

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -  
BIOQUÍMICA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TAMOXIFENO E/OU  
ESTRADIOL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
COMPORTAMENTAIS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**CARINE LAMPERT**

Porto alegre – RS

Fevereiro de 2013

CARINE LAMPERT

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TAMOXIFENO E/OU  
ESTRADIOL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
COMPORTAMENTAIS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deusa Vendite

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia F. Pettenuzzo

Porto Alegre – RS

Fevereiro de 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Lampert, Carine  
EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE TAMOXIFENO  
E/OU ESTRADIOL SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
COMPORTAMENTAIS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS / Carine  
Lampert. -- 2013.  
102 f.

Orientadora: Deusa Aparecida Vendite.  
Coorientadora: Letícia Ferreira Pettenuzzo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Tamoxifeno. 2. Estrógeno. 3. Alimentos  
palatáveis. 4. Ganho de peso. 5. Comportamento. I.  
Vendite, Deusa Aparecida, orient. II. Ferreira  
Pettenuzzo, Letícia, coorient. III. Título.

*Dedico este trabalho à minha família e à minha orientadora, que foi a mentora do trabalho e a quem sei que esta pesquisa é muito especial.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dr. Deusa Vendite, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, dedicação, companheirismo, pelo suporte em todas as etapas do trabalho, desde a injeção dos animais, inclusive nos finais de semana, até a elaboração do trabalho escrito. Pela disposição em ajudar independente do dia da semana e do horário.

À Prof<sup>a</sup> Dr. Letícia Pettenuzzo, minha co-orientadora, pela oportunidade, atenção, dedicação e suporte em todos os momentos que precisei.

À Prof<sup>a</sup> Dr. Carla Dalmaz pela oportunidade, confiança, pela disponibilidade e atenção sempre que precisei.

Aos professores componentes da banca examinadora pela cordialidade e disposição em avaliar o trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica que contribuíram para minha formação e aprendizado.

À todos os colegas do laboratório 37, pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo, apoio e amizade. À amiga e colega de laboratório Danusa Arcego que compartilhou comigo alegrias, problemas, decepções desde as disciplinas e experimentos do mestrado até coisas pessoais. À amiga e colega de laboratório Ana Paula Toniazzo pela amizade, apoio, companheirismo e ajuda sempre que preciso. Ao colega Charles Ferreira pela parceria e momentos alegres. À colega de laboratório Rachel Krolow, pelo exemplo de profissional, pela ajuda, incentivo e apoio nos momentos que mais precisei.

Aos colegas do laboratório 35 pela amizade e ajuda sempre que necessário, em especial à Dr. Simone Nardin Weis pelo apoio, incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha família que sempre me deu o suporte e apoio necessário. Em especial aos meus pais pelo carinho, apoio e dedicação e à minha irmã Claudete e à minha sobrinha Isabel pelo carinho, apoio e paciência.

Aos amigos que fiz na bioquímica no decorrer deste período e àqueles que me acompanham de longa data pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Aos funcionários do PPG-Bioquímica e aos funcionários do biotério, sempre dispostos a ajudar e facilitar nosso trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMO</b> .....  | 1  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | 2  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....   | 3  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 5  |
| 1.1 Estradiol .....  | 6  |
| 1.1.1 <i>Estradiol – mecanismo de ação</i> .....   | 7  |
| 1.1.2 <i>Estrógeno e comportamento alimentar</i> .....   | 9  |
| 1.1.3 <i>Estrógeno, memória, depressão e ansiedade</i> .....   | 11 |
| 1.2 Tamoxifeno – modulador seletivo do receptor de estrógeno .....   | 12 |
| 1.2.1 <i>Tamoxifeno - Mecanismo de ação</i> .....  | 14 |
| 1.2.2 <i>Efeitos do tamoxifeno</i> .....   | 14 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 17 |
| 2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....  | 18 |
| 2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....   | 18 |
| <b>3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS</b> .....  | 19 |
| 3.1 Capítulo I: Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats. 20 |    |
| 3.2 Capítulo II: Efeitos da administração crônica de estradiol e tamoxifeno sobre o comportamento tipo-depressivo, tipo-ansioso e memória de medo contextual. ....     | 58 |
| 3.2.1 <i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....   | 58 |
| 3.2.2 <i>RESULTADOS</i> .....  | 63 |
| <b>4. DISCUSSÃO</b> .....  | 68 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....  | 80 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....  | 82 |

## RESUMO

O Tamoxifeno (TAM) é um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM), utilizado no tratamento do câncer de mama estrógeno-positivo. O TAM tem efeito antagonista de estrógeno na mama, porém, em outros tecidos pode ter efeito agonista ou antagonista dependendo do tecido. A ativação do receptor de estradiol (E) pode alterar o comportamento do tipo-depressivo, do tipo-ansioso, o peso corporal e estimular a ingestão de alimento palatável (doce) em ratas ovariectomizadas (OVX). No entanto, não existem evidências sobre o efeito do tamoxifeno no consumo de alimentos palatáveis e são controversos os efeitos do TAM na ansiedade, depressão e memória. O objetivo do presente estudo é investigar os efeitos do tratamento crônico com estradiol e/ou tamoxifeno sobre parâmetros metabólicos, comportamento alimentar, comportamento do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e memória de medo contextual em ratas ovariectomizadas. Ratas Wistar ovariectomizadas (OVX) foram injetadas (ip.) durante 40 dias com: E, TAM, E+TAM ou veículo (OVX e SHAM - controles). Os testes comportamentais iniciaram 25 dias após o início do tratamento. Foi avaliado o comportamento alimentar para alimentos palatáveis (Froot Loops®) (fora da caixa moradia) e o consumo de chocolate durante 7 dias (na caixa moradia). Foram avaliados, também, o comportamento do tipo-ansioso (campo aberto e labirinto em cruz elevado), comportamento do tipo-depressivo (nado forçado) e memória de medo contextual (medo condicionado contextual e teste de sensibilidade ao choque). As ratas injetadas com E, TAM, e E+TAM mostraram uma redução no peso corporal e consumo de ração padrão e um maior consumo de Froot Loops® em comparação com os grupos controles. Em relação ao consumo de chocolate o grupo E apresentou um consumo maior que os grupos OVX, TAM e E+TAM. Não houve diferenças entre os grupos nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado e no teste do nado forçado apenas o grupo E+TAM apresentou menor comportamento do tipo-depressivo. O tratamento com E e TAM melhorou a memória contextual em comparação com o grupo OVX. Estes tratamentos, também, mostraram um perfil lipídico favorável: baixos níveis de CT, LDL, razão LDL/HDL e baixos níveis de glicose no plasma. O grupo E apresentou níveis mais elevados de TG e HDL, quando comparado com TAM e E+TAM. Este estudo mostrou que o tamoxifeno apresenta efeito agonista de estrógeno em relação à perda de peso, diminuição de gordura retroperitoneal, na maior parte do perfil lipídico plasmático analisado e em alguns parâmetros comportamentais: consumo de ração padrão, consumo de alimento doce, comportamento do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e memória contextual. Mas, mostrou um efeito antagonista de estrógeno no tecido uterino e no comportamento alimentar para chocolate.



## ABSTRACT

Tamoxifen (TAM) is a selective estrogen receptor modulator (SERM), used to treat estrogen-positive breast cancer. TAM has antagonistic effect of estrogen in breast, but in other tissues it may have agonist or antagonist effect depending on the tissue. It has been shown that activation of estradiol receptor (ER) can change the depressive-like behavior, anxious-like behavior, body weight and increase the palatable food (sweet) intake in ovariectomized (OVX) animals. However, there is no evidence about the effect of tamoxifen on consumption of palatable foods and there are controversial studies concerning the effects of TAM in anxiety, depression and memory. The aim of this study is to investigate the effects of chronic treatment with estradiol and/or tamoxifen on metabolic parameters, feeding behavior, anxiety-like and depressive-like behavior and contextual fear memory in ovariectomized rats. Ovariectomized (OVX) rats were injected (ip.) for 40 days with: E, TAM, E+TAM or vehicle (OVX and SHAM - controls). The behavioral testing started 25 days after treatment. We assessed feeding behavior for palatable food (Froot Loops®) (out of the home cage) and consumption of chocolate for 7 days (in the home cage). We also evaluated the anxious-like behavior (open field and elevated plus maze), depressive-like behavior (forced swim test) and contextual fear memory (contextual fear conditioning and shock sensitivity testing). The rats injected with E, TAM and E+TAM showed a reduction in body weight and standard chow intake and an increase on Froot Loops® consumption compared to control groups. Regarding the chocolate consumption, E group showed a greater chocolate intake than the OVX, TAM and E+TAM groups. There were no differences between groups in open field and elevated plus maze tests and about the forced swim test, only the E+TAM group had lower depressive-like behavior. Also, treatment with E and TAM improved contextual memory in comparison to the OVX group and showed a favorable lipid profile: lower levels of total cholesterol, LDL, LDL/HDL ratio and lower levels of plasma glucose. E group had higher levels of TG and HDL compared to TAM and E+TAM. This study showed that tamoxifen has estrogen agonist effect concerning to weight, retroperitoneal fat accumulation, in most plasmatic lipids profile and in some behavioral parameters: standard chow intake, sweet food consumption, anxious-like and depressive-like behavior and contextual memory. On the other hand, the present study showed that TAM has an estrogenic antagonistic effect in uterine tissue and feeding behavior for chocolate.

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-OH-TAM: 4-hidroxitamoxifeno

AF-1: Função de ativação - 1

AF-2: Função de ativação – 2

CEUA: comitê de ética no uso de animais

CREB: proteína de ligação do elemento de resposta de AMPc

CT: colesterol total

E: 17 $\beta$ -estradiol

E+TAM: 17 $\beta$ -estradiol juntamente com tamoxifeno

ERE: Elemento de resposta à esteróides

GSK-3b: glicogênio sintase quinase-3b

HDL: Lipoproteína de alta densidade

ICLAS: International Council for Laboratory Animal Science

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPL: Lipoproteína lipase

MAPK: proteína quinase ativada por mitogeno

NIH: National Institutes of Health

NPY: Neuropeptídeo Y

OVX: ovariectomizadas

PI3-K: fosfoinositol-3 quinase

POMC: Pro-ópiomelanocortina

RE: receptor de estrógeno

RE $\alpha$ : receptor de estrógeno alfa

RE $\beta$ : receptor de estrógeno beta

SBNeC: Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento

SERM: modulador seletivo de receptor de estrógeno

SNC: Sistema Nervoso Central

SOCS3: supressor da sinalização de citosinas 3

TAM: tamoxifeno

TG: Triglicerídeos

UCP: Proteína desacopladora

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

## 1. INTRODUÇÃO

---

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comumente diagnosticada entre as mulheres (Youlden et al. 2012), respondendo por 22% dos casos novos a cada ano (INCA, 2013). Aproximadamente dois terços dos cânceres de mama são estrógeno e/ou progesterona receptor-positivo (Paplomata and O'Regan 2013). Tamoxifeno (TAM) - um modulador seletivo de receptor de estrógeno (SERM) tem sido o tratamento padrão para todos os estágios do câncer de mama hormônio receptor-positivo, desde sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos em 1986 (Jaiyesimi et al. 1995). O tamoxifeno atua como antagonista de estrógeno no tecido mamário, porém pode agir como agonista dependendo do tecido, como no caso do tecido ósseo, cardíaco e endometrial (Riggins et al. 2007; Sato et al. 1996; Smith and O'Malley 2004). Exceto os estudos específicos relacionados com sua atividade antiestrogênica/antineoplásica, pouco se sabe sobre os efeitos desta droga no sistema nervoso.

### *1.1 Estradiol*

Estrógenos são uma classe de hormônios esteróides secretados ciclicamente em mulheres desde a puberdade até a menopausa e afetam profundamente a fisiologia e o comportamento das mulheres. O principal representante dos estrógenos é o 17 $\beta$ -estradiol (E) (Walf et al. 2011). Mulheres na menopausa, quando os níveis de estrógenos diminuem, apresentam alterações físicas (calorões, sudorese noturna, secura dos olhos e na mucosa vaginal, etc.) e psicológicas (ansiedade, depressão, esquecimento, etc.)

(Jensen et al. 2010) notáveis. A terapia de reposição hormonal tem sido indicada para mulheres na menopausa, pois tem mostrado resultados positivos no combate às alterações físicas e psicológicas provocadas pela menopausa (Walf et al. 2011). Contudo, é bem documentado que este tipo de terapia pode levar a um aumento na incidência de câncer mamário, uterino e/ou problemas cardiovasculares (Jensen et al. 2010; Walf et al. 2011).

Além do importante papel do estrógeno na fisiologia reprodutiva, este hormônio tem efeitos marcantes em outras funções fisiológicas tais como, desenvolvimento, crescimento, homeostase energética, sistema imune, manutenção óssea, etc. (Walf et al. 2011). Evidências também mostram que o E contribui para o bom funcionamento do sistema nervoso central, aumentando o desempenho cognitivo, melhorando respostas afetivas, gerando efeitos neuroprotetores (Gillies and McArthur 2010; Walf et al. 2011), modulando a plasticidade sináptica/excitabilidade neuronal e a sobrevivência neuronal/crescimento axonal (Markou et al. 2005). Está bem estabelecido também o papel do  $17\beta$ -estradiol na redução da ingestão de alimento, perda de peso e também, melhora no perfil lipídico (Asarian and Geary 2006; Eckel 2011).

### *1.1.1 Estradiol – mecanismo de ação*

Os receptores de estrógeno (RE) são parte de uma grande família de receptores nucleares que agem como fatores de transcrição quando ativados pelo estrógeno. Os REs existem como monômeros quando inativos e a ativação destes receptores pelo estrógeno leva a formação de homo –

heterodímeros que interagem com uma região específica do DNA, o elemento responsivo a estrógeno (do inglês: estrogen responsive element - ERE) (Beato et al. 1995; Zwart et al. 2010). REs possuem dois domínios de ativação, os quais facilitam a interação do RE com o aparato de transcrição – função de ativação-1 (AF-1) e função de ativação-2 (AF-2). Ambos, RE $\alpha$  e RE $\beta$  apresentam um domínio AF-2, mas ao contrário do RE $\alpha$ , RE $\beta$  parece ter um fraco domínio AF-1 e depende mais de AF-2 para sua função de ativação transcricional (Faulds et al. 2012; McDonnell 1999). REs ativados podem também modular a transcrição de genes que não possuem ERE através da sua interação com outros fatores de transcrição ligados ao DNA; tais como, NFKB, CREB (proteína de ligação do elemento de resposta à AMPc), entre outros (Morissette et al. 2008).

Em camundongos foi demonstrado que RE $\beta$  modula a atividade transcricional dos RE $\alpha$ , sugerindo uma interdependência entre estes subtipos de receptores em alguns tecidos (Lindberg et al. 2003). Geralmente, os RE $\alpha$  são mais expressos nos tecidos sensíveis ao estrógeno, por outro lado, a distribuição do RE $\beta$  é mais restrita. Além da diferente distribuição nos tecidos, dentro de um mesmo tecido pode ocorrer uma diferente expressão destes receptores (Jensen et al. 2010). Cabe lembrar que no tecido mamário existe mais RE $\alpha$  do que RE $\beta$  e no cérebro existe uma grande co-expressão de ambos os subtipos destes receptores (Shughrue et al. 1997; Zhang et al. 2002).

Além disso, os estrógenos podem induzir eventos celulares sem uma ação direta sobre o DNA. As ações não genômicas do 17 $\beta$ -estradiol são muito rápidas (minutos/segundos) e se dá através da sua interação com receptores associados à membrana plasmática, desencadeando a ativação de vias por

segundo mensageiros (Faulds et al. 2012). Entre estas vias destacam-se a via da proteína quinase ativada por mitogeno (MAPK) e fosfoinositol-3 quinase (PI3-K), as quais convergem para fosforilação e inativação da enzima glicogênio sintase quinase-3b (GSK-3b), relacionada com apoptose e morte neuronal. Sua inativação promove sobrevivência neuronal (Morissette et al. 2008).

Vários sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores estão envolvidos nas ações do estrógeno no sistema nervoso, tais como sistema serotoninérgico, dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico, orexinérgico, opioidérgico, conseqüentemente modulando funções cognitivas, o humor e o sistema de recompensa (Crema et al. 2009; McEwen et al. 2012; McEwen and Alves 1999; Morissette et al. 2008). O córtex cerebral e o hipocampo apresentam maior concentração de RE $\beta$ , sugerindo a participação deste subtipo de receptor em funções cognitivas e afetivas (Handa et al. 2012).

### *1.1.2 Estrógeno e comportamento alimentar*

Está bem estabelecido o papel do estradiol na redução da ingestão de alimento e de peso corporal (Asarian and Geary 2006; Eckel 2011). A incidência de obesidade aumenta enormemente em mulheres na menopausa. Estes efeitos possivelmente se devem a um aumento na expressão de genes anorexígenos e à diminuição da expressão de genes orexígenos (Santollo et al. 2012). As ações do estrógeno sobre sistemas neurais que regulam o comportamento alimentar podem contribuir em parte para as diferenças entre homens e mulheres na ingestão de alimento e nas doenças relacionadas com



comportamento alimentar, as quais ocorrem com maior frequência nas mulheres jovens (Sodersten et al. 2003). Em roedores, a ovariectomia de ratas adultas promove um aumento na ingestão de alimento e estes efeitos são revertidos pela administração de estrógeno (Asarian and Geary 2006; Wade 1975). Além disso, tem sido observada uma diminuição na ingestão de alimentos durante o proestro (fase com maior concentração de estrógeno), sugerindo que as flutuações nas concentrações de estrógeno durante o ciclo estral são acompanhadas por alterações no comportamento alimentar (Geary and Asarian 1999).

Apesar de bem estabelecidos os efeitos do estradiol sobre a ingestão de alimento, o papel do estradiol sobre o consumo específico de alimento palatável ainda é controverso e complexo (Boswell et al. 2006; Butera et al. 2010). A preferência por alimentos palatáveis e a ativação do sistema de recompensa é um mecanismo básico e evolucionariamente conservado de sobrevivência em animais e humanos (Berthoud et al. 2011). Alimentos palatáveis ativam o sistema de recompensa, afetando assim o comportamento ingestivo (Alsio et al. 2012; Lajtha and Sershen 2010). Alimentos ricos em gordura e açúcar são atrativos porque podem ser rapidamente convertidos em energia (Berthoud et al. 2011; Erlanson-Albertsson 2005).

Tem sido demonstrado que a preferência por alimentos palatáveis, incluindo doces, difere entre homens e mulheres. Mulheres apresentam maior propensão ao consumo de alimentos doces e esta preferência aumenta quando os níveis de estrógenos estão elevados: ao longo do ciclo menstrual e durante a gravidez (Boswell et al. 2006; Clarke and Ossenkopp 1998; Curtis et al. 2005; Frye et al. 1994; Gamaro et al. 2003; Green et al. 2009). Ratas durante o

proestro produzem mais respostas de ingestão para uma solução de sacarose durante um teste de reatividade ao sabor quando comparadas com machos e com fêmeas no estro (Clarke and Ossenkopp 1998). E a administração de estradiol em ratas OVX aumenta a ingestão de alimentos palatáveis (Gamaro et al. 2003; Hintiryan et al. 2009). No entanto, outros estudos relatam que o estrógeno não afeta as respostas comportamentais para alimentos palatáveis (Butera et al. 2010; Hrupka et al. 1997).

### *1.1.3 Estrógeno, memória, depressão e ansiedade*

Os receptores de estrógenos RE $\alpha$  e RE $\beta$  são expressos no sistema nervoso de mamíferos e na medula espinhal. Por conta disto o estrógeno pode estar relacionado com determinadas doenças neurológicas, neuropsiquiátricas e também pode modular comportamentos de ansiedade, depressão e função cognitiva (Handa et al. 2012).

Em humanos as diferenças sexuais em relação ao comportamento depressivo iniciam na puberdade (Hyde et al. 2008). A terapia de reposição hormonal melhora o humor de mulheres na fase de transição para a menopausa e também na fase pós-menopausa (Cohen et al. 2003). Além disso, roedores na fase do proestro (maiores níveis de estradiol/progesterona/andrógenos) apresentam um menor comportamento depressivo (menor imobilidade no nado forçado) comparado com o diestro (menores níveis de estrógeno) (Frye and Walf 2002). Também, o comportamento depressivo induzido pela remoção dos ovários é revertido pela administração de estrógeno (Estrada-Camarena et al. 2003; Okada et al. 1997).

Há evidências de que o estrógeno aumenta o tempo que ratos permanecem nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado e aumenta o tempo de permanência no centro do aparato no teste do campo aberto, demonstrando efeito ansiolítico (Calmarza-Font et al. 2012; Hiroi and Neumaier 2006).

O hipocampo possui um importante papel na regulação do aprendizado, memória e respostas emocionais (estresse, medo), bem como sobre as memórias espacial, declarativa e contextual em humanos e animais. Muitos estudos avaliando fêmeas de ratos, camundongos e macacos *rhesus* reportam um efeito positivo do estrógeno em tarefas dependentes do hipocampo (Foster et al. 2008; Luine 2008; Spencer et al. 2008). Estrógenos estimulam a neurogênese hipocampal e aumentam os níveis de proteínas sinápticas no hipocampo de maneira tempo e dose-dependente e facilitam a memória espacial de trabalho e o medo condicionado contextual (Barha and Galea 2010; Jasnow et al. 2006).

### *1.2 Tamoxifeno – modulador seletivo do receptor de estrógeno*

O tamoxifeno é um medicamento derivado do trifeniletileno, mundialmente usado para o tratamento de todos os estágios do câncer de mama estrógeno-positivo (Fisher et al. 1989) e na prevenção do câncer de mama em mulheres de alto risco, tanto na pré quanto pós-menopausa (Cuzick et al. 2003; Powles et al. 2007). Em 1998, um estudo do National Institutes of Health (NIH) - “Breast Cancer Prevention Trial”, mostrou que Novaldex (nome comercial do TAM) reduzia em mais de 45% a incidência de câncer de mama invasivo em mulheres de alto risco para a doença, mas estava associado com

um aumento de câncer endometrial (Fisher et al. 1998). Em 1999, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica sugeriu que o medicamento deveria ser prescrito para a prevenção e/ou tratamento do câncer de mama (O'Neill et al. 2004), pois é considerado o tratamento mais efetivo no combate ao câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, mesmo gerando vários efeitos colaterais (calorões, sudorese intensa, diminuição da libido, diminuição da memória verbal, esteatose hepática, câncer endometrial, etc.).

O Tamoxifeno começou a ser utilizado em humanos sem muitos experimentos prévios em animais (exceto os estudos específicos relacionados com sua atividade antiestrogênica/antineoplásica). Alguns autores utilizam o TAM como antagonista de estrógeno no sistema nervoso (Walf and Frye 2005), no entanto, outros tem mostrado que esta droga pode ter efeito agonista (Calmarza-Font et al. 2012; Sharma et al. 2007). Além disso, o tratamento em humanos é feito de forma crônica (5 anos) (Jordan 2006), portanto, se torna difícil comparar os possíveis efeitos desta droga no SNC ao longo do tratamento com resultados de experimentos realizados com administração aguda de TAM.

Tamoxifeno é metabolizado no fígado pelo sistema do citocromo P450 em vários metabólitos. O 4-hidroxitamoxifeno (4-OH-TAM) é um metabólito ativo, o qual possui potencial anti-estrogênico maior que o próprio tamoxifeno (Goetz et al. 2008; Johnson et al. 2004). Além do 4-OH-TAM, foi reportado mais recentemente que o metabólito 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno), também pode ser ativo e está presente em maiores concentrações que o 4-OH-TAM no plasma de mulheres sob tratamento e apresenta uma atividade equivalente a do 4-OH-TAM (Lim et al. 2005). Além disso, tem sido mostrado

que a concentração de tamoxifeno no soro não reflete a concentração nos tecidos (Coezy et al. 1982), uma vez que existe uma maior concentração de TAM nos tecidos, provavelmente devido a sua hidrofobicidade.

### *1.2.1 Tamoxifeno - Mecanismo de ação*

O receptor do estrógeno tem dois domínios de ativação transcricional (AF1 e AF2), os quais recrutam co-ativadores. A interação do estrógeno com o seu receptor ativa tanto AF1 quanto AF2, resultando numa atividade transcricional ótima. TAM bloqueia AF2 competitivamente, mas não inibe AF1. Portanto, em tecidos nos quais a atividade do AF2 é dominante (ex: tecido mamário) o TAM se comporta como antagonista de estrógeno. Enquanto que, em tecidos que são mais dependentes da atividade do AF1, TAM se comporta como agonista parcial (McDonnell 1999; Smith and O'Malley 2004; Zwart et al. 2010). Além disso, TAM possui outras ações (não genômicas) tais como: antioxidante ou pró-oxidante (depende do tipo de tecido/dose), inibição da calmodulina, inibição da proteína quinase C. Estas ações não genômicas do TAM podem contribuir para os efeitos do tamoxifeno, independente de sua interação com o RE (Clarke et al. 2001).

### *1.2.2 Efeitos do tamoxifeno*

Vários estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com TAM em ratas OVX diminui o peso corpóreo (Wallen et al. 2001) e o consumo de ração (Gray et al. 1993; Wade and Heller 1993), sugerindo um efeito agonista de estrógeno. O tratamento agudo (5 dias) com TAM em ratos machos também

resultou em uma diminuição na ingestão de ração e diminuição do peso corpóreo. Além disso, os animais tratados com TAM apresentaram um aumento no RNAm de neuropeptídeo Y (NPY) e diminuição da ácido graxo sintase no hipotálamo (Lopez et al. 2006). Em humanos, o tratamento com TAM diminuiu o peso de mulheres obesas, porém não teve efeito em mulheres com peso normal ou com sobrepeso (Wasserman et al. 2004). Embora vários estudos mostrem que animais tratados com tamoxifeno apresentam diminuição no peso corporal e na ingestão de ração padrão, não existe informação na literatura sobre os efeitos do tratamento com tamoxifeno no consumo de alimentos palatáveis. Nesse sentido, é importante considerar que humanos têm acesso a uma variedade de alimentos ricos em gordura e carboidratos simples e que muitas mulheres acabam ganhando peso durante o tratamento com tamoxifeno, principalmente aquelas com peso adequado antes do diagnóstico (Lopez et al. 2006; Nissen et al. 2011), tornando o efeito do tamoxifeno sobre o consumo de alimento palatável uma questão importante a ser analisada.

Os efeitos do tamoxifeno sobre a depressão e ansiedade são controversos. Sintomas de depressão e/ou maior sensibilidade para eventos do cotidiano têm sido relatados por algumas pacientes, mas pouco se sabe sobre a atividade desta droga no sistema nervoso. Em humanos é difícil afirmar que algumas alterações comportamentais observadas sejam devidas somente ao tratamento com TAM, pois estes pacientes muitas vezes ainda estão sofrendo com o impacto da doença/quimioterapia/radioterapia/mutilação da mama. Em roedores, a administração de TAM por 5 (Vogt et al. 2008) ou 14 dias (Sapronov and Kasakova 2008) induziu comportamento do tipo depressivo (aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado) nos animais. Por

outro lado, a administração de tamoxifeno em animais deprimidos diminuiu o tempo de imobilidade no nado forçado e aumentou o tempo gasto nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, indicando um efeito antidepressivo e ansiolítico do TAM (Calmarza-Font et al. 2012). Outro estudo verificou que a administração aguda de TAM reverteu os efeitos ansiolíticos da administração de estradiol ou de agonistas RE $\beta$  em ratas OVX, sugerindo que TAM estaria agindo como antagonista de receptores de estrógeno (Walf and Frye 2005). Pouco tem sido estudado em relação aos efeitos do tamoxifeno sobre a memória. O'Neill e colaboradores (O'Neill et al. 2004) verificaram que o TAM e seu metabolito ativo 4-OH-TAM são capazes de exercer um papel neuroprotetor em cultura de células neuronais, porém não são capazes de melhorar a função de memória como o estradiol. Enquanto que outros estudos observaram que animais tratados com tamoxifeno mostraram um aumento na densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo (Gonzalez-Burgos et al. 2012) e melhoraram o desempenho cognitivo relacionado ao córtex pré-frontal (Velazquez-Zamora et al. 2012).

## **2. OBJETIVOS**

---



## *2.1 Objetivo Geral*

Avaliar os efeitos da administração crônica de tamoxifeno e/ou estradiol sobre parâmetros metabólicos, comportamento alimentar, comportamento do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e memória de medo contextual em ratas ovariectomizadas.

## *2.2 Objetivos específicos*

- Avaliar o comportamento alimentar para ração padrão e alimentos palatáveis (chocolate e Froot Loops®).
- Verificar parâmetros metabólicos como alteração de peso dos animais ao longo do tratamento, gordura retroperitoneal, peso uterino e perfil lipídico no final do tratamento.
- Avaliar o comportamento do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e memória de medo contextual.

### **3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS**

---

**3.1 Capítulo I: Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats.**

Artigo científico submetido à revista *Physiology and Behavior*.

**Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats**

Carine Lampert<sup>1</sup>, Danusa Arcego<sup>1</sup>, Daniela P. Laureano<sup>1</sup>, Luísa A. Diehl<sup>1</sup>, Isadora Ferreira da Costa Lima<sup>1</sup>, Rachel Krolow<sup>1</sup>, Letícia Pettenuzzo<sup>1</sup>, Carla Dalmaz<sup>1</sup>, Deusa Vendite<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde — ICBS, UFRGS (Saúde), RS, Brazil.

Mailing address: Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab 37. CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 55 51-3308-5570

Fax: 55 51-3308-5535

Email address: [vendite.ez@terra.com.br](mailto:vendite.ez@terra.com.br) (corresponding author)

## ABSTRACT

Tamoxifen (TAM) is a selective estrogen receptor modulator (SERM) used in the treatment of breast cancer; however many women complain of weight gain during TAM treatment. The anorectic effects of estradiol (E) and TAM are well known, although the effects of E on the consumption of palatable food are controversial and there is no information regarding the effects of TAM on palatable food consumption. The aim of this study was to investigate the effects of chronic treatment with Estradiol and/or Tamoxifen on feeding behavior in ovariectomized rats exposed to standard chow and palatable foods (Froot Loops® or chocolate). Additionally, parameters such as body weight, uterine weight, lipid profile and plasma glucose were also measured. Wistar rats were ovariectomized (OVX) and subsequently injected (ip.) for 40 days with: E, TAM, E+TAM or vehicle (OVX and SHAM – controls). Behavioral tests were initiated 25 days after the start of treatment. Froot Loops® consumption was evaluated in a novel environment during 3 minutes. Standard chow intake was evaluated for two days and chocolate intake during 7 days in the home cage in a free choice model (chocolate or standard chow). Rats injected with E, TAM and E+TAM groups showed a reduction in body weight and standard chow intake, compared with control groups. With regard to palatable food intake, the E, TAM and E+TAM groups demonstrated increased consumption of Froot Loops®, compared with the SHAM and OVX groups. In contrast, all groups increased their consumption of chocolate, compared with standard chow; however the E group consumed more chocolate than the OVX, TAM and E+TAM groups. Despite these differences in chocolate consumption, all groups showed the

same caloric intake during the chocolate exposure period, however TAM and E+TAM groups showed decreased body weight. Treatment with estradiol and tamoxifen showed a favorable lipid profile with low levels of TC, LDL, LDL/HDL ratio and lower levels of plasma glucose. E group demonstrated high levels of TG and HDL, when compared with the TAM and E+TAM groups. Taken together, results suggest that TAM acted in an estrogen-like manner on the majority of parameters analyzed. However, tamoxifen acts in different manner depending on the type of palatable food and the exposure. In addition, the TAM group demonstrated weight loss, compared with other groups independently of the type of food presented (palatable food or standard chow), showing a low caloric efficiency. Therefore, the possible weight gain seen in women that are treated with TAM may be due to a change in lifestyle.

**Key Words:** Estrogen; tamoxifen; palatable foods; chocolate; lipid profile; weight gain

## 1. INTRODUCTION

Tamoxifen (TAM) is a triphenethylene derivative drug that is widely used for the treatment of all stages of breast cancer [1], reducing the incidence of breast cancer in both pre and postmenopausal women at elevated risk [2,3]. TAM is a selective estrogen receptor modulator (SERM), a class of drugs that act as estrogen receptor agonists or antagonists, depending on the target tissue [4]. TAM behaves like an estrogen antagonist in mammary tissue while it

mimics the effects of estrogen in other tissues, for example the uterus, cardiac and bone tissue [5,6,7]. However, it is not yet understood whether TAM has estrogenic or antiestrogenic activities in the brain.

Estrogens exert their physiological effects through two estrogen receptor (ER) subtypes, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear receptor family of ligand-activated transcription factors. ER has two 'activation' domains within the receptor, which facilitate the interaction of the ER with the transcription apparatus - activation function-1 (AF-1) and activation function-2 (AF-2). Both ER $\alpha$  and ER $\beta$  contain an AF-2 domain, but unlike ER $\alpha$ , ER $\beta$  seems to have a weaker AF-1 domain and depends more on the AF-2 for its transcriptional activation function [8,9]. Furthermore, estrogen can act by non-genomic mechanisms via membrane ERs [10]. Evidence suggests that tamoxifen inhibits ER-AF-2 activity, and consequently acts as an antagonist in ER $\beta$  and has partial agonist activity in ER $\alpha$  [11].

In addition to the estrogen effects on reproductive physiology, this ovarian hormone can modulate numerous brain neurotransmitters and neuromodulators, including the serotonergic, dopaminergic, neuropeptide Y and opioidergic systems, and consequently modulate cognitive functions, mood and the reward system [12,13,14]. It is well established that estradiol reduces food intake, body weight and improves lipid profile, possibly via the activation of ER $\alpha$  [15,16]. These effects are probably due to an increase in the expression of anorexigenic genes and a decrease in the expression of orexigenic genes [17]. It is well known that tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake in rats [18,19].

Apart from these well-established effects of estradiol on food intake, the role of estradiol on palatable food intake is controversial and more complex [20,21]. Palatable foods activate the reward system, thereby affecting ingestive behavior [22,23]. The predilection for palatable foods and reward system activation is a basic and evolutionarily-conserved survival mechanism in animals and humans [24]. Foods rich in fat and sugar are attractive because such foods can be rapidly converted into energy [24,25]. It has been demonstrated that the preference for palatable foods, including sweets, differs between males and females, and sweet preferences change across the menstrual cycle and during pregnancy [20,26,27,28,29,30]. However, other studies report that estrogen does not affect behavioral responses to palatable foods [21,31].

Although it is well established that tamoxifen-treated animals demonstrate reduced body weight and standard chow intake, there is no information in the literature regarding tamoxifen treatment and the consumption of palatable food. On the other hand, humans have access to a variety of fat and sweet foods and it is known that many women experience weight gain during tamoxifen treatment for breast cancer. This is especially true for patients who were not overweight before diagnosis [19,32].

Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of chronic treatment with Estradiol and/or Tamoxifen on feeding behavior in ovariectomized rats exposed to standard chow and palatable foods (Froot Loops® or chocolate). Additionally, parameters such as body weight, uterine weight and lipid profile were also measured.



## **2. METHODS**

### *2.1 Animals*

We used 120 adult female (7–13 per group), Wistar rats (75 days of age at the beginning of the treatment), weighing between 180–220g. Rats were housed in groups, with five rats per cage. Cages were made of Plexiglas material (65x25x15 cm) with the floor covered with sawdust. Animals were maintained on a standard dark–light cycle (lights on between 7:00h and 19:00 h), at a room temperature of 21±1 °C. The rats had free access to food (standard rat chow) and water. All experimental procedures occurred during the light phase (10:00–15:00h). All animal treatments were in accordance with the institutional guidelines and according to the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), and all efforts were made to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals used.

### *2.2 Surgery*

All rats were ovariectomized or just underwent the surgery without removal of ovaries (SHAM group). Ovariectomies were performed under aseptic conditions. Rats were anesthetized with 60 mg/kg ketamine HCl (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brazil) and 16 mg/kg xylazine (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brazil) i.p., and bilateral ovariectomy was performed with a single abdominal incision. The abdominal skin was then cut, the peritoneum was opened, both ovarian arteries were linked, and both ovaries

were removed. The muscle and the skin were sutured [33]. Animals received one drop (p.o.) of acetaminophen (200mg/ml, Paracetamol EMS, Hortolândia, SP, Brazil) after surgery as analgesic.

### *2.3 Treatments*

After a recovery period of 10-15 days, the animals received Froot Loops® or chocolate in their home cage, 24h before the beginning the treatments in order to avoid taste aversion [34,35]. The animals were divided into five groups: sham group (submitted to the surgery without removal of ovaries and received vehicle), OVX group (received vehicle), 17 $\beta$ -estradiol group (OVX that received 0.1mg/kg), Tamoxifen group (OVX that received 2mg/kg) and E+TAM (OVX that received 0.1mg/kg of 17 $\beta$ -estradiol + 2mg/kg of tamoxifen). Tamoxifen (PharmaPlus - Porto Alegre, RS, Brazil) and estradiol (Sigma-St. Louis, MO, USA) were dissolved in vehicle: ethanol (10%), DMSO (5%) and 0.9% NaCl (85%). It is important to note that the 2 mg/kg dose of tamoxifen used in the present study is calculated to be the equivalent dose that is prescribed to patients (20 mg), based on surface area (mg/m<sup>2</sup>) [34]. The 0.1 mg/kg dose of estradiol was chosen based on previous studies [36], and mimics the proestrus phase of the estrous cycle [37]. Rats were injected (1 ml/kg ip.) daily between 1:00pm and 3:00pm until euthanasia. Body weight was monitored once a week.

### *2.4 Sweet food ingestion*

The behavioral test was initiated 25 days after the first injection. Prior to all tests, rats were acclimatized to the experimental room for at least 30 min. This feeding behavior was conducted during the light phase [28, 38], in order to measure the consumption of sweet food regardless of physiological mechanisms of hunger [25].

Rats were placed in a rectangular box (40 cm×15 cm×20 cm) with floor and side walls made of wood and a glass ceiling. Ten Froot Loops® (Kellogg's® — pellets of wheat, cornstarch and sucrose) were placed in one extremity of the box. The animals were habituated to this environment for 5 days, during 3 min each day, under food restriction (receiving 80% of habitual ingestion). After the last habituation session, the animals were fed ad libitum and were exposed to a 3-min test session, 24h later. Time spent to reach the food, time spent until beginning to eat and the number of ingested Froot Loops® were evaluated in each trial and in the test session. A protocol was established so that when the animals ate part of the Froot Loops® (e.g., 1/3 or 1/4), this fraction was considered [38]. This experiment could mimic the problem of women that gain weight during TAM treatment and diet in order to lose weight using food restriction.

### *2.5 Exposure to chocolate and standard chow*

Twenty five days after the first injection, the animals were separated with two animals from the same group per cage and the consumption of standard chow was measured during two days. To determine the caloric efficiency, (the amount of weight gained as a result of caloric intake), the daily weight gain (in

milligrams) was divided by the daily caloric intake (in Kcal) [39]. On the third day, the animals received standard chow and chocolate *ad libidum*, allowing them to choose between the two types of food during the next 7 days. The food was previously weighed and the remaining quantity was measured each day to evaluate consumption. See Table 1 for nutritional composition of these foods. For this experiment we used a different set of animals.

### *2.6 Blood collection and structure dissection*

One day after the last behavioral procedure, animals were killed by decapitation between 09:00h and 15:00h, after an overnight fasting. The trunk blood was collected into tubes with EDTA, centrifuged at 4°C/1000g, and plasma separated and stored at -80°C until analysis of plasma lipids and plasma glucose. Uterus and retroperitoneal fat were carefully dissected and weighed using a scale with a precision of 0.0001g.

### *2.7 Plasma lipids and glucose (Blood Biochemistry)*

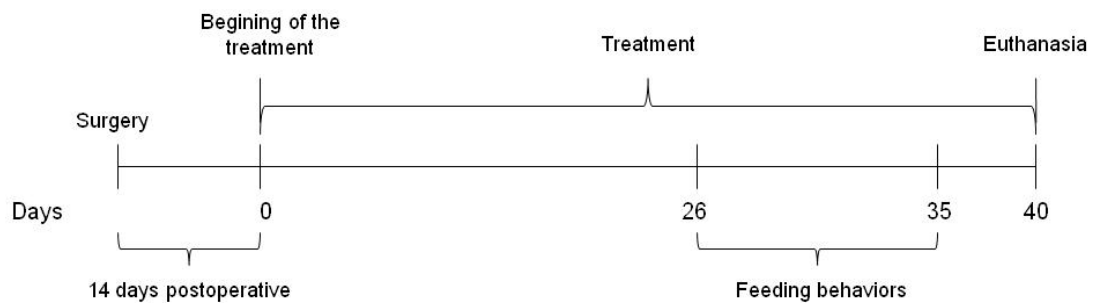
Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), and triglyceride analyses were performed on EDTA plasma, collected from animals fasted for 14 hours before blood collection. TC and triglycerides were measured by enzymatic method kits (Wiener Lab, Argentina). HDL concentrations were measured by a system for selective precipitation of Low and Very Low density Lipoproteins (LDL and VLDL) and HDL cholesterol measurement in the supernatant, using an end point reaction, as described in the HDL Kit (Labtest,

Brazil). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL) was calculated using the Friedewald formula [40]. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina). All analyses were performed on a Spectra Max M5 autoanalyzer. For this experiment we used a different set of animals.

## 2.8 Statistical analyses

Data were analyzed using one-way or repeated-measures analysis of variance (ANOVA) and were expressed as means  $\pm$  SEM. When indicated, a post-hoc Duncan multiple range test was performed. Significance levels for all measures were set at  $p < 0.05$ .

The timeline of the experimental procedures is shown below:



## 3. RESULTS

### 3.1 Body weight, retroperitoneal fat and uterine weight

SHAM and OVX groups showed an increase in body weight ( $F(4,34)=46.56, p<0.001$ ) and retroperitoneal fat ( $F(4,48)=4.91, p=0.002$ ), and these effects were prevented by chronic administration of E, TAM or E+TAM ( $F(4,34)=46.56, p<0.001$ ) (Fig. 1 and Table 2).

Ovariectomized rats that received vehicle showed a significantly decreased uterine weight, when compared with the sham group. Those animals treated with estradiol demonstrated a significantly increased uterine weight, whereas TAM and E+TAM were unable to reverse the uterine weight loss due to ovariectomy ( $F(4,35)=9.11, p<0.001$ ) (Table 2).

### 3.2 Standard chow intake

We observed that the consumption of standard chow in the home cage was lower in groups treated with E, TAM or E+TAM ( $F(4,17)=4.5, p=0.01$ ). The caloric efficiency of these groups was also lower ( $F(4,13)=16.8, p<0.0001$ ), compared with the SHAM and OVX groups (Fig. 2A and 2B).

### 3.3 Sweet food ingestion

A one-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, showed that the E, TAM and E+TAM groups took less time to reach the *Froot Loops*® ( $F(4,44)=5.49, p<0.001$ ) (Fig. 3A) and start to eat ( $F(4,41)=2.73, p=0.001$ ) (Fig. 3B). E, TAM and E+TAM increased their intake of *Froot loops*® ( $F(4,41)=5.58, p=0.01$ ), compared to the SHAM and OVX groups (Fig. 3C).

### 3.4 Exposure to chocolate and standard chow

When chocolate and standard chow were offered in the home cage, one-way ANOVA showed that the consumption of chocolate was higher in the E group, compared with the OVX, TAM and E+TAM groups ( $F(4,13)=4.15$ ,  $p=0.02$ ). No differences were seen among groups regarding the consumption of standard chow during 7 days ( $F(4,13)=1.8$ ,  $p=0.19$ ) (Fig 4A). During exposure to standard chow and chocolate, all groups showed an increase in total calories consumed per day and there were no significant differences among the groups ( $F(4,14)=278$ ,  $p<0.001$ ), unlike those observed when the animals were exposed only to standard chow (Fig. 4B). Although the same amounts of calories were consumed during the exposure to standard chow and chocolate, the OVX group showed the greatest weight gain and caloric efficiency, followed by the E, SHAM and TAM groups, while the E+TAM group had a weight loss ( $F(4,33)=18.6$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 4C) and lower caloric efficiency ( $F(4,10)=24.67$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 4D).

### 3.5 Blood Biochemistry

Ovariectomy caused an increase in total cholesterol ( $F(4,27)=5.81$ ,  $p=0.001$ ) and LDL cholesterol ( $F(4,27)=5.72$ ,  $p=0.002$ ) levels and this was prevented by the administration of estradiol and tamoxifen. The OVX, TAM and E+TAM groups demonstrated lower levels of HDL cholesterol ( $F(4,27)=4.48$ ,  $p=0.006$ ), compared to the SHAM and E groups. TAM treatment reduced

triglycerides levels ( $F(4,27)=5.77$ ,  $p=0.002$ ) and prevented the effect of estradiol on this parameter. The TAM treatment group also showed the lowest plasma glucose levels, followed by E+TAM and estradiol groups ( $F(4,26)=8.3$ ,  $p<0.001$ ). The OVX group showed a higher of LDL/HDL ratio, compared with the other groups ( $F(4,27)=4.7$ ,  $p=0.005$ ) (Table 3).

#### 4. DISCUSSION

Chronic treatment of ovariectomized rats with estradiol and tamoxifen led to a decrease in body weight, retroperitoneal fat and a decrease in standard chow intake. The caloric efficiency was lower for the E, TAM and E+TAM groups. When rats were exposed to a palatable food, a different profile was observed depending on the type of palatable food. The E, TAM and E+TAM groups consumed more *Froot loops*® than the other groups. With regard to chocolate, the E group consumed more calories from chocolate, when compared with OVX, TAM and E+TAM groups. Chronic treatment with estradiol and tamoxifen showed a favorable lipid profile; low levels of TC, LDL, LDL/HDL ratio and lower levels of glucose were observed. Levels of HDL were lower in the OVX, TAM and E+TAM groups. The E group showed higher levels of TG and HDL, in contrast to the TAM and E+TAM groups. The differences between SHAM and E group may be due to the hormonal fluctuations according to the phase of the estrous cycle presented by the SHAM rats.

Despite the known effects of tamoxifen as estrogen-agonist in uterine tissue in women [41], the present study showed that tamoxifen, in contrast to



estradiol, was unable to revert the uterine weight loss induced by ovariectomy, and also inhibited the effect of estradiol. These results are in agreement with other study showing that tamoxifen has no effect on uterine weight [18]. However, other studies have shown that tamoxifen could partially reverse the uterine weight loss caused by ovariectomy [42,43]. The reason for these contradictory results on uterine weight is not well understood, because TAM was effective as an estrogen agonist when measuring the parameters, body weight loss and retroperitoneal fat (see below).

OVX and SHAM group, which received the vehicle, increased body weight and retroperitoneal fat, whereas rats treated with estradiol and/or tamoxifen showed a reduction in these parameters. These results are consistent with previous findings in the literature [10,18,19,21,34,35]. Estradiol and tamoxifen treatment provoked a decrease in standard chow intake in ovariectomized rats, as expected and in agreement with data from literature [18,19,21,44]. The decrease in food intake associated with TAM and E treatment undoubtedly contributed to the decrease in body weight and fat content, but it is not clear whether hypophagia can entirely explain the weight loss [18]. An important role of the estradiol receptors (ERs), particularly ER $\alpha$ , in the reduction of body weight, food intake and adipose tissue has been demonstrated [15,45,46,47]. Adipocytes isolated from obese women have been reported to present reduced ER $\alpha$  mRNA levels, compared to those of non-obese women, suggesting that estrogen signaling, in particular via ER $\alpha$ , may influence body weight [46]. ER $\alpha$ -deficient mice exhibited an increased adipose tissue mass without displaying differences in energy intake, suggesting that the

weight gain is due to a decrease in energy expenditure [10,48]. This could explain the low caloric efficiency of animals treated with estradiol and tamoxifen, found in the present study. Since tamoxifen, as well as estradiol, prevented any further weight gain, fat gain and food intake, it may be suggested that tamoxifen acts as an estradiol agonist on these parameters via ER $\alpha$  activation, given that tamoxifen is considered a partial agonist of ER $\alpha$  [11]. In addition, estradiol and tamoxifen reduce lipoprotein lipase activity [49,50,51], which could contribute to decrease fat deposition due to reduced fatty acids release for lipogenesis. In addition, weight loss may be due to role of estrogen in modulating uncoupling protein (UCP) in white adipose tissue. Estrogen can increase the expression of UCP2 in white adipose tissue and increase the energy spent as heat [52].

We also found differences in the palatable food intake profile when rats were submitted to different kinds of exposure to palatable foods (restrictive schedule to Froot Loops® or free access to chocolate). During the exposure to sweet food (Froot Loops®), after 5 days of food restriction and under a restrictive schedule of exposure to froot loops, rats treated with estradiol and/or tamoxifen increased their consumption, compared with the control groups. Other studies have also shown an increase in sweet food intake when estradiol levels are high, as seen in the proestrus in rats [27] and in the follicular phase in women [15]. When the animals were exposed to chocolate and standard chow in the home cage for 7 days with 24 hours of free access, all groups consumed more chocolate than standard chow. In contrast, rats treated with estradiol ate even more chocolate than the OVX, TAM and E+TAM groups, although the total caloric consumption was the same in all groups. A similar observation was

made by Boswell et al., (2006) [20], who utilized a chocolate cake mix and observed an increase in food intake in rats treated with estradiol. On the other hand, Butera et al., (2010) [21] observed that estradiol treatment caused a reduction in chocolate intake, in a treatment paradigm that mimics the estrous cycle, instead of continuous hormone replacement. Therefore, we found that Tamoxifen acted in a different manner, depending on the kind of palatable food and/or the paradigm of exposure to food.

Independently of sex, both rats and humans are naturally more susceptible to palatable foods. Food intake is regulated by several factors; a homeostatic pathway that maintains energy sources and a hedonic pathway that stimulates the desire to consume foods that are palatable [23]. Palatable food can mobilize opioids and dopamine and increases the levels of galanin, enkephalin, and orexin in the reward system, stimulating overeating as a positive feedback [23,25]. Estrogen is also able to interact with the reward system by increasing the expression of orexin and galanin neurons in the hypothalamus, which are involved in reward-based feeding behavior [53,54,55,56]. The activation of these neurons promotes the release of dopamine and an increase in palatable food intake [25,53,54]. This stimulation in reward circuitry may occur through ER $\beta$ , given that this receptor is able to modulate the dopamine receptor and dopamine transporter in the striatum and accumbens nucleus [13] and this is probably the estradiol receptor that is more related to the ingestion of palatable foods [27]. Tamoxifen is known to have antagonist effects in ER $\beta$  [11], and this could explain the difference in chocolate intake between the tamoxifen and estradiol groups. In this sense, we speculate

that estradiol could increase palatable food ingestion by stimulation of the release of hormones and neuropeptides involved in reward circuitry, independently of the satiety system; such an effect may occur through ER $\beta$ . In addition, the TAM and E+TAM groups consumed the same calories as the other groups during the exposure to chocolate, but demonstrated a lower caloric efficiency.

Evaluation of Froot Loops consumption, unlike the evaluation of chocolate consumption, involved a habituation period (5 days) and during this period the animals were deprived of food (80%). On the test day the animals were fed, but consumption was assessed as before, using a restrictive schedule. Food deprivation strongly augments the reward value (for example, the speed of learning to obtain a rewarding stimulus) [57]. However, the OVX and Sham groups showed a significantly higher latency to eat and ate less, compared with groups treated with estradiol and/or tamoxifen. Independently from the hormonal milieu of the animal, food deprivation increases the expression of neuropeptides Y (NPY) in the arcuate nucleus, consequently more NPY is released in the paraventricular nucleus [58] and these effects can be reversed by leptin administration [59]. Furthermore, estradiol treatment reduces the circulating leptin levels, increases the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3, an inhibitor of leptin signaling) expressions in the medial basal hypothalamus; however these effects were not observed in OVX rats treated with vehicle [44]. Given that NPY is related to the increased consumption of a high carbohydrate diet [60], the food deprivation that rats underwent during the habituation period might have been responsible

for the higher consumption of Froot Loops in rats treated with estradiol and tamoxifen. This effect was not observed in the Sham and OVX groups, probably due to the high circulating leptin levels (which inhibit NPY), given that these groups have a higher fat accumulation. NPY declines in relation to body fat, presumably attributable to an increase in leptin levels [60]. Further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the effects of estradiol and tamoxifen on palatable food behavior.

Estradiol and tamoxifen treatment showed a favorable profile regarding plasma lipids and glucose. The estradiol and tamoxifen groups had a decrease in TC, LDL levels, and LDL/HDL ratio and plasma glucose, compared to the OVX rats treated with vehicle; however, the effect of TAM was more accentuated on TC and glucose levels. The TAM and OVX groups showed lower HDL cholesterol levels, compared with the estradiol group; however the difference in LDL/HDL ratio in OVX rats was probably due to the high levels of LDL in this group. The decrease in plasma LDL caused by estradiol may be the result of increased hepatic LDL receptor expression [61,62,63] which increases the clearance of plasma LDL and the secretion of cholesterol into the bile. In addition, it has been demonstrated that this LDL receptor transcription activation occurs via  $E\alpha$  [63], therefore, tamoxifen may act by the same mechanism, increasing hepatic LDL receptor expression [64] with a consequent decrease in LDL levels. With regard to HDL levels, estrogen is known to increase plasma levels of HDL cholesterol [65,66]. This may be due to an increase of hepatic apo A-I expression [67,68] and by a modulation of the proteins involved in the metabolism of HDL expression, such as HDL receptor SR-BI [69,70]. However,

the effect of tamoxifen is less conclusive, because literature reports increase [71], decrease [64], or no change [72] on HDL cholesterol levels. Moreover, differently from Estradiol treatment, the levels of SR-BI expression were not changed with Tamoxifen treatment [64]. However, despite the lower levels of HDL showed in TAM group, the LDL/HDL ratio was equal to the Estradiol group and different from OVX rats treated with vehicle. It has been shown that estradiol induces a decrease in lipoprotein lipase (LPL) activity in adipose tissue [50, 73] and this mechanism could, at least in part, explain the elevated serum triglycerides found in Estradiol group. Tamoxifen also reduces the LPL activity in humans and rats, but differently from Estradiol, it did not elevate plasma triglycerides levels [51], perhaps it can be due to a decrease in VLDL secretion. It has been demonstrated that tamoxifen induces hepatic triacylglycerol accumulation [64], probably due to an increase in the synthesis [74] or a fatty acid oxidation blockade [64]. It could disturb the liver function and reduce the secretion of VLDL.

## **5. CONCLUSION**

Tamoxifen treatment mimicked the effects of estradiol in many parameters: weight loss, retroperitoneal fat, standard chow intake and in most lipids analyzed, but in the uterine weight TAM behaved as estrogen-antagonist. Concerning the palatable food intake, TAM acted in a different manner depending on the experimental conditions. Under restrictive schedule, TAM treated rats ate as much Froot Loops as E group. Under free access, all groups showed more preference to chocolate than standard chow, but E group ate

even more chocolate. Further, TAM group showed lower caloric efficiency irrespective of the kind of food offered (palatable or standard chow), showing that TAM group has greater energy expenditure and in consequence it accumulates less fat than the other groups. Therefore, the possible weight gain seen in women that are treated with TAM may be due to a change in lifestyle.

### **Acknowledgements**

I would like to thank all integrants of Stress Neurobiology laboratory of Biochemistry Department-ICBS of our university for the help in experiments.

This study doesn't have any conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

This work was supported by National Research Council of Brazil (CNPq), Carine Lampert was the recipient of a CAPES fellowship.

### **References**

[1] Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 1989;320(8):479-84.

[2] 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.

- [3] Powles TJ, Ashley S, Tidy A, Smith IE, Dowsett M. Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(4):283-90.
- [4] Jordan VC. The science of selective estrogen receptor modulators: concept to clinical practice. *Clin Cancer Res* 2006;12(17):5010-3.
- [5] Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004;25(1):45-71.
- [6] Sato M, Rippy MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J* 1996;10(8):905-12.
- [7] Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, Bouton AH. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett* 2007;256(1):1-24.
- [8] Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, Zierath JR, Galuska D, Steiler TL, et al. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 2006;49(3):588-97.
- [9] McDonnell DP. The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10(8):301-11.
- [10] Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 2012;212(1):3-12.
- [11] Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140(12):5566-78.
- [12] McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999;20(3):279-307.



- [13] Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, et al. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;108(3-5):327-38.
- [14] McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci* 2012;126(1):4-16.
- [15] Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361(1471):1251-63.
- [16] Eckel LA. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav* 2011;104(4):517-24.
- [17] Santollo J, Yao D, Neal-Perry G, Etgen AM. Middle-aged female rats retain sensitivity to the anorexigenic effect of exogenous estradiol. *Behav Brain Res* 2012;232(1):159-64.
- [18] Wade GN, Heller HW. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am J Physiol* 1993;264(6 Pt 2):R1219-23.
- [19] Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, et al. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 2006;55(5):1327-36.
- [20] Boswell KJ, Reid LD, Caffalette CA, Stitt KT, Klein LA, Lacroix AM, et al. Estradiol increases consumption of a chocolate cake mix in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84(1):84-93.
- [21] Butera PC, Wojcik DM, Clough SJ. Effects of estradiol on food intake and meal patterns for diets that differ in flavor and fat content. *Physiol Behav* 2010;99(1):142-5.
- [22] Alsio J, Olszewski PK, Levine AS, Schioth HB. Feed-forward mechanisms: addiction-like behavioral and molecular adaptations in overeating. *Front Neuroendocrinol* 2012;33(2):127-39.

- [23] Lajtha A, Sershen H. Heterogeneity of reward mechanisms. *Neurochem Res* 2010;35(6):851-67.
- [24] Berthoud HR, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia, and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300(6):R1266-77.
- [25] Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97(2):61-73.
- [26] Curtis KS, Stratford JM, Contreras RJ. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 2005;86(3):281-6.
- [27] Green AD, Barr AM, Galea LA. Role of estradiol withdrawal in 'anhedonic' sucrose consumption: a model of postpartum depression. *Physiol Behav* 2009;97(2):259-65.
- [28] Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;76(2):327-33.
- [29] Clarke SN, Ossenkopp KP. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):R718-24.
- [30] Frye CA, Crystal S, Ward KD, Kanarek RB. Menstrual cycle and dietary restraint influence taste preferences in young women. *Physiol Behav* 1994;55(3):561-7.
- [31] Hrupka BJ, Smith GP, Geary N. Ovariectomy and estradiol affect postingestive controls of sucrose licking. *Physiol Behav* 1997;61(2):243-7.
- [32] Nissen MJ, Shapiro A, Swenson KK. Changes in weight and body composition in women receiving chemotherapy for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2011;11(1):52-60.
- [33] Crema LM, Vendite D, Horn AP, Diehl LA, Aguiar AP, Nunes E, et al. Effects of chronic restraint stress and estradiol replacement on glutamate release and uptake in the spinal cord from ovariectomized female rats. *Neurochem Res* 2009;34(3):499-507.

- [34] Fudge MA, Kavaliers M, Baird JP, Ossenkopp KP. Tamoxifen produces conditioned taste avoidance in male rats: an analysis of microstructural licking patterns and taste reactivity. *Horm Behav* 2009;56(3):322-31.
- [35] Fudge MA, Kavaliers M, Baird JP, Ossenkopp KP. Tamoxifen and raloxifene produce conditioned taste avoidance in female rats: a microstructural analysis of licking patterns. *Life Sci* 2009;84(9-10):282-9.
- [36] Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res* 2007;1132(1):10-9.
- [37] Prediger ME, Gamaro GD, Crema LM, Fontella FU, Dalmaz C. Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. *Neurochem Res* 2004;29(10):1923-30.
- [38] Pettenuzzo LF, Noschang C, von Pozzer Toigo E, Fachin A, Vendite D, Dalmaz C. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 2008;95(3):295-301.
- [39] da SBC, Silveira PP, Portella AK, Diehl LA, Nunes E, de Oliveira VS, et al. Could preference for palatable foods in neonatally handled rats alter metabolic patterns in adult life? *Pediatr Res* 2007;62(4):405-11.
- [40] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18(6):499-502.
- [41] Williams-Brown MY, Salih SM, Xu X, Veenstra TD, Saeed M, Theiler SK, et al. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;126(3-5):78-86.
- [42] Sikoski P, Register TC, Lees CJ, Lundeen S, Hutchison J, Brown KH, et al. Effects of two novel selective estrogen receptor modulators, raloxifene, tamoxifen, and ethinyl estradiol on the uterus, vagina and breast in

ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(1):75 e1-7.

[43] Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:40-47.

[44] Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine* 2012.

[45] Santollo J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Eckel LA. Activation of ERalpha is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Horm Behav* 2010;58(5):872-7.

[46] Nilsson M, Dahlman I, Ryden M, Nordstrom EA, Gustafsson JA, Arner P, et al. Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond)* 2007;31(6):900-7.

[47] Roesch DM. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 2006;87(1):39-44.

[48] Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(23):12729-34.

[49] Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, et al. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303(4):E445-56.

[50] Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, et al. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 2000;275(15):11404-11.

- [51] Hozumi Y, Kawano M, Hakamata Y, Miyata M, Jordan VC. Tamoxifen inhibits lipoprotein activity: in vivo and in vitro studies. *Horm Res* 2000;53(1):36-9.
- [52] Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, Richelsen B. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(1):191-7.
- [53] Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, Benoit SC. The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 2010;167(1):11-20.
- [54] Barson JR, Chang GQ, Poon K, Morganstern I, Leibowitz SF. Galanin and the orexin 2 receptor as possible regulators of enkephalin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: relation to dietary fat. *Neuroscience* 2011;193:10-20.
- [55] Barson JR, Morganstern I, Leibowitz SF. Galanin and consummatory behavior: special relationship with dietary fat, alcohol and circulating lipids. *EXS* 2010;102:87-111.
- [56] Anker JJ, Carroll ME. Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr Top Behav Neurosci* 2011;8:73-96.
- [57] Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443(7109):289-95.
- [58] Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(23):10931-5.
- [59] Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;98(5):1101-6.

- [60] Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004;25(3):473-504.
- [61] Di Croce L, Bruscalupi G, Trentalance A. Independent behavior of rat liver LDL receptor and HMGCoA reductase under estrogen treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224(2):345-50.
- [62] Marino M, Distefano E, Pallottini V, Caporali S, Bruscalupi G, Trentalance A. Activation of IP(3)-protein kinase C-alpha signal transduction pathway precedes the changes of plasma cholesterol, hepatic lipid metabolism and induction of low-density lipoprotein receptor expression in 17-beta-estradiol-treated rats. *Exp Physiol* 2001;86(1):39-45.
- [63] Li C, Briggs MR, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 2001;142(4):1546-53.
- [64] Lelliott CJ, Lopez M, Curtis RK, Parker N, Laudes M, Yeo G, et al. Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis. *FASEB J* 2005;19(9):1108-19.
- [65] Lamon-Fava S, Posfai B, Asztalos BF, Horvath KV, Dallal GE, Schaefer EJ. Effects of estrogen and medroxyprogesterone acetate on subpopulations of triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoproteins. *Metabolism* 2003;52(10):1330-6.
- [66] Lamon-Fava S, Herrington DM, Reboussin DM, Sherman M, Horvath K, Schaefer EJ, et al. Changes in remnant and high-density lipoproteins associated with hormone therapy and progression of coronary artery disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2009;205(1):325-30.
- [67] Lamon-Fava S, Micherone D. Regulation of apoA-I gene expression: mechanism of action of estrogen and genistein. *J Lipid Res* 2004;45(1):106-12.

- [68] Lamon-Fava S, Postfai B, Diffenderfer M, DeLuca C, O'Connor J, Jr., Welty FK, et al. Role of the estrogen and progestin in hormonal replacement therapy on apolipoprotein A-I kinetics in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(2):385-91.
- [69] Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, Eacho PI. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res* 2002;43(3):383-91.
- [70] Lopez D, Sanchez MD, Shea-Eaton W, McLean MP. Estrogen activates the high-density lipoprotein receptor gene via binding to estrogen response elements and interaction with sterol regulatory element binding protein-1A. *Endocrinology* 2002;143(6):2155-68.
- [71] Mastroianni A, Bellati C, Facchetti G, Oldani S, Franzini C, Berrino F. Increased plasma HDL-cholesterol and apo A-I in breast cancer patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Clin Biochem* 2000;33(6):513-6.
- [72] Love RR, Wiebe DA, Newcomb PA, Cameron L, Leventhal H, Jordan VC, et al. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1991;115(11):860-4.
- [73] Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, Kilgore M. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase—possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(1 Pt1):101-7.
- [74] Cole LK, Jacobs RL, Vance DE. Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology* 2010;52(4):1258-65.

**Table 1.** Nutritional composition per 100g of food used in the study.

| Food                   | Energy (Kcal) | Total protein (g) | Total carbohydrate (g) | Total fat (g) |
|------------------------|---------------|-------------------|------------------------|---------------|
| Chocolate Neugebauer®  | 516           | 3.2               | 64                     | 27.2          |
| Rat chow Nuvilab CR-1® | 324           | 22                | 55                     | 4.5           |
| Froot Loops®           | 376           | 5.6               | 83                     | 2.6           |



**Table 2.** Retroperitoneal fat and uterine weight.

|                         | SHAM                    | OVX        | E                       | TAM                  | E+TAM                |
|-------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Retroperitoneal fat (g) | 3.2±0.3                 | 3.3±0.4    | 2.3±0.2 <sup>a</sup>    | 2.2±0.3 <sup>a</sup> | 1.8±0.1 <sup>a</sup> |
| Uterine weight (mg)     | 414.9±59.6 <sup>a</sup> | 189.1±48.7 | 386.8±39.0 <sup>a</sup> | 190.5±26.9           | 253.8±26.2           |

Data are shown as mean±SE.

<sup>a</sup> Different superscripts in the same row indicate statistical differences ( $p < 0,05$ ) among groups.

**Table 3.** Plasma lipids (mg/dL) and plasma glucose (mg/dL).

|                   | SHAM                   | OVX                   | E                     | TAM                    | E+TAM                  |
|-------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Total Cholesterol | 42.4±2.8 <sup>ac</sup> | 52.9±3.6 <sup>b</sup> | 43.7±3.2 <sup>c</sup> | 33.7±4.3 <sup>ad</sup> | 36.6±1.5 <sup>ac</sup> |
| HDL Cholesterol   | 21.6±2.1 <sup>a</sup>  | 16.2±0.8              | 21.6±2.0 <sup>a</sup> | 14.3±1.1               | 16.2±1.3               |
| LDL Cholesterol   | 26.6±2.8               | 43.7±3.6 <sup>a</sup> | 31.6±2.8              | 25.9±3.4               | 27.1±2.8               |
| Triglyceride      | 37.4±2.0 <sup>ab</sup> | 44.6±3.9 <sup>a</sup> | 47.3±4.2 <sup>a</sup> | 28.7±2.8 <sup>b</sup>  | 33.8±2.9 <sup>b</sup>  |
| LDL/HDL           | 1.2±0.2                | 2.7±0.2 <sup>a</sup>  | 1.5±0.2               | 1.9±0.3                | 1.8±0.3                |
| Plasma glucose    | 94.7±5.7 <sup>a</sup>  | 89.3±2.3 <sup>a</sup> | 82.3±1.0 <sup>b</sup> | 74.4±2.9 <sup>c</sup>  | 79.9±1.4 <sup>bc</sup> |

Data are shown as mean±SE.

<sup>a,b,c</sup>Different superscripts in the same row indicate statistical differences ( $p<0.05$ ) among groups.

## Legends to figures

**Fig. 1:** Weight change (g) during 28 days of treatment. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p$ <0.0001, significantly different from control groups (SHAM and OVX).

**Fig. 2.** Standard chow consumption during 2 days (Kcal/100g of rat weight) (A) and caloric efficiency (mg of weight/Kcal/day) (B). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p$ <0.05 significantly different from control groups (SHAM and OVX).

**Fig. 3:** Consumption of sweet food (Froot Loops®) during the feeding behavior (with animals previously fed ad libitum). Latency to reach until froot loops (A). Latency to begin to eat the froot loops (B). Number of froot loops consumed in 3 minutes (C). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p$ <0.05, significantly different from control groups (SHAM and OVX). \*\* $p$ <0.05, significantly different from the others groups. & $p$ <0.05, significantly different from OVX group.

**Fig. 4:** Standard chow and chocolate consumption during seven days (total kcal/100g of rat weight) (A). Profile of food intake (Kcal/100 g of rat weight/day) during the exposition to just standard chow and when were exposed to standard chow plus chocolate (B). Weight change during the exposition of chocolate (C).

Caloric efficiency during the exposition of chocolate (D). Data are expressed as mean $\pm$ SEM. § $p$ <0.05, significantly different from OVX, TAM and E+TAM groups. \* $p$ <0.05, significantly different from control groups (SHAM and OVX). & $p$ <0.05, significantly different from OVX group. # $p$ <0.05, significantly different from E group.

Figure 1

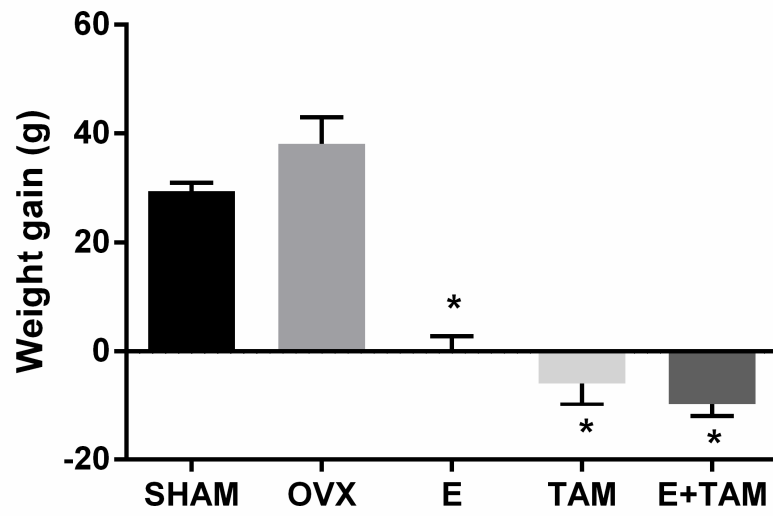


Figure 2

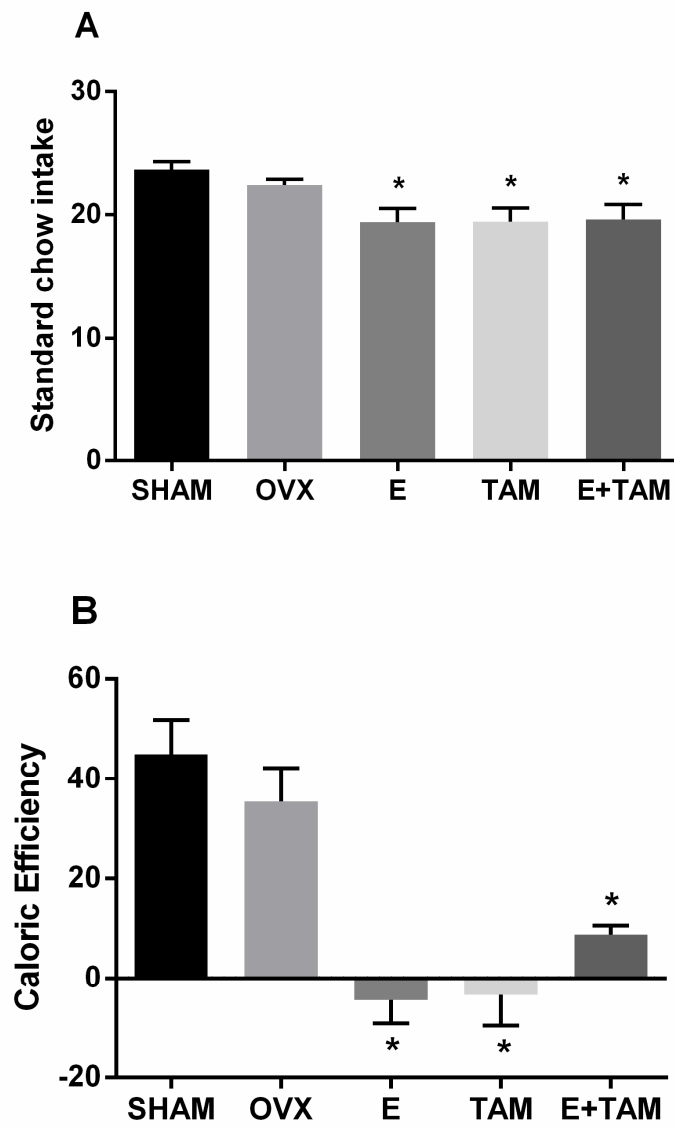
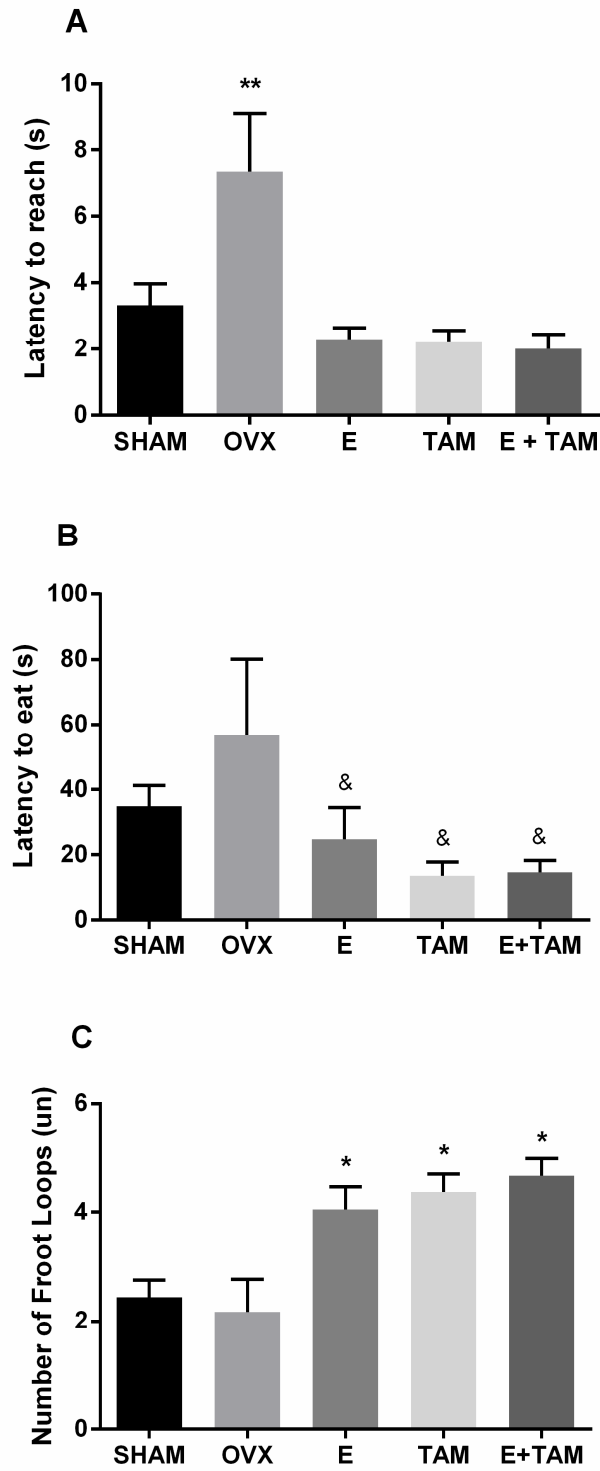
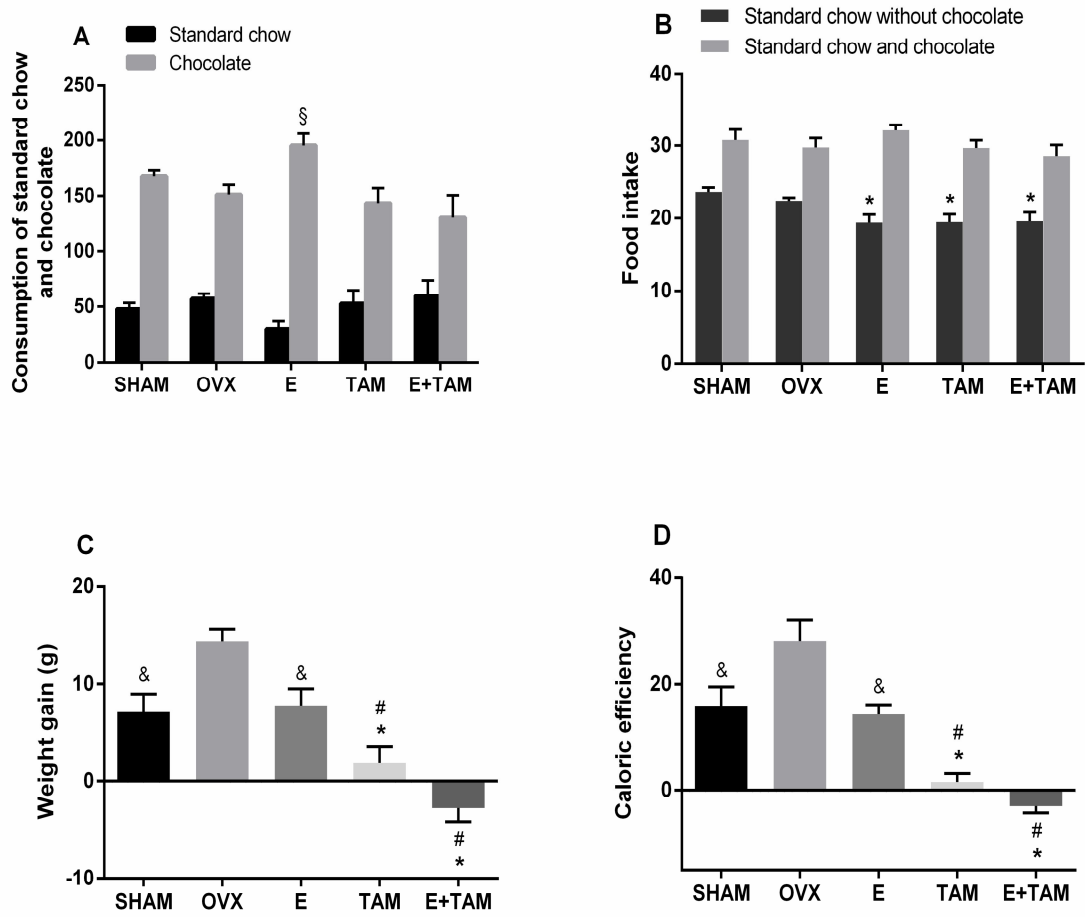


Figure 3



**Figure 4**





## **3.2 Capítulo II: Efeitos da administração crônica de estradiol e tamoxifeno sobre o comportamento tipo-depressivo, tipo-ansioso e memória de medo contextual.**

Tendo em vista que os níveis de estrógenos influenciam nas respostas afetivas, ansiedade, depressão e memória, é importante analisar como o tamoxifeno se comporta frente a estes parâmetros a fim de conhecer melhor possíveis efeitos do tamoxifeno no SNC e assim, permitir uma melhor avaliação dos benefícios/riscos do tratamento.

### **3.2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Animais**

Foram utilizadas ratas *Wistar* adultas (60 dias) provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, mantidas em caixas-moradia, confeccionadas em "plexiglas", medindo 41x34x16cm, com assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 h), com ração padrão e água "*ad libidum*". O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram tratados de acordo com o recomendado pela SBNeC e com as recomendações do "International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)", buscando sempre minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais utilizados.

## **Cirurgia de ovariectomia**

Conforme descrita no capítulo I.

## **Drogas**

Os animais foram injetados diariamente conforme descrito no capítulo I.

## **Tarefas comportamentais**

Após o 30º dia de administração das drogas foram realizadas as seguintes tarefas comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado, medo condicionado e teste de reatividade ao choque. Os animais continuaram recebendo as drogas até o final das tarefas comportamentais.

### *Campo Aberto*

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora e exploratória e o comportamento tipo-ansioso do animal ao ser colocado em um ambiente desconhecido (Vogt et al. 2008; Walsh and Cummins 1976). O aparato consiste em uma caixa quadrada de acrílico preta, medindo de 50x50cm<sup>2</sup> e 50cm de altura. Na sessão de treino o animal é colocado individualmente em um dos cantos do quadrado e após 5 min é retirado. O aparato é higienizado com

etanol 30% antes de ser introduzido um novo animal. Na sessão de teste, 24 horas após, os animais são re-expostos ao aparato por mais 5 minutos. Com o auxílio de uma câmera e do software any-maze video-tracking system é registrado o comportamento do animal e avaliada a distância percorrida no aparato, a permanência na zona periférica e central do aparato, a distância percorrida em cada zona e o número de cruzamentos pelos 16 quadrados iguais criados pelo software.

#### *Labirinto em cruz elevado*

O teste do labirinto em cruz elevado avalia de maneira mais específica o comportamento do tipo-ansioso. O aparato consiste de quatro braços arranjados em forma de cruz (braços medindo 50cm de comprimento e 15cm de largura), elevados 50 cm do chão. Dois dos braços, opostos um ao outro, não têm paredes (braços abertos); os outros dois braços (braços fechados) têm paredes de 49 cm de altura. O animal é colocado no centro do labirinto, na junção entre os braços abertos e os braços fechados. Durante 5 minutos, com o auxílio de uma câmera e do software any-maze video-tracking system é avaliado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, braços fechados e no centro do labirinto (zona neutra). Também, é analisada a frequência de *Head dips* (imersão da cabeça abaixo do nível do chão do braço aberto para explorar o ambiente), de *rearings* (se erguer sobre as patas traseiras para explorar o ambiente) e *groomings* (passar as patas na cabeça, focinho e lambê-las, a fim de se limpar). Estes parâmetros foram definidos de acordo com estudos prévios (Anseloni and Brandao 1997). Este teste é

sensível para avaliar o estado de ansiedade do animal, baseado no princípio em que a exposição a um braço elevado e aberto induz a um conflito entre a aversão ao ambiente aberto e o comportamento exploratório natural do animal (Pellow et al. 1985; Pellow and File 1986).

#### *Nado forçado*

Uma sessão de treino é conduzida durante 15 minutos onde o animal é colocado em um cilindro (20 cm de diâmetro e 50cm de altura contendo aproximadamente 30 cm de água à 25°C) no qual é forçado a nadar, pois não consegue tocar no fundo e não tem como escapar. No final da sessão o animal é secado com uma toalha e recolocado na caixa moradia. O teste é conduzido vinte e quatro horas após, sob as mesmas condições, porém, com duração de apenas 5 minutos, onde é avaliado o tempo de imobilidade - período em que o animal bóia (com o nariz na superfície da água e somente com leve movimento das patas ou cauda, o suficiente para não afundar) e a duração da tentativa de escape (tentar subir pelas paredes do cilindro), com o auxílio de um cronômetro digital. A interpretação clássica é que a imobilidade está relacionada a um desamparo aprendido - estado tipo “depressivo”, já que esse tempo de imobilidade é diminuído com a administração de antidepressivos (Hargreaves et al. 2005; Porsolt et al. 1978; Porsolt et al. 1977).

#### *Medo condicionado ao contexto*

Este teste consiste de uma sessão de treino na qual os animais são colocados em um aparato de metal com grades metalizadas no chão durante 3 minutos (período de habituação ao ambiente). Após a habituação ao ambiente, o animal recebe 3 choques consecutivos de 0.5mA por 200 mseg com intervalos de 15 seg. Após os 3 choques o animal permanece por mais 30 segundos no aparato. Na sessão de teste, 24 horas depois, o animal é colocado no mesmo aparato onde permanece durante 5 minutos, sem receber choque algum. Neste período é registrado a frequência de *rearings* (comportamento de exploração) e o tempo de *freezing* (congelamento) do animal (Ribeiro et al. 2010).

#### *Sensibilidade ao choque*

Um teste de sensibilidade ao choque adaptado (Cahill and McGaugh 1990; van der Staay and Blokland 1996) foi realizado a fim de verificar se existem diferenças na sensibilidade ao choque utilizado no teste do medo condicionado, que justifiquem os resultados encontrados. Este teste foi realizado com outra leva de animais. Os animais foram colocados na mesma caixa utilizada para realizar o medo condicionado e foram dados choques com duração de 1 segundo, amperagem crescente começando com 0.1mA (com intervalos de 0.1 mA) até 0.5mA (amperagem utilizada no medo condicionado) e o intervalo entre os choques foi de 10 segundos. Nessa tarefa foi avaliada a reação de Flinch (primeiro movimento em resposta ao choque), vocalização e salto (quando as 4 patas não encostam na grade).

## **Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. As comparações dos diferentes grupos experimentais foram realizadas através de ANOVA de uma via. Quando significativa ( $p < 0,05$ ) foi seguido pelo teste de raio múltiplo de Duncan.

### **3.2.2 RESULTADOS**

O padrão comportamental observado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado não foi indicativo de comportamento tipo-ansioso. No campo aberto, não houve diferença entre os grupos nos parâmetros analisados na sessão de teste: distância percorrida ( $F(4,33)=1.36$ ,  $p=0.27$ ), número de cruzamentos ( $F(4,33)=0.5$ ,  $p=0.74$ ), tempo na periferia ( $F(4,33)=0.46$ ,  $p=0.77$ ), distância percorrida na periferia ( $F(4,33)=1.53$ ,  $p=0.22$ ), tempo no centro ( $F(4,33)=0.45$ ,  $p=0.77$ ) e distância percorrida no centro ( $F(4,33)=0.31$ ,  $p=0.87$ ) (Tabela 1). O mesmo ocorreu na tarefa do labirinto em cruz elevado, nenhum grupo mostrou qualquer parâmetro indicativo de comportamento tipo-ansioso: percentual de tempo nos braços abertos ( $F(4,32)=1.23$ ,  $p=0.31$ ), percentual de entradas nos braços abertos ( $F(4,32)=0.54$ ,  $p=0.71$ ), percentual de tempo nos braços fechado ( $F(4,32)=1.23$ ,  $p=0.31$ ), percentual de entradas nos braços fechados ( $F(4,32)=0.54$ ,  $p=0.71$ ), *rearings* ( $F(4,31)=1.22$ ,  $p=0.32$ ) e *head dips* ( $F(4,30)=0.77$ ,  $p=0.55$ ) (Tabela 2).

No teste do nado forçado os tratamentos com estradiol e tamoxifeno isoladamente não apresentaram diferença em relação aos parâmetros de

imobilidade e tentativa de escape. Enquanto que no grupo tratado com ambos (E+TAM) houve uma diminuição no tempo de imobilidade ( $F(4,37)=11.3$ ,  $p<0.001$ ) e maior tempo de tentativa de escape ( $F(4,37)=3.71$ ,  $p=0.012$ ) (Fig. 1), sugerindo uma diminuição no comportamento tipo depressivo neste grupo.

Em relação ao medo condicionado, o grupo OVX apresentou o maior número de *rearings* ( $F(4,42)=5.4$ ,  $p=0.001$ ) entre os grupos e menor tempo de *freezing* ( $F(4,42)=3.8$ ,  $p=0.01$ ) que os grupos E, TAM e E+TAM durante o teste (Fig. 2).

No teste de sensibilidade ao choque não foram observadas diferenças entre os grupos para os parâmetros analisados, reação de flinch ( $F(4,36)=1.24$ ,  $p=0.3$ ), vocalização ( $F(4,36)=0.96$ ,  $p=0.4$ ) e salto ( $F(4,36)=0.52$ ,  $p=0.7$ ) (Dados não demonstrados).

Tabela 1. Parâmetros avaliados durante a sessão de teste do Campo Aberto.

|                                   | SHAM      | OVX        | E          | TAM       | E+TAM      |
|-----------------------------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|
| Distância percorrida              | 18,2±0.8  | 15,8±0.7   | 15,5±1.1   | 17,6±1.0  | 16,4±1.1   |
| Nº de cruzamentos                 | 168,5±8.7 | 157,1±11.6 | 152,6±10.8 | 160,6±6.8 | 149,2±10.9 |
| Tempo na periferia                | 276,3±5.4 | 269,2±7.1  | 270,9±6.1  | 278,8±4.7 | 274,5±5.4  |
| Distância percorrida na periferia | 15,6±1.0  | 13,3±0.5   | 13,4±1.0   | 15,3±0.9  | 13,7±1.0   |
| Tempo no centro                   | 23,7±5.4  | 30,8±7.1   | 29,1±6.1   | 21,2±4.7  | 25,5±5.4   |
| Distância percorrida no centro    | 2,6±0.4   | 2,5±0.5    | 2,2±0.4    | 2,3±0.4   | 2,7±0.4    |

Dados expressos como média±SEM.

Não houve diferença entre os grupos,  $p < 0.05$ .

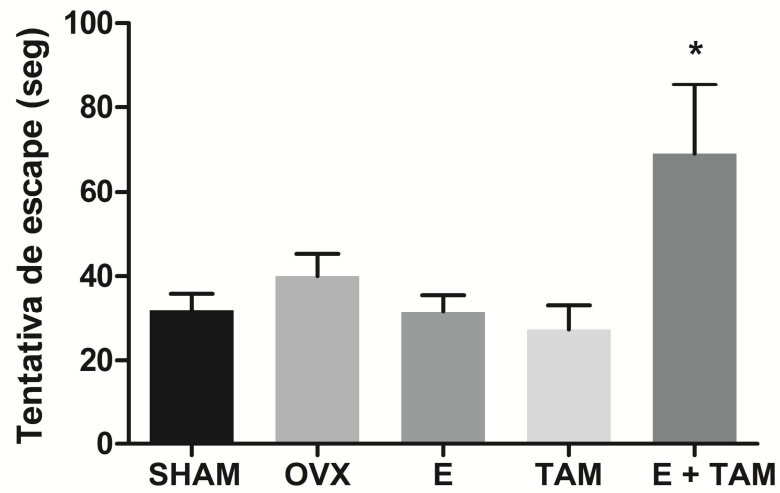
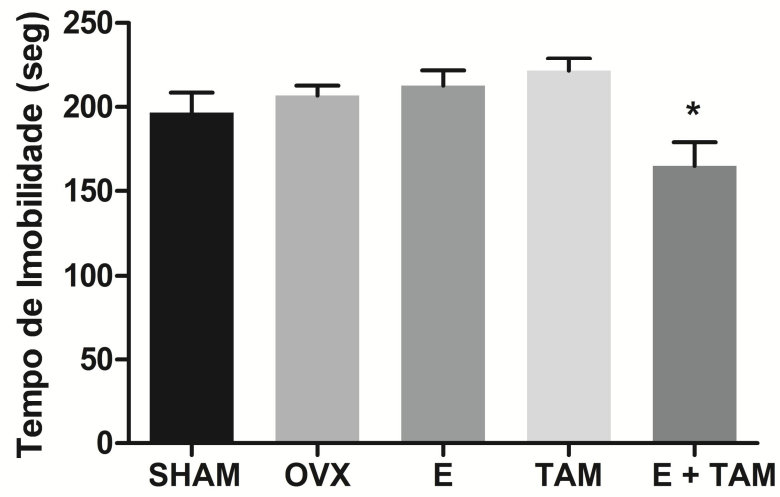
Tabela 2. Parâmetros avaliados durante o teste do Labirinto em Cruz Elevado.

|                               | SHAM     | OVX      | E          | TAM      | E+TAM    |
|-------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|
| Tempo nos braços abertos (%)  | 55.4±5.2 | 54.4±4.9 | 39.9±6.2   | 50.2±4.1 | 55.5±9.7 |
| Tempo nos braços fechados (%) | 44,5±5.2 | 45,6±4.9 | 60,1±6.2   | 49,8±4.1 | 44,5±9.7 |
| Entradas nos BA (%)           | 57.2±3.1 | 54.9±2.4 | 52.5±5.4   | 52.2±3.1 | 59.4±6.1 |
| Entradas nos BF (%)           | 42,8±3.1 | 45,0±2.4 | 47,5±5.4   | 47,8±3.1 | 49,8±4.1 |
| <i>Rearings</i>               | 25.8±4,7 | 27.2±1.8 | 30.875±2.1 | 28.5±1.9 | 23.6±3.2 |
| <i>Head Dips</i>              | 26.8±3.6 | 25.2±1.9 | 23.4±2.2   | 21.9±1.7 | 27.6±2.2 |

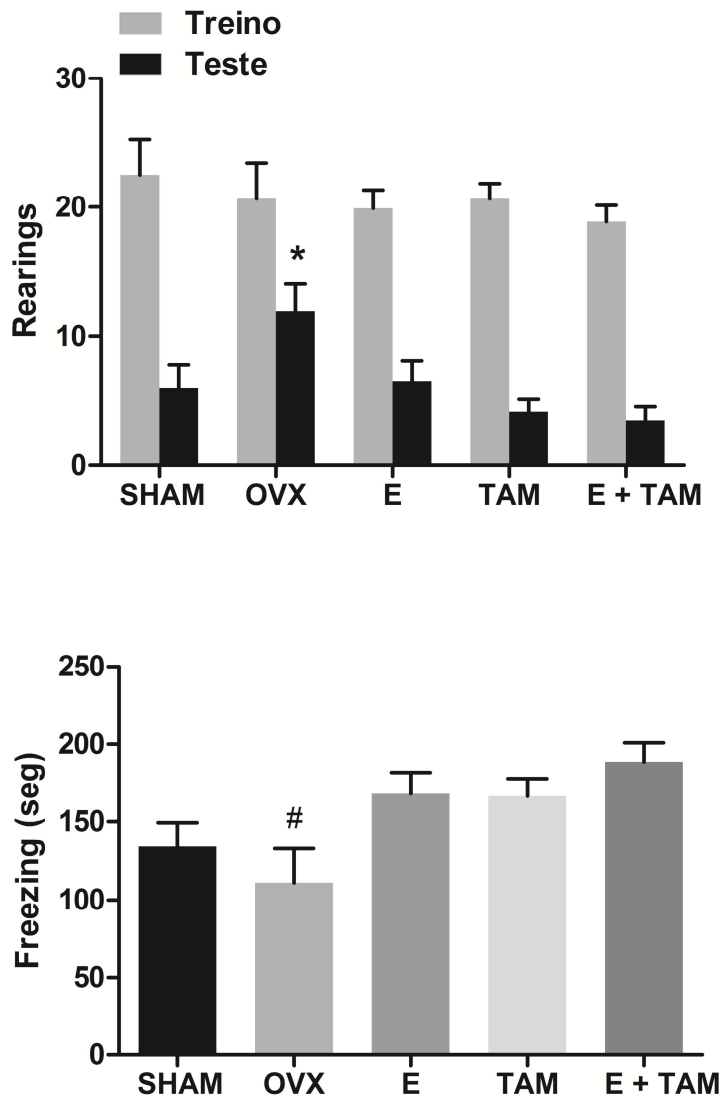
Dados expressos como média±SEM.

Não houve diferença entre os grupos,  $p < 0.05$ .





**Figura 1:** Parâmetros avaliados durante a sessão de teste do nado forçado. (A) Tentativa de escape (seg.). (B) Tempo de imobilidade (seg.). Dados expressos como média±SEM. \*Diferente estatisticamente dos demais grupos,  $p < 0.05$ .



**Figura 2:** Frequência de rearings e tempo de freezing no teste do medo condicionado ao contexto. (A) Frequência de rearings durante o treino e o teste. (B) Tempo de freezing durante o teste (seg.). Dados expressos como média±SEM. \*Diferente estatisticamente dos demais grupos,  $p < 0.05$ . #Diferente estatisticamente dos grupos E, TAM e E+TAM,  $p < 0.05$ .

## **4. DISCUSSÃO**

---

Ratas ovariectomizadas tratadas cronicamente com estradiol ou tamoxifeno apresentaram alterações em vários parâmetros metabólicos e comportamentais. Estas ratas apresentaram diminuição de peso corporal, gordura retroperitoneal e melhora no perfil lipídico. Além disso, houve menor consumo de ração padrão e menor eficiência calórica quando comparado com os controles, sendo que o grupo tratado com ambos, estradiol e tamoxifeno apresentou a menor eficiência calórica. Em relação à exposição a alimentos palatáveis, um diferente perfil de comportamento foi observado dependendo do tipo de alimento apresentado. Os grupos E, TAM e E+TAM consumiram mais Froot Loops® que os controles. Enquanto que para o chocolate, o grupo E consumiu maior quantidade de calorias proveniente do chocolate do que os grupos OVX, TAM e E+TAM. Os diferentes tratamentos não afetaram o comportamento do tipo-ansioso, enquanto que os animais tratados com E+TAM apresentaram uma diminuição no comportamento do tipo-depressivo. Além disso, o teste do medo condicionado ao contexto demonstrou que a administração de estradiol melhorou a memória e que o tamoxifeno atuou da mesma maneira. Os diferentes resultados encontrados para o grupo SHAM podem ser devido às flutuações hormonais de acordo com a fase do ciclo estral.

Embora o tamoxifeno seja considerado um agonista de estrógeno no útero (Williams-Brown et al. 2011), o presente estudo mostrou que TAM, diferentemente do E, não foi capaz de reverter a perda de peso uterino induzida pela ovariectomia e inibiu o efeito do estradiol neste parâmetro, quando administrados conjuntamente. Estes resultados estão de acordo com

outro estudo que mostra que o tamoxifeno não tem efeito sobre o peso uterino (Wade and Heller 1993). Entretanto, outros estudos mostraram que o tamoxifeno foi capaz de reverter parcialmente a perda de peso uterino provocada pela ovariectomia (Sikoski et al. 2007; Stygar et al. 2003). A razão para estes resultados contraditórios em relação ao peso uterino não é bem compreendida.

Os grupos OVX e SHAM, que receberam apenas veículo apresentaram maior peso corporal gordura retroperitoneal, enquanto as ratas tratadas com estradiol e/ou tamoxifeno mostraram uma redução destes parâmetros. Estes resultados são consistentes com achados anteriores na literatura (Butera et al. 2010; Faulds et al. 2012; Fudge et al. 2009a; Fudge et al. 2009b; Lopez et al. 2006; Wade and Heller 1993). Os animais tratados com estradiol e/ou tamoxifeno apresentaram uma diminuição no consumo de ração padrão, como esperado, conforme dados da literatura (Butera et al. 2010; Larco et al. 2012; Lopez et al. 2006; Wade and Heller 1993). A diminuição do consumo de alimento induzido pelos tratamentos com TAM e E, certamente, contribuíram para a redução do peso corporal e teor de gordura, mas não está claro se a hipofagia pode explicar inteiramente a perda de peso (Wade and Heller 1993). Tem sido demonstrado um importante papel dos receptores de estradiol, especialmente RE $\alpha$  na redução do peso corporal, consumo de alimento e tecido adiposo (Asarian and Geary 2006; Nilsson et al. 2007; Roesch 2006; Santollo et al. 2010). Adipócitos isolados de mulheres obesas apresentaram níveis reduzidos de RNAm de RE $\alpha$ , em comparação com os de mulheres não obesas, sugerindo que a sinalização do estradiol, em particular através de RE $\alpha$ ,

pode influenciar o peso corporal (Nilsson et al. 2007). Camundongos deficientes de RE $\alpha$  exibiram uma maior massa de tecido adiposo sem apresentar diferenças no consumo de energia, o que sugere que o aumento de peso é devido a uma diminuição no gasto energético (Faulds et al. 2012; Heine et al. 2000). Isto poderia explicar a eficiência calórica baixa dos animais tratados com estradiol e/ou tamoxifeno, encontrada no presente estudo. Uma vez que o tamoxifeno e o estradiol diminuem o ganho de peso, ganho de gordura e a ingestão de alimentos, pode-se sugerir que o tamoxifeno atua como um agonista de estradiol sobre estes parâmetros através da ativação RE $\alpha$ , dado que o tamoxifeno é considerado um agonista parcial do RE $\alpha$  (Hall and McDonnell 1999). Além disso, o estradiol e tamoxifeno diminuem a atividade da lipoproteína lípase (Homma et al. 2000; Hozumi et al. 2000; Yonezawa et al. 2012), o que poderia contribuir para diminuir a deposição de gordura devido à reduzida liberação de ácidos graxos para a lipogênese. Além disso, a perda de peso pode ser devida, também, ao papel do estrógeno na modulação da proteína desacopladora (UCP) no tecido adiposo branco, tendo em vista que o estradiol pode aumentar a expressão de UCP2 no tecido adiposo branco e aumentar o gasto de energia na forma de calor (Pedersen et al. 2001).

Foram observadas diferenças no perfil de ingestão de alimento palatável quando os animais foram submetidos a diferentes tipos de exposição e a diferentes alimentos palatáveis (exposição restritiva ao Froot Loops® ou o acesso livre ao chocolate). Durante a exposição ao alimento doce (Froot Loops®), após 5 dias de restrição alimentar e no âmbito de um programa

restritivo de exposição (3 minutos por dia), os ratos tratados com estradiol e/ou tamoxifeno aumentaram o consumo, comparado com os grupos controles. Outros estudos também mostraram um aumento na ingestão de alimentos doces quando os níveis de estradiol estão elevados, como, por exemplo, no pró-estro em ratos (Green et al. 2009), e na fase folicular em mulheres (Asarian and Geary 2006). Quando os animais foram expostos ao chocolate e ração padrão na caixa moradia por 7 dias, com 24 horas de acesso livre, todos os grupos consumiram mais chocolate do que a dieta padrão. Em contraste, os ratos tratados com estradiol comeram mais chocolate que os grupos OVX, TAM, e E+TAM, embora o consumo calórico total tenha sido o mesmo para todos os grupos. Um achado semelhante foi encontrado por Boswell e colaboradores (Boswell et al. 2006), que utilizaram uma mistura de bolo de chocolate e observaram um aumento na ingestão deste tipo de alimento em ratas tratadas com estradiol. Por outro lado, Butera e colaboradores, (Butera et al. 2010) observaram que o tratamento com estradiol causou uma redução na ingestão de chocolate, num paradigma de tratamento que imita o ciclo estral, em vez de reposição hormonal contínua. No presente estudo observamos que o tamoxifeno agiu de maneira semelhante ou diferente do estrógeno, dependendo do tipo de alimento palatável apresentado e/ou do paradigma de exposição a estes alimentos.

Independentemente do sexo, tanto ratos quanto humanos são naturalmente propensos ao consumo de alimentos palatáveis. A ingestão de alimentos é regulada por vários fatores, uma via homeostática que mantém as fontes de energia e uma via hedônica que estimula o desejo de consumir

alimentos que são palatáveis (Lajtha and Sershen 2010). Alimentos palatáveis podem mobilizar opióides e dopamina e aumentar os níveis de galanina, encefalina, e orexina no sistema de recompensa, estimulando um excesso no consumo como um feedback positivo (Erlanson-Albertsson 2005; Lajtha and Sershen 2010). O estrógeno é também capaz de interagir com o sistema de recompensa, aumentando a expressão de orexina e galanina em neurônios do hipotálamo, os quais estão envolvidos no comportamento baseado em recompensa alimentar (Anker and Carroll 2011; Barson et al. 2011; Barson et al. 2010; Choi et al. 2010). A ativação destes neurônios promove a liberação de dopamina e um aumento na ingestão de alimentos palatáveis (Barson et al. 2011; Choi et al. 2010; Green et al. 2009). Esta estimulação no circuito de recompensa pode ocorrer através de RE $\beta$ , dado que este receptor é capaz de modular o receptor de dopamina e do transportador de dopamina no estriado e no núcleo accumbens (Morissette et al. 2008), e é provável que seja o receptor de estradiol mais relacionado com a ingestão de alimentos palatáveis (Green et al. 2009). Tamoxifeno é conhecido por ter efeitos antagonistas de RE $\beta$  (Hall and McDonnell 1999), o que pode explicar a diferença no consumo de chocolate entre os grupos TAM e E. Neste sentido, especula-se que o estradiol pode aumentar a ingestão de alimentos palatáveis através da estimulação da liberação de hormônios e neuropeptídeos envolvidos no circuito de recompensa, independentemente do sistema de saciedade; tal efeito pode ocorrer através de RE $\beta$ . Além disso, os grupos TAM e E+TAM consumiram a mesma quantidade de calorias que os outros grupos durante a exposição ao chocolate, porém demonstraram uma menor eficiência calórica.



A avaliação do consumo de Froot Loops®, diferente da avaliação do consumo de chocolate, envolveu um período de habituação (5 dias) e durante este período, os animais foram privados de alimento (20%) e eram expostos ao alimento de maneira restritiva (apenas 3 minutos por dia). No dia do teste os animais estavam alimentados. A privação de alimento aumenta fortemente o valor da recompensa (por exemplo, a velocidade de aprendizagem para se obter um estímulo recompensador) (Morton et al. 2006). No entanto, os grupos OVX e SHAM mostraram uma latência significativamente maior para começar a comer e comeram menos Froot Loops® em comparação com os grupos tratados com estradiol e/ou tamoxifeno. Independentemente do estado hormonal do animal, a privação de alimentos aumenta a expressão de NPY no núcleo arqueado, conseqüentemente mais NPY é lançado no núcleo paraventricular (Kalra et al. 1991) e estes efeitos podem ser revertidos pela administração de leptina (Schwartz et al. 1996). Além disso, o tratamento com estradiol diminui os níveis circulantes de leptina, aumenta a expressão do receptor de leptina e do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3, um inibidor da sinalização da leptina) no hipotálamo basal medial e estes efeitos não foram observados nos ratos OVX tratados com veículo (Larco et al. 2012). Sabendo-se que o NPY está relacionado com o aumento do consumo de alimentos ricos em carboidratos (Leibowitz and Wortley 2004), a privação de alimento que os ratos foram submetidos durante o período de habituação pode ter sido responsável pelo maior consumo de Froot Loops® por ratos tratados com estradiol e tamoxifeno. Este efeito não foi observado nos grupos SHAM e OVX, provavelmente devido aos altos níveis circulantes de leptina (que inibe NPY), uma vez que estes grupos têm um maior acúmulo de gordura. Níveis de

NPY são inversamente proporcionais à quantidade de gordura corporal, presumivelmente devido à relação entre quantidade de gordura e níveis de leptina (Leibowitz and Wortley 2004). Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos do estradiol e tamoxifeno no comportamento frente a alimentos palatáveis.

Além dos efeitos metabólicos e dos efeitos centrais do estradiol sobre o comportamento alimentar, vários estudos tem evidenciado um papel ansiolítico, antidepressivo e melhora no desempenho cognitivo em ratas tratadas com estradiol (Gillies and McArthur 2010; Handa et al. 2012; Walf and Frye 2010). Estudos avaliando as ações neurobiológicas do RE $\beta$  sugerem que a ativação deste subtipo receptor está relacionada com comportamentos de medo, ansiedade e depressão (Handa et al. 2012; Lebron-Milad and Milad 2012; Walf and Frye 2005; Walf and Frye 2007; Walf et al. 2004). Para o tamoxifeno, existem resultados variados na literatura quanto ao seu papel sobre a ansiedade, depressão e memória. Alguns autores mostram efeitos ansiogênicos do tamoxifeno (Mook et al. 2005), enquanto outros observaram efeito ansiolítico nas ratas OVX tratadas com TAM (Kazakova et al. 2007). Alguns autores verificaram que a administração aguda de TAM reverte os efeitos ansiolíticos da administração de estradiol ou de agonistas RE $\beta$  em ratas OVX (Walf and Frye 2005). Enquanto que outro estudo observou um aumento na permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado em ratos submetidos a estresse crônico variado, após administração aguda de tamoxifeno (Calmarza-Font et al. 2012). No presente estudo não foi observada diferença entre os grupos nos parâmetros relacionados ao comportamento do

tipo-ansioso nos testes do labirinto em cruz elevado e no campo aberto. Esta ausência de efeito em relação ao comportamento do tipo-ansioso pode ser devida à idade dos animais. Um estudo evidenciou que ratas jovens (2 meses) OVX tratadas com estradiol não apresentaram alterações no comportamento do tipo-ansioso, enquanto que em ratas mais velhas (20 meses) o estradiol provocou redução na ansiedade (Diz-Chaves et al. 2012). Investigações a respeito dos efeitos do estradiol sobre o comportamento do tipo-ansioso têm demonstrado que diferentes doses e diferentes regimes de tratamento ou diferentes modelos animais podem resultar tanto no aumento quanto na diminuição deste comportamento (Handa et al. 2012).

Alguns estudos em humanos têm associado o uso do tamoxifeno com o aumento na incidência de sintomas de depressão (Thompson et al. 1999). Entretanto, outros estudos não encontraram relação entre o uso do tamoxifeno e o desenvolvimento ou agravamento da depressão (Day et al. 2001; Lee et al. 2007). Um estudo verificou que a administração aguda de tamoxifeno reduziu o comportamento do tipo-depressivo no nado forçado em ratos submetidos a estresse crônico variado (Calmarza-Font et al. 2012). No presente estudo, o tratamento crônico com estradiol e tamoxifeno isoladamente não apresentaram diferença no nado forçado, porém o grupo tratado com ambos (E+TAM) apresentou menor tempo de imobilidade e maior tempo de tentativa de escape, indicando um perfil mais favorável à diminuição do comportamento tipo-depressivo. Há evidências de que os efeitos do estradiol e dos SERMs sobre a depressão e ansiedade podem estar associados à regulação do sistema serotoninérgico (degradação da enzima monoamina oxidase e expressão de

transportadores de serotonina, receptor 5HT<sub>2A</sub> e da enzima tirosina hidroxilase (Calmarza-Font et al. 2012), enquanto que outro estudo verificou que o tamoxifeno não interfere no sistema serotoninérgico (Mook et al. 2005). Mais estudos são necessários para entender porque as drogas isoladamente não tiveram efeito, porém, quando administradas em conjunto tiveram um efeito antidepressivo.

Os achados do presente estudo no teste do medo condicionado contextual corroboram com os dados da literatura (Gupta et al. 2001). Os animais tratados com estradiol e/ou tamoxifeno apresentaram menor número de *rearings* e menor tempo de *freezing* na sessão de teste, indicando um melhor perfil de memória contextual. No teste de sensibilidade ao choque não foram observadas diferenças entre os grupos, indicando que todos os grupos foram sensíveis da mesma maneira ao choque ao qual foram submetidos no teste do medo condicionado, sendo, então, o estímulo aversivamente igual para todos os grupos. Portanto, os resultados obtidos no teste do medo condicionado contextual foram devidos provavelmente às diferenças no processamento da memória contextual. Estes resultados vão de encontro a outros estudos que observaram uma melhora no desempenho cognitivo com o tratamento com estradiol e tamoxifeno (Gonzalez-Burgos et al. 2012; Velazquez-Zamora et al. 2012).

Os tratamentos com estradiol e tamoxifeno apresentaram um perfil favorável sobre a glicose e lipídios plasmáticos. Os grupos E, TAM e E+TAM tiveram uma diminuição no CT, LDL, na relação LDL/HDL e na glicose plasmática em comparação com as ratas OVX tratadas com veículo. No

entanto, o efeito do TAM foi mais acentuado para os níveis de glicose e CT. Os grupos OVX e TAM apresentaram níveis mais baixos de colesterol HDL, em comparação com o grupo E, no entanto a diferença na relação LDL/HDL em ratas OVX foi provavelmente devido aos níveis elevados de LDL no grupo. A diminuição de LDL no plasma pelo estradiol pode ser resultado de um aumento na expressão do receptor de LDL hepático (Di Croce et al. 1996; Li et al. 2001; Marino et al. 2001), o que aumenta a depuração de LDL no plasma e a liberação de colesterol na bile. Além disso, demonstrou-se que esta ativação da transcrição do receptor de LDL ocorre via RE $\alpha$  (Li et al. 2001), dessa maneira, o tamoxifeno poderia estar atuando pelo mesmo mecanismo, no sentido de aumentar a expressão hepática do receptor de LDL (Lelliott et al. 2005), com um conseqüente decréscimo nos níveis plasmáticos de LDL. Em relação ao HDL, é conhecido o efeito do estrógeno em aumentar os níveis plasmáticos de HDL (Lamon-Fava et al. 2009; Lamon-Fava et al. 2003). Isto pode ser devido a um aumento da expressão hepática de apo AI (Lamon-Fava and Micherone 2004; Lamon-Fava et al. 2006) e por uma modulação de proteínas envolvidas no metabolismo do HDL, tais como o receptor HDL SR-BI (Jones et al. 2002; Lopez et al. 2002). No entanto, o efeito do tamoxifeno é menos conclusivo, pois a literatura reporta aumento (Mastroianni et al. 2000), diminuição (Lelliott et al. 2005) ou nenhuma mudança (Love et al. 1991) nos níveis de colesterol HDL. Além disso, ao contrário do tratamento com estradiol, a expressão de SR-BI não foi alterada com o tratamento com TAM (Lelliott et al. 2005). Entretanto, apesar dos baixos níveis de HDL vistos no grupo TAM, a razão LDL/HDL foi igual à do grupo E e diferente do grupo OVX que recebia veículo. Em relação aos níveis de triglicérides, estudos mostram que o estradiol induz uma

diminuição na atividade da lipoproteína lipase (LPL) em tecido adiposo (Homma et al. 2000; Price et al. 1998) e esse mecanismo pode, pelo menos em parte, explicar a elevação dos níveis plasmáticos de triglicerídeos no grupo E. O tamoxifeno também reduz a atividade da LPL em humanos e ratos, mas diferentemente do grupo E, os animais tratados com TAM (grupos TAM e E+TAM) não apresentaram uma elevação nos níveis plasmáticos de triglicerídeos (Hozumi et al. 2000), talvez isso possa ser devido a uma diminuição da secreção de VLDL. Tamoxifeno é altamente metabolizado no fígado (Goetz et al. 2008; Johnson et al. 2004) e evidências mostram que o tamoxifeno induz um acúmulo de triglicerídeo hepático (Lelliott et al. 2005), provavelmente devido a um aumento na síntese (Cole et al. 2010), ou um bloqueio na oxidação de ácidos graxos (Lelliott et al. 2005). Portanto, estes fatores poderiam contribuir para uma redução na secreção de VLDL e menores níveis de TG circulantes.

## **5. CONCLUSÃO**

---

O tratamento com tamoxifeno mimetizou os efeitos do estradiol em muitos parâmetros metabólicos (perda de peso, diminuição de gordura retroperitoneal e na maior parte do perfil lipídico analisado) e comportamentais (consumo de ração padrão, consumo de alimento doce, comportamento do tipo-ansioso, do tipo-depressivo e memória contextual). TAM mostrou efeito antagonista de estrógeno no útero. No que diz respeito à ingestão de alimentos palatáveis, TAM agiu de maneira diferente, dependendo das condições experimentais. Quando o acesso era restrito, os ratos tratados com TAM comeram tanto Froot Loops® quanto o grupo E. Enquanto que, quando o acesso era livre, todos os grupos apresentaram maior preferência ao chocolate do que a dieta padrão, mas o grupo E comeu ainda mais chocolate do que os grupos OVX, TAM e E+TAM. Além disso, o grupo TAM apresentou menor eficiência calórica, independentemente do tipo de alimento oferecido (palatável ou dieta padrão), mostrando que o grupo TAM tem menor ganho de peso por calorias ingeridas o que poderia indicar que o tamoxifeno provoca um maior gasto energético, ocasionando um menor acúmulo de gordura. Portanto, o possível ganho de peso visto em mulheres tratadas com TAM pode ser devido a uma alteração no estilo de vida. Além disso, possivelmente os sintomas de depressão relatados por algumas mulheres durante o tratamento com TAM se devam a outras causas e não consequência do tratamento. Tendo em vista os efeitos benéficos do tamoxifeno sobre a maioria dos parâmetros analisados neste estudo, se forem confirmados em humanos, poderia se sugerir, assim como outros autores já sugeriram, a possibilidade de utilização do TAM como substituto da terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa.



## 6. REFERÊNCIAS

---

- Alsio J, Olszewski PK, Levine AS, and Schioth HB. 2012. Feed-forward mechanisms: addiction-like behavioral and molecular adaptations in overeating. *Front Neuroendocrinol* 33(2):127-139.
- Anker JJ, and Carroll ME. 2011. Females are more vulnerable to drug abuse than males: evidence from preclinical studies and the role of ovarian hormones. *Curr Top Behav Neurosci* 8:73-96.
- Anseloni VZ, and Brandao ML. 1997. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol* 8(6-7):533-540.
- Asarian L, and Geary N. 2006. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471):1251-1263.
- Barha CK, and Galea LA. 2010. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 1800(10):1056-1067.
- Barson JR, Chang GQ, Poon K, Morganstern I, and Leibowitz SF. 2011. Galanin and the orexin 2 receptor as possible regulators of enkephalin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: relation to dietary fat. *Neuroscience* 193:10-20.
- Barson JR, Morganstern I, and Leibowitz SF. 2010. Galanin and consummatory behavior: special relationship with dietary fat, alcohol and circulating lipids. *EXS* 102:87-111.
- Beato M, Herrlich P, and Schutz G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83(6):851-857.
- Berthoud HR, Lenard NR, and Shin AC. 2011. Food reward, hyperphagia, and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(6):R1266-1277.
- Boswell KJ, Reid LD, Caffalette CA, Stitt KT, Klein LA, Lacroix AM, and Reid ML. 2006. Estradiol increases consumption of a chocolate cake mix in female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 84(1):84-93.

Butera PC, Wojcik DM, and Clough SJ. 2010. Effects of estradiol on food intake and meal patterns for diets that differ in flavor and fat content. *Physiol Behav* 99(1):142-145.

Cahill L, and McGaugh JL. 1990. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. *Behav Neurosci* 104(4):532-543.

Calmarza-Font I, Lagunas N, and Garcia-Segura LM. 2012. Antidepressive and anxiolytic activity of selective estrogen receptor modulators in ovariectomized mice submitted to chronic unpredictable stress. *Behav Brain Res* 227(1):287-290.

Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, and Benoit SC. 2010. The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 167(1):11-20.

Clarke R, Leonessa F, Welch JN, and Skaar TC. 2001. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 53(1):25-71.

Clarke SN, and Ossenkopp KP. 1998. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol* 274(3 Pt 2):R718-724.

Coezy E, Borgna JL, and Rochefort H. 1982. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 42(1):317-323.

Cohen LS, Soares CN, Poitras JR, Prouty J, Alexander AB, and Shifren JL. 2003. Short-term use of estradiol for depression in perimenopausal and postmenopausal women: a preliminary report. *Am J Psychiatry* 160(8):1519-1522.

Cole LK, Jacobs RL, and Vance DE. 2010. Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology* 52(4):1258-1265.

Crema LM, Vendite D, Horn AP, Diehl LA, Aguiar AP, Nunes E, Vinade L, Fontella FU, Salbego C, and Dalmaz C. 2009. Effects of chronic restraint stress and estradiol replacement on glutamate release and uptake in the spinal cord from ovariectomized female rats. *Neurochem Res* 34(3):499-507.

Curtis KS, Stratford JM, and Contreras RJ. 2005. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol Behav* 86(3):281-286.

Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, and Boyle P. 2003. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 361(9354):296-300.

Day R, Ganz PA, and Costantino JP. 2001. Tamoxifen and depression: more evidence from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project's Breast Cancer Prevention (P-1) Randomized Study. *J Natl Cancer Inst* 93(21):1615-1623.

Di Croce L, Bruscalupi G, and Trentalance A. 1996. Independent behavior of rat liver LDL receptor and HMGCoA reductase under estrogen treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 224(2):345-350.

Diz-Chaves Y, Kwiatkowska-Naqvi A, Von Hulst H, Pernia O, Carrero P, and Garcia-Segura LM. 2012. Behavioral effects of estradiol therapy in ovariectomized rats depend on the age when the treatment is initiated. *Exp Gerontol* 47(1):93-99.

Eckel LA. 2011. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav* 104(4):517-524.

Erlanson-Albertsson C. 2005. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2):61-73.

Estrada-Camarena E, Fernandez-Guasti A, and Lopez-Rubalcava C. 2003. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 28(5):830-838.

Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, and Gustafsson JA. 2012. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 212(1):3-12.

Fisher B, Costantino J, Redmond C, Poisson R, Bowman D, Couture J, Dimitrov NV, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER et al. . 1989. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med* 320(8):479-484.

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J et al. . 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90(18):1371-1388.

Foster TC, Rani A, Kumar A, Cui L, and Semple-Rowland SL. 2008. Viral vector-mediated delivery of estrogen receptor-alpha to the hippocampus improves spatial learning in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Mol Ther* 16(9):1587-1593.

Frye CA, Crystal S, Ward KD, and Kanarek RB. 1994. Menstrual cycle and dietary restraint influence taste preferences in young women. *Physiol Behav* 55(3):561-567.

Frye CA, and Walf AA. 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav* 41(3):306-315.

Fudge MA, Kavaliers M, Baird JP, and Ossenkopp KP. 2009a. Tamoxifen and raloxifene produce conditioned taste avoidance in female rats: a microstructural analysis of licking patterns. *Life Sci* 84(9-10):282-289.

Fudge MA, Kavaliers M, Baird JP, and Ossenkopp KP. 2009b. Tamoxifen produces conditioned taste avoidance in male rats: an analysis of microstructural licking patterns and taste reactivity. *Horm Behav* 56(3):322-331.

Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, and Dalmaz C. 2003. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacol Biochem Behav* 76(2):327-333.

Geary N, and Asarian L. 1999. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 67(1):141-147.

Gillies GE, and McArthur S. 2010. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* 62(2):155-198.

Goetz MP, Kamal A, and Ames MM. 2008. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther* 83(1):160-166.

Gonzalez-Burgos I, Rivera-Cervantes MC, Velazquez-Zamora DA, Feria-Velasco A, and Garcia-Segura LM. 2012. Selective estrogen receptor modulators regulate dendritic spine plasticity in the hippocampus of male rats. *Neural Plast* 2012:309494.

Gray JM, Schrock S, and Bishop M. 1993. Estrogens and antiestrogens: actions and interactions with fluphenazine on food intake and body weight in rats. *Am J Physiol* 264(6 Pt 2):R1214-1218.

Green AD, Barr AM, and Galea LA. 2009. Role of estradiol withdrawal in 'anhedonic' sucrose consumption: a model of postpartum depression. *Physiol Behav* 97(2):259-265.

Gupta RR, Sen S, Diepenhorst LL, Rudick CN, and Maren S. 2001. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats(1). *Brain Res* 888(2):356-365.

Hall JM, and McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140(12):5566-5578.

Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, and Herbison AE. 2012. Roles for oestrogen receptor beta in adult brain function. *J Neuroendocrinol* 24(1):160-173.

Hargreaves GA, McGregor IS, and Sachdev PS. 2005. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation is antidepressant but not anxiolytic in rat models of anxiety and depression. *Psychiatry Res* 137(1-2):113-121.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, and Cooke PS. 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23):12729-12734.

Hintiryan H, Foster NN, and Chambers KC. 2009. Dissociating the conditioning and the anorectic effects of estradiol in female rats. *Behav Neurosci* 123(6):1226-1237.

Hiroi R, and Neumaier JF. 2006. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. *Behav Brain Res* 166(1):93-100.

Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, and Murata Y. 2000. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 275(15):11404-11411.

Hozumi Y, Kawano M, Hakamata Y, Miyata M, and Jordan VC. 2000. Tamoxifen inhibits lipoprotein activity: in vivo and in vitro studies. *Horm Res* 53(1):36-39.

Hrupka BJ, Smith GP, and Geary N. 1997. Ovariectomy and estradiol affect postingestive controls of sucrose licking. *Physiol Behav* 61(2):243-247.

Hyde JS, Mezulis AH, and Abramson LY. 2008. The ABCs of depression: integrating affective, biological, and cognitive models to explain the emergence of the gender difference in depression. *Psychol Rev* 115(2):291-313.

Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, and Hortobagyi GN. 1995. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol* 13(2):513-529.

Jasnow AM, Schulkin J, and Pfaff DW. 2006. Estrogen facilitates fear conditioning and increases corticotropin-releasing hormone mRNA expression in the central amygdala in female mice. *Horm Behav* 49(2):197-205.

Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, and Frye CA. 2010. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav* 99(2):151-162.

Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, Desta Z, Flockhart DA, and Skaar TC. 2004. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 85(2):151-159.

Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, and Eacho PI. 2002. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res* 43(3):383-391.

Jordan VC. 2006. The science of selective estrogen receptor modulators: concept to clinical practice. *Clin Cancer Res* 12(17):5010-5013.

Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, and Kalra PS. 1991. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23):10931-10935.

Kazakova SB, Fedotova Iu O, and Saprionov NS. 2007. [Effect of tamoxifen on anxiety in ovariectomized and intact female rats]. *Eksp Klin Farmakol* 70(5):3-8.

Lajtha A, and Sershen H. 2010. Heterogeneity of reward mechanisms. *Neurochem Res* 35(6):851-867.

Lamon-Fava S, Herrington DM, Reboussin DM, Sherman M, Horvath K, Schaefer EJ, and Asztalos BF. 2009. Changes in remnant and high-density lipoproteins associated with hormone therapy and progression of coronary artery disease in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 205(1):325-330.



Lamon-Fava S, and Micherone D. 2004. Regulation of apoA-I gene expression: mechanism of action of estrogen and genistein. *J Lipid Res* 45(1):106-112.

Lamon-Fava S, Posfai B, Asztalos BF, Horvath KV, Dallal GE, and Schaefer EJ. 2003. Effects of estrogen and medroxyprogesterone acetate on subpopulations of triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoproteins. *Metabolism* 52(10):1330-1336.

Lamon-Fava S, Postfai B, Diffenderfer M, DeLuca C, O'Connor J, Jr., Welty FK, Dolnikowski GG, Barrett PH, and Schaefer EJ. 2006. Role of the estrogen and progestin in hormonal replacement therapy on apolipoprotein A-I kinetics in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(2):385-391.

Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, and Wu TJ. 2012. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine*.

Lebron-Milad K, and Milad MR. 2012. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biol Mood Anxiety Disord* 2(1):3.

Lee KC, Ray GT, Hunkeler EM, and Finley PR. 2007. Tamoxifen treatment and new-onset depression in breast cancer patients. *Psychosomatics* 48(3):205-210.

Leibowitz SF, and Wortley KE. 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25(3):473-504.

Lelliott CJ, Lopez M, Curtis RK, Parker N, Laudes M, Yeo G, Jimenez-Linan M, Grosse J, Saha AK, Wiggins D et al. . 2005. Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis. *FASEB J* 19(9):1108-1119.

Li C, Briggs MR, Ahlborn TE, Kraemer FB, and Liu J. 2001. Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 142(4):1546-1553.

Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, and Skaar TC. 2005. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 55(5):471-478.

Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, and Ohlsson C. 2003. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17(2):203-208.

Lopez D, Sanchez MD, Shea-Eaton W, and McLean MP. 2002. Estrogen activates the high-density lipoprotein receptor gene via binding to estrogen response elements and interaction with sterol regulatory element binding protein-1A. *Endocrinology* 143(6):2155-2168.

Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, Blount M, Vazquez MJ, Finer N, Powles TJ et al. . 2006. Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55(5):1327-1336.

Love RR, Wiebe DA, Newcomb PA, Cameron L, Leventhal H, Jordan VC, Feyzi J, and DeMets DL. 1991. Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 115(11):860-864.

Luine VN. 2008. Sex steroids and cognitive function. *J Neuroendocrinol* 20(6):866-872.

Marino M, Distefano E, Pallottini V, Caporali S, Bruscalupi G, and Trentalance A. 2001. Activation of IP(3)-protein kinase C-alpha signal transduction pathway precedes the changes of plasma cholesterol, hepatic lipid metabolism and induction of low-density lipoprotein receptor expression in 17-beta-oestradiol-treated rats. *Exp Physiol* 86(1):39-45.

Markou A, Duka T, and Prelevic GM. 2005. Estrogens and brain function. *Hormones (Athens)* 4(1):9-17.

Mastroianni A, Bellati C, Facchetti G, Oldani S, Franzini C, and Berrino F. 2000. Increased plasma HDL-cholesterol and apo A-I in breast cancer patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. *Clin Biochem* 33(6):513-516.

McDonnell DP. 1999. The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol Metab* 10(8):301-311.

McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, and Waters EM. 2012. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci* 126(1):4-16.

McEwen BS, and Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20(3):279-307.

Mook D, Felger J, Graves F, Wallen K, and Wilson ME. 2005. Tamoxifen fails to affect central serotonergic tone but increases indices of anxiety in female rhesus macaques. *Psychoneuroendocrinology* 30(3):273-283.

Morissette M, Le Saux M, D'Astous M, Jourdain S, Al Sweidi S, Morin N, Estrada-Camarena E, Mendez P, Garcia-Segura LM, and Di Paolo T. 2008. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3-5):327-338.

Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, and Schwartz MW. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443(7109):289-295.

Nilsson M, Dahlman I, Ryden M, Nordstrom EA, Gustafsson JA, Arner P, and Dahlman-Wright K. 2007. Oestrogen receptor alpha gene expression levels are reduced in obese compared to normal weight females. *Int J Obes (Lond)* 31(6):900-907.

Nissen MJ, Shapiro A, and Swenson KK. 2011. Changes in weight and body composition in women receiving chemotherapy for breast cancer. *Clin Breast Cancer* 11(1):52-60.

O'Neill K, Chen S, and Diaz Brinton R. 2004. Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following

toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 188(2):268-278.

Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, and Inukai T. 1997. Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Jpn J Pharmacol* 73(1):93-96.

Paplomata E, and O'Regan R. 2013. New and emerging treatments for estrogen receptor-positive breast cancer: focus on everolimus. *Ther Clin Risk Manag* 9:27-36.

Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, and Richelsen B. 2001. Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 288(1):191-197.

Pellow S, Chopin P, File SE, and Briley M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3):149-167.

Pellow S, and File SE. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24(3):525-529.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, and Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47(4):379-391.

Porsolt RD, Bertin A, and Jalfre M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229(2):327-336.

Powles TJ, Ashley S, Tidy A, Smith IE, and Dowsett M. 2007. Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *J Natl Cancer Inst* 99(4):283-290.

Price TM, O'Brien SN, Welter BH, George R, Anandjiwala J, and Kilgore M. 1998. Estrogen regulation of adipose tissue lipoprotein lipase--possible mechanism of body fat distribution. *Am J Obstet Gynecol* 178(1 Pt 1):101-107.

Ribeiro AM, Barbosa FF, Godinho MR, Fernandes VS, Munguba H, Melo TG, Barbosa MT, Eufrazio RA, Cabral A, Izidio GS et al. . 2010. Sex differences in aversive memory in rats: possible role of extinction and reactive emotional factors. *Brain Cogn* 74(2):145-151.

Riggins RB, Schrecengost RS, Guerrero MS, and Bouton AH. 2007. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett* 256(1):1-24.

Roesch DM. 2006. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87(1):39-44.

Santollo J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, and Eckel LA. 2010. Activation of ERalpha is necessary for estradiol's anorexigenic effect in female rats. *Horm Behav* 58(5):872-877.

Santollo J, Yao D, Neal-Perry G, and Etgen AM. 2012. Middle-aged female rats retain sensitivity to the anorexigenic effect of exogenous estradiol. *Behav Brain Res* 232(1):159-164.

Sapronov NS, and Kasakova SB. 2008. Effects of synthetic and plant-derived selective modulators of estrogen receptors on depression-like behavior of female rats. *Bull Exp Biol Med* 146(1):73-76.

Sato M, Rippy MK, and Bryant HU. 1996. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J* 10(8):905-912.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, and Baskin DG. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98(5):1101-1106.

Sharma K, Mehra RD, Dhar P, and Vij U. 2007. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response

element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res* 1132(1):10-19.

Shughrue PJ, Lane MV, and Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388(4):507-525.

Sikoski P, Register TC, Lees CJ, Lundeen S, Hutchison J, Brown KH, and Cline JM. 2007. Effects of two novel selective estrogen receptor modulators, raloxifene, tamoxifen, and ethinyl estradiol on the uterus, vagina and breast in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Am J Obstet Gynecol* 196(1):75 e71-77.

Smith CL, and O'Malley BW. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25(1):45-71.

Sodersten P, Bergh C, and Ammar A. 2003. Anorexia nervosa: towards a neurobiologically based therapy. *Eur J Pharmacol* 480(1-3):67-74.

Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, and McEwen BS. 2008. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol* 29(2):219-237.

Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, and Sahlin L. 2003. Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:40.

Thompson DS, Spanier CA, and Vogel VG. 1999. The Relationship Between Tamoxifen, Estrogen, and Depressive Symptoms. *Breast J* 5(6):375-382.

van der Staay FJ, and Blokland A. 1996. Behavioral differences between outbred Wistar, inbred Fischer 344, brown Norway, and hybrid Fischer 344 x brown Norway rats. *Physiol Behav* 60(1):97-109.

Velazquez-Zamora DA, Garcia-Segura LM, and Gonzalez-Burgos I. 2012. Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. *Horm Behav* 61(4):512-517.

- Vogt MA, Chourbaji S, Brandwein C, Dormann C, Sprengel R, and Gass P. 2008. Suitability of tamoxifen-induced mutagenesis for behavioral phenotyping. *Exp Neurol* 211(1):25-33.
- Wade GN. 1975. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J Comp Physiol Psychol* 88(1):183-193.
- Wade GN, and Heller HW. 1993. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am J Physiol* 264(6 Pt 2):R1219-1223.
- Walf AA, and Frye CA. 2005. ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* 30(9):1598-1609.
- Walf AA, and Frye CA. 2007. Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86(2):407-414.
- Walf AA, and Frye CA. 2010. Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav* 99(2):169-174.
- Walf AA, Paris JJ, Rhodes ME, Simpkins JW, and Frye CA. 2011. Divergent mechanisms for trophic actions of estrogens in the brain and peripheral tissues. *Brain Res* 1379:119-136.
- Walf AA, Rhodes ME, and Frye CA. 2004. Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 78(3):523-529.
- Wallen WJ, Belanger MP, and Wittnich C. 2001. Sex hormones and the selective estrogen receptor modulator tamoxifen modulate weekly body weights and food intakes in adolescent and adult rats. *J Nutr* 131(9):2351-2357.
- Walsh RN, and Cummins RA. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83(3):482-504.

Wasserman L, Flatt SW, Natarajan L, Laughlin G, Matusalem M, Faerber S, Rock CL, Barrett-Connor E, and Pierce JP. 2004. Correlates of obesity in postmenopausal women with breast cancer: comparison of genetic, demographic, disease-related, life history and dietary factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28(1):49-56.

Williams-Brown MY, Salih SM, Xu X, Veenstra TD, Saeed M, Theiler SK, Diaz-Arrastia CR, and Salama SA. 2011. The effect of tamoxifen and raloxifene on estrogen metabolism and endometrial cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* 126(3-5):78-86.

Yonezawa R, Wada T, Matsumoto N, Morita M, Sawakawa K, Ishii Y, Sasahara M, Tsuneki H, Saito S, and Sasaoka T. 2012. Central versus peripheral impact of estradiol on the impaired glucose metabolism in ovariectomized mice on a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303(4):E445-456.

Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, and Baade PD. 2012. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* 36(3):237-248.

Zhang JQ, Cai WQ, Zhou DS, and Su BY. 2002. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res* 935(1-2):73-80.

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neeffjes J, Mancini MA, and Michalides R. 2010. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* 123(Pt 8):1253-1261.