

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCELO FREITAS MONTENEGRO

**Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos
na reatividade vascular**

**Ribeirão Preto – SP
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO FREITAS MONTENEGRO

Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Ribeirão Preto – SP

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Montenegro, Marcelo Freitas

Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular. Ribeirão Preto, 2009.

100 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Reatividade vascular. 2. Tamoxifeno. 3. Metabólitos do tamoxifeno. 5. Metabolismo do tamoxifeno. 6. Óxido nítrico. 7. Estresse oxidativo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Freitas Montenegro

Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

A minha querida mãe Maria de Lourdes Freitas, especialmente, por tudo.

A minha esposa e amiga Mary

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

À funcionária Fátima Helena Ferreira Petean, o início de tudo;

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, não somente pela oportunidade e pelos ensinamentos acadêmicos, mas pelos ensinamentos pessoais, tão essenciais à formação e indisponíveis em qualquer literatura;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A Lisandra R. Pessa, Carla S. Ceron e Anna Laura Bechara pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos de laboratório, pela amizade e paciência, em especial aos amigos Carlos Alan Cândido Dias Junior e Evandro Neto Neves, pelas longas discussões sobre ciência.

A secretária da pós-graduação Sonia Maria Stefanelli pelo excelente auxílio técnico, além da amizade e cooperação.

A todos os colegas de departamento, funcionários ou alunos, pela amizade e companheirismo, em especial aos amigos Fernando Spiller, Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, José Carlos de Aguiar, Osmar Vettore e José Waldik Ramon.

Obrigado.

Vaidade das vaidades, diz o Eclesiastes, vaidade das vaidades, tudo é vaidade. Que proveito tira o homem de todo o trabalho com que se afadiga debaixo do sol? Uma geração passa, e outra vem. O sol se levanta, o sol se põe; apressa-se a voltar ao seu lugar; em seguida se levanta de novo. O vento vai em direção ao sul, vai em direção ao norte, volteia e gira nos mesmos circuitos. Todos os rios se dirigem para o mar, e o mar não se enche; os rios continuam a correr em direção ao mar e não se cansam; Todas as coisas se afadigam mais do que se pode dizer. A vista não se farta de ver, o ouvido nunca se sacia de ouvir.

Eu apliquei meu espírito a um estudo atencioso e à sábia observação de tudo o que há debaixo dos céus: Foi posto ao homem esta obrigação ingrata. Vi tudo o que se faz debaixo do sol e percebi: tudo era vaidade e correr atrás do vento; Eu disse comigo mesmo: “Eis que amontoei e acumulei mais sabedoria do que todos antes de mim”; porque meu espírito estudou muito a sabedoria e a ciência e apliquei o meu espírito ao discernimento da sabedoria, da loucura e da tolice, mas cheguei a conclusão que isso também era vaidade e correr atrás do vento; Que prazer tem o homem ao ver seu trabalho debaixo do sol, além de olhá-lo e contemplá-lo? Apenas este é o seu proveito. Passei então a pensar na sabedoria na loucura e na tolice. Concluí que a sabedoria leva vantagem sobre a loucura, como a luz leva vantagem sobre as trevas. Mas notei que o mesmo destino espera ambos, sábio e louco; e notei que a minha sorte será a mesma dos demais. Então para que serve a minha sabedoria? Percebi então que pensar em tudo isso também era vaidade e correr atrás do vento.

RESUMO

RESUMO

MONTENEGRO, M.F. Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular. 2009. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O tamoxifeno é um antiestrogênico largamente utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama. Entretanto, vários estudos epidemiológicos têm demonstrado sua capacidade de reduzir significativamente o risco de doenças cardiovasculares, ao mesmo tempo em que aumenta os riscos de trombose. As causas desses efeitos ambíguos do tamoxifeno permanecem desconhecidas. Neste trabalho, objetivamos testar a hipótese de que esses diferentes efeitos cardiovasculares do tamoxifeno poderiam ser resultantes da ação de seus diferentes metabólitos: 4-hidroxi-tamoxifeno n-desmetil-tamoxifeno e o recém caracterizado endoxifeno. Esta hipótese baseou-se no conhecimento de que o tamoxifeno é extensamente metabolizado por enzimas do sistema citocromo P450, as quais produzem os referidos metabólitos, que possuem atividade farmacológica superior ao próprio tamoxifeno. Para testar esta hipótese, estudamos os efeitos do tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos na reatividade vascular do trem posterior de ratos, além de diferentes parâmetros bioquímicos, que poderiam indicar ação benéfica ou deletéria destes metabólitos na função endotelial, tais como os níveis de nitratos e nitritos e o estresse oxidativo, além da atividade de enzimas envolvidas no controle e produção de espécies reativas do oxigênio, como a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase e NADPH oxidase. Adicionalmente, avaliamos os possíveis efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos em anéis de aorta, utilizando técnicas de órgão isolado, bem como os possíveis mecanismos envolvidos em tais efeitos. Os resultados mostraram que enquanto o tratamento com tamoxifeno promoveu uma redução no vasorelaxamento dependente do endotélio, o tratamento com seus

metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno promoveu melhoras significativas no mesmo parâmetro, avaliado em um importante leito vascular de resistência, o trem posterior de ratos. O tratamento com tamoxifeno aumentou o estresse oxidativo e diminuiu os níveis de metabólitos do NO, enquanto seus metabólitos mostraram-se antioxidantes sem afetar significativamente os níveis de metabólitos do NO. Por fim, assim como o tamoxifeno, os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno induziram vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos, sendo que a amplitude do vasorelaxamento foi superior para os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os metabólitos do tamoxifeno exercem efeitos diferenciados aos do tamoxifeno, o que poderia explicar, ao menos em parte, os diferentes achados descritos para o uso do tamoxifeno.

ABSTRACT

ABSTRACT

MONTENEGRO, M.F. Effects of tamoxifen and its metabolites on vascular reactivity. 2009. 100 p. Thesis (PhD) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator (SERM) widely used to treat or prevent breast cancer. Several epidemiological studies have suggested that tamoxifen produces beneficial cardiovascular effects at the same time that it increases the risk of thrombosis. The mechanisms explaining these contradictory effects are not well known. In this study, we evaluated the hypothesis that these different cardiovascular effects reported with the use of tamoxifen could be due to the effects of main tamoxifen metabolites: 4-hydroxy-tamoxifen, *n*-desmethyl-tamoxifen, and a recently characterized metabolite named endoxifen. This hypothesis is based on knowledge that tamoxifen is extensively metabolized by P450 enzymes, which are responsible for the production these metabolites which have been reported to have superior pharmacological properties than the parent drug. To test this hypothesis, we studied the effects of treatment with tamoxifen and its metabolites (*N*-desmethyl-tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen, and endoxifen) on vascular reactivity on perfused hindquarter vascular bed of rats. In addition, we assessed biochemical parameters related to endothelial function, such as plasma nitrite and nitrate levels, oxidative stress, and activity of enzymes enrolled in the control and production of reactive oxygen species, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase. Finally, we evaluated the possible acute effects induced by tamoxifen and its metabolites on pre-contracted aortic rings, using standardized organ bath techniques. Our results showed that while tamoxifen impaired endothelial-dependent vasodilator responses, tamoxifen metabolites *N*-desmethyl-tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen, and endoxifen improved endothelial-dependent vasodilator responses. While

tamoxifen increased oxidative stress and decreased nitric oxide formation, treatment with tamoxifen metabolites decreased oxidative stress, without producing significant effects on markers of nitric oxide formation. Finally, similar to tamoxifen, tamoxifen metabolites induced vasorelaxation in isolated precontracted aortic rings, although these effects were more pronounced with *N*-desmethyl-tamoxifen and endoxifen. Our results suggest that tamoxifen metabolites produce different effects when compared with tamoxifen and may explain, at least in part, the controversial effects associated with tamoxifen treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica do tamoxifeno a endoxifeno e outros metabólitos.

Figura 2. Demonstração esquemática da preparação do leito do trem posterior.

Figura 3. Linearidade do método de determinação de MDA.

Figura 4. Curva padrão da atividade da SOD.

Figura 5. Vasorelaxamento dependente do endotélio induzido pela Ach no leito vascular do trem posterior de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 6. Vasorelaxamento independente do endotélio induzido pelo NPS no leito vascular do trem posterior de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 7. Concentrações de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em termos de MDA no plasma e sangue total de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 8. Concentrações de NO_x (nitrato + nitrito) e nitrito no plasma de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 9. Atividade no sangue total da SOD, CAT e GPx de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 10. Atividade da NADPH oxidase e produção de ânion superóxido na aorta de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno.

Figura 11: Efeito Relaxante Máximo e pD₂ obtidos para o vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam ou seus metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina.

Figura 12: Participação dos receptores do estrógeno no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam ou seus metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina.

Figura 13: Efeito do L-NAME no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam ou seus metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina.

Figura 14: Participação de prostanóides no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam ou seus metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina.

Figura 15: Efeito da associação de inibidores da COX e NOS no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam ou seus metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EPM – erro padrão da média

NADPH – β - Nicotinamida adenosina dinucleotído fosfato

GSH – Glutathiona reduzida

NOS – sintase do óxido nítrico

L-NAME – N_{ω} -Nitro-L-arginina metil éster, inibidor não seletivo da NOS

DHE – Dihidroetidina

NO – óxido nítrico

SERM – Modulador seletivo do receptor de estrógeno

ICI 182.780 – antagonista dos receptores de estrógeno

Ach – Acetilcolina

NPS – Nitroprussiato de sódio

μ g – micrograma

nm – nanômetros

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

RPM – rotação por minuto

$P < 0,05$ – valor de probabilidade $< 0,05$

$^{\circ}\text{C}$ – graus celsius

NS – não significativo

n – número. Refere-se ao número amostral utilizado nos experimento

ml – mililitro (10^{-3} l)

min – minuto

mg – miligrama

Abs – Absorbância

COX – ciclooxigenase

MDA – malondialdeído

PBS – tampão fosfato salina

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	16
1. Introdução	21
<i>O tamoxifeno produz diferentes efeitos no sistema cardiovascular</i>	<i>21</i>
<i>O tamoxifeno e as enzimas P450: produção de diferentes metabólitos ativos</i>	<i>22</i>
<i>Tamoxifeno e reatividade vascular</i>	<i>24</i>
<i>Os diferentes metabólitos do tamoxifeno podem ter ações diferentes na reatividade vascular</i>	<i>25</i>
<i>O óxido nítrico (NO) pode estar envolvido nos efeitos benéficos exercidos pelo tamoxifeno na vasculatura.</i>	<i>26</i>
<i>O tamoxifeno promove vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos</i>	<i>26</i>
<i>O Tamoxifeno aumenta o estresse oxidativo ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de enzimas antioxidantes</i>	<i>27</i>
2 - Hipótese	31
3 – Objetivo	33
4 - Materiais e Métodos	35
<i>Considerações Gerais:</i>	<i>35</i>
<i>Preparação do leito vascular do trem posterior do rato</i>	<i>37</i>
<i>Drogas e soluções</i>	<i>38</i>
<i>Determinação de nitritos plasmáticos por quimiluminescência</i>	<i>39</i>
<i>Determinação de nitratos e nitritos (NO_x) com reagente de Griess</i>	<i>40</i>
<i>Determinação do estresse oxidativo:</i>	<i>40</i>
1. Avaliação da peroxidação lipídica	40
<i>Curva padrão de MDA</i>	<i>41</i>
<i>Determinação dos níveis plasmáticos de MDA</i>	<i>41</i>
2. Oxidação da DHE	43
<i>Avaliação da atividade da SOD</i>	<i>43</i>
<i>Atividade da CAT</i>	<i>45</i>
<i>Atividade da GPx</i>	<i>45</i>
<i>Atividade da NADPH oxidase</i>	<i>46</i>

<i>Avaliação dos efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos</i>	46
<i>Estudo dos efeitos agudos do tamoxifeno ou seus metabolitos em anéis isolados de aorta... 47</i>	47
<i>Estudo participação dos receptores de estrógeno na resposta vascular induzida pelo tamoxifeno ou seus metabólitos.....</i>	48
<i>Determinação dos mediadores envolvidos na resposta vascular ao tamoxifeno ou seus metabólitos.....</i>	48
<i>Análise estatística</i>	48
5 – Resultados.....	51
<i>Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na freqüência cardíaca, pressão arterial sistêmica e peso corpóreo.</i>	51
<i>Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular do trem posterior de ratos à Ach e ao NPS.</i>	52
<i>O tratamento com tamoxifeno aumenta os níveis de MDA no plasma e sangue, enquanto seus metabólitos apresentam efeitos antioxidantes.....</i>	55
<i>O tratamento com tamoxifeno diminui os níveis plasmáticos de metabólitos do óxido nítrico (nitratos e nitritos).</i>	57
<i>Efeitos do tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos na atividade de enzimas antioxidantes.....</i>	57
<i>Efeitos do tamoxifeno ou seus metabólitos em anéis de aorta contraídos com fenilefrina.</i>	59
<i>Papel dos receptores de estrógeno nos efeitos vasodilatadores exercidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos.</i>	61
<i>Efeito do L-NAME na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.</i>	62
<i>Efeito da Indometacina na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.</i>	63
<i>Efeito da associação de L-NAME e indometacina na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.....</i>	63
6 – Discussão	70
7 – Conclusão.....	80
8 – Referências Bibliográficas	82
9 – Apêndice.....	89
<i>Artigo publicado na revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology:.....</i>	89
10 – Anexos	99
<i>1. Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa.....</i>	100

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O tamoxifeno produz diferentes efeitos no sistema cardiovascular

Doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em todo mundo e fortes evidências sugerem que a sinalização hormonal desempenha um importante papel na regulação de mecanismos cardioprotetores [1]. Neste sentido, vários estudos têm mostrado que mulheres antes da menopausa apresentam um risco significativamente mais baixo de doença cardiovascular, quando comparado com os homens da mesma faixa etária [2]. Entretanto, este risco aumenta consideravelmente com o início da menopausa [3].

Nos últimos anos, muitas evidências epidemiológicas têm mostrado que mulheres tratadas com tamoxifeno, um medicamento largamente utilizado no tratamento e prevenção do câncer de mama, apresentam risco cardiovascular diminuído, mesmo durante a menopausa [4].

Este efeito protetor exercido pelo tamoxifeno no sistema cardiovascular resulta principalmente na redução de infarto do miocárdio [5], o que tem sido confirmado por uma série de outros estudos [4, 6-9]. Esta particularidade tem levado alguns autores a sugerir que o efeito cardioprotetor do tamoxifeno é semelhante ao observado com uso das estatinas [2, 9, 10]. O tratamento com tamoxifeno, entretanto, resulta em grande variabilidade de prognóstico, e os mecanismos pelos quais estas respostas variáveis ao tamoxifeno ocorrem, até o momento permanecem desconhecidos.

Por outro lado, o tamoxifeno não é usado sem riscos. Em direto contraste com os estudos anteriormente citados, hoje o maior consenso a respeito de suas ações no sistema cardiovascular é o aumento do risco de trombose venosa [4, 11] e embolia pulmonar [12]. Este aumento no risco de trombose, ao menos em parte, parece ser mediado por espécies reativas do oxigênio [13], que promovem um aumento da função

plaquetária [13]. A suscetibilidade a trombose com uso de tamoxifeno assemelha-se àquelas observadas com uso de estrógenos na terapia de reposição hormonal [14, 15]. Entretanto, este risco parece não acontecer com uso do raloxifeno, um antiestrogênico da mesma família e estruturalmente relacionado ao tamoxifeno [16];

Não está claro na literatura científica as possíveis causas pelas quais o tratamento crônico com tamoxifeno aumenta o risco de trombose ao mesmo tempo em que diminui o risco de infarto do miocárdio [17]. É importante ressaltar que a maioria dos dados atualmente disponíveis a respeito dos efeitos do tamoxifeno no sistema cardiovascular são provenientes de estudos cujo objetivo principal foi avaliar o impacto desta droga no câncer de mama e não no sistema cardiovascular. Sendo assim, a maioria dos dados hoje disponíveis a respeito do efeito protetor ou deletério do tamoxifeno no sistema cardiovascular baseiam-se em análises secundárias. Neste sentido, estudos cujo objetivo principal seja avaliar a ação do tamoxifeno no sistema cardiovascular e a descoberta dos mecanismos pelos quais o tamoxifeno exerce estes diferentes efeitos seriam de grande interesse para o desenvolvimento de terapias racionais, que possam fazer uso das ações benéficas que o tamoxifeno parece exercer no sistema cardiovascular.

O tamoxifeno e as enzimas P450: produção de diferentes metabólitos ativos

O tamoxifeno foi o protótipo de um grupo de drogas estruturalmente relacionadas chamadas de moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (ou SERMs). Estes SERMs têm a capacidade de atuar no receptor de estrógeno de forma diferente daquelas pelas quais atua o próprio estrógeno; podem agir como agonistas ou antagonistas, dependendo do tecido alvo. Esta particularidade pode estar associada aos diferentes efeitos que o tamoxifeno exerce no sistema cardiovascular. Por outro lado, hoje sabemos que o tamoxifeno é extensamente metabolizado por enzimas do sistema P450 [18-21].

Seus efeitos ocorrem via formação de metabólitos ativos antiestrogênicos, que são mais potentes que o próprio tamoxifeno [22-26]. Este processo de metabolização via P450 resulta em dois metabólitos ativos bem estabelecidos: o 4-hidroxi-tamoxifeno e o n-desmetil-tamoxifeno [27, 28]. Mais recentemente, um grupo de pesquisadores da Indiana University School of Medicine, EUA, caracterizaram outro metabólito ativo do tamoxifeno, 4-hidroxi-n-desmetil-tamoxifeno, denominado endoxifeno [26]. Embora este metabólito tenha sido identificado em 1988 (naquela época recebeu a sigla BX para designá-lo), nenhum estudo verificou sua atividade [25]. Para surpresa dos pesquisadores, o endoxifeno apresentou alta afinidade por ambos receptores de estrógeno (α e β) e potência antiestrogênica 100 vezes superior ao tamoxifeno [26, 29]. Além do mais, o endoxifeno tem sido descrito como o metabólito mais importante clinicamente, uma vez que a concentração plasmática de endoxifeno é cerca de seis vezes maior do que o 4-hidroxi-tamoxifeno, o qual se acreditava até então, ser o metabólito encontrado em maior quantidade no plasma durante o tratamento com tamoxifeno [24, 26].

A importância que diferentes isoformas de enzimas P450 podem exercer nos efeitos farmacológicos das drogas é amplamente conhecida. [30, 31]. Com o tamoxifeno, estas enzimas têm igual importância: diferentes isoformas de enzimas P450 metabolizam o tamoxifeno (Figura 1) resultando em diferentes compostos [23, 31, 32], com diferentes efeitos, o que poderia explicar, ao menos em parte, as disparidades na literatura a respeito dos efeitos do tamoxifeno sobre o sistema cardiovascular.

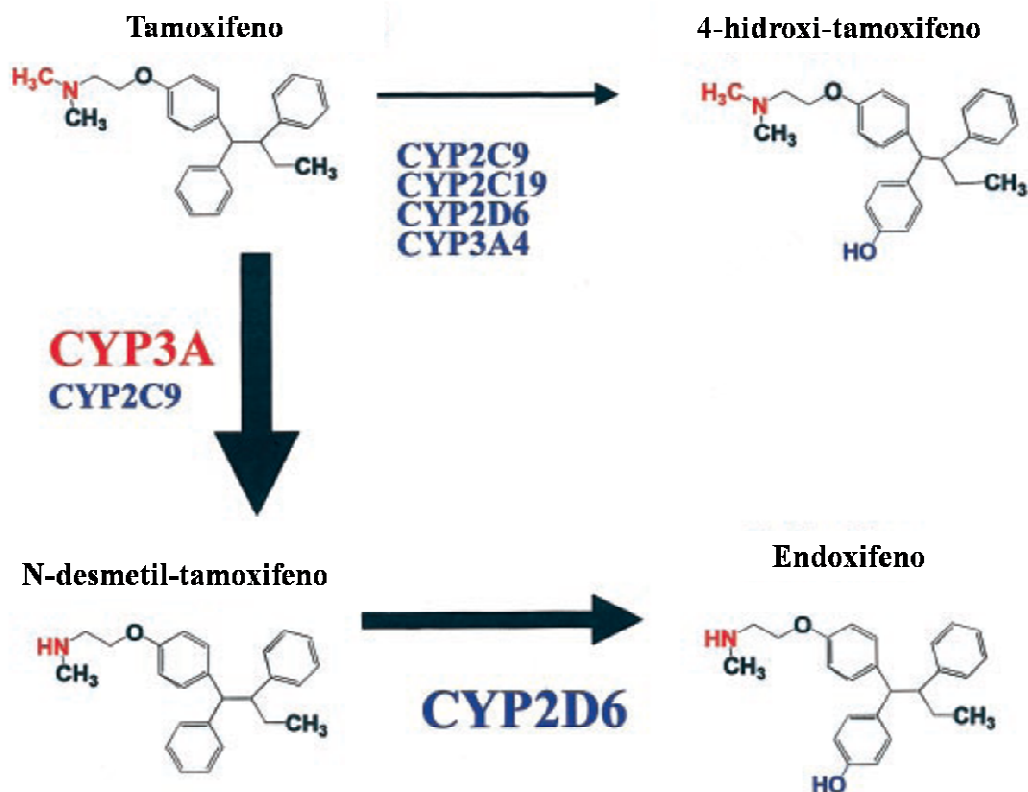


Figura 1. Rota metabólica do tamoxifeno a endoxifeno e outros metabólitos. Adaptado de Stearns et al.[26]

Tamoxifeno e reatividade vascular

A reatividade vascular tem se mostrado um eficiente parâmetro para avaliar a função vascular [33] e a correlação entre redução na resposta vascular mediada pelo endotélio, disfunção endotelial e doença cardiovascular está bem estabelecida [33-35]. Neste sentido, muitos estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o tamoxifeno melhora a reatividade vascular, exercendo um efeito benéfico nas respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio. Por exemplo, Clarke e cols. demonstraram que homens com doença arterial coronariana submetidos ao tratamento com tamoxifeno tinham uma melhora significativa na função endotelial [36], avaliada por meio de dilatação mediada pelo fluxo [36]. Outro estudo comparou o mesmo parâmetro em mulheres pós-

menopausadas tratadas ou não com tamoxifeno [37]. As mulheres que receberam tratamento com tamoxifeno apresentaram um aumento significativo na dilatação mediada pelo fluxo, indicando melhora na função endotelial [37]. Sbarouni e cols. [38] encontraram uma significativa melhora no mesmo parâmetro com uso da raloxifeno, porém com magnitude inferior à observada com tamoxifeno; Estas melhoras na reatividade vascular induzidas pelo tamoxifeno também têm sido relatadas em estudos experimentais utilizando coelhos e ratos de ambos os sexos [39-41]. Conjuntamente, estes resultados sugerem que as evidências experimentais indicando efeitos protetores do tamoxifeno, são confirmadas em estudos clínicos, e que este efeito benéfico na vasculatura parece ser independente de gênero.

Por outro lado, alguns estudos não observaram efeitos vasculares associados ao uso do tamoxifeno. Por exemplo, Ong e cols. não encontraram diferenças na reatividade vascular avaliada pela dilatação mediada pelo fluxo em mulheres menopausadas tratadas com tamoxifeno [42]; Griffiths e cols. utilizando raloxifeno [43] encontraram resultados semelhantes, em direto contraste com os estudos anteriormente citados. É importante ressaltar, entretanto, que nenhum destes estudos levou em consideração a ação dos diferentes metabólitos do tamoxifeno. Como mencionamos anteriormente, a formação destes metabólitos pode ser significativamente alterada pela ação de enzimas do sistema citocromo P450.

Os diferentes metabólitos do tamoxifeno podem ter ações diferentes na reatividade vascular

Embora esteja bem estabelecido na literatura que o tamoxifeno sofre extensa metabolização e que seus metabólitos possuem efeitos farmacológicos, nenhum estudo prévio havia avaliado se estes metabólitos poderiam alterar a reatividade vascular de

forma diferenciada. Neste sentido, o grande interesse deste trabalho foi verificar a ação do tamoxifeno e seus diferentes metabólitos na reatividade vascular.

O óxido nítrico (NO) pode estar envolvido nos efeitos benéficos exercidos pelo tamoxifeno na vasculatura.

O NO é um gás solúvel com papéis fisiológicos fundamentais. Alterações na atividade do NO contribuem para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos, tais como hipertensão arterial, aterosclerose, doença coronariana e hipertensão pulmonar, entre outras [44]. Estas alterações podem ser devidas, ao menos em parte, a variações de atividade da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), a qual produz NO a partir da L-arginina e outros cofatores [44, 45].

O NO tem um papel essencial na manutenção da homeostase, tendo potente ação vasodilatadora, bem como anti-plaquetária [44] e a diminuição da biodisponibilidade de NO pode promover o meio ideal para a trombose [44].

Recentemente, uma série de estudos tem demonstrado que o raloxifeno, um SERM relacionado ao tamoxifeno, aumenta a expressão da eNOS [46], bem como a produção de NO [47], de forma semelhante ao estrógeno [1, 48]. Estas evidências sugeriram fortemente que a interação de agonistas com os receptores de estrógeno poderia ativar rapidamente a eNOS por mecanismos não-genômicos [49-51] e ser, ao menos em parte, responsável pelo efeito benéfico ao sistema cardiovascular relatados em mulheres que fazem uso de SERMs como tamoxifeno [4, 6-9].

O tamoxifeno promove vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o tamoxifeno tem a propriedade de induzir vasorelaxamento agudo, provavelmente envolvendo mecanismos não-genômicos,

semelhantes ao descrito para o estradiol, em mecanismo em parte dependente de NO [40]. Além disso, o tamoxifeno mostrou-se eficaz em induzir vasorelaxamento agudo de leito mesentérico contraído, nas concentrações a partir de 1 μM , próximas às aquelas encontradas no plasma de pacientes em tratamento com tamoxifeno [52]. Apesar disto, nenhum estudo prévio havia avaliado se metabólitos do tamoxifeno promoviam vasorelaxamento, se este vasorelaxamento seria similar ao observado com tamoxifeno e a participação da produção de NO nesses efeitos. Esta constatação poderia explicar, ao menos em parte, a melhora na reatividade vascular observada com uso do tamoxifeno. Sendo assim, foi de grande interesse para este estudo avaliar se o tamoxifeno ou seus metabólitos apresentariam propriedades de induzir vasorelaxamento, bem como se esses efeitos seriam dependentes da síntese de NO.

O Tamoxifeno aumenta o estresse oxidativo ao mesmo tempo em que aumenta a expressão de enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ROS) influenciam uma série de processos bioquímicos, e atuam como sinalizador intracelular, em um mecanismo fisiológico controlado por uma série de enzimas chamadas antioxidantes, entre as quais podemos citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) entre outras [53-56]. Entretanto, em estados patológicos, ou por exposição a substâncias exógenas (como drogas, por exemplo), este equilíbrio fisiológico entre a produção endógena de ROS e sua eliminação por enzimas antioxidantes pode sofrer alterações, promovendo diversos processos deletérios ao organismo (estresse oxidativo) [54, 57]. Por exemplo, pode ocorrer peroxidação de membranas lipídicas, seqüestro de NO e morte celular. Na vasculatura, o estresse oxidativo pode atuar de forma altamente deletéria, uma vez que o aumento de ROS promove um seqüestro de NO (via redução) e formação de

peroxinitrito (ONOO^-) [45]. Esta reação tem importância fundamental, pois impede que o NO atue na manutenção do tônus vascular, e ainda forma peroxinitrito, uma molécula com alta capacidade oxidante. Além do mais, o estresse oxidativo aumenta a função plaquetária, contribuindo para os estados pró-coagulantes envolvidos na trombose. Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que o tamoxifeno aumenta o estresse oxidativo [58]. Por exemplo, foi demonstrado que os 3 principais metabólitos ativos do tamoxifeno (4-hidroxi-tamoxifeno, n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno) aumentam em diferentes proporções a geração de ROS em plaquetas [13].

Por outro lado, um estudo recente mostrou um aumento na expressão e atividade da enzima SOD mitocondrial (MnSOD ou SOD2, isoforma constitutiva da SOD), em tecidos cardíacos e em cardiomiócitos submetidos ao tratamento com tamoxifeno [59]. Este aumento na expressão da MnSOD induzido pelo tamoxifeno já foi observado anteriormente [47, 60]. Entretanto, nenhuma alteração na atividade CAT e GPx [47, 60] foi observada, indicando que a SOD parece de fato ter maior importância no que se refere ao tamoxifeno.

Estes experimentos sugerem que tamoxifeno exerce diferentes ações no que se refere à produção de espécies reativas de oxigênio. É interessante notar que o aumento de ROS na vasculatura pode resultar em alterações na atividade plaquetária. Estudos “*in vitro*” sugerem que o tamoxifeno induz a produção de ROS em plaquetas isoladas [13] e aumenta a concentração intracelular de cálcio em plaquetas [61] aumentando função plaquetária. Essa característica por ter relação com os eventos de trombose venosa e tromboembolia relatados na terapia com tamoxifeno [12]. Por outro lado, o aumento na atividade de enzimas antioxidantes (como a SOD) pode exercer um efeito protetor, reduzindo a ação de ROS sobre a função plaquetária. Estas evidências experimentais demonstram novamente os efeitos ambíguos que o tamoxifeno possui sobre o sistema

cardiovascular, os quais podem ser devidos, ao menos em parte, pela ação de seus diferentes metabólitos.

HIPÓTESE

2 - Hipótese

Assim, considerando os estudos acima descritos, formulamos a hipótese de que os diferentes (por vezes antagônicos) efeitos cardiovasculares do tamoxifeno poderiam resultar da ação de seus diferentes metabólitos: 4-hidroxi-tamoxifeno n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno, *os quais poderiam ser benéficos ou deletérios.*

OBJETIVO

3 – Objetivo

Baseado nesta hipótese, este estudo teve como objetivo:

- a) Avaliar os efeitos de 14 dias de tratamento com tamoxifeno ou seus 3 principais metabólitos (4-hidroxi-tamoxifeno, n-desmetil-tamoxifeno e o recentemente caracterizado endoxifeno) sobre a reatividade vascular do trem posterior de ratos;
- b) Avaliar os efeitos desse tratamento nos níveis plasmáticos de metabolitos do NO, bem como estresse oxidativo.
- c) Estudar se os metabólitos do tamoxifeno apresentam efeitos agudos em anéis de aorta contraídos, bem como os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - Materiais e Métodos

Realizamos especificamente os seguintes ensaios:

- 1) Avaliação da reatividade vascular no trem posterior dos ratos, em resposta à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS);
- 2) Determinação dos níveis plasmáticos de nitratos e nitritos, medidos pelo reagente de Griess, bem como os níveis plasmáticos de nitrito quantificados por quimiluminescência;
- 3) Avaliação do estresse oxidativo, pela quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA) no plasma e sangue, e a análise da oxidação da dihidroetidina (DHE) em anéis de aorta;
- 4) Avaliação da atividade eritrocítica de enzimas envolvidas no controle e produção de espécies reativas do oxigênio, tais como a SOD, CAT, GPx, bem como a atividade tecidual da enzima NADPH oxidase na aorta dos animais.
- 5) Avaliação dos efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos em anéis de aorta contraídos com fenilefrina.

Considerações Gerais:

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética e experimentação animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob número 136/2006. Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (USP), com 6 semanas de idade, pesando entre 190 e 210 gramas no início do estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, em número máximo de 5 animais por unidade com água e ração apropriada “*ad libitum*”, cumprindo adequadamente as exigências vigentes. O protocolo experimental consistiu no tratamento diário dos animais com veículo controle, tamoxifeno

ou seus metabólitos durante 14 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais:

- 1) **Controle**: ratos tratados subcutaneamente com óleo de milho;
- 2) **Tamoxifeno**: ratos tratados subcutaneamente com 1mg/kg de tamoxifeno dissolvido em óleo de milho;
- 3) **n-desmetil-tamoxifeno**: ratos tratados subcutaneamente com 1mg/kg de n-desmetil-tamoxifeno dissolvido em óleo de milho;
- 4) **4-hidroxi-tamoxifeno**: ratos tratados subcutaneamente com 1mg/kg de 4-hidroxi-tamoxifeno dissolvido em óleo de milho;
- 5) **Endoxifeno**: ratos tratados subcutaneamente com 1mg/kg de endoxifeno dissolvido em óleo de milho;

Tamoxifeno e seus metabólitos foram emulsificados em óleo de milho, como descrito previamente [62] e as doses utilizadas foram escolhidas com base em estudos anteriores os quais sugerem que essas doses são capazes de inibir o crescimento de tumores mamários, em modelo experimental de câncer de mama em roedores [62].

Após o período de tratamento (14 dias), os animais foram anestesiados, e submetidos a análise da reatividade vascular do trem posterior. Este mesmo protocolo foi repetido, sendo que ao fim do tratamento, os animais não foram submetidos a reatividade vascular do trem posterior, mas somente sangue e tecidos foram coletados para a continuidade das análises dos diferentes ensaios bioquímicos propostos nesse estudo. Por fim, ratos Wistar saudáveis pesando de 200-300g foram utilizados nos estudos de anel isolado de aorta.

Preparação do leito vascular do trem posterior do rato

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uretana (1,2 g/kg). Após a indução da anestesia, uma incisão abdominal foi realizada e a aorta abdominal ligada e canulada, na região próxima à bifurcação ilíaca. O trem posterior foi então perfundido *in situ* com solução de Krebs - bicarbonato (borbulhada com 95% O₂, 5% CO₂, a 37 °C, pH 7,4), com uso de bomba peristáltica (Carter-Manostat, Barnant Com, IL, USA) ao fluxo constante de 16 ml/Kg/minuto (min). Em seguida, o animal foi sacrificado com injeção intracardíaca de KCl 3 mol/l e a veia cava seccionada para o escape do perfusado. A pressão de perfusão basal foi ajustada para aproximadamente 90 mmHg adicionando-se metoxamina (50-100 μmol/l), um agonista α₁-adrenérgico, diretamente na solução de Krebs. Nestas condições, como o fluxo é constante, mudanças na pressão de perfusão refletem mudanças no tônus vascular do trem posterior. Após o início da perfusão, um período de aproximadamente 20-30 min foi esperado para estabilização da preparação e então as curvas aos vasodilatadores foram iniciadas. Entre a bomba peristáltica e o cateter na aorta, um transdutor de pressão (conectado a um sistema de aquisição de dados, MP150CE; Biopac Systems Inc. CA, USA) foi inserido para a avaliação em tempo real das mudanças na pressão de perfusão. Curvas dose-resposta à Ach e ao NPS foram examinadas, para avaliação das respostas dependente e independente do endotélio, respectivamente. Ach (3.10⁻⁴ a 10⁻¹ μg) ou NPS (3.10⁻⁵ a 10⁻² mg) foram injetados em pequenos volumes (30-100 μl), diretamente no circuito de perfusão, conforme descrito anteriormente [63, 64]. A figura 2 demonstra de forma esquemática a preparação do leito do trem posterior.

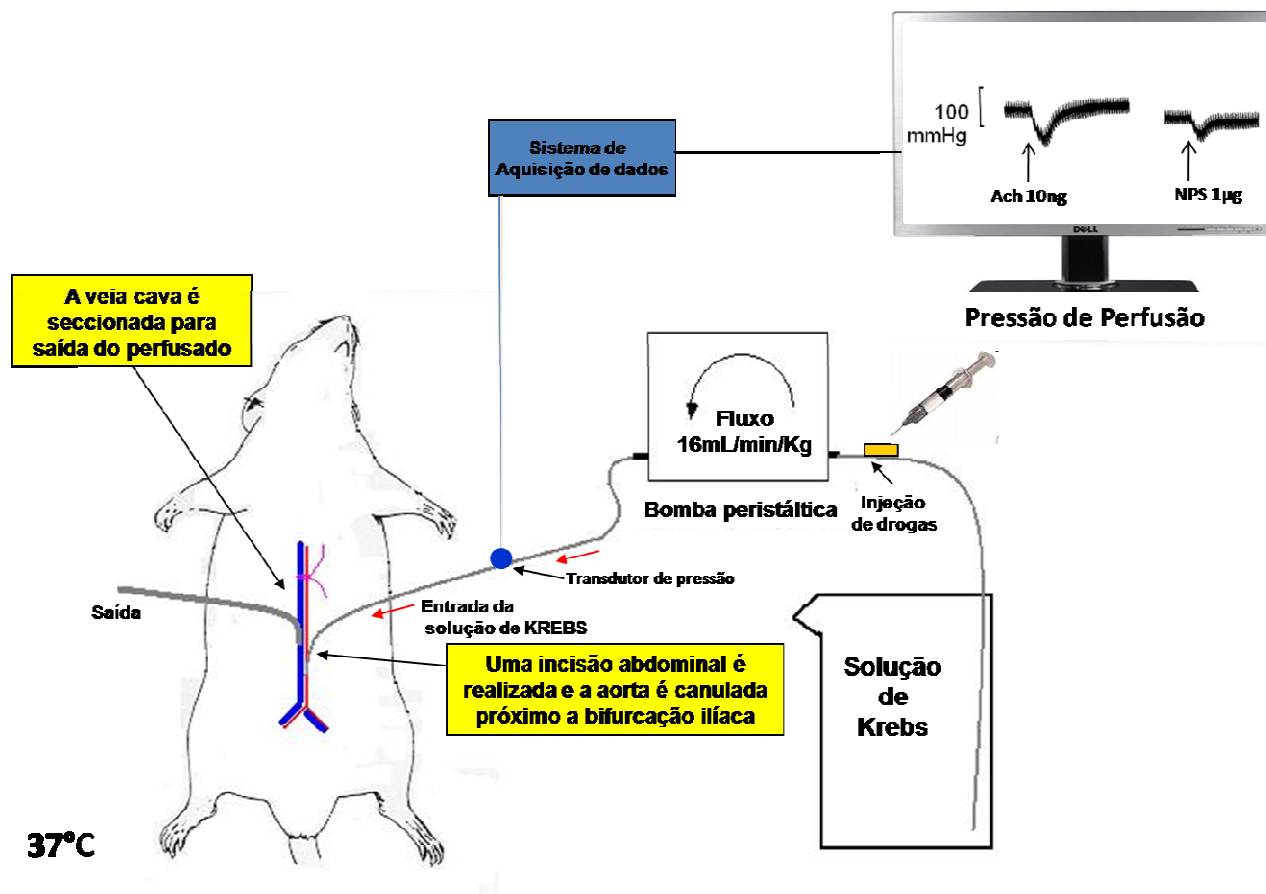


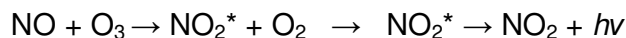
Figura 2. Demonstração esquemática da preparação do leito do trem posterior do rato.

Drogas e soluções

Os metabólitos *n*-desmetil-tamoxifeno e 4-hidroxi-tamoxifeno foram obtidos da Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá). O endoxifeno (4-hydroxy-*N*-desmethyl-tamoxifeno) foi sintetizado e doado pelo Dr. Zeruesenay Desta (Indiana University School of Medicine, Indianápolis, EUA). As demais drogas e reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, EUA). As soluções de Ach e NPS utilizadas foram preparadas em solução salina imediatamente antes do uso.

Determinação de nitritos plasmáticos por quimiluminescência

Neste trabalho, as determinações de nitritos no plasma foram realizadas em duplicata, pelo método de quimiluminescência. Utilizamos um analisador de NO automatizado marca Sievers Model 280 NO Analyzer, Boulder, CO, USA, o qual permite determinar NO em concentrações de pmol/l [65]. Resumidamente, 8 ml de uma solução redutora (KI 1g + I₂ 0,65 mg + 20 ml de água + 70 ml de ácido acético glacial) foram adicionados a um frasco (purge vessel) conectado em linha com o analisador. Este frasco possui um septo que permite a injeção de amostras diretamente na solução redutora que tem a propriedade de converter o nitrito a NO ($2 \text{NO}_2^- + 2\text{I}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{NO} + \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). Além disso, por meio desse sistema em linha, um gás inerte é corrido (nitrogênio). Sendo assim, 100 µl de plasma heparinizado provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais foram injetados diretamente na solução redutora, e o nitrito da amostra foi reduzido a NO, que por sua vez foi arrastado pelo nitrogênio até uma câmara que possui ozônio (O₃). O princípio da detecção do NO por quimiluminescência se baseia na rápida reação do NO na fase gasosa O₃ que resulta em nitrito no seu estado excitado (NO₂^{*}). Como o elétron excitado retorna ao seu estado fundamental, um fóton é emitido e detectado como quimiluminescência (*hν*), como exemplificado a seguir:



O sinal de quimiluminescência é detectado pelo analisador de NO, convertido a sinal elétrico e transformado em área (AUC, área sob a curva), pelo software do equipamento. Como a área resultante é diretamente proporcional à quantidade de sinal de quimiluminescência, uma curva padrão de nitrito de sódio foi construída (10 a 500 pmol/l), e a AUC obtida com as amostras foram comparadas com os valores de AUC da curva padrão de nitrito de sódio e interpolada por meio de regressão dos dados, utilizando o software do equipamento.

Determinação de nitratos e nitritos (NO_x) com reagente de Griess

Alíquotas de plasma em heparina foram estocadas a -70°C. As concentrações de NO_x foram determinadas em duplicata pelo reagente de Griess como descrito anteriormente [66] com as seguintes modificações. Em resumo, 40 µl de plasma foram incubados 40 µl de tampão de nitrato redutase (0,1 mol/l de fosfato de potássio, pH 7,5, com 1 mmol/l de fosfato de β-nicotinamida adenina dinucleotideo (NADPH), 10 mmol/l flavina adenina dinucleotideo, e 2 unidades de nitrato redutase/ml) em cada poço de placas de 96-poços. A placa então foi incubada por 16h a 37 °C protegidas da luz. Oitenta microlitros (80 µl) de reagente de Griess (preparado na hora do uso: 1% sulfanilamida, 0,1% naftilenodiamino em 5% ácido fosfórico) foram adicionados a cada poço, com subsequente incubação por 15 min à temperatura ambiente. Uma curva padrão de nitrato de sódio foi obtida incubando nitrato de sódio (0,2–200 µmol/l) nas mesmas condições. O total de nitrito recuperado foi superior a 97% e a absorbância foi medida 540 nm utilizando um espectrofotômetro de placas. Os resultados foram expressos como micromoles por litro (µmol/l) de NO_x (nitrato + nitrito).

Determinação do estresse oxidativo:

1. Avaliação da peroxidação lipídica

Neste trabalho, o estresse oxidativo foi determinado pela metodologia *espectrofluorimétrica* descrita por Yagi [67, 68]. Embora o princípio da metodologia seja o mesmo descrito para técnica de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), a principal vantagem neste método é a maior sensibilidade e a eliminação de possíveis interferentes. Estas características têm um importante impacto nas medidas plasmáticas do estresse oxidativo, com maior fidedignidade dos valores, e na redução de interferentes nas análises de TBARS. Além disso, na metodologia espectrofluorimétrica, determinamos

os níveis de MDA, os resultados são expressos em níveis de “MDA” e não somente como espécies reativas do ácido tiobarbitúrico “TBARS”.

Curva padrão de MDA

Para obtenção da curva-padrão de MDA, 1,1,3,3-tetrametoxipropano foi utilizado como padrão. Este composto reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando MDA. Plasma de ratos saudáveis receberam concentrações crescentes de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0,05 a 0,5 nmol/ml de plasma) e foram analisados utilizando o próprio 1,1,3,3-tetrametoxipropano como controle (0,05 a 0,5 nmol). Os resultados obtidos apresentaram uma forte correlação entre os padrões de 1,1,3,3-tetrametoxipropano e os valores de MDA no plasma tratado (Figura 3), sugerindo que o método é linear e que amostras de plasma de ratos não possuem interferentes significativos na análise.

Determinação dos níveis plasmáticos de MDA

Foram misturados 10 µL de plasma com 2 ml de H₂SO₄ 0,04 mol/l em tubo de ensaio. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de ácido fosfotungstíco 10% à mistura, que foi então vigorosamente agitada. Depois de ficar em temperatura ambiente por 5 min, a mistura foi centrifugada a 3.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado misturado com 1 ml de 0,04 mol/l e 150 µL de ácido fosfotungstíco 10%. Centrifugou-se novamente essa nova mistura a 3.000 g por 10 min. O precipitado foi resuspenso com 2 ml de água destilada, mais 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) (uma solução de igual volume de TBA aquoso 10% e ácido acético glacial). Em tubos de ensaio, a mistura foi aquecida a 95 °C por 60 min em banho-maria. Após o resfriamento, adicionou-se 250 µL de n-butanol, seguido de agitação vigorosa. Depois de nova centrifugação a 3.000 g durante 15 min, a camada de n-butanol foi quantificada em

espectrofluorímetro a 553 nm de excitação e 515 nm de emissão. Após a medida de fluorescência, os níveis de MDA foram obtidos pela fórmula mostrada a seguir, onde f é a intensidade de fluorescência da amostra, e F a intensidade de fluorescência da solução padrão, obtida pela reação de 0,5 nmol de 1,1,3,3-tetrametoxipropano com TBA: $MDA = 0,5 \times f / F \times 1,0 / 0,01 = f / F \times 25$ (nmol/ml de plasma).

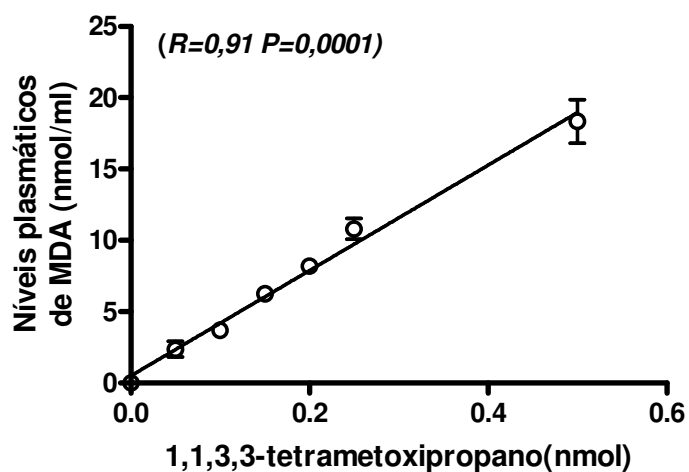


Figura 3. Linearidade do método de determinação de MDA no plasma obtida neste estudo. ($N=3$, leituras em triplicata). Plasma de ratos foram tratados com crescentes concentrações de 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetidos a análise de MDA. Os resultados mostraram uma forte correlação entre o MDA recuperado a partir do plasma e a curva padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

2. Oxidação da DHE

A DHE é oxidada por espécies reativas de oxigênio a hidroxietídio e etídio, os quais emitem fluorescência. Sendo assim, utilizamos essa substância para avaliar a produção de espécies reativas do oxigênio na aorta dos animais dos diferentes grupos experimentais, como previamente descrito [69], com algumas modificações. Em resumo, anéis de aortas dos diferentes grupos experimentais, foram incubados em tampão fosfato contendo ácido etilenodiamino penta acético (100 $\mu\text{mol/l}$) e DHE (50 $\mu\text{mol/l}$) a 37 °C durante 30 min. Após este período de incubação, os anéis foram lavados com tampão fosfato para retirar o excesso de DHE e então macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, o macerado de aorta foi transferido para tubos de eppendorf de 1,5 ml e ressuspensos em 500 μl de acetonitrila. Todas as amostras foram homogeneizadas em vortex durante 20-30 segundos, seguida de centrifugação a 12.000 rotações por minuto (RPM) a 4 °C durante 10 min. Duzentos microlitros (200 μl) do sobrenadante foram então transferidos para uma placa opaca de 96 poços e então a leitura foi realizada em espectrofluorímetro em 392 nm de excitação e 410 nm de emissão.

Avaliação da atividade da SOD

A metodologia para a avaliação da atividade da SOD utilizada foi a descrita por Misra & Fridovic [70]. Esta técnica se baseia na autooxidação espontânea da epinefrina a adrenocromo, que é dependente do ânion superóxido (O_2^-). O adrenocromo formado é quantificado espectrofotometricamente a 480 nm. A SOD presente na amostra compete pelo ânion superóxido, impedindo a formação de adrenocromo, que é proporcional a autooxidação da epinefrina. Sendo assim, quanto mais unidades de SOD estão presentes na amostra, menor é a formação de adrenocromo. Uma unidade (1U) de SOD é definida como a quantidade de SOD responsável por 50% de inibição da autooxidação da

epinefrina a 25 °C. O método consiste em reagir 100 µl uma solução de epinefrina (10 mmol/l em HCl 0,01 mol/l) com 2,9 ml de tampão de carbonato de sódio (Na_2CO_3 - NaHCO_3) a 0,05mol/l, com pH 10,2. A leitura é realizada durante um tempo de 5 min. A figura 4 mostra uma típica curva de autooxidação da epinefrina obtida durante a padronização. Utilizamos 50 µl de sangue de para as leituras.

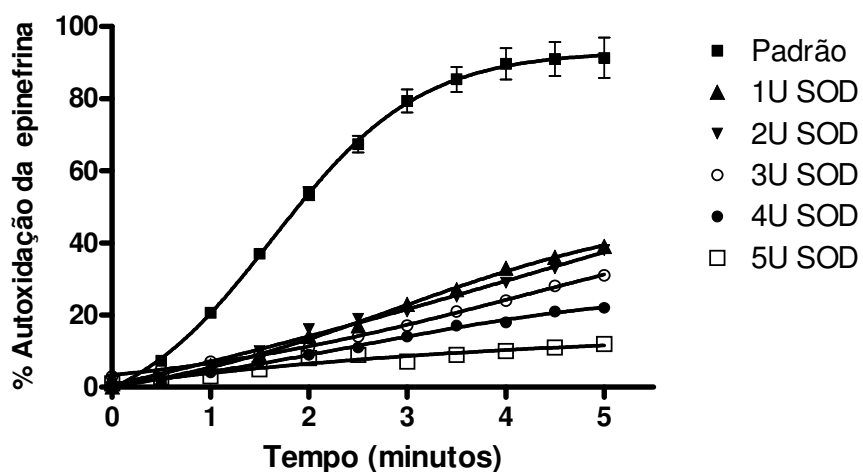


Figura 4. Formação de adrenocromo em função do tempo. Epinefrina foi adicionada a 0,05 mol/l de tampão de carbonato de sódio contendo 0,1 mmol/l de EDTA, pH 10,2 a 25 °C. A concentração final de epinefrina foi de 10 mmol/l, leitura realizada a 480nm. Na ausência de SOD (padrão) a epinefrina é totalmente oxidada a adrenocromo. Contrariamente, na presença de SOD, a oxidação da epinefrina a adrenocromo é reduzida.

Atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Beers [71], onde a atividade é determinada pela velocidade de consumo do substrato da CAT a 240 nm. Resumidamente, 5 µl de sangue total são adicionados a uma cubeta de vidro contendo 2.995 ml de uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,036% (v/v), preparada em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,0. O tempo para a diminuição da absorbância de 0,45 para 0,40 a 25 °C é medido em min, e utilizado para o cálculo da atividade enzimática, onde: Unidade de CAT/ml será igual $3,45 \times \text{fator de diluição} / \text{min} \times 0,1$.

Atividade da GPx

A atividade da GPx foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Flohé [72], onde a atividade é determinada pela velocidade de consumo de NADPH a 340 nm. Resumidamente, amostras de sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais, foram diluídas na concentração de 3 mg de hemoglobina por ml (3 mgHb/ml). A quantificação dos níveis de hemoglobina foi realizada com uso do reagente de Drabkin. Em uma cubeta de espectrofotômetro, 100 µl de cada amostra diluída foram adicionadas a 700 µl de um coquetel contendo 0,24 U de glutathione reductase (GR), 10 mmol/l de glutathione (GSH), 1 mmol/l de azida sódica e 48 mmol/l de fosfato de sódio. Após leve agitação, a cubeta foi então incubada durante 10 min a 37 °C. Em seguida, 100 µl de NADPH foram adicionados ao ensaio, e o consumo de NADPH independente de GPx foi avaliado durante 3 min. Por fim, 100 µl de uma solução de 0,0007% (v/v) de peróxido de hidrogênio foram adicionados ao ensaio e o consumo de NADPH dependente de GPx foi monitorado durante 5 min a 340 nm em espectrofotômetro, a 25 °C. O branco do ensaio seguiu o mesmo protocolo, exceto que 100 µl de PBS foram utilizados. A

diferença entre a absorbância inicial e final (após os 5 min de ensaio) das amostras e do branco foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática com a seguinte fórmula: $(\Delta\text{Abs}_{340\text{nm}} / \text{min amostra} - \Delta\text{Abs}_{340\text{nm}} / \text{min branco}) \times (2) \times (1) \times (\text{f.d.}) / (6,22) \times (0,1)$, onde:

2 = 2 μmol de GSH produzidos por μmol de NADPH oxidado

3.1 = volume total em ml do ensaio

f.d. = fator de diluição

6,22 = coeficiente de extinção molar do NADPH a 340 nm

0,1 = Volume em ml da amostra utilizada.

Atividade da NADPH oxidase

Para a determinação da atividade da enzima NADPH oxidase, utilizamos a técnica de luminescência com o probe Lucigenina. Em resumo, anéis de aorta provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1 ml de tampão Krebs-HEPES, pH 7,2, contendo 5 $\mu\text{mol/l}$ de lucigenina. Após avaliação dos valores da linha de base, 300 $\mu\text{mol/l}$ de NADPH foram adicionados e as contagens de luminescência foram medidas continuamente durante 15 min em luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37 °C. Os valores da linha de base obtidos *sem* a presença de NADPH foram descontados dos valores obtidos na presença de NADPH. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos anéis de aorta e expressos em unidades relativas de luminescência (RLU) /mg/min, como descrito previamente [73].

Avaliação dos efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos

Ratos Wistar foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 g/Kg), em seguida decaptados. A aorta torácica foi cuidadosamente removida, lavada com solução de

Krebs, e dissecada de tecidos conjuntivos e gordura. Cerca 3 anéis de 3-4 mm de comprimento foram extraídos da parte proximal de cada aorta e montados em cubas para órgãos isolados (volume de 10 ml) com transdutor de tensão isométrica (FT 03, Grass Instrument Division), contendo solução de Krebs- Henseleit (em mmol/l: NaCl 130, CaCl₂ 1,6, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, KCl 4,7, NaHCO₃ 14,9, glicose 5,5), em uma temperatura de 37 °C e pH de 7,4, sob constante gaseificação com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os dados foram registrados em gramas, utilizando o programa Summit for ACQUIRE e Data viewer (Gould Instruments Systems). Após 60 min de estabilização sob tensão basal de 1,0 g (demonstrada como a melhor tensão aplicada ao sistema), os anéis aórticos foram estimulados com fenilefrina (0,1 μmol/l), um agonista α₁-adrenérgico, por três vezes. Os anéis que não apresentaram contração entre 80 e 100% acima da tensão basal (0,8 a 1 g) não foram utilizados nos experimentos. Após a terceira contração com fenilefrina, a presença ou a ausência de endotélio foi testada mediante a resposta vasorelaxante à Ach (1μmol/l). Os anéis incapazes de produzir 80% de relaxamento em resposta à Ach foram excluídos. Em seguida, uma quarta contração com fenilefrina (0,1 μmol/l) foi realizada e os anéis que não resultaram em contração similar à terceira contração com fenilefrina foram descartados. Finalmente, após a quarta contração com fenilefrina (0,1 μmol/l), as respostas ao tamoxifeno e aos diferentes metabólitos foram realizadas.

Estudo dos efeitos agudos do tamoxifeno ou seus metabólitos em anéis isolados de aorta

Em anéis isolados de aorta contraídos com fenilefrina (0,1 μmol/l), curvas concentração efeito foram construídas em resposta ao tamoxifeno ou seus metabólitos, nas concentrações de 10⁻¹⁴ até 10⁻⁵ mol/l.

Estudo participação dos receptores de estrógeno na resposta vascular induzida pelo tamoxifeno ou seus metabólitos

Para verificar qual a participação dos receptores de estrógeno na resposta vascular ao tamoxifeno ou seus metabólitos, em outra série de experimentos, anéis de aorta com endotélio foram pré-incubados por 30 min com ICI 182.780 (10 $\mu\text{mol/l}$), um antagonista dos receptores de estrógeno. Após este período, curvas concentração efeito em resposta ao tamoxifeno ou seus metabólitos foram realizadas (10^{-14} a 10^{-5} mol/l).

Determinação dos mediadores envolvidos na resposta vascular ao tamoxifeno ou seus metabólitos

Para determinar os possíveis mediadores envolvidos na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno ou seus metabólitos em anéis de aorta, as preparações foram pré-incubadas com inibidor da sintase do óxido nítrico, *N_w*-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/l}$), com inibidor da ciclooxigenase (COX), indometacina (10 $\mu\text{mol/l}$) ou associação de ambos, por 30 min. Após este período, curvas concentração efeito em resposta ao tamoxifeno ou seus metabólitos foram realizadas (10^{-14} a 10^{-5} mol/l).

Análise estatística

Para analisar os resultados de reatividade vascular, os parâmetros levados em consideração foram a curva de relaxamento, pD_2 (- log EC50) e efeito máximo (E_{max}) dos grupos tratados em relação ao grupo controle, por meio de análise da curva da regressão não-linear dos dados. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste Dunnett's ou teste t student (quando indicado) com o software Prism 3 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, California, USA). Em

relação à análise dos dados das concentrações de nitrato e nitrito plasmáticos, stress oxidativo e a atividade de diferentes enzimas para os grupos controle e tratados, os resultados foram analisados com ANOVA de uma via, seguido do teste Dunnett's. Todos os resultados foram analisados levando-se em consideração os erros padrões de suas respectivas médias (E.P.M.), e foi considerado estatisticamente significativo o valor de probabilidade inferior 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5 – Resultados

Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na frequência cardíaca, pressão arterial sistêmica e peso corpóreo.

O tratamento de ratos durante 14 dias (1 mg/Kg/dia subcutaneamente) com tamoxifeno ou seus metabólitos (n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno) não promoveram mudanças significativas na frequência cardíaca e na pressão arterial sistêmica entre os diferentes grupos ($P > 0,05$; Tabela 1). Entretanto, os animais que receberam tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos ganharam menos peso que os animais que receberam apenas veículo ($P < 0,05$; Tabela 1). *Conjuntamente, esses dados indicam que o tratamento realizado não promoveu mudanças significativas na frequência cardíaca e na pressão arterial sistêmica o que poderia limitar as interpretações dos dados de reatividade vascular.*

Tabela 1. Peso corpóreo (PC), Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos anestesiados tratados com veículo (Controle), tamoxifeno ou seus metabolitos.

Grupo	<i>n</i>	PC (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle	8	330 ± 5	83 ± 3	338 ± 8
Tamoxifeno	7	270 ± 17 ^a	85 ± 1	344 ± 12
N-desmetil-Tam	8	247 ± 5 ^a	87 ± 3	379 ± 21
4-hidroxi-Tam	7	246 ± 8 ^a	83 ± 5	347 ± 23
Endoxifeno	8	257 ± 7 ^a	89 ± 6	369 ± 8

^a $P < 0,01$ versus grupo controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's.).

Os valores são média ± E.P.M

Efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos na reatividade vascular do trem posterior de ratos à Ach e ao NPS.

Para avaliar os efeitos vasculares do tamoxifeno ou seus metabólitos, o trem posterior dos ratos tratados foi isolado e sua funcionalidade foi avaliada em resposta a Ach e ao NPS (6-8 por grupo), como descrito em detalhes na seção de materiais e métodos. As figuras. 5 e 6 mostram, respectivamente, o vasorelaxamento dependente do endotélio e independente do endotélio induzidos por doses crescentes de Ach ($3 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-1} μ g) e NPS ($3 \cdot 10^{-5}$ a 10^{-2} mg). O tratamento com tamoxifeno por duas semanas promoveu uma significativa redução na resposta vasodilatadora à Ach quando comparado com animais controles que receberam apenas o veículo (a pD_2 reduziu de $2,21 \pm 0,06$ para $1,95 \pm 0,05$; $P < 0,05$; Fig.5, painel A e E). Contrariamente, o tratamento com os metabólitos do tamoxifeno resultou em um significativo aumento nas respostas vasodilatadoras à Ach (a pD_2 aumentou de $2,21 \pm 0,06$ no grupo Controle para $2,52 \pm 0,04$ no grupo *n-desmetil-tamoxifeno*, para $2,54 \pm 0,03$ no grupo 4-hidroxi-tamoxifeno e para $2,63 \pm 0,08$ no grupo endoxifeno; $P < 0,01$; Fig.5; painéis B-E). Enquanto nenhuma diferença significativa foi observada no efeito máximo induzido pela Ach nos grupos tamoxifeno, *n-desmetil-tamoxifeno* e endoxifeno, um aumento significativo no efeito de relaxamento máximo à Ach foi observado nos animais do grupo 4-hidroxi-tamoxifeno (efeito de relaxamento máximo aumentou de 44 ± 2 mmHg no grupo Controle para 62 ± 1 mmHg no grupo 4-hidroxi-tamoxifeno; $P < 0,001$; Fig. 5; painéis C e E). Nesse estudo, nós não encontramos mudanças significativas na pD_2 (Fig. 6; painel A-D) ou no efeito de relaxamento máximo ao NPS ($P > 0,05$; Fig. 6, painel E). *Conjuntamente, esses dados indicam que enquanto o tratamento com tamoxifeno promoveu um efeito deletério na reatividade vascular (reduzindo as respostas dependentes do endotélio à Ach), seus principais metabólitos promoveram efeitos benéficos, melhorando de forma significativa a reatividade vascular*

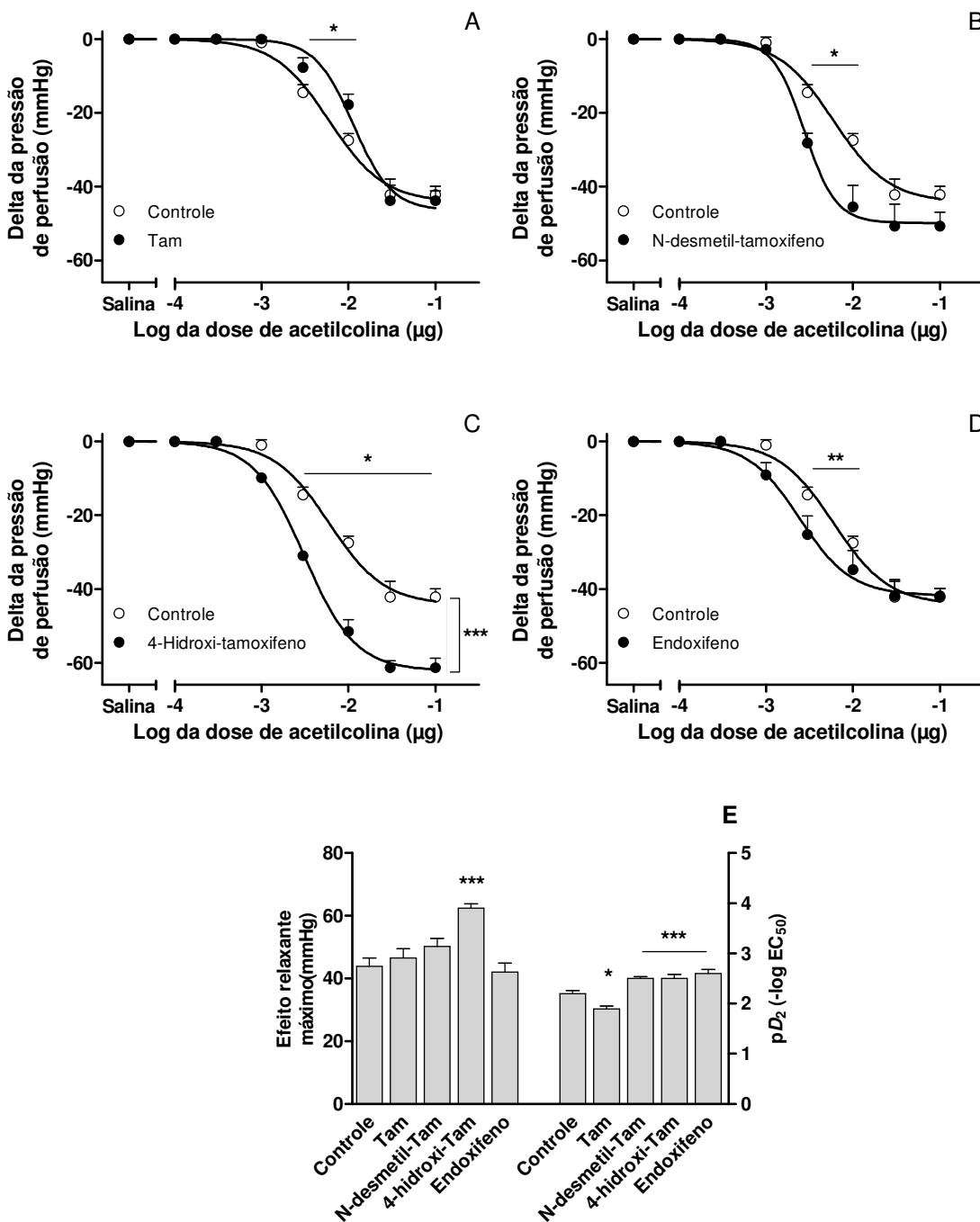


Figura 5. Vasorelaxamento endotélio-dependente induzido pela acetilcolina no leito vascular do trem posterior de ratos tratados com Tam (A), *n*-desmetil-tamoxifeno (B), 4-hidroxi-tamoxifeno (C), Endoxifeno (D) ou veículo (Controle). Painele mostra os valores obtidos para o efeito relaxante máximo e pD₂. As respostas vasculares foram avaliadas após pré-contracção do leito vascular do trem posterior com metoxamina até uma pressão média de ~90 mmHg. Dados são mostrados como médias ± E.P.M (n = 6-8 por grupo). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0.001 versus grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

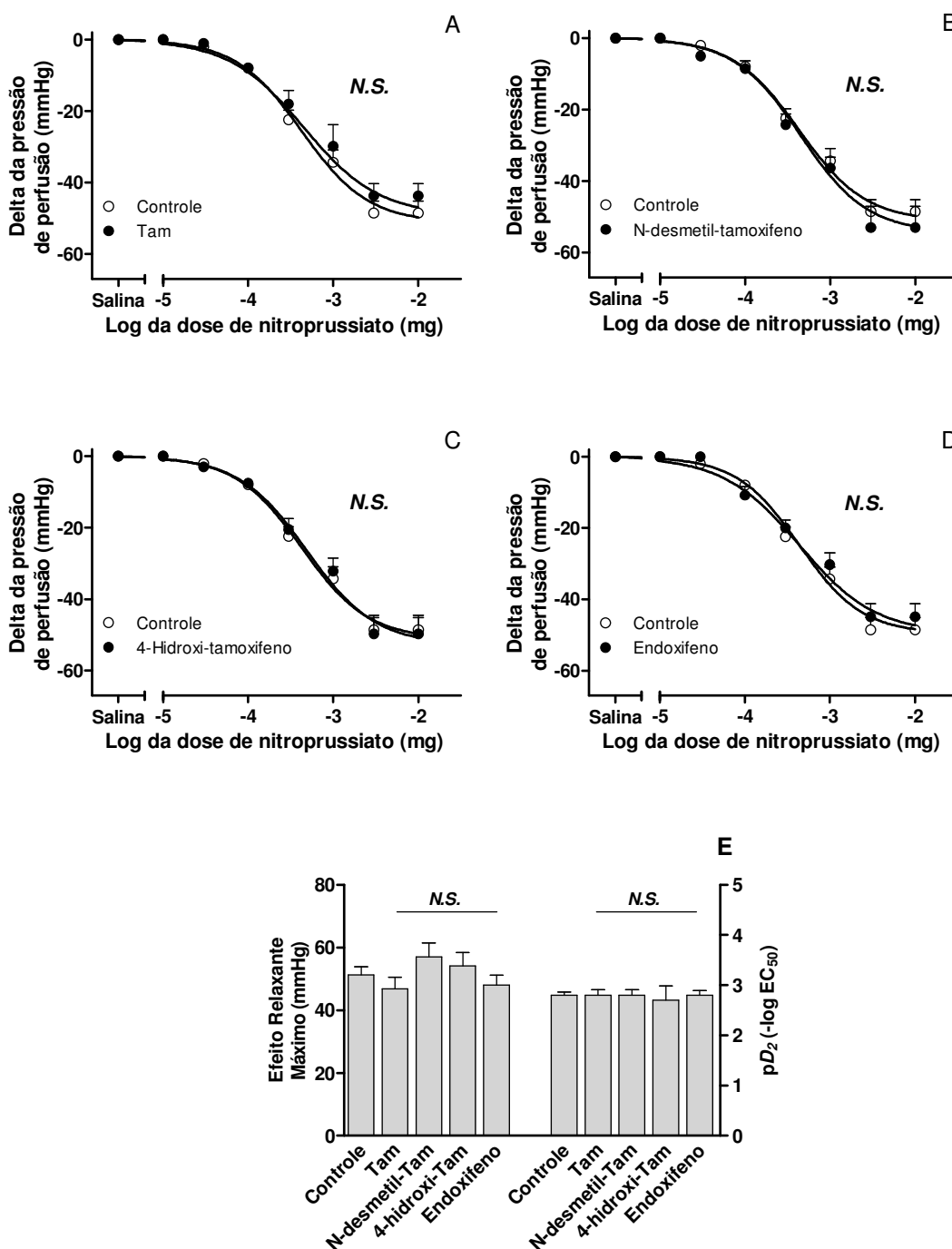


Figura 6. Vasorelaxamento endotélio-independente induzido pelo NPS no leito vascular do trem posterior de ratos tratados com Tam (A), *n*-desmetil-tamoxifeno (B), 4-hidroxi-tamoxifeno (C), Endoxifeno (D) ou veículo (Controle). Painele mostra os valores obtidos para o efeito relaxante máximo e pD₂. As respostas vasculares foram avaliadas após pré-contracção do leito vascular do trem posterior com metoxamina até uma pressão média de ~90 mmHg. Dados são mostrados como médias ± E.P.M. (n = 6-8 por grupo). N.S. = não significativo *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

dependente do endotélio. Adicionalmente, as respostas inalteradas ao NPS indicam que o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos não promoveu alterações significativas no relaxamento da musculatura lisa vascular independente do endotélio.

O tratamento com tamoxifeno aumenta os níveis de MDA no plasma e sangue, enquanto seus metabólitos apresentam efeitos antioxidantes

Neste estudo, nós avaliamos o estresse oxidativo por meio de duas metodologias. A primeira foi a peroxidação lipídica medida pelos níveis de MDA no plasma e sangue, e a segunda foi a oxidação da DHE induzida por anéis de aorta provenientes dos diferentes grupos experimentais, como descrito em detalhes na seção de métodos. Os resultados mostraram que o tratamento com tamoxifeno promoveu um significativo aumento do estresse oxidativo, quando comparado com os animais do grupo controle ($P < 0,05$; Fig. 7, painéis A e B). Contrariamente, o tratamento com os metabólitos *n-desmetil-tamoxifeno*, 4-hidroxi-tamoxifeno ou endoxifeno promoveu um significativo efeito antioxidante, com a diminuição dos níveis de MDA quando comparado com o grupo Controle ($P < 0,01$ para plasma e $P < 0,05$ sangue total; Fig. 7, painéis A e B respectivamente). Por outro lado, no estresse oxidativo, avaliado pela oxidação da DHE nas aortas provenientes de ratos dos diferentes grupos experimentais, nenhuma diferença foi observada ($P > 0,05$; Fig. 10, painel B). *Estes resultados sugerem que enquanto o tamoxifeno aumenta o estresse oxidativo, seus metabólitos têm efeitos antioxidantes relevantes, acordando com os dados funcionais de reatividade vascular.*

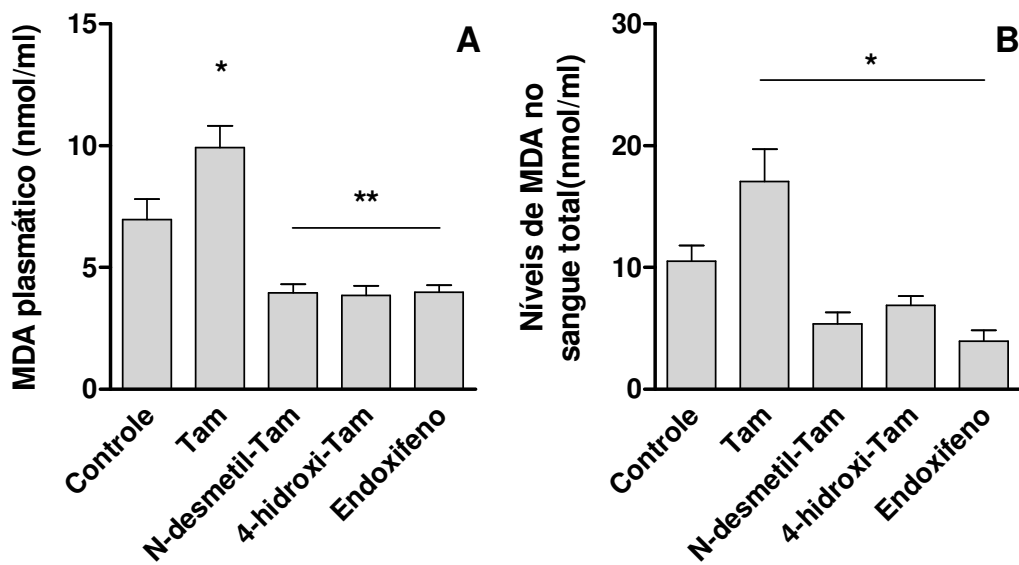


Figura 7. Concentrações de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressos em termos de MDA (nmol/ml) no plasma (A) e sangue total (B) de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou Endoxifeno. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 6-8 por grupo). *P<0,05, **P<0,01 *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

O tratamento com tamoxifeno diminui os níveis plasmáticos de metabólitos do óxido nítrico (nitratos e nitritos).

Nós avaliamos se o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos promoviam alterações na formação de NO, medindo os níveis plasmáticos de NO_x (Nitrito+Nitrato) e de nitrito, utilizando dois métodos diferentes (reagente de Griess e quimiluminescência, como descrito anteriormente). Os níveis plasmáticos de NO_x e nitritos dos ratos tratados com tamoxifeno foram significativamente baixos, quando comparados com os níveis plasmáticos dos ratos do grupo Controle (ambos $P < 0,05$ versus grupo controle; Fig. 8, painéis A e B), enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis plasmáticos de NO_x e nitritos dos ratos tratados com os diferentes metabólitos do tamoxifeno (todos $P > 0,05$ versus grupo Controle; Fig. 8, painéis A e B). *Essa diminuição nos níveis de metabólitos do NO observada no grupo tamoxifeno sugerem que, ao menos em parte, o aumento do estresse oxidativo nesse grupo (Fig.7) pode diminuir a biodisponibilidade de NO, com impacto deletério na função endotelial, como observado pelos dados de reatividade vascular no grupo tamoxifeno (Fig.5, painel A e E).*

Efeitos do tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos na atividade de enzimas antioxidantes

Amostras de sangue total dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos foram coletadas e a atividade da SOD, CAT e GPx foram determinadas como descrito na seção de métodos. Os resultados mostraram que o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos promove um significativo aumento da atividade da SOD, quando comparado com o grupo Controle ($P < 0,05$; Fig. 9, painel A). Enquanto o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos não promoveu mudanças significativas na atividade da CAT

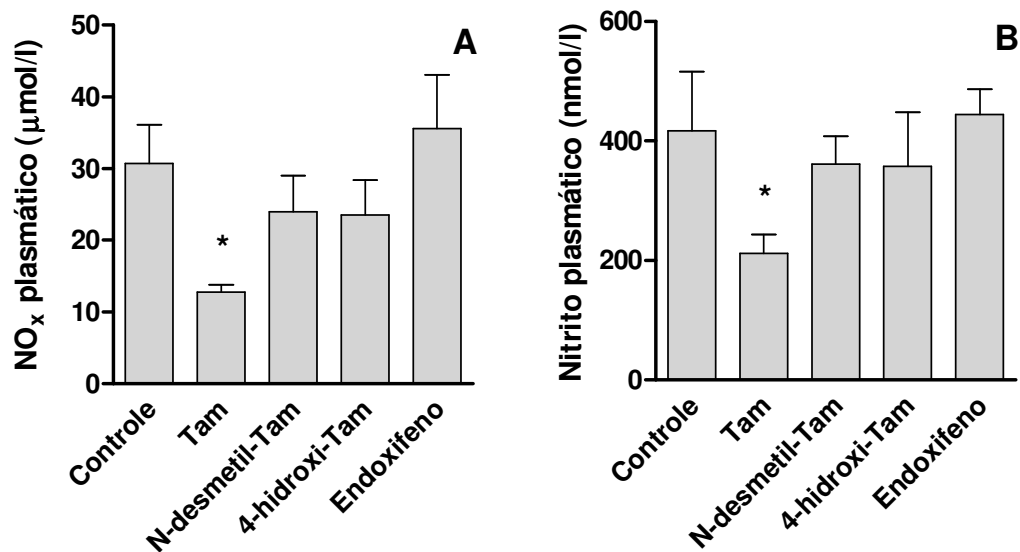


Figura 8. Concentrações de NO_x (nitrato + nitrito; µmol/l; A) e nitrito (nmol/l; B) no plasma de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou Endoxifeno. Dados são mostrados como médias ± E.P.M (n = 6-8 por grupo). *P<0,05 *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

($P > 0,05$; Fig. 9, painel B), a atividade da GPx foi significativamente aumentada nos grupos tratados com *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno ($P < 0,05$; Fig. 9, painel C). Por fim, o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos não promoveu mudanças significativas na atividade da NADPH oxidase na aorta dos animais dos diferentes grupos experimentais ($P > 0,05$; Fig. 10, painel A). *Conjuntamente, estes dados indicam que o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos influencia de forma diferenciada na atividade de enzimas antioxidantes.* Enquanto nenhuma alteração na atividade da CAT foi observada, o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos induziu um significativo aumento da SOD. *Entretanto, somente nos grupos tratados com os metabolitos do tamoxifeno (n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno) o aumento da atividade da GPx foi observado. Estas evidências são compatíveis com os achados descritos anteriormente, que demonstram que somente os animais tratados com tamoxifeno apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos e sangüíneos de MDA (Figura 7), bem como níveis plasmáticos reduzidos de metabolitos do óxido nítrico (Figura 8). Adicionalmente, os resultados de atividade da NADPH oxidase na aorta são compatíveis com os resultados da oxidação da DHE, e sugerem que a aorta não é significativamente afetada, pelo menos no seu status oxidativo, pelo tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos.*

Efeitos do tamoxifeno ou seus metabólitos em anéis de aorta contraídos com fenilefrina.

Para avaliar possíveis efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno ou seus metabólitos, anéis isolados de aorta foram montados e preparados em banho de órgão-isolado e curvas concentração-efeito ao tamoxifeno, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno foram construídas, como descrevemos em detalhes na seção de

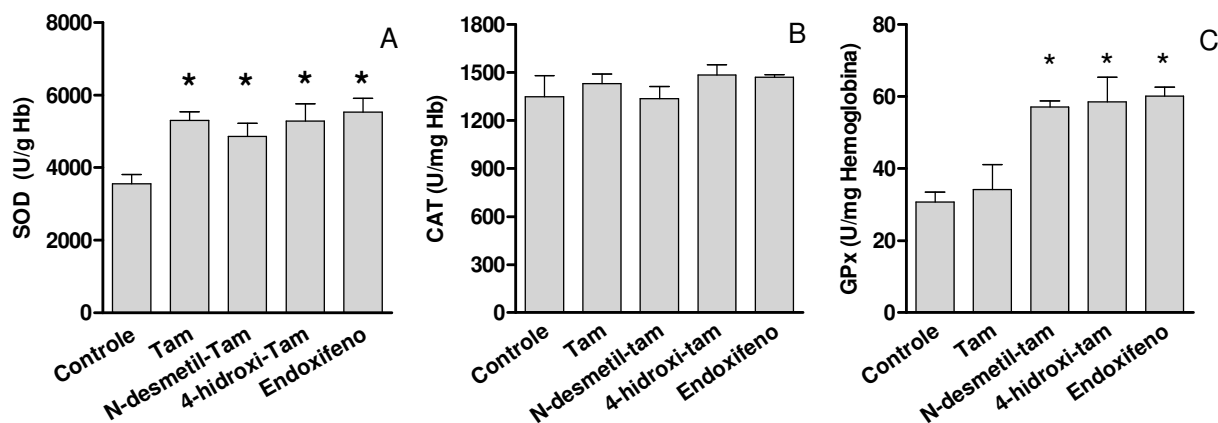


Figura 9. Atividade no sangue total da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) em ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou Endoxifeno. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 6-8 por grupo). *P<0,05 *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

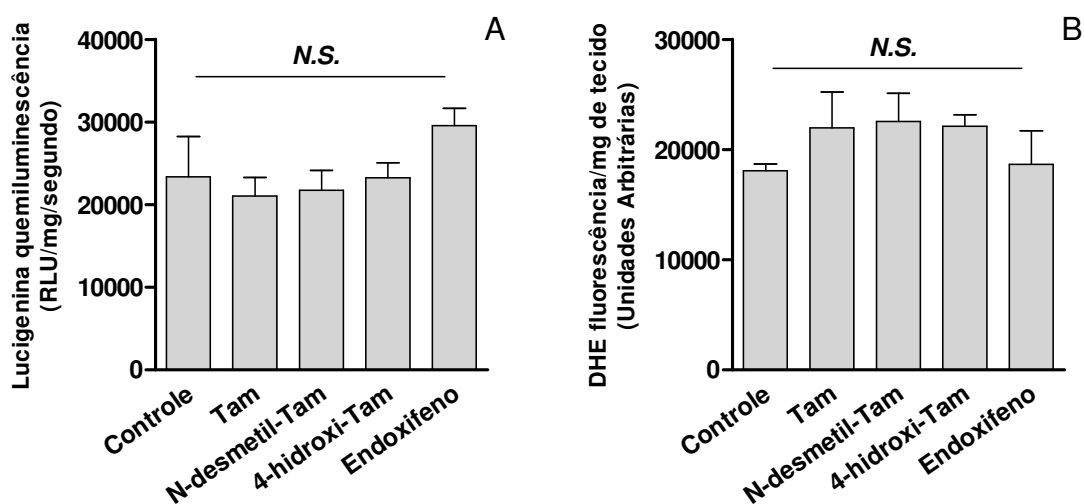


Figura 10. Atividade da NADPH oxidase (A) e produção de ânion superóxido (B) na aorta de ratos Controles ou tratados com Tam, *n*-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno ou Endoxifeno. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 4-5 por grupo). N.S. = não significativo *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

materiais e métodos. O tamoxifeno e seus metabólitos induziram vasorelaxamento agudo dos anéis de aorta contraídos, de forma concentração-dependente (Figura 11, painéis A, B e C). Enquanto o 4-hidroxi-tamoxifeno induziu efeito relaxante máximo similar ao tamoxifeno ($92,61 \pm 2\%$ versus $88,50 \pm 2\%$, respectivamente; $P > 0,05$; Figura 11, painéis B e D), os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno induziram um relaxamento máximo superior ao do tamoxifeno ($101,18 \pm 1,85\%$ e $101,50 \pm 1,8\%$, respectivamente versus $88,50 \pm 2\%$ do tamoxifeno; $P < 0,05$; Figura 11, painéis A, C e D). Adicionalmente, enquanto os valores de pD_2 obtidos para 4-hidroxi-tamoxifeno foram similares ao tamoxifeno ($8,88 \pm 0,12$ versus $8,55 \pm 0,12$, respectivamente; $P > 0,05$; Figura 11, painel D), os valores de pD_2 para os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno foram superiores ao do tamoxifeno ($9,07 \pm 0,14$ e $8,9 \pm 0,08$, respectivamente versus $8,55 \pm 0,12$ do tamoxifeno; $P < 0,05$ somente para o n-desmetil-tamoxifeno; Figura 11, painel D). *Conjuntamente, esses dados indicam que enquanto o metabólito 4-hidroxi-tamoxifeno induz efeitos agudos similares ao do tamoxifeno, seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno apresentam efeitos agudos diferenciados, com resposta vasodilatadora aumentada e com deslocamento da curva de concentração efeito para esquerda em relação ao tamoxifeno.*

Papel dos receptores de estrógeno nos efeitos vasodilatadores exercidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos.

Para avaliar se os efeitos vasorelaxantes do tamoxifeno e seus metabólitos são dependentes dos receptores de estrógeno, curvas concentração-efeito foram construídas em anéis de aorta pré-incubados com ICI 182.780, um antagonista dos receptores de estrógeno α e β , na concentração de $10 \mu\text{mol/l}$. Essa concentração de ICI 182.780 não influenciou na contração induzida pela fenilefrina ($0,1 \mu\text{mol/l}$), pois esta foi similar na ausência ou presença de ICI 182.780. Os efeitos vasorelaxantes induzidos pelo

tamoxifeno e pelo 4-hidroxi-tamoxifeno foram similares, na presença ou ausência do antagonista dos receptores de estrógeno (Figura 12, painéis A e C; $P>0,05$). Contrariamente, as respostas vasorelaxantes induzidas pelos metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno foram significativamente reduzidas na presença do ICI 182.780 (Figura 12, painéis B e D; $P<0,01$). *Conjuntamente, esses dados indicam que enquanto o tamoxifeno e o 4-hidroxi-tamoxifeno induzem seus efeitos vasorelaxantes de forma independente dos receptores de estrógeno, seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno exercem seus efeitos, ao menos em parte, dependentes dos receptores de estrógeno.*

Efeito do L-NAME na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.

Para avaliar se os efeitos vasorelaxantes do tamoxifeno e seus metabólitos são dependentes da síntese de NO, curvas concentração-efeito foram construídas em anéis de aorta pré-incubados com L-NAME, um inibidor da sintase do NO na concentração de 100 $\mu\text{mol/l}$. Novamente, os efeitos vasorelaxantes induzidos pelo tamoxifeno e pelo 4-hidroxi-tamoxifeno foram similares, na presença ou ausência de L-NAME (Figura 13, painéis A e C; $P>0,05$). Contrariamente, as respostas vasorelaxantes induzidas pelos metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno foram significativamente reduzidas na presença de L-NAME (Figura 13, painéis B e D; $P<0,01$). *Conjuntamente, esses dados indicam que o tamoxifeno e o 4-hidroxi-tamoxifeno não dependem da síntese de NO para promover vasorelaxamento. Contrariamente, os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno dependem, ao menos em parte, da síntese de NO para produzir vasorelaxamento.*

Efeito da Indometacina na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.

Para avaliar a contribuição da síntese de prostanóides nos efeitos vasorelaxantes induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos, curvas concentração-efeito foram construídas em anéis de aorta pré-incubados com indometacina, um inibidor não seletivo das ciclooxigenases, na concentração de 10 $\mu\text{mol/l}$. A inibição das ciclooxigenases com indometacina reduziu significativamente as respostas vasorelaxantes induzidas pelo tamoxifeno e seus metabólitos (Figura 14, painéis A, B, C e D; $P < 0,01$).

Efeito da associação de L-NAME e indometacina na vasodilatação induzida pelo tamoxifeno e seus metabólitos.

Quando L-NAME (100 $\mu\text{mol/l}$) e indometacina (10 $\mu\text{mol/l}$) foram associados na cuba de órgão-isolado, as respostas vasorelaxantes induzidas pelo tamoxifeno e seus metabólitos foram praticamente abolidas (Figura 15, painéis A, B, C e D; $P < 0,01$).

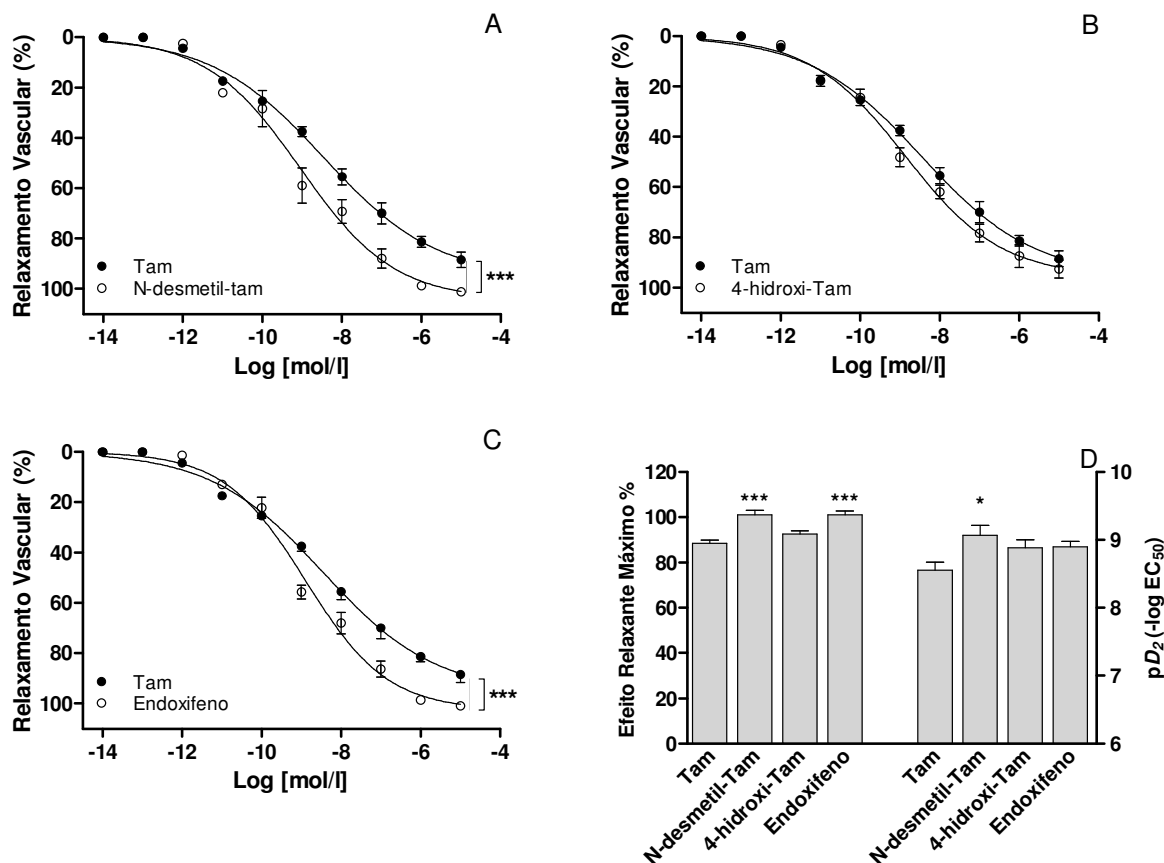


Figura 11: Vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam e seus metabólitos (A, B e C) em anéis de aorta contraídos com fenilefrina. Figura D mostra o perfil de Efeito relaxante Máximo e pD₂ obtidos. Enquanto o metabólito 4-hidroxi-Tam induziu efeito máximo igual ao do Tam (B), os metabólitos, N-desmetil-Tam e endoxifeno induziram efeitos máximos superiores (A e C). Adicionalmente, o metabólito N-desmetil-Tam deslocou a curva para esquerda, com significativo efeito nos valores de pD₂. Dados são mostrados como médias ± E.P.M (n = 5-6 por grupo). *P < 0,05, ***P < 0,001 *versus* grupo Controle (ANOVA seguido por teste de Dunnett's).

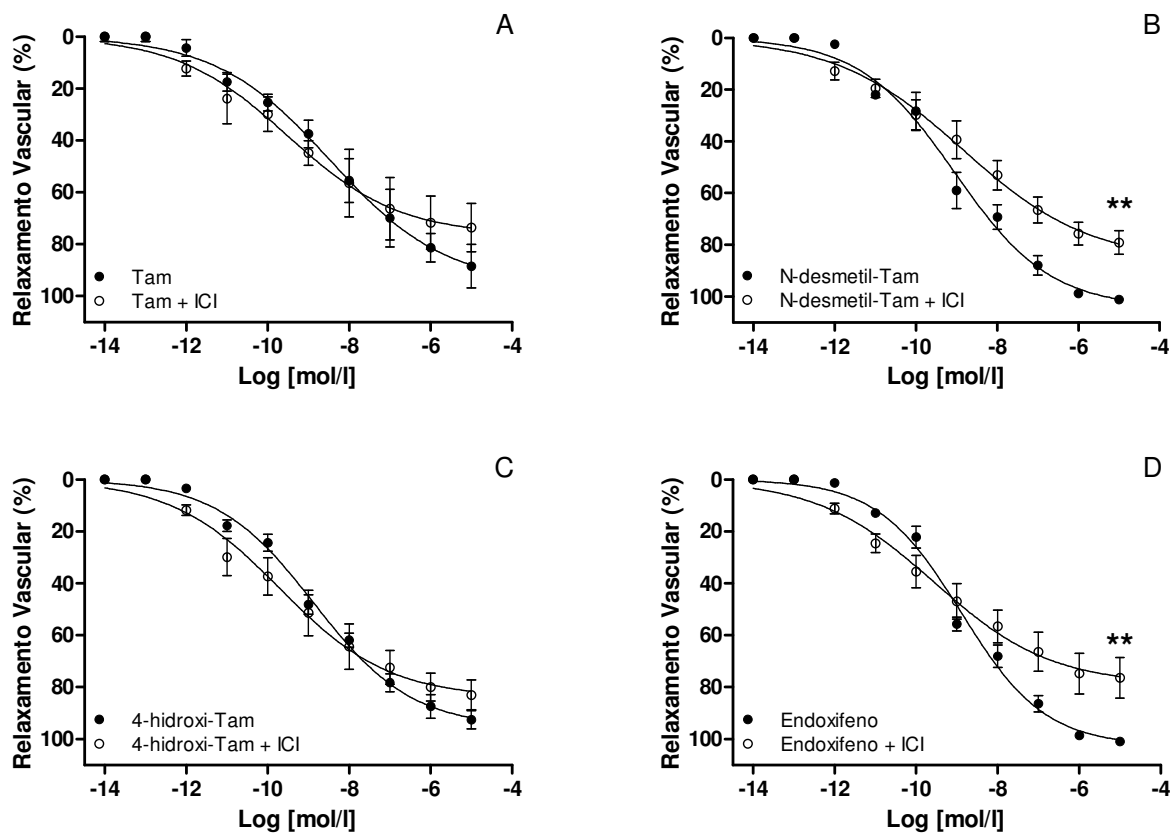


Figura 12: Papel dos receptores do estrogênio no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam e seus metabólitos em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina. Enquanto os efeitos do Tam e do metabólito 4-hidroxi-Tam (A e C) não foram significativamente influenciados pelo pré-tratamento com antagonista do receptor de estrogênio ICI 182.780, as respostas aos metabólitos N-desmetil-Tam e endoxifeno foram significativamente reduzidas (B e D). Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 5-6 por grupo). **P<0,01 *versus* grupo Controle (teste t student).

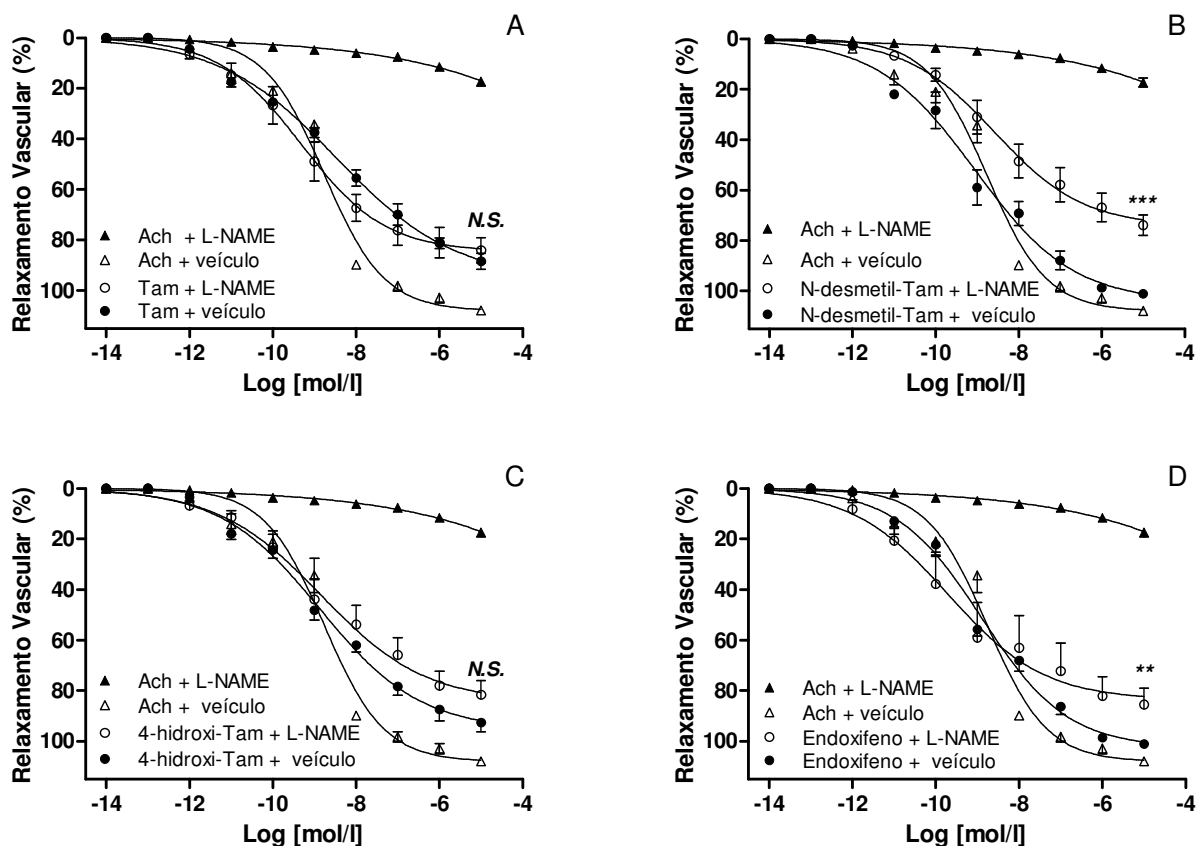


Figura 13: Efeito do L-NAME no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam e seus metabólitos em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina. Enquanto os efeitos do Tam e do metabólito 4-hidroxi-Tam não foram significativamente influenciados pelo L-NAME (A e C), o pré-tratamento dos anéis com L-NAME reduziu significativamente o efeito máximo obtido para metabólitos N-desmetil-Tam e endoxifeno (B e D). Os gráficos mostram ainda a resposta à Ach na presença e ausência de L-NAME nas mesmas condições experimentais. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 5-6 por grupo). N.S. = não significativo *versus* Tam + veículo (A) ou 4-hidroxi-Tam + veículo (C); ***P<0,001 *versus* N-desmetil-Tam + veículo; **P<0,01 *versus* Endoxifeno + veículo (teste t student).

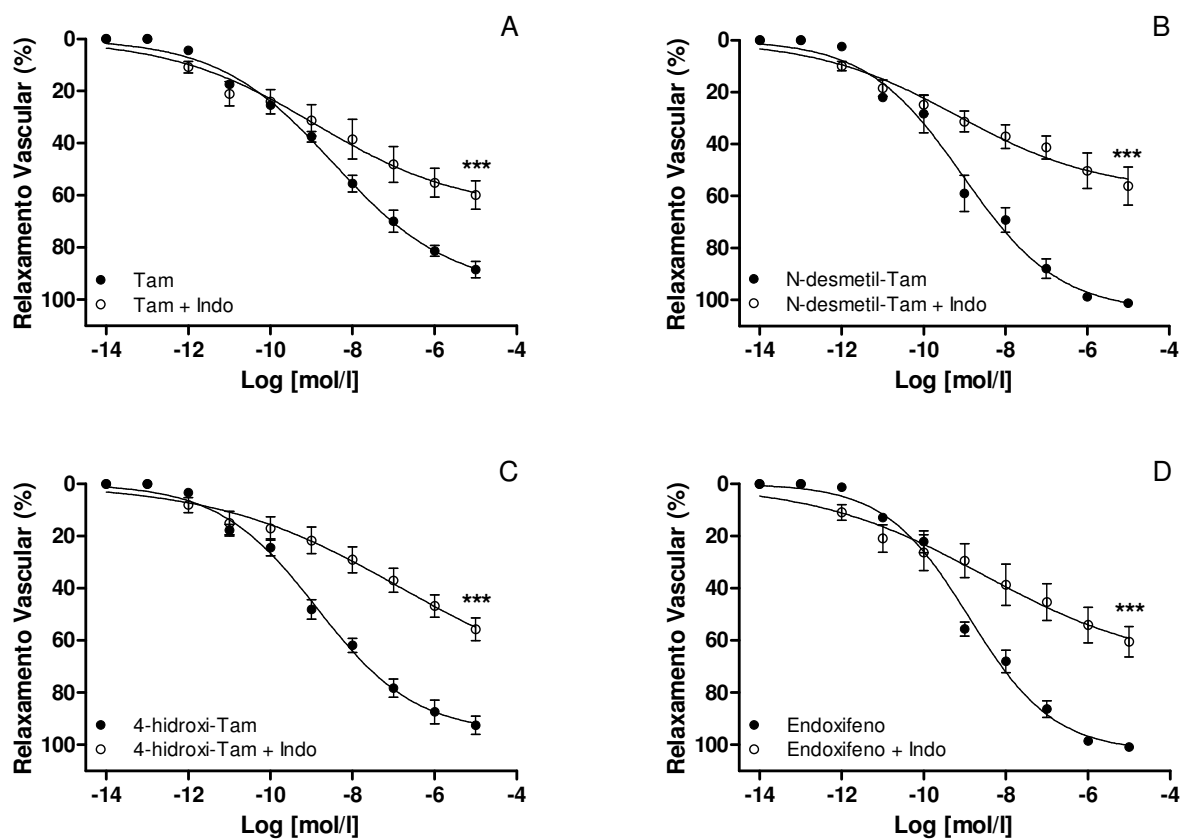


Figura 14: Participação de prostanóides no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam e seus metabólitos em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina. O pré-tratamento dos anéis com indometacina ($10\mu\text{mol/l}$, Indo), um inibidor das cicloxigenases, reduziu significativamente a resposta vasodilatadora induzida pelo Tam ou seus metabólitos. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M ($n = 5-6$ por grupo). *** $P < 0,001$ (teste t student).

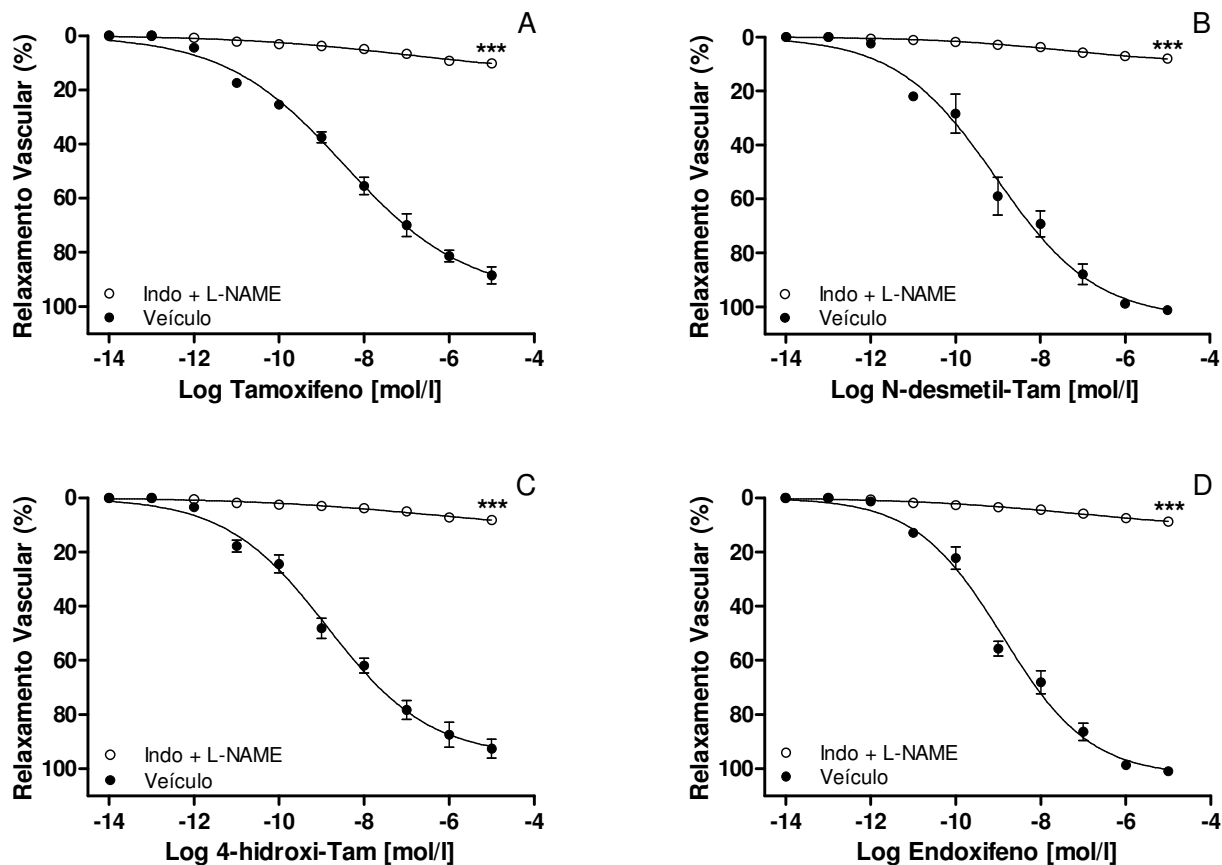


Figura 15: Efeito da associação de indometacina (Indo) e L-NAME no vasorelaxamento agudo induzido pelo Tam e seus metabólitos em anéis de aorta com endotélio contraídos com fenilefrina. O pré-tratamento dos anéis com inibidores da NOS e COX praticamente aboliu a resposta vasodilatadora ao Tam e a seus metabólitos. Dados são mostrados como médias \pm E.P.M (n = 5-6 por grupo). ***P<0,001 (teste t student).

DISCUSSÃO

6 – Discussão

Os principais resultados desse estudo foram: (I) O tratamento com tamoxifeno promove uma redução no vasorelaxamento dependente do endotélio em resposta à Ach; (II) Os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno promovem melhoras significativas no vasorelaxamento dependente do endotélio induzido pela Ach; (III) Enquanto o tamoxifeno aumenta o estresse oxidativo e diminui os níveis de metabólitos do NO, seus metabólitos diminuem o estresse oxidativo sem afetar significativamente os níveis de metabólitos do NO; (IV) Assim como o tamoxifeno, os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno induzem o vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos, embora as amplitudes desses efeitos sejam superiores para os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno; (V) Enquanto os efeitos vasorelaxantes agudos induzidos pelo tamoxifeno e 4-hidroxi-tamoxifeno são independentes do receptor de estrógeno e da NOS, os efeitos dos metabólitos n-desmetil-tamoxifeno e endoxifeno são parcialmente dependentes do receptor de estrógeno e da NOS; (VI) O vasorelaxamento agudo induzido pelo tamoxifeno e seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno são em parte devido a síntese de prostanóides e; (VII) O vasorelaxamento agudo induzido pelo tamoxifeno e seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno são dependentes da COX e da NOS. Conjuntamente, estes resultados demonstram que os metabólitos do tamoxifeno atuam de forma diferenciada em relação ao tamoxifeno e sugerem que a variabilidade nos efeitos cardiovasculares descritos durante o tratamento com tamoxifeno possa ser devido, ao menos em parte, pela associação dos diferentes efeitos do tamoxifeno e seus metabólitos ativos.

Vários estudos têm descrito efeitos cardiovasculares diversos associados ao uso do tamoxifeno [17, 74], sendo alguns deles divergentes [75-77]. Por exemplo, diversos

estudos epidemiológicos associam o uso do tamoxifeno com o risco aumentado de trombose venosa e tromboembolia [4, 12, 74, 78]. Contrariamente, diversos estudos têm descrito que o tamoxifeno tem ação benéfica no sistema cardiovascular. Estes incluem melhoras na função endotelial [36, 37], redução dos níveis de lipídeos plasmáticos [9, 37, 79], redução do risco de infarto do miocárdio [4] e efeitos antioxidantes [75, 80]. As causas para esses resultados divergentes são ainda desconhecidas.

Com base no conhecimento que o tamoxifeno é extensamente metabolizado e que este metabolismo produz metabólitos ativos com propriedades superiores ao do próprio tamoxifeno [27, 29, 81], este estudo foi realizado para avaliar a possibilidade do tamoxifeno e seus metabólitos produzirem efeitos diferenciados, os quais poderiam ser benéficos ou deletérios, na reatividade vascular.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com tamoxifeno reduziu significativamente a resposta vasodilatadora à Ach, em um relevante leito vascular de resistência, o trem posterior do rato, sugerindo que o tratamento com tamoxifeno promove uma leve, porém significativa, disfunção endotelial. Contrariamente aos efeitos deletérios observados com tamoxifeno, seus metabólitos melhoraram significativamente a resposta dependente do endotélio à Ach, sugerindo que o tamoxifeno e seus metabólitos produzem efeitos divergentes na função endotelial.

A disfunção endotelial é amplamente associada à diminuição da biodisponibilidade de NO, como resultado da diminuição da expressão ou atividade da eNOS, ou uma consequência da inativação do NO formado devido ao aumento de formação de espécies reativas de oxigênio [34]. Neste estudo, os animais tratados com tamoxifeno apresentaram níveis plasmáticos e sanguíneos de MDA significativamente aumentados, o que sugere que o tamoxifeno aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio; Por outro lado, a melhora observada na resposta dependente do endotélio à Ach após o

tratamento com n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno foi associada com a diminuição da peroxidação lipídica, como sugerido pelos níveis reduzidos de MDA no plasma e sangue nesses grupos experimentais. Nesse contexto, vários estudos têm sugerido que o tratamento com antioxidantes resulta em melhora nas respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio [82-84], e é possível que os efeitos antioxidantes induzidos pelos metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno sejam os responsáveis pela melhora dependente do endotélio em resposta à Ach observada no presente estudo.

Por outro lado, outros estudos têm descrito resultados conflitantes a respeito do papel do tamoxifeno na produção de espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, enquanto alguns estudos experimentais e clínicos têm descrito que o tratamento com tamoxifeno aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio [13, 85-87], outros têm defendido que o tamoxifeno possui efeitos antioxidantes [75, 80, 88].

Diversos são os fatores que podem explicar essas divergências. Por exemplo, o delineamento experimental, dose e duração do tratamento e a espécie avaliada, bem como os métodos utilizados para avaliação do estresse oxidativo, podem limitar a comparação de diferentes estudos. Adicionalmente, como sugerido pelos nossos resultados, os metabólitos do tamoxifeno podem ter ações diferenciadas na produção de espécies reativas de oxigênio.

A peroxidação lipídica, avaliada neste estudo pela medida dos níveis plasmáticos e sanguíneos de MDA, é o resultado da ação de espécies reativas de oxigênio sobre componentes lipídicos das células e tecidos [89, 90]. Embora a determinação dos níveis de MDA possa indicar aumento ou diminuição do estresse oxidativo, essa abordagem não nos permite inferir as causas dessas alterações. Por exemplo, drogas podem induzir um aumento dos níveis de MDA diretamente pelo aumento da formação de espécies reativas

do oxigênio; Contrariamente, drogas podem não induzir diretamente a formação de espécies reativas do oxigênio, porém podem inibir a atividade de enzimas antioxidantes, contribuindo para o aumento dos níveis de MDA. Por fim, drogas que induzem o aumento da atividade de enzimas antioxidantes podem reduzir os níveis de MDA. Por essa razão e com base nas variabilidades descritas para o tamoxifeno, nesse estudo consideramos importante avaliar se o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos influenciaria na atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e GPx. Adicionalmente, avaliamos se o tamoxifeno e seus metabólitos alteram a atividade de uma das principais enzimas pró-oxidante, a NADPH oxidase [54].

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos não induziu alterações significativas na atividade da NADPH oxidase, avaliada em anéis de aorta provenientes dos diferentes grupos experimentais. Estes resultados foram fortemente compatíveis com os resultados da oxidação da DHE, também em anéis de aorta, os quais igualmente foram inalterados pelo tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos. Por outro lado, quando comparado com o grupo Controle, o tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos induziu um significativo aumento na atividade da SOD eritrocitária. Contrariamente, nenhuma alteração significativa na atividade da CAT foi observada. A SOD e a CAT são enzimas que trabalham de forma associada: enquanto a SOD catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ($2O_2^- + 2H^+ + SOD \rightarrow O_2 + 2H_2O_2$), a CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular ($2H_2O_2 + CAT \rightarrow 2H_2O + O_2$). Sendo assim, um aumento na atividade apenas da SOD observado pelo tratamento com tamoxifeno ou seus metabólitos poderia resultar no acúmulo de peróxido de hidrogênio, contribuindo para o estresse oxidativo, que foi observado somente no grupo tamoxifeno, enquanto seus metabólitos mostraram-se antioxidantes.

Estes resultados intrigantes nos estimularam avaliar a atividade da GPx, uma vez que esta enzima também tem a propriedade de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular ($2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{GPx} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$) [91]. Para nossa surpresa, somente nos grupos tratados com os metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno a atividade da GPx estava aumentada, enquanto que no grupo tratado com tamoxifeno, a atividade da GPx foi similar ao grupo Controle. Estes resultados nos conduziram a sugerir que o aumento do estresse oxidativo observado no grupo tamoxifeno, ao menos em parte, é devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio; Contrariamente, seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno podem exercer seus efeitos antioxidantes pelo aumento combinado da atividade das enzimas SOD e GPx. Estes resultados são fortemente compatíveis com os resultados funcionais observados, que mostram que enquanto o tamoxifeno produz efeitos deletérios na reatividade vascular, seus metabólitos produzem efeitos benéficos nesse parâmetro.

Neste estudo, os níveis plasmáticos de nitrito e NO_x estavam significativamente reduzidos no grupo de animais tratados com tamoxifeno, quando comparados com os demais grupos experimentais, sugerindo que o tamoxifeno pode exercer alguma influência na expressão ou atividade da eNOS. Embora estes parâmetros não tenham sido avaliados neste estudo, os níveis plasmáticos de nitrito têm sido descritos como um importante marcador da formação de NO [92, 93]. Além disso, reduções nos níveis plasmáticos de nitrito são associados ao grau de disfunção endotelial, inclusive em estudos clínicos [94]. Neste sentido, os níveis reduzidos de nitrito e NO_x no plasma dos animais tratados com tamoxifeno foram compatíveis com disfunção endotelial observada.

Neste estudo, o tratamento de ratos durante duas semanas com tamoxifeno ou seus metabólitos não produziram mudanças significativas na frequência cardíaca e

pressão arterial média. Entretanto, os animais tratados com tamoxifeno ou seus metabólitos ganharam menos peso que os animais Controles. Embora não existam dados disponíveis a respeito dos metabólitos do tamoxifeno, evidências similares têm sido descritas por outros estudos experimentais com o tamoxifeno [95-97]. Os mecanismos que poderiam explicar o ganho de peso reduzido associado ao tratamento com tamoxifeno não é conhecido [96].

Neste estudo, nós demonstramos pela primeira vez importantes efeitos agudos induzidos pelos metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno em anéis de aorta contraídos. Nossos resultados sugerem que, assim como previamente descrito para o tamoxifeno [40, 98], os metabólitos aqui estudados possuem a propriedade de induzir vasorelaxamento agudo, em concentrações bem próximas àquelas encontradas no plasma de pacientes em tratamento com tamoxifeno [24, 26]. Por exemplo, pacientes recebendo a dose de 20 mg/dia de tamoxifeno, tipicamente apresentam concentrações médias no plasma de tamoxifeno e n-desmetil-tamoxifeno próximas de 1 $\mu\text{mol/l}$, enquanto as concentrações médias 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno são próximas a 100 nmol/l [24, 26]. Em nossos estudos “*in vitro*”, efeitos vasorelaxantes foram observados a partir da concentração de 1 pmol/l , com efeito máximo próximo de 10 $\mu\text{mol/l}$. Nossos resultados “*in vitro*” sugerem ainda que existem diferenças significativas entre tamoxifeno e seus metabólitos na capacidade de induzir esses efeitos relaxantes, bem como nos mecanismos de ação envolvidos; Entretanto todos estes efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos foram abolidos com a inibição da COX e da NOS, sugerindo que estes efeitos vasorelaxantes envolvem a síntese de prostanóides e NO.

A extensa metabolização do tamoxifeno foi caracterizada na década de 70 pelos trabalhos de Jordan et al. que também caracterizou o primeiro metabólito do tamoxifeno

com alta potência, o 4-hidroxi-tamoxifeno, o qual apresenta afinidade pelo receptor de estrógeno cerca de 100 vezes superior ao tamoxifeno [99]. Posteriormente, foi demonstrado que este metabólito era cerca de 30 a 100 vezes mais potente em inibir a proliferação celular dependente de estrógeno [27, 100, 101]. Tendo como base estes resultados, nas últimas três décadas o metabólito 4-hidroxi-tamoxifeno vem sendo amplamente utilizado em estudos in vitro, como o metabólito ativo do tamoxifeno. Por outro lado, apesar da alta potência antiestrogênica do 4-hidroxi-tamoxifeno, a contribuição deste metabólito para os efeitos clínicos do tamoxifeno permanecem um assunto de grande debate, principalmente porque os níveis plasmáticos deste metabólito são relativamente baixos quando comparados aos níveis de tamoxifeno e n-desmetil-tamoxifeno [100]. A relação entre metabolismo do tamoxifeno e seus efeitos vem sendo amplamente estudada, após a caracterização do novo metabólito, n-desmetil-4-hidroxi-tamoxifeno, realizada pelos colaboradores deste estudo na Universidade de Indianápolis, nos Estados Unidos, cerca de sete anos atrás [26, 29]. O nome endoxifeno foi sugerido para o novo metabólito e embora o mesmo tenha sido identificado em humanos na década de 80 [25], sua atividade biológica permaneceu desconhecida até recentemente. Estes pesquisadores demonstraram que pacientes em tratamento com tamoxifeno apresentavam níveis de endoxifeno cerca de 10 vezes superiores ao do 4-hidroxi-tamoxifeno, o qual se acreditava ser o metabólito de maior relevância clínica. Adicionalmente, foi observado que pacientes que recebiam tratamento coadjuvante com paroxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, apresentavam níveis plasmáticos de endoxifeno significativamente baixos, comparados com os que não recebiam tratamento coadjuvante. Com base no conhecimento que a paroxetina inibe a atividade das enzimas CYP2D6, estes pesquisadores verificaram os níveis de endoxifeno em pacientes portadores de alelos variantes CYP2D6. Novamente, os níveis plasmáticos

de endoxifeno em pacientes com polimorfismos na enzima CYP2D6 estavam significativamente baixos, comparado aos pacientes sem variantes genéticas na CYP2D6. Mais importante, os níveis plasmáticos de tamoxifeno, n-desmetil-tamoxifeno e 4-hidroxi-tamoxifeno não foram influenciados por polimorfismos da CYP2D6, bem como pelo tratamento com paroxetina [26]. Este estudo teve importantes repercussões, pois há tempos estudos de farmacogenética sugerem que polimorfismos genéticos podem influenciar em aspectos terapêuticos do tratamento de diversos tipos de câncer [31]. Além disso, estudos subseqüentes têm sugerido que variantes polimórficas da enzima CYP2D6 ou a associação de inibidores desta enzima (como paroxetina) podem ter impacto na eficácia do tamoxifeno [19, 102], destacando a idéia de que o endoxifeno poderia ter um importante papel nos efeitos mediados pelo tratamento com tamoxifeno. Por fim, estudos in vitro demonstraram que o endoxifeno é formado a partir do n-desmetil-tamoxifeno, via ação da enzima CYP2D6 [23]. Com base nessas perspectivas a respeito do endoxifeno, neste trabalho nós avaliamos o papel do tamoxifeno e seus principais metabólitos, incluindo endoxifeno, na reatividade vascular. Nossos resultados sugerem que o tamoxifeno e seus metabólitos podem atuar de forma diferenciada nos parâmetros aqui avaliados, e nos conduz a sugerir que indivíduos com dificuldades em metabolizar o tamoxifeno podem estar mais suscetíveis aos efeitos adversos associados com uso de tamoxifeno.

Finalmente, nossos resultados sugerem que enquanto o tamoxifeno produz efeitos deletérios, seus metabólitos produzem efeitos benéficos na vasculatura e na formação de espécies reativas do oxigênio. Embora este estudo puramente experimental com todas suas limitações de interpretação possa não refletir a realidade clínica, este trabalho destaca a importância da avaliação e a consideração dos diferentes metabólitos do tamoxifeno em futuros estudos clínicos. Se nossos dados puderem ser extrapolados para

as condições clínicas, é possível que diferenças individuais na capacidade de metabolizar o tamoxifeno possam influenciar nos benefícios ou riscos cardiovasculares induzidos pelo tratamento com tamoxifeno.

CONCLUSÃO

7 – Conclusão

Os dados apresentados nesta tese nos permitem concluir que:

- a) Nossos resultados sugerem que enquanto o tamoxifeno produz efeitos deletérios na vasculatura e na formação de NO e espécies reativas do oxigênio, seus metabólitos produzem efeitos benéficos, com significativos efeitos antioxidantes.

- b) O tamoxifeno e seus metabólitos n-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno e endoxifeno induzem o vasorelaxamento agudo de anéis de aorta contraídos; Existem diferenças significativas entre tamoxifeno e seus metabólitos na capacidade de induzir esses efeitos relaxantes, bem como nos mecanismos de ação envolvidos; Entretanto todos estes efeitos agudos induzidos pelo tamoxifeno e seus metabólitos são dependentes da COX e da NOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 – Referências Bibliográficas

- [1] Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1371-80.
- [2] Love RR, Wiebe DA, Feyzi JM, Newcomb PA, Chappell RJ. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(20):1534-9.
- [3] Ballard VL, Edelberg JM. Harnessing hormonal signaling for cardioprotection. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005;2005(51):re6.
- [4] Braithwaite RS, Chlebowski RT, Lau J, George S, Hess R, Col NF. Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. *J Gen Intern Med.* 2003;18(11):937-47.
- [5] McDonald CC, Stewart HJ. Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee. *Bmj.* 1991;303(6800):435-7.
- [6] Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1998;339(22):1609-18.
- [7] Costantino JP, Kuller LH, Ives DG, Fisher B, Dignam J. Coronary heart disease mortality and adjuvant tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(11):776-82.
- [8] Rutqvist LE, 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(17):1398-406.
- [9] Saarto T, Blomqvist C, Ehnholm C, Taskinen MR, Elomaa I. Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: a randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 1996;14(2):429-33.
- [10] Grainger DJ, Metcalfe JC. Tamoxifen: teaching an old drug new tricks? *Nat Med.* 1996;2(4):381-5.
- [11] Duggan C, Marriott K, Edwards R, Cuzick J. Inherited and acquired risk factors for venous thromboembolic disease among women taking tamoxifen to prevent breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(19):3588-93.
- [12] Hernandez RK, Sorensen HT, Pedersen L, Jacobsen J, Lash TL. Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. *Cancer.* 2009;30:30.
- [13] Vitseva O, Flockhart DA, Jin Y, Varghese S, Freedman JE. The effects of tamoxifen and its metabolites on platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(3):1144-50.
- [14] Beral V, Banks E, Reeves G. Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy. *Lancet.* 2002;360(9337):942-4.
- [15] Langer RD, Pradhan AD, Lewis CE, Manson JE, Rossouw JE, Hendrix SL, et al. Baseline associations between postmenopausal hormone therapy and inflammatory, haemostatic, and lipid biomarkers of coronary heart disease. The Women's Health Initiative Observational Study. *Thromb Haemost.* 2005;93(6):1108-16.
- [16] Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hosszowski K, 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(7):847-57.
- [17] Grainger DJ, Schofield PM. Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence. *Circulation.* 2005;112(19):3018-24.

- [18] Furr BJ, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther.* 1984;25(2):127-205.
- [19] Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, et al. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9312-8.
- [20] Rae JM, Goetz MP, Hayes DF, Ingle JN, Li L, Storniolo AM, et al. CYP2D6 genotype and tamoxifen response. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):E6.
- [21] Lim YC, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA, et al. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(2):503-12.
- [22] Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(8):869-74.
- [23] Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310(3):1062-75.
- [24] Lee KH, Ward BA, Desta Z, Flockhart DA, Jones DR. Quantification of tamoxifen and three metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to a clinical trial. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;791(1-2):245-53.
- [25] Lien EA, Solheim E, Kvinnsland S, Ueland PM. Identification of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen as a metabolite of tamoxifen in human bile. *Cancer Res.* 1988;48(8):2304-8.
- [26] Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1758-64.
- [27] Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res.* 1982;42(1):317-23.
- [28] Katzenellenbogen BS, Norman MJ, Eckert RL, Peltz SW, Mangel WF. Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1984;44(1):112-9.
- [29] Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;85(2):151-9.
- [30] Flockhart DA, Tanus-Santos JE. Implications of cytochrome P450 interactions when prescribing medication for hypertension. *Arch Intern Med.* 2002;162(4):405-12.
- [31] Scripture CD, Sparreboom A, Figg WD. Modulation of cytochrome P450 activity: implications for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2005;6(10):780-9.
- [32] Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(12):913-58.
- [33] Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(5):1235-41.
- [34] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.

- [35] Loke KE, Woodman OL. Effect of ischaemic preconditioning on vascular dysfunction induced by ischaemia and reperfusion in rat hindquarters. *Cardiovasc Res.* 1996;32(6):1081-7.
- [36] Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation.* 2001;103(11):1497-502.
- [37] Stamatelopoulos KS, Lekakis JP, Poulakaki NA, Papamichael CM, Venetsanou K, Aznaouridis K, et al. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Am Heart J.* 2004;147(6):1093-9.
- [38] Sbarouni E, Flevari P, Kroupis C, Kyriakides ZS, Koniavitou K, Kremastinos DT. The effects of raloxifene and simvastatin on plasma lipids and endothelium. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2003;17(4):319-23.
- [39] Figtree GA, Lu Y, Webb CM, Collins P. Raloxifene acutely relaxes rabbit coronary arteries in vitro by an estrogen receptor-dependent and nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation.* 1999;100(10):1095-101.
- [40] Figtree GA, Webb CM, Collins P. Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-, nitric oxide-, and estrogen receptor-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(2):519-23.
- [41] Thorin E, Pham-Dang M, Clement R, Mercier I, Calderone A. Hyper-reactivity of cerebral arteries from ovariectomized rats: therapeutic benefit of tamoxifen. *Br J Pharmacol.* 2003;140(7):1187-92.
- [42] Ong PJ, Linardou H, Graham HA, Savage P, Hayward CS, Coombes RC, et al. Tamoxifen is not detrimental to endothelial function in postmenopausal women with breast cancer. *Am Heart J.* 2001;142(4):E6.
- [43] Griffiths KA, Sader MA, Skilton MR, Harmer JA, Celermajer DS. Effects of raloxifene on endothelium-dependent dilation, lipoproteins, and markers of vascular function in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(4):698-704.
- [44] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
- [45] Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1115-26.
- [46] Rahimian R, Dube GP, Toma W, Dos Santos N, McManus BM, van Breemen C. Raloxifene enhances nitric oxide release in rat aorta via increasing endothelial nitric oxide mRNA expression. *Eur J Pharmacol.* 2002;434(3):141-9.
- [47] Oge A, Sezer ED, Ozgonul M, Bayraktar F, Sozmen EY. The effects of estrogen and raloxifene treatment on the antioxidant enzymes and nitrite-nitrate levels in brain cortex of ovariectomized rats. *Neurosci Lett.* 2003;338(3):217-20.
- [48] Rahimian R, Laher I, Dube G, van Breemen C. Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(1):116-22.
- [49] Haynes MP, Li L, Russell KS, Bender JR. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(2):99-108.
- [50] Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2118-23.
- [51] Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000;87(8):677-82.

- [52] Tatchum-Talom R, Martel C, Labrie F, Marette A. Acute vascular effects of the selective estrogen receptor modulator EM-652 (SCH 57068) in the rat mesenteric vascular bed. *Cardiovasc Res*. 2003;57(2):535-43.
- [53] Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982;47(5):412-26.
- [54] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
- [55] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 2001;11(4):173-86.
- [56] Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(11):2032-6.
- [57] Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2(1):98-105.
- [58] Mandlekar S, Yu R, Tan TH, Kong AN. Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2000;60(21):5995-6000.
- [59] Daosukho C, Ittarat W, Lin SM, Sawyer DB, Kiningham K, Lien YC, et al. Induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mediates cardioprotective effect of tamoxifen (TAM). *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(5):792-803.
- [60] Ghanam K, Javellaud J, Ea-Kim L, Oudart N. The protective effect of 17 beta-estradiol on vasomotor responses of aorta from cholesterol-fed rabbit is reduced by inhibitors of superoxide dismutase and catalase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249(3):858-64.
- [61] Dobrydneva Y, Weatherman RV, Trebley JP, Morrell MM, Fitzgerald MC, Fichandler CE, et al. Tamoxifen stimulates calcium entry into human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(4):380-90.
- [62] Mandlekar S, Hebbar V, Christov K, Kong AN. Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 2000;60(23):6601-6.
- [63] Woodman OL, Wongsawatkul O. Ischaemia enhances the role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in endothelium-dependent and nitric oxide-mediated dilatation of the rat hindquarters vasculature. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(4):254-60.
- [64] Woodman OL, Wongsawatkul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistance arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(1-2):34-40.
- [65] Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, et al. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):9943-8.
- [66] Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272(3):1011-5.
- [67] Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998;108:101-6.
- [68] Cau SB, Dias-Junior CA, Montenegro MF, de Nucci G, Antunes E, Tanus-Santos JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol*. 2008;581(1-2):132-7.

- [69] Fernandes DC, Wosniak J, Jr., Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FR, et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C413-22.
- [70] Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3170-5.
- [71] Beers RF, Jr., Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952;195(1):133-40.
- [72] Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
- [73] Janiszewski M, Souza HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL, Laurindo FR. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(5):446-53.
- [74] Goldhaber SZ. Tamoxifen: preventing breast cancer and placing the risk of deep vein thrombosis in perspective. *Circulation.* 2005;111(5):539-41.
- [75] Wiseman H. Tamoxifen as an antioxidant and cardioprotectant. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:209-19.
- [76] Gail MH, Costantino JP, Bryant J, Croyle R, Freedman L, Helzlsouer K, et al. Weighing the risks and benefits of tamoxifen treatment for preventing breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(21):1829-46.
- [77] Meier CR, Jick H. Tamoxifen and risk of idiopathic venous thromboembolism. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;45(6):608-12.
- [78] Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, et al. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet.* 2003;361(9354):296-300.
- [79] de Medina P, Payre BL, Bernad J, Bosser I, Pipy B, Silvente-Poirot S, et al. Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):1165-73.
- [80] Wiseman H, Laughton MJ, Arnstein HR, Cannon M, Halliwell B. The antioxidant action of tamoxifen and its metabolites. Inhibition of lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1990;263(2):192-4.
- [81] Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(5):471-8.
- [82] Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF, Jr., Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1996;93(6):1107-13.
- [83] Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996;94(1):6-9.
- [84] Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996;97(1):22-8.
- [85] El-Beshbishy HA. Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. *J Biochem Mol Biol.* 2005;38(5):563-70.
- [86] Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res.* 2007;67(3):1282-90.
- [87] Wakatsuki A, Ogawa Y, Saibara T, Okatani Y, Fukaya T. Size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in breast cancer patients with tamoxifen-induced fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3676-81.

- [88] Ek RO, 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(1-2):227-35.
- [89] Yagi K. Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.* 1998;108:107-10.
- [90] Meagher EA, FitzGerald GA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(12):1745-50.
- [91] Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999;4:D339-45.
- [92] Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(7):790-6.
- [93] Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12814-9.
- [94] Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(2):295-302.
- [95] Mark CJ, Tatchum-Talom R, Martin DS, Eyster KM. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(5):R1969-75.
- [96] Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr.* 2001;131(9):2351-7.
- [97] Pham-Dang ML, Clement R, Mercier I, Calderone A. Comparative effects of tamoxifen and angiotensin II type-1 receptor antagonist therapy on the hemodynamic profile of the ovariectomized female rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(9):915-9.
- [98] Hutchison SJ, Chou TM, Chatterjee K, Sudhir K. Tamoxifen is an acute, estrogen-like, coronary vasodilator of porcine coronary arteries in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38(5):657-65.
- [99] Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G. A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol.* 1977;75(2):305-16.
- [100] Jordan VC. Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res Treat.* 1982;2(2):123-38.
- [101] Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Long DJ, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem.* 1982;16(1):1-13.
- [102] Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, et al. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;101(1):113-21.

APÊNDICE

9 – Apêndice

Artigo publicado na revista ***Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology***:

Assessment of Vascular Effects of Tamoxifen and Its Metabolites on the Rat Perfused

Hindquarter Vascular Bed. Volume 104 Issue 5, **400 - 407**

Assessment of Vascular Effects of Tamoxifen and Its Metabolites on the Rat Perfused Hindquarter Vascular Bed

Marcelo F. Montenegro¹, Lisandra R. Pessa¹, Valéria A. Gomes², Zeruesenay Desta³, David A. Flockhart³ and Jose E. Tanus-Santos¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil,

²Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, and

³Division of Clinical Pharmacology, Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA

(Received 5 September 2008; Accepted 29 October 2008)

Abstract: Tamoxifen has been suggested to produce beneficial cardiovascular effects, although the mechanisms for these effects are not fully known. Moreover, although tamoxifen metabolites may exhibit 30–100 times higher potency than the parent drug, no previous study has compared the effects produced by tamoxifen and its metabolites on vascular function. Here, we assessed the vascular responses to acetylcholine and sodium nitroprusside on perfused hindquarter vascular bed of rats treated with tamoxifen or its main metabolites (*N*-desmethyl-tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen, and endoxifen) for 2 weeks. Plasma and whole-blood thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations were determined using a fluorometric method. Plasma nitrite and NOx (nitrite + nitrate) concentrations were determined using an ozone-based chemiluminescence assay and Griess reaction, respectively. Treatment with tamoxifen reduced the responses to acetylcholine ($pD_2 = 2.2 \pm 0.06$ and 1.9 ± 0.05 after vehicle and tamoxifen, respectively; $P < 0.05$), while its metabolites improved these responses ($pD_2 = 2.5 \pm 0.04$ after *N*-desmethyl-tamoxifen, 2.5 ± 0.03 after 4-hydroxy-tamoxifen, and 2.6 ± 0.08 after endoxifen; $P < 0.01$). Tamoxifen and its metabolites showed no effect on endothelial-independent responses to sodium nitroprusside ($P > 0.05$). While tamoxifen treatment resulted in significantly higher plasma and whole blood lipid peroxide levels (37% and 62%, respectively; both $P < 0.05$), its metabolites significantly decreased lipid peroxide levels (by approximately 50%; $P < 0.05$). While treatment with tamoxifen decreased the concentrations of markers of nitric oxide formation by approximately 50% ($P < 0.05$), tamoxifen metabolites had no effect on these parameters ($P > 0.05$). These results suggest that while tamoxifen produces detrimental effects, its metabolites produce counteracting beneficial effects on the vascular system and on nitric oxide/reactive oxygen species formation.

Tamoxifen is a selective oestrogen receptor modulator widely used in the treatment and prevention of breast cancer. In addition to its actions on the breast, tamoxifen produces cardiovascular effects including alterations of lipid profile [1,2], down-regulation of inflammatory markers [3,4], and increased risk of deep venous thrombosis [5]. Experimental studies have shown that tamoxifen acutely relaxes coronary rings [6–8], while clinical studies have shown that tamoxifen enhances flow-mediated dilation [9,10]. Tamoxifen increases the production of reactive oxygen species by platelets, thus modestly increasing platelet aggregation [11]. However, the mechanisms involved in tamoxifen-induced diverse cardiovascular effects are poorly understood.

While there are no studies showing how the metabolites of tamoxifen affect vascular function, it is well known that tamoxifen is metabolized to several metabolites that possess variable effects and potencies towards the oestrogen receptors

depending on the tissue studied. Among the tamoxifen metabolites, *N*-desmethyl-tamoxifen has been reported to be quantitatively important while 4-hydroxy-tamoxifen, although representing a minor pathway [12,13], exhibits up to a 100 times higher potent antioestrogenic activity than tamoxifen [14]. For this reason, tamoxifen has been referred to as a prodrug by some authors [15,16]. However, recent studies have described another active metabolite, 4-hydroxy-*N*-desmethyl-tamoxifen (endoxifen), which has pharmacological activity and potency comparable to that of observed with 4-hydroxy-tamoxifen [15,17–19]. In addition, the plasma concentrations of endoxifen in patients taking usual doses of tamoxifen is on the average over six times higher than those of 4-hydroxy-tamoxifen [15,19], suggesting that endoxifen could be a more important tamoxifen metabolite. In fact, recent clinical data in breast cancer patients are consistent with an important role of endoxifen in tamoxifen activity [20].

Despite the improved knowledge on the metabolism of tamoxifen, no study has addressed whether endoxifen or other tamoxifen metabolites produce variable effects on the vascular bed. In the present study, we hypothesized that tamoxifen and its metabolites promote differential effects

Author for correspondence: Jose Eduardo Tanus-Santos, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil (fax + 55 16 3633 2301, e-mails tanus@fmrp.usp.br, tanussantos@yahoo.com).

on vascular resistance vessels. We examined how treatment with tamoxifen or its main metabolites (*N*-desmethyl-tamoxifen, 4-hydroxy-tamoxifen, and endoxifen) affect the vascular reactivity (endothelium-dependent and endothelium-independent) in a relevant vascular resistance bed. In addition, we assessed whether treatment with tamoxifen or its metabolites affect nitric oxide formation and oxidative stress.

Materials and Methods

Animals and treatments. The study complied with international guidelines of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the US National Institutes of Health and was approved by our institutional ethics committee. Male Wistar rats (180–200 g) obtained from the colony at University of São Paulo (Ribeirão Preto Campus, Brazil) were maintained on a 12-h light/dark cycle at a room temperature (22–25°) with free access to standard rat chow and water.

The rats were randomly divided into five groups ($n = 8/\text{group}$) and were treated for 2 weeks with daily subcutaneous injections of vehicle (Control group; 100 μl of corn oil), tamoxifen (Tam group; 1 mg/kg), *N*-desmethyl-tamoxifen (*N*-desmethyl-Tam group; 1 mg/kg), 4-hydroxy-tamoxifen (4-hydroxy-Tam group; 1 mg/kg), or 4-hydroxy-*N*-desmethyl-tamoxifen (Endoxifen group; 1 mg/kg). Tamoxifen and its metabolites were emulsified in corn oil as previously described [21]. The doses of tamoxifen were chosen on the basis on previous work showing inhibition of mammary tumours in a rat model of breast cancer [21] and beneficial cardiovascular effects [22]. Although presumably the metabolites would normally be present in lower concentrations than tamoxifen itself after a particular dose, we wanted to compare the effects of equal amounts of tamoxifen metabolites. Therefore we used the same dose of each metabolite.

Measurement of cardiovascular responses. After 2 weeks of treatment, the rats (220–340 g) were anaesthetized with urethane (1.25 g/kg, intraperitoneally) and a tracheotomy was performed using polyethylene tubing (PE200). Another polyethylene catheter (PE50) was inserted into the left carotid and the mean arterial pressure was recorded using a data acquisition system (MP150CE; Biopac Systems Inc., Goleta, CA) connected to a computer (Acknowledge 3.2, for windows). Heart rate values were derived from the blood pressure recordings and processed online. The absence of somatic motor reflexes in response to tail pitching or blinking in response to a low-pressure corneal stimulation indicated deep anaesthesia and analgesia. The data acquisitions were initiated 30 min after onset of anaesthesia.

Preparation of rat hindquarters vascular bed. After baseline assessment of mean arterial pressure and heart rate, a midline abdominal incision was performed and the aorta was cannulated above the iliac bifurcation. The hindquarters were then perfused *in situ* with Krebs bicarbonate solution bubbled with 95% O_2 , 5% CO_2 , at 37°, pH 7.4, containing (in mmol/l): NaCl 118; NaHCO_3 25.0; KCl 4.7; KH_2PO_4 1.2; MgSO_4 1.2; glucose 11.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.5, and using a peristaltic pump (Carter-Manostat, Barnant Com, IL) at a constant rate of 16 ml/min/kg. The vena cava was sectioned to allow the perfusate to escape. The basal perfusion pressure was similar in all experimental groups (approximately 25–30 mmHg). Resting perfusion pressure was adjusted to approximately 90 mmHg by adding methoxamine (50–100 μM) to the perfusate and remained stable throughout the experiment. There were no significant differences between the groups in relation to the concentration of methoxamine used in the study groups (data not shown). Because the flow was constant, changes in perfusion pressure reflected changes in vascular tone. After hindquarter perfusion was initiated, the rat was killed

by an intracardiac injection of KCl 3 M, and 30 min of perfusion were then allowed for the preparation to stabilize before responses to vasodilators were measured. A side-arm of the perfusion circuit, between the peristaltic pump and the aortic catheter, was connected to a pressure transducer, and perfusion pressure was monitored on real-time using a data acquisition system (MP150CE; Biopac Systems Inc., Goleta, CA). Dose–response curves to acetylcholine and sodium nitroprusside were examined. Acetylcholine ($3 \cdot 10^{-4}$ to 10^{-1} μg) or sodium nitroprusside ($3 \cdot 10^{-5}$ to 10^{-2} mg) was injected in small volumes (10–100 μl) directly into the perfusion circuit, as previously described [23].

Drugs and solutions. All drugs and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), except *N*-desmethyl-tamoxifen and 4-hydroxy-tamoxifen, which was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Endoxifen (4-hydroxy-*N*-desmethyl-tamoxifen) was provided by Dr Zeruesenay Desta, (Indiana University, Indianapolis, IN). Acetylcholine and sodium nitroprusside were dissolved in saline solution before use.

Determination of plasma NO_x (nitrate + nitrite) concentrations. Arterial blood samples were collected in tubes containing heparin and immediately centrifuged at 1000 $\times\text{g}$ for 3 min. Plasma aliquots were stored at -70° until analyzed. Plasma NO_x concentrations were determined in duplicate by using the Griess reaction as described previously [24] with the following modifications. Briefly, 40 μl of plasma was incubated with the same volume of nitrate reductase buffer (0.1 M potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 10 mM flavin adenine dinucleotide, and 2 units of nitrate reductase/ml) in individual wells of a 96-well plate. Samples were allowed to incubate overnight at 37° in the dark. Eighty microlitres of freshly prepared Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) were added to each well and the plate was incubated for an additional 15 min at room temperature. A standard nitrate curve was obtained by incubating sodium nitrate (0.2–200 μM) with the same reductase buffer. The total amount of nitrite recovery was >96% and absorbances were measured at 540 nm using a microplate reader. The assay results were not significantly affected by the presence of plasma proteins and the results are reported as micromoles per litre ($\mu\text{mol/l}$) of NO_x (nitrate + nitrite).

Measurement of plasma nitrite concentrations. Plasma aliquots were analyzed in duplicate for their nitrite content using an ozone-based reductive chemiluminescence assay as previously described [25]. Briefly, to measure nitrite concentrations in plasma, 100 μl of plasma samples were injected into a solution of acidified tri-iodide, purging with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (Sievers Model 280 NO analyzer, Boulder, CO). Approximately 8 ml of tri-iodide solution (2 g potassium iodide and 1.3 g iodine dissolved in 40 ml water with 140 ml acetic acid) was placed in the purge vessel into which plasma samples were injected. The tri-iodide solution reduces nitrites to NO gas, which is detected by the NO analyzer.

Assessment of lipid peroxide levels in plasma and whole blood. Plasma and whole blood lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using a fluorometric method as previously described [26]. This method requires excitation at 515 nm and emission at 553 nm and uses 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane as standard [27]. The lipoperoxide levels were expressed in terms of malondialdehyde (nmol/ml).

Statistical analysis. The results are expressed as means \pm SEM. The comparisons between groups were assessed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison tests (GRAPHPAD PRISM 3 Software, San Diego, CA). A probability value < 0.05 was considered significant.

Table 1.

Body weight (BW), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in anaesthetized rats treated with vehicle (Control), tamoxifen (Tam) or its metabolites.

Group	n	BW (g)	MAP (mmHg)	HR (bpm)
Control	8	330 ± 5	83 ± 3	338 ± 8
Tam	7	270 ± 17*	85 ± 1	344 ± 12
<i>N</i> -desmethyl-Tam	8	247 ± 5*	87 ± 3	379 ± 21
4-hydroxy-Tam	7	246 ± 8*	83 ± 5	347 ± 23
Endoxifen	8	257 ± 7*	89 ± 6	369 ± 8

* $P < 0.01$ versus the Control group (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.)

The values are means ± SEM.

Results

Body weight, mean arterial blood pressure, and heart rate responses.

Body weight, mean arterial blood pressure, and heart rate responses at the end of treatment are shown in table 1. We found no significant changes in mean arterial pressure and in heart rate after 14 days of treatment with vehicle (Control), tamoxifen, or its metabolites (all $P > 0.05$; table 1). However, rats that received tamoxifen or its metabolites gained less weight than animals in the Control group (all $P < 0.01$; table 1).

Effects of tamoxifen and its metabolites on the hindquarter vascular reactivity to acetylcholine and sodium nitroprusside.

To evaluate the vascular effects of tamoxifen and its metabolites, rat hindquarter vascular beds were isolated and their functional responses to acetylcholine and sodium nitroprusside ($n = 6-8$, per group) were assessed. Figures 1 and 2 show, respectively, endothelial-dependent and endothelial-independent vasorelaxation induced by acetylcholine (3.10^{-4} to 10^{-1} μg) and sodium nitroprusside (3.10^{-5} to 10^{-2} mg) in the hindquarter vascular bed. Treatment with tamoxifen for 2 weeks reduced the potency of acetylcholine compared to vehicle in Control rats (pD_2 decreased from 2.21 ± 0.06 to 1.95 ± 0.05 ; $P < 0.05$; fig. 1, panels A and E). Conversely, treatment with the different tamoxifen metabolites produced significant increase in the potency of acetylcholine-induced relaxation (pD_2 increased from 2.21 ± 0.06 in the Control group to 2.52 ± 0.04 in the *N*-desmethyl-Tam, to 2.54 ± 0.03 in the 4-hydroxy-Tam, and to 2.63 ± 0.08 in the Endoxifen groups; $P < 0.01$; fig. 1; panels B-E). While no significant differences were observed in the maximum relaxation obtained in response to acetylcholine in hindquarter bed of rats from Tam, *N*-desmethyl-Tam, or Endoxifen groups, a marked increase in maximum relaxation effect was observed in the 4-hydroxy-Tam group (maximum relaxation effect increased from 44 ± 2 mmHg in the Control group to 62 ± 1 mmHg in the 4-hydroxy-Tam group; $P < 0.001$; fig. 1; panels C and E). We found no significant differences in pD_2 (fig. 2; panels A-D) or maximum relaxation effect in responses to sodium nitroprusside (all $P > 0.05$; fig. 2, panel E).

Treatment with tamoxifen increases oxidative stress while its metabolites show antioxidant effects.

We found increased plasma and whole blood lipid peroxide levels in the Tam group compared with the Control group ($P < 0.05$; fig. 3, panels A and B). However, treatment with *N*-desmethyl-Tam, 4-hydroxy-Tam, or endoxifen decreased the oxidative stress significantly, as suggested by lower plasma and blood lipid peroxide levels in these groups compared to the Control group ($P < 0.01$ for plasma and $P < 0.05$ for whole blood; fig. 3, panels A and B, respectively).

Tamoxifen treatment decreased plasma nitric oxide metabolites.

We evaluated nitric oxide formation by measuring plasma NO_x (nitrate + nitrite) and plasma nitrite by using two different methods. Rats in the Tam group showed significantly lower plasma NO_x and plasma nitrite concentrations (both $P < 0.05$ versus the Control group; fig. 4, panels A and B) compared to the Control group. However, no significant differences were found in plasma NO_x or plasma nitrite when animals treated with *N*-desmethyl-Tam, 4-hydroxy-Tam, or endoxifen were compared to the Control group (all $P > 0.05$ versus Control group; fig. 4, panels A and B).

Discussion

The main findings of this study were: (i) tamoxifen impaired endothelial-dependent vasodilator response to acetylcholine; (ii) tamoxifen metabolites *N*-desmethyl-Tam, 4-hydroxy-Tam, and endoxifen improved endothelial-dependent vasodilator response to acetylcholine, and (iii) while tamoxifen increased oxidative stress and decreased nitric oxide formation, treatment with tamoxifen metabolites decreased oxidative stress, without producing significant effects on markers of nitric oxide formation. These data suggest that the overall cardiovascular response to tamoxifen is likely to be the net aggregate effect of tamoxifen and its metabolites and that improved understanding of the effects elicited by the individual compounds as well as differences in exposure to them is important to fully understand the net effect expected *in vivo* after tamoxifen administration.

Several reports have described variable cardiovascular effects produced by tamoxifen [28,29]. The reasons for these conflicting results are poorly understood. However, no study has been conducted to examine the possibility that tamoxifen and its metabolites could produce different, contrasting effects on the cardiovascular system, although it is known that tamoxifen is metabolized to several metabolites some of which are more active (up to 100 times more potent) than tamoxifen itself [14,17,18]. To our knowledge, this is the first study comparatively assessing the cardiovascular effects produced by tamoxifen and its metabolites.

We found that tamoxifen impaired the responses to acetylcholine in a relevant vascular resistance bed. An impaired endothelium-dependent relaxation has been associated with lower nitric oxide bioavailability, which may result from

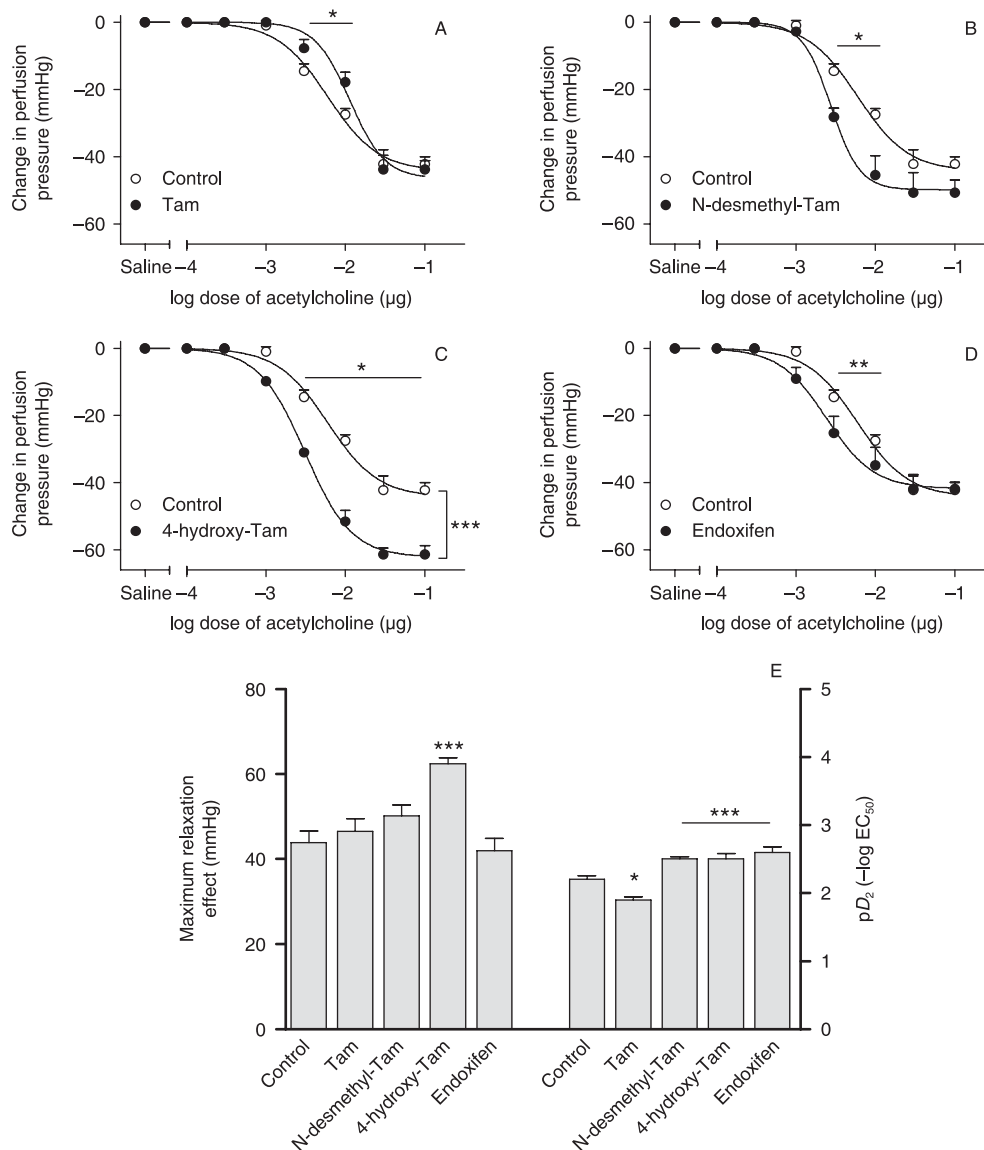


Fig. 1. Endothelial-dependent vasorelaxation induced by acetylcholine in rat hindquarter vascular bed from animals treated with tamoxifen (Tam) (panel A), *N*-desmethyl-Tam (panel B), 4-hydroxy-Tam (panel C), endoxifen (panel D), or vehicle (Control). Panel E shows values obtained to maximum relaxation effects and pD_2 . Vascular responses were studied after precontraction of the hindquarter vascular bed with methoxamine to a perfusion pressure of approximately 90 mmHg. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6-8$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus the Control group.

decreased expression or activity of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), or impaired NO signalling as a consequence of enhanced nitric oxide inactivation by increased concentrations of reactive oxygen species [30]. In agreement with this idea, we found that tamoxifen-induced endothelial dysfunction was associated with increased plasma and whole blood malondialdehyde levels, and decreased concentrations of relevant markers of nitric oxide formation. Previous studies, however, have reported conflicting results on the effects of tamoxifen on reactive oxygen species concentrations. For example, while some authors reported increased concentrations of reactive oxygen species in

experimental and clinical studies with tamoxifen [11,31-33], others have shown antioxidant effects induced by this drug [22,34,35]. These conflicting results may reflect differences in the study design including doses, duration of treatment, or species.

In contrast with the detrimental effects produced by tamoxifen, we found that tamoxifen metabolites improved the responses to acetylcholine, thus suggesting that tamoxifen and its metabolites produce divergent effects on the endothelial function. 4-Hydroxy-Tam showed the best response among the tamoxifen metabolites studied here, with significant effects on acetylcholine-induced relaxation. This finding is

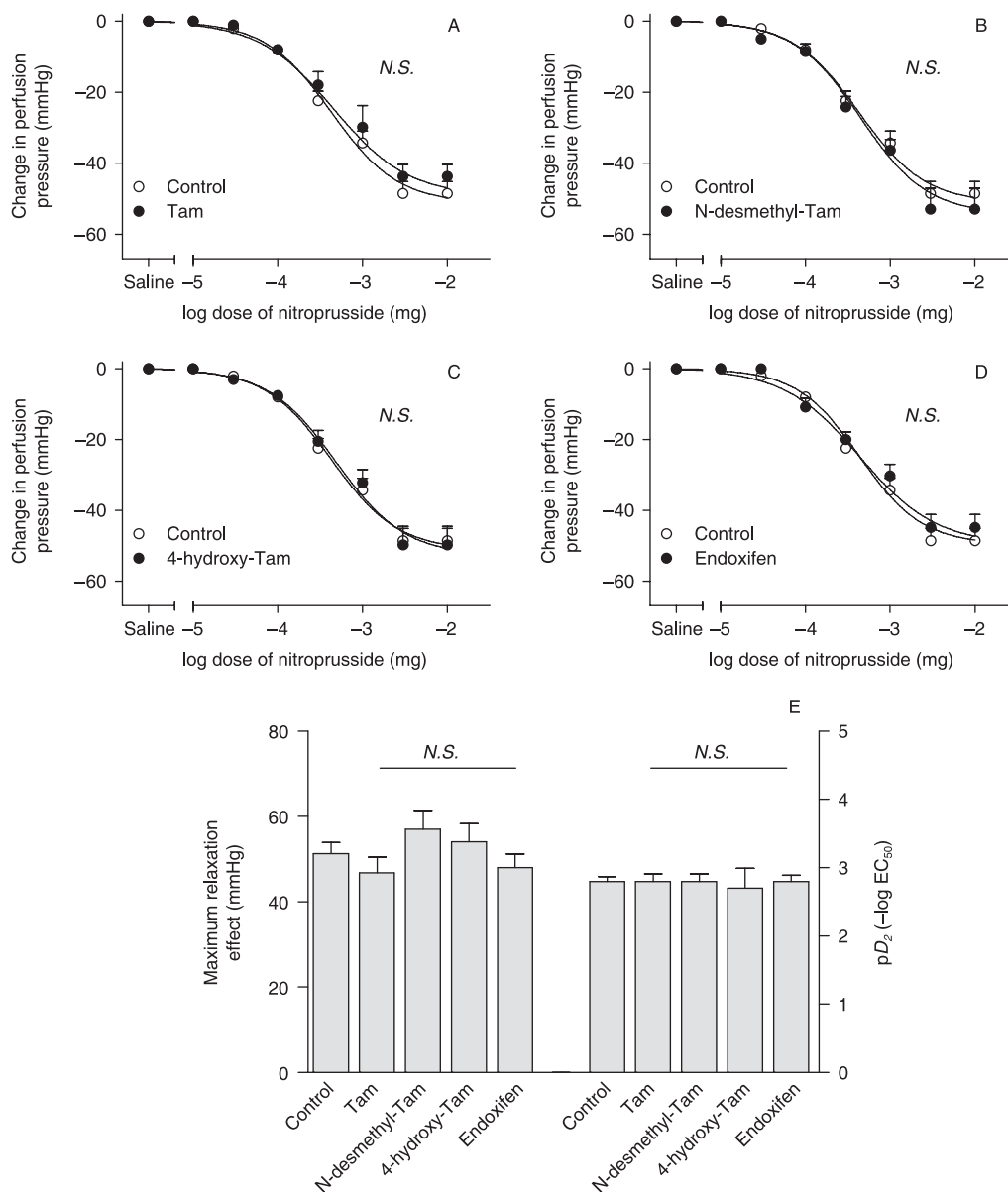


Fig. 2. Endothelial-independent vasorelaxation induced by sodium nitroprusside in rat hindquarter vascular bed from animals treated with tamoxifen (Tam) (panel A), *N*-desmethyl-Tam (panel B), 4-hydroxy-Tam (panel C), endoxifen (panel D), or vehicle (Control). Panel E shows values obtained to maximum relaxation effects and pD₂. Vascular responses were studied after precontraction of the hindquarter vascular bed with methoxamine to a perfusion pressure of approximately 90 mmHg. Data are shown as mean ± SEM (n = 6–8 per group). N.S. = Non-significant versus Control group.

important because several *in vitro* experiments have shown that endoxifen has pharmacological activity that is comparable to that of 4-hydroxy-Tam [17,19]. In the present study, we report for the first time differential effects produced by these metabolites. Indeed, the improved endothelial-dependent responses that we found after treatment with tamoxifen metabolites were associated with decreased lipid peroxidation levels in both plasma and whole blood, and with increased concentrations of markers of nitric oxide formation, consistent with antioxidant effects produced by tamoxifen metabolites. In this context, several studies have

shown that antioxidants can improve endothelium-dependent relaxation [36], and it is possible that antioxidant effects produced by tamoxifen metabolites may have improved the response to acetylcholine in the present study.

We found lower nitrite and lower NO_x concentrations in rats treated with tamoxifen compared with the concentrations found in the Control group. The lower concentrations of these markers of NO formation suggest that tamoxifen may inhibit eNOS activity. Supporting this suggestion, the plasma nitrite levels have been recently recognized as an important marker of nitric oxide formation [37–39], and

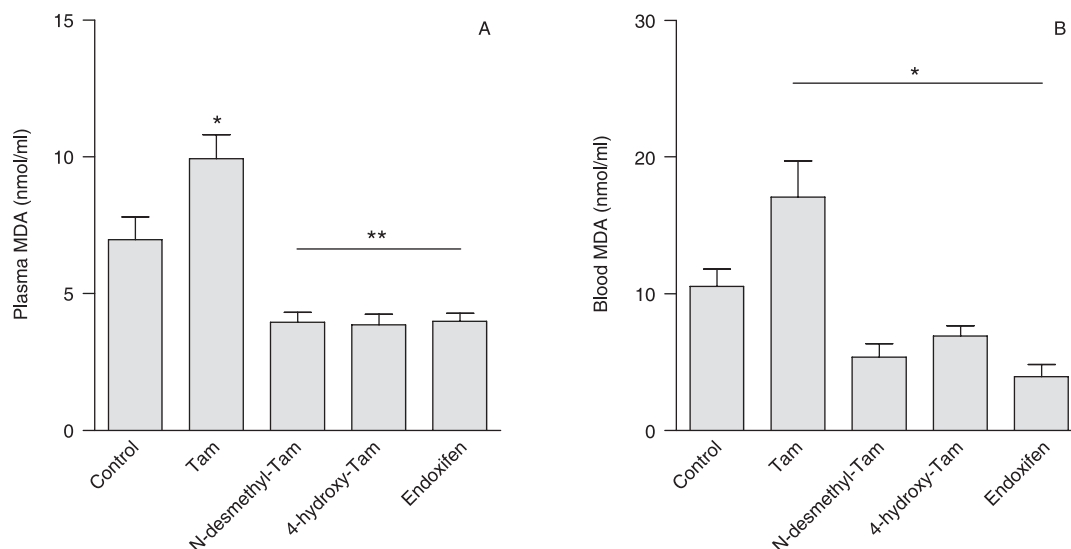


Fig. 3. Concentrations of thiobarbituric acid reactive species expressed in terms of malondialdehyde (MDA; nmol/ml) in plasma (panel A) and blood (panel B) from Control, tamoxifen (Tam), *N*-desmethyl-Tam, 4-hydroxy-Tam and endoxifen-treated rats. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6-8$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control group.

promises to give a measurable parameter of clinical utility [39,40]. Moreover, the concentrations of these makers of NO formation may reflect the degree of endothelial dysfunction [41] and also indicate how drugs can affect NO formation in the vascular system [42–44].

We found that treatment with tamoxifen or its metabolites for 2 weeks produced no effects on baseline heart rate and mean arterial pressure, although the animals that received tamoxifen or its metabolites gained less weight than those treated with vehicle. While no information is currently available with respect to tamoxifen metabolites, similar findings

were reported in other experimental studies with regards to tamoxifen [45–47]. The precise mechanisms that could explain the lower weight gain associated with tamoxifen or its metabolites are not well understood [46].

Some limitations of our study should be taken into consideration. First, we have not examined the activity and expression of eNOS, an approach that could help to explain the differential effects of tamoxifen and its metabolites on the vascular responses to acetylcholine. However, we measured nitrite concentrations in plasma, and this marker of nitric oxide formation reflects nitric oxide synthase activity

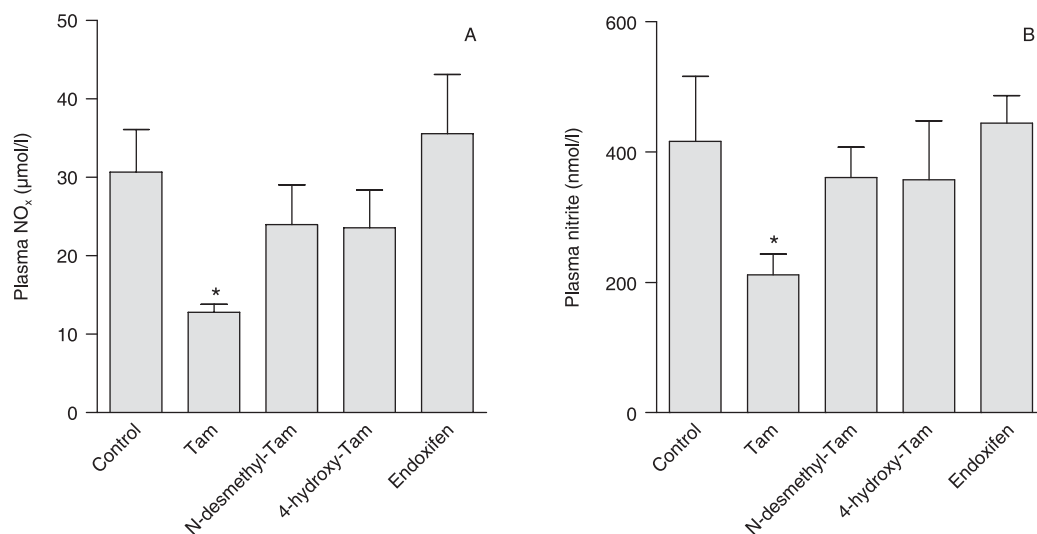


Fig. 4. Concentrations of NO_x (nitrate + nitrite; μ mol/l; panel A) and nitrite (nmol/l; panel B) in plasma from Control, tamoxifen (Tam), *N*-desmethyl-Tam, 4-hydroxy-Tam, and endoxifen-treated rats. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 6-8$ per group). * $P < 0.05$ versus the Control group.

because approximately 70% of plasma nitrite derives from nitric oxide synthase activity in the endothelium [37,41]. Second, the precise mechanisms that could elucidate the mechanisms of the pro- or antioxidant actions of tamoxifen and its metabolites have not been addressed in the present study. It would be interesting to examine the effects produced by tamoxifen and its metabolites in disease conditions, especially those with altered ROS or NO formation. Third, we have not examined whether oestrogen receptors are involved in the responses reported here, or why tamoxifen has opposing effects to its metabolites. Finally, it might be relevant to study the effects produced by other selective oestrogen receptor modulators on the resistance vascular bed.

If our data could be extrapolated to clinical conditions, it is possible that interindividual differences in plasma concentrations of tamoxifen and its metabolites brought about by interpatient differences in tamoxifen metabolism could determine whether an individual patient would derive beneficial effects or is at increased risk for adverse tamoxifen-induced cardiovascular effects.

In conclusion, our results suggest that while tamoxifen produces detrimental effects, its metabolites produce counteracting beneficial effects on the vascular system and on nitric oxide/reactive oxygen species formation.

Acknowledgements

We thank Osmar Vettore for technical expertise. This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

References

- Saarto T, Blomqvist C, Ehnholm C, Taskinen MR, Elomaa I. Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: a randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;**14**:429–33.
- de Medina P, Payre BL, Bernad J, Bossier I, Pipy B, Silvente-Poirot S *et al*. Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**308**:1165–73.
- Cushman M, Costantino JP, Tracy RP, Song K, Buckley L, Roberts JD *et al*. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:255–61.
- Grainger DJ, Metcalfe JC. Tamoxifen: teaching an old drug new tricks? *Nat Med* 1996;**2**:381–5.
- Meier CR, Jick H. Tamoxifen and risk of idiopathic venous thromboembolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998;**45**:608–12.
- Figtree GA, Webb CM, Collins P. Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-, nitric oxide-, and estrogen receptor-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;**295**:519–23.
- Hutchison SJ, Chou TM, Chatterjee K, Sudhir K. Tamoxifen is an acute, estrogen-like, coronary vasodilator of porcine coronary arteries *in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;**38**:657–65.
- Leung HS, Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Ko WH *et al*. Tamoxifen dilates porcine coronary arteries: roles for nitric oxide and ouabain-sensitive mechanisms. *Br J Pharmacol* 2006;**149**:703–11.
- Stamatelopoulos KS, Lekakis JP, Poulakaki NA, Papamichael CM, Venetsanou K, Aznaouridis K *et al*. Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Am Heart J* 2004;**147**:1093–9.
- Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation* 2001;**103**:1497–502.
- Vitseva O, Flockhart DA, Jin Y, Varghese S, Freedman JE. The effects of tamoxifen and its metabolites on platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**312**:1144–50.
- Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM. Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy and N-desmethyl metabolites and isomerization of *trans*-4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* 2002;**30**:869–74.
- Lien EA, Solheim E, Ueland PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res* 1991;**51**:4837–44.
- Coezy E, Borgna JL, Rochefort H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 1982;**42**:317–23.
- Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system *in vitro*: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**310**:1062–75.
- Lim YC, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA *et al*. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**318**:503–12.
- Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV *et al*. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2004;**85**:151–9.
- Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;**55**:471–8.
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P *et al*. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**:1758–64.
- Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW *et al*. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 2005;**23**:9312–8.
- Mandlekar S, Hebbar V, Christov K, Kong AN. Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;**60**:6601–6.
- Ek RO, 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**:227–35.
- Woodman OL, Wongsawatkul O. Ischaemia enhances the role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in endothelium-dependent and nitric oxide-mediated dilatation of the rat hindquarters vasculature. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;**31**:254–60.
- Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**272**:1011–5.
- Dias-Junior CA, Gladwin MT, Tanus-Santos JE. Low-dose

- intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Free Radic Biol Med* 2006;**41**:1764–70.
- 26 Cau SB, Dias-Junior CA, Montenegro MF, de Nucci G, Antunes E, Tanus-Santos JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 2008;**581**:132–7.
- 27 Dias-Junior CA, Montenegro MF, Florencio BC, Tanus-Santos JE. Sildenafil improves the beneficial haemodynamic effects of intravenous nitrite infusion during acute pulmonary embolism. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;**103**:374–9.
- 28 Goldhaber SZ. Tamoxifen: preventing breast cancer and placing the risk of deep vein thrombosis in perspective. *Circulation* 2005;**111**:539–41.
- 29 Grainger DJ, Schofield PM. Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence. *Circulation* 2005;**112**:3018–24.
- 30 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;**87**:840–4.
- 31 El-Beshbishy HA. Hepatoprotective effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract against tamoxifen-induced liver injury in rats. *J Biochem Mol Biol* 2005;**38**:563–70.
- 32 Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J *et al.* Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2007;**67**:1282–90.
- 33 Wakatsuki A, Ogawa Y, Saibara T, Okatani Y, Fukaya T. Size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in breast cancer patients with tamoxifen-induced fatty liver. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:3676–81.
- 34 Wiseman H. Tamoxifen as an antioxidant and cardioprotectant. *Biochem Soc Symp* 1995;**61**:209–19.
- 35 Wiseman H, Laughton MJ, Arnstein HR, Cannon M, Halliwell B. The antioxidant action of tamoxifen and its metabolites. Inhibition of lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1990;**263**:192–4.
- 36 Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;**10**:1115–26.
- 37 Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O *et al.* Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 2003;**35**:790–6.
- 38 Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. *Acta Physiol* 2006;**188**:123–7.
- 39 Metzger IF, Sertorio JT, Tanus-Santos JE. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. *Free Radic Biol Med* 2007;**43**:987–92.
- 40 Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 2008;**394**:72–6.
- 41 Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P *et al.* Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 2006;**40**:295–302.
- 42 Castro MM, Rizzi E, Rascado RR, Nagasaki S, Bendhack LM, Tanus-Santos JE. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2004;**498**:189–94.
- 43 Nagasaki S, Sertorio JT, Metzger IF, Bem AF, Rocha JB, Tanus-Santos JE. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 2006;**41**:1044–9.
- 44 Souza-Costa DC, Figueiredo-Lopes L, Alves-Filho JC, Semprini MC, Gerlach RF, Cunha FQ *et al.* Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* 2007;**35**:239–45.
- 45 Mark CJ, Tatchum-Talom R, Martin DS, Eyster KM. Effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators on vascular reactivity in the perfused mesenteric vascular bed. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**:R1969–75.
- 46 Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr* 2001;**131**:2351–7.
- 47 Pham-Dang ML, Clement R, Mercier I, Calderone A. Comparative effects of tamoxifen and angiotensin II Type-1 receptor antagonist therapy on the hemodynamic profile of the ovariectomized female rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;**81**:915–9.

ANEXOS

10 – Anexos

1. Documento de aprovação do comitê de ética em pesquisa.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

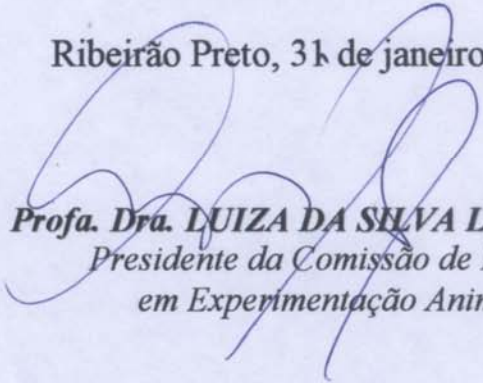


CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 136/2006, sobre o projeto intitulado "*Efeitos do tamoxifen e seus metabólicos ativos na reatividade vascular*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **29 de janeiro de 2007**.

(We certify that the protocol n° 136/2006, about "*Effects of tamoxifen and active metabolites on vascular reactivity*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 01/29/2007 meeting).

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2007.


Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Presidente da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)