **Cardiovascular protection by oestrogen is partly mediated through modulation of autonomic nervous function.** Cardiovascular Research. 1995; 30: 161–165.

DUBEY, R.K.; OPARIL, S.; IMTHUM, B.; JACKSON, E.K. **Sex hormones and hypertension.** Cardiovascular Research. 2002; 53: 688 – 708.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. **Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 Randomised trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women.** Lancet. 1992; 339: 71–85.

EK, R.O.; YILDIZ, Y.; CECEN, S.; YENISEY, C.; KAVAK, T. **Effects of tamoxifen on myocardial ischemia-reperfusion injury model in ovariectomized rats.** Mol Cell Biochem. 2008; 308: 227–235

EWER MS, GLÜCK S. **A woman's heart: the impact of adjuvant endocrine therapy on cardiovascular health.** Cancer. 2009; 115(9):1813-26.

FALUDI, A.A.; BERTOLAMI, M.C.; ALDRIGHI, J.M. **Menopausa.** Atheros. 2000; 11(3): 86 – 93.

FIGTREE, G.A., WEBB, C.M., COLLINS, P. **Tamoxifen Acutely Relaxes Coronary Arteries by an Endothelium-, Nitric Oxide-, and Estrogen Receptor- Dependent Mechanism.** The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics. 2000; 295: 519–523.

FRANKLIN, S.S.; GUSTIN, W. 4TH; WONG, N.D.; LARSON, M.G.; WEBER, M.A; KANNEL, W.B.; LEVY, D. **Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study.** Circulation. 1997; 96: 308-315.

GENNARI, L.; MERLOTTI, D.; DE PAOLA, V.; CALABRO, A.; BECHERINI, L.; MARTINI, G.; NUTI, R. **Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review.** *Am J Epidemiol.* 2005; 161: 307–320.

GERALDES, P.; GOSELIN, H.; TANGUAY, J.; CLÉMENT, R.; CALDERONE, A. **Tamoxifen treatment of myocardial infarcted female rats exacerbates scar formation.** *European Journal of Physiology.* 2007; 454: 385–393.

GILL, R.M.; JONES, B.D.; CORBLY, A.K.; OHAD, D.G.; SMITH, G.D.; SANDUSKY, G.E.; CHRISTE, M.E.; WANG, J., SHEN, W. **Exhaustion of the Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure induced by chronic coronary microembolization.** *Life Sci.* 2006; 79(6):536-44.

GRODSTEIN, F.; STAMPFER, M.J.; MANSON, J.E. **Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease.** *The New England Journal of Medicine.* 1996; 335: 453-461.

HAAS, E.; MEYER, M.R.; SCHURR, U.; BHATTACHARYA, I.; MINOTTI, R.; NGUYEN, H.H.; HEIGL, A.; LACHAT, M.; GENONI, M.; BARTON, M. **Differential effects of 17 β -estradiol on function and expression of estrogen receptor α , estrogen receptor β , and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis.** *Hypertension* 2007; 49: 1358–1363.

HALL, J.M.; MCDONNELL, D.P. **Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting.** *Mol Interv* 2005; 5: 343–357.

HAMMES, S.R.; LEVIN, E.R. **Extranuclear steroid receptors: nature and actions.** *Endocr Rev.* 2007 28: 726-741.

HASBI, A.; O'DOWD, B.F.; GEORGE, S.R. **A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search?** *Mol. Interv.* 2005; 5: 158–161.

HE, J.; KARGACIN, M.E.; KARGACIN, G.J.; WARD C. A. **Tamoxifen inhibits Na⁺ and K⁺ currents in rat ventricular myocytes.** *American Journal of Physiology.* 2003; 285: 661-668.

HELDRLING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S.; MATTHEWS, J.; CHENG, G.; HARTMAN, J.; TUJAGUE.; M,STROM, A.; TREUTER, E; WARNER, M. **Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.** *Physiol Rev.* 2007 **87**:905–931.

HISAMOTO, K.; BENDER, J.R. **Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors.** *Steroids.* 2005; 70: 382-387.

HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. For the HERS research group. **Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) Research Group.** *JAMA* 1998; 280: 605 - 613.

HUTCHISON SJ, CHOU TM, CHATTERJEE K, SUDHIR K. **Tamoxifen is an acute, estrogen-like, coronary vasodilator of porcine coronary arteries *in vitro*.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 2000; 38: 657-65.

HWANG KC, LEE KH E JANG Y. **Inhibition of MEK1,2ERK mitogenic pathway by estrogen with antiproliferative properties in rat aortic smooth muscle cells.** *Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology.* 2002; 80: 85-90.

JACKSON, W.F. **Ion channels and vascular tone.** *Hypertension.* 2000; 35:173-178.

JIANG, C.; SARREL, P.M.; LINDSAY, D.C; POOLE-WILSON, P.A.; COLLINS, P. **Endothelium-independent relation of rabbit coronary artery by 17- β oestradiol *in vitro*.** *British Journal of Pharmacology.* 1991; 104: 1033-1037

KARAS, R.H.; GAUER, E.A.; BIEBER, H.E.; BAUR, W.E.; MENDELSON, M.E. **Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogenactivated protein kinase-independent pathway.** 1998; *J Clin Invest.* 101: 2851–2861.

KLEPPISCH, T. NELSON, M.A. **ATP-sensitive K⁺ currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation.** *Am J Physiol* 1995; 269: H1634-H1640.

KO, E.A., HAN, J., JUNG, D.I., PARK, W.S. **Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells.** *Smooth Muscle Research.* 2008; 44: 65–81.

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.* 1996; 93: 5925-5930.

KUO, T.B.J. E YANG, C.C.H. **Sexual dimorphism in the complexity of cardiac pacemaker activity.** *American Journal of Physiology.* 2002; 283: 1695–1702.

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

LI, L.; HISAMOTO K, KIM KH, HAYNES MP, BAUER PM, SANJAY A, COLLINGE M, BARON R, SESSA WC, AND BENDER JR. **Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 16468-16473.

LIPTON A. **The anti-oestrogen tamoxifeno is a calcium antagonist in perfused rat mesentery.** *Cancer Chemotherapy pharmacology.* 20: 125-127. 1987.

LIU, C.C.; KUO, T.B.J. E YANG C.C.H. **Effects of estrogen on gender-related autonomic differences in humans.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: 2188–2193.

LOVE, RR.; WIEBE, D.A.; NEWCOMB, P.A. **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.; EPSTEIN, S.; NEWCOMB, P.A.; JORDAN, V.C.; CARBONE, P.P.; DEMETS, D.L. **Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausalwomen with breast cancer.** *N Engl J Med.* 1992; 326: 852–856.

MACMAHON, S.; PETO, R.; CUTLER, J.; COLLINS, R.; SORLIE, P.; NEATON, J.; ABBOTT, R.; GODWIN, J.; DYER, A.; STAMLER, J. **Blood pressure stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure:**

prospective observation studies corrected for the regression dilution bias. Lancet. 1990 ; 335: 827–838.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J.A. **Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β .** Mol Interv. 2003; 3: 281-292.

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

MENDELSON, M.E.; KARAS, R.H. **The protective effects of estrogen on the cardiovascular system.** The New England Journal of Medicine. 1999; 340: 1801-1811.

MEYER, M.R.; HAAS, E.; PROSSNITZ, E.R.; BARTON, M. **Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen.** Molecular and Cellular Endocrinology. 2009; 308: 9–16.

MILLER, V.M.; LI, L.; SIECK, G.C. **Endothelium-dependent effects of estrogen on vasomotor tone: consequences of non-genomic actions.** Vasc Pharmacol. 2002; 38: 109-113.

MIYOSHI, Y.; NAKAYA, Y. **Angiotensin II blocks ATP-sensitive K 1 channels in porcine coronary artery smooth muscle cells.** Biochem Biophys Res Commun. 1991; 181: 700 –706.

MONTENEGRO FM, PESSA LR, GOMES VA, DESTA Z, FLOCKHART DA, TANUS-SANTOS JE. **Assessment of Vascular Effects of Tamoxifen and Its Metabolites on the Rat Perfused Hindquarter Vascular Bed.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2009. 104: 400–407.

MORIARTY, K.; KIM, K.H.; BENDER, J.R. **Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling.** Endocrinology. 2006; 147: 5557–5563.

NELSON, M.T. e QUAYLE, J.M. **Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle.** American Journal of Physiology. 1995; 268: 799 - 822.

O'BRIAN, C.A., LISKAMP, R.M., SOLOMON, D.H. **Triphenylethylenes: a new class of protein kinase C inhibitors.** *J.Natl. Cancer Inst.* 1986; 76: 1243–1246.

O'MALLEY, C.A.; HAUTAMAKI, R.D; KELLEY, M.; MEYER, E.M. **Effects of ovariectomy and estradiol benzoate on high affinity choline uptake, Ach synthesis, and release from rat cerebral cortical synaptosomes.** *Brain Research.* 1987; 403: 237-242.

OWMAN, C.; BLAY, P.; NILSSON, C.; LOLAIT, S.J. **Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 228: 285–292.

PARK, S., KIM, B., KIM J WON, K.J., LEE, S., KWON, S., CHO, S. **Tamoxifen induces vasorelaxation via inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle.** *J. Vet. Med. Sci.* 2003; 65: 1155–60.

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

PRAKASH, Y.S.; TOGAIBAYEVA, A.A.; KANNAN, M.S.; MILLER, V.M.; FITZPATRICK, L.A.; SIECK, G.C. **Estrogen increases [Ca²⁺] efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle.** *Am J Physiol.* 1999; 45: H926-H934.

QUAYLE, J.M.; BONEV, A.D.; BRAYDEN, J.E.; NELSON, M.T. **Pharmacology of ATPsensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery.** *Am J Physiol.* 1995; 269: C1112-C1118.

REVANKAR, C.M.; CIMINO, D.F.; SKLAR, L.A.; ARTERBURN, J.B.; PROSSNITZ, E.R. **A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling.** *Science.* 2005 307: 1625–1630.

REVELLI, A.; MASSOBRIO, M.; TESARIK, J. **Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues.** *Endocr Rev.* 1998 19: 3-17.

ROSENKRANZ, K.; HINNEY, A.; ZIEGLER, A.; HERMANN, H.; FICHTER, M.; MAYER, H.; SIEGFRIED, W.; YOUNG, J.K.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. **Systematic mutation screening of the estrogen receptor-gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants.** J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 4524-4527.

RUTQVIST, L.E. 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

SHEARMAN, A.M. **Oestrogen receptor genetics: a needle that cuts through many haystacks?** Eur Heart J. 2006; 27:1519-1520.

SIMON, T., BOUTOUYRIE, P., SIMON, J.M., LALOUX, B., TOURNIGAND, C., TROPEANO, A.I., LAURENT, S. & JAILLON, P. **Influence of tamoxifen on carotid intima-media thickness in postmenopausal women.** Circulation. 2002; 106: 2925-2929.

SOBEY, C.G. **Potassium Channel Function in Vascular Disease.** Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 2001; 21: 28-38.

SONG, J., STANDLEY, P.R., ZHANG, F., JOSHI, D., GAPPY, S., SOWERS, J.R., RAM, J.L. **Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and contractility in vascular smooth muscle from rats.** Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics. 1996; 277: 1444–53.

STERGIOU, G.S.; ZOURBAKI, A.S; EFSTATHIOU, S.P.; STATHOPOULOS, G.P.; KERAMOPOULOS, A.D; MOUNTOKALAKIS, T.D. **Effect of Estrogen Receptor Modulator Tamoxifen on Blood Pressure, Plasma Renin Activity, and Renal Sodium Excretion** American Journal Of Hypertension. 2002; 15: 739–742.

STIRONE, C.; BOROUJERDI, A.; DUCKLES, S.P.; KRAUSE, D.N. **Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects.** Mol. Pharmacol. 2005a; 67: 105–113.

SUDHIR K, CHOU TM, MULLEN WL, HAUSMANN D, COLLINS P, YOCK PG, CHATTERJEE K. **Mechanisms of estrogen-induced vasodilation: in vivo studies in canine coronary conductance and resistance arteries.** Journal of the American College Cardiology. 1995; 26: 807–14.

SUDHIR, K.; CHOU, T.M.; MESSINA, L.M.; HUTCHISON, S.J.; KORACH, K.S.; CHATTERJEE, K.; RUBANYI, G.M. **Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene.** Lancet 1997b; 349:1146-1147.

SUDHIR, K.; CHOU, T.M.; CHATTERJEE, K.; SMITH, E.P.; WILLIAMS, T.C.; KANE, J.P.; MALLOY, M.J.; KORACH, K.S.; RUBANYI, G.M. **Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man.** Circulation 1997a; 96: 3774-3777.

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

THE WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. **Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women.** JAMA 2002; 288: 321–333.

THOMAS, P.; PANG, Y.; FILARDO, E.J.; DONG, J. **Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.** Endocrinology. 2005; 146: 624-632.

THORIN, E., PHAM-DANG, M., CLEMENT, R., MERCIER, I., CALDERONE, A. **Hyper-reactivity of cerebral arteries from ovariectomized rats: therapeutic benefit of tamoxifeno.** British Journal of Pharmacology. 2003; 140: 1187–1192.

TORAN-ALLERAND, C.D. **Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end?** Endocrinology 2004; 145: 1069-1074.

TSANG SY, YAO X, CHAN HY, CHAN FL, LEUNG CS, YUNG LM, AU CL, CHEN ZY, LAHER I, HUANG Y. **Tamoxifen and estrogen attenuate enhanced vascular reactivity induced by estrogen deficiency in rat carotid arteries.** Biochemical Pharmacology. 2007; 73: 1330-9.

TSANG, S.Y., YAO, X., CHAN, F.L., WONG, C.M., CHEN, Z.Y., LAHER, I., HUANG, Y. **Estrogen and tamoxifen modulate cerebrovascular tone in ovariectomized female rats.** Hypertension. 2004; 44: 78–82.

VALVERDE, M.A.; ROJAS, P.; AMIGO, J.; COSMELLI, D.; ORIO, P.; BAHAMONDE, M.I.; MANN, G.E.; VERGARA, C.; LATORRE, R. **Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit.** Science. 1999; 285 (5435):1929-31

WASSMANN S, LAUFS U, STAMENKOVIC D, LINZ W, STASCH JP, AHLBORY K, RÖSEN R, BÖHM M, NICKENIG G. **Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production.** Circulation. 2002; 30: 2083-91.

WELSH, D.G., NELSON, M.T., ECKMAN, D.M., BRAYDEN, J.E. **Swelling activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure.** Journal of Physiology. 2000; 527: 139-148.

WENGER, N.K.; SPEROFF, L.; PACKARD, B. **Cardiovascular health and disease in women.** The New England Journal of Medicine. 1993; 329(4): 247-56.

WHITE, R.E., DARKOW, D.J., LANG, J.L. **Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKca channels through a cGMPdependent mechanism.** Circulation Research. 1995; 77: 936–42.

WICKMAN, G., VOLLRATH, B. **Effects of tamoxifen on oxyhemoglobin-induced cerebral vasoconstriction.** European Journal of Pharmacology. 2000; 390: 181-4.

WILLIAMS, J.K.; ADAMS, M.R.; HERRINGTON, D.M.; CLARKSON, T.B. **Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries.** J Am Coll Cardiol 1992; 20: 452- 457.