

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO SOBRE O TAMOXIFENO: PAPEL DOS RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO NA RESPOSTA TERAPÊUTICA E EFEITOS COGNITIVOS DO
TRATAMENTO**

MARTINA LICHTENFELS

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO SOBRE O TAMOXIFENO: PAPEL DOS RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO NA RESPOSTA TERAPÊUTICA E EFEITOS COGNITIVOS DO
TRATAMENTO**

MARTINA LICHTENFELS

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Porto Alegre

2016

BANCA EXAMINADORA

CAROLINE BRUNETTO DE FARIAS

Coordenadora de Pesquisa Celular e Molecular, ICI-RS

EDUARDO PANDOLFI PASSOS

Coordenador do GPPG, Colaborador do PPG em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

MÁRCIA SILVEIRA GRAUDENZ

Professora do PPG em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Gilberto Schwartsmann, pelas oportunidades, estímulo, entusiasmo e confiança. És um grande exemplo para mim. Muito obrigada por ter me acolhido nesta etapa tão importante.

Ao meu co-orientador, Rafael Roesler, pelos ensinamentos, disponibilidade e grande auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

As agências financiadoras CNPQ e FIPE/HCPA pelo incentivo a pesquisa.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e da Unidade de Experimentação Animal pela convivência, disponibilidade e contribuições para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Câncer e Neurobiologia pela convivência e troca de experiências. Agradeço especialmente à Arethusa Dornelles, Martina Blank, Fernanda Petry e Caroline Brunetto de Farias colaboradoras essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os coautores e colaboradores dos artigos desenvolvidos pelas contribuições.

Ao DKFZ, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, que me aceitou e proporcionou novos conhecimentos e perspectivas sobre a pesquisa. Especialmente ao Prof. Dr. Stefan Wiemann pela parceria, confiança e contribuições científicas.

Aos familiares, em especial para meus pais, Henriete e Ivo, e meu marido Diego pelo companheirismo, paciência e incentivo nesta etapa crucial de minha vida. Vocês estiveram sempre presentes, me ajudando muito nos momentos de dificuldade e dúvidas, mas também festejando nos momentos de alegria. Meu eterno agradecimento.

Agradeço também aos amigos que estiveram sempre presentes alegrando meus dias e me incentivando.

RESUMO – Capítulo 1

Introdução: Estimativas mostram que mais de dois terços das mulheres com câncer de mama possuem receptores hormonais positivos, e recebem terapia endócrina como tratamento, sendo tamoxifeno (TAM) o tratamento padrão (EBCTCG 2005; Davies *et al.*, 2012). Porém, muitas pacientes se tornam resistentes com o passar do tempo. Estudos prévios mostraram que a expressão do receptor de estrogênio β (RE β) aumenta a resposta ao tratamento com TAM em células de câncer de mama, assim como a coexpressão de RE α e RE β esta associada com maior ação proliferativa de TAM (Treeck *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014). Também foi observada a existência de “cross-talk” entre os RE e a família do receptor do fator de crescimento epidérmico (HER) na resposta ao tratamento com TAM (Lindberg *et al.*, 2011; Blows *et al.*, 2010). **Objetivo:** Verificar a expressão do RE β , e suas interações com RE α e receptores HER, durante o tratamento com TAM e em células resistentes ao TAM. **Métodos:** A expressão do RE β foi analisada em dois bancos de dados contendo informações de pacientes com câncer de mama. A expressão de RNAm dos RE, receptores HER e vias de sinalização PTEN, Akt e MAPK foram avaliadas após tratamento com TAM, em células resistentes ao TAM e em células silenciadas para os genes dos RE. Também foi avaliada a viabilidade celular após tratamento com TAM e nas células silenciadas para os genes dos RE. **Resultados:** Pacientes com câncer de mama apresentaram expressão reduzida do RE β , e os subtipos de câncer de mama RE α positivos apresentaram baixa expressão do RE β quando comparados aos subtipos RE α negativos. Células expressando níveis moderados de RE β apresentaram melhor resposta ao tratamento com TAM. Diminuição nos níveis dos RE é acompanhada por aumento nos níveis dos receptores ErbB2 e ErbB3, aumento de PTEN e diminuição de Akt e MAPK3 após tratamento com TAM. RE β modula a ação antiproliferativa do TAM através da via de MAPK3. Células resistentes ao TAM apresentaram baixos níveis dos RE e altos níveis dos receptores EGFR, ErbB3 e ErbB4. **Conclusão:** Estes resultados demonstram que o RE β , e suas interações com RE α e receptores HER, possuem papel importante na resposta ao tratamento com TAM.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama; Receptor de estrogênio; Receptores ErbB; Tamoxifeno; Resistência a medicamentos.

ABSTRACT – Chapter 1

Introduction: Approximately two-thirds of all breast cancer patients overexpress hormonal receptors, and are treated with endocrine therapy, being tamoxifen (TAM) the standard treatment. However many of initial responders to TAM as first-line experience relapse. Several mechanisms have been proposed to explain the occurrence of acquired TAM resistance. Previous studies showed that estrogen receptor β (ER β) expression is associated with better response to tamoxifen treatment, as the co-expression of ER α and ER β is associated with TAM antiproliferative effects. Moreover, there is growing interest about the cross-talk between ERs and ErbB family in response to endocrine therapy. Suggesting that TAM can act through ER β and/or ErbB family as compensatory pathways. **Objective:** To evaluate the expression of ER β and the relation of ER β with ER α and ErbB family in response to TAM treatment and in TAM resistant cells. **Methods:** ER β expression was analyzed in two different databases of breast cancer patients. The mRNA levels of ER, HER receptors and PTEN, Akt and MAPK signal pathways were measured after TAM treatment, in TAM resistance cells and in cells silenced for ER genes. The cellular viability was also measured after TAM treatment, in TAM resistance cells and in cells silenced for ER genes. **Results:** Breast cancer patients presented reduced ER β expression and the ER α -positive breast cancer subtypes presented lower ER β levels when compared to ER α -negative breast cancer subtypes. Cells expressing moderate levels of ER β presented better response to TAM treatment. Down-regulation of ERs induced by TAM treatment are accompanied with an increase in ErbB2 and ErbB3, reduced AKT and MAPK3 mRNA levels and increased PTEN levels. ER β modulates TAM anti-proliferative effects through MAPK3 pathway. TAM-resistant cells expressed decreased ER mRNA levels and increased EGFR, ErbB3 and ErbB4 levels. Demonstrating that the cross-talk between ERs and HER family influence the response to TAM treatment. **Conclusion:** These results provide additional data indicating the importance of ER β , and the relation with ER α and HER receptors, to predict TAM responsiveness.

KEYWORDS: Breast cancer; Estrogen receptor alpha; Estrogen receptor beta; ErbB receptors; Tamoxifen; Drug resistance.

RESUMO – Capítulo 2

Introdução: Aproximadamente 70% das pacientes com câncer de mama possuem tumores com receptores hormonais positivos, e estas pacientes são tratadas com terapia endócrina, sendo tamoxifeno (TAM) o tratamento padrão. Apesar de muito eficaz no tratamento do câncer de mama, o TAM é associado a diversos efeitos adversos, incluindo déficits cognitivos. Porém, os mecanismos pelos quais o TAM causa estes danos ainda necessitam ser elucidados. **Objetivo:** Investigar os efeitos do TAM e sua interação com os receptores de estrogênio (RE) na consolidação de memória através da tarefa de esquivas inibitória em ratas fêmeas. **Métodos:** No primeiro experimento, ratas Wistar fêmeas receberam oralmente doses únicas de TAM (1, 3, 10 mg/kg) ou solução salina imediatamente após o treino e foram testadas para retenção de memória 24h pós-treino. No segundo experimento, as ratas receberam injeção subcutânea de agonista do RE α ou agonista do RE β 30 minutos antes do treino. Após o treino, as ratas receberam uma dose oral de TAM 1 mg/kg e foram testadas 24h pós-treino. No terceiro experimento, as ratas foram treinadas e testadas 24h pós-treino. Imediatamente após o teste, as ratas receberam uma dose oral de TAM 1 mg/kg ou solução salina e foram testadas nas 24h seguintes por 5 dias, sendo no quinto dia realizado o teste reminder. **Resultados:** Tamoxifeno na concentração de 1 mg/kg causou danos na retenção de memória quando aplicado imediatamente pós-treino e o uso do agonista do RE α foi capaz de reverter este dano. Ainda, tamoxifeno na mesma concentração causou um atraso na extinção da memória. **Conclusão:** Estes achados indicam que os receptores de estrogênio regulam a primeira fase da consolidação da memória e também os efeitos de TAM na retenção da memória.

PALAVRAS-CHAVE: Tamoxifeno; Receptores de estrogênio; Esquiva inibitória; Memória; Cognição.

ABSTRACT – Chapter 2

Introduction: Approximately 70% of women with breast cancer have tumors positive for hormone receptors, and these patients undergo treatment with endocrine therapy, being tamoxifen (TAM) the most widely used agent. Despite being very effective in breast cancer treatment, TAM is associated with side effects that include cognitive impairments. However, the specific aspects and mechanisms underlying these impairments remain to be characterized. **Objective:** Here we have investigated the effects of TAM and interaction with estrogen receptors (ER) on formation of memory for inhibitory avoidance (IA) conditioning in female rats. **Methods:** In the first experiment, Wistar female rats received a single oral dose of tamoxifen (1, 3, or 10 mg/kg) or saline by gavage immediately after training and were tested for memory retention 24h after training. In the second experiment, rats received a subcutaneous injection with estrogen receptor α agonist or estrogen receptor beta agonist 30 minutes before the training. After training, rats received a single oral dose of tamoxifen 1 mg/kg and were tested 24h after training. In the third experiment, rats were trained and tested 24h later. Immediately after test, rats received a single dose of tamoxifen (1 mg/kg) or saline by gavage and were given four additional daily test trials followed by a reminder. **Results:** Tamoxifen at 1 mg/kg impaired memory retention when given immediately after training and the estrogen receptor alpha agonist improved these tamoxifen related memory impairment. Moreover, Tamoxifen caused delayed memory extinction. **Conclusion:** These findings indicate that estrogen receptors regulate the early phase of memory consolidation and the effects of tamoxifen on memory consolidation.

KEYWORDS: Tamoxifen; Estrogen receptor; Inhibitory avoidance; Memory; Cognition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento mamário e sua relação com os subtipos de câncer de mama.....	18
Figura 2 - Estratégia de busca de referências bibliográficas do capítulo 1.....	23
Figura 3 - Estratégia de busca de referências bibliográficas do capítulo 2.....	25
Figura 4 - Vias de ação do TAM no câncer de mama.....	30
Figura 5 - Representação esquemática dos domínios dos RE α e RE β	31
Figura 6 - Diferentes vias de sinalização ativadas pelos homo e heterodímeros de receptores HER.....	34
Figura 7 - Via de sinalização do estrogênio demonstrando as interações entre RE e receptores HER.....	36
Figura 8 - Vias de sinalização ativadas nos tumores de mama estrogênio positivos.....	38
Figura 9 - Fatores que influenciam a resposta ao tratamento com TAM.....	39
Figura 10 – Mecanismos de resistência adquirida ao tratamento com TAM: através da modulação dos RE, das vias compensatórias dos receptores tirosina quinase (RTK) e respostas de estresse.....	43
Figura 11 - Distribuição dos RE no cérebro.....	49
Figura 12 - Esquiva inibitória.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos subtipos de câncer de mama.....	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB - *Actin beta* - Beta-actina

AkT - *Protein kinase B* – Proteína quinase B

ANOVA - *One-way Analysis of Variance* – Análise de variância de uma via

ATCC - *American Type Culture Collection*

BDNF - *Brain-Derived Neurotrophic Factor* – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BRCA1 - *Breast Cancer 1, Early Onset gene* - gene do Câncer de mama 1, início precoce

BRCA2 - *Breast Cancer 2, Early Onset gene* - gene do Câncer de mama 1, início precoce

cDNA - *complementary Deoxyribonucleic Acid* - Ácido desoxirribonucleico complementar

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS - *Central Nervous System* – Sistema nervoso central

CPE - Centro de Pesquisa Experimental

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CPP - *Conditioned Place Preference* – Preferência condicionada de lugar

CYP2D6 - *Cytochrome P450, Family 2, Subfamily D, Polypeptide 6 gene* - citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6

DKFZ - *Deutsches Krebs Forschung Zentrum* – Centro Alemão de Pesquisa do Câncer

DPN - *Diarylpropionitrile*

EBCTCG - *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor* – Receptor do fator de crescimento epidérmico

ERK - *Extracellular Signal –Regulated Kinase* - Cinase reguladora de sinal extracelular

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ESR1 – *Estrogen Receptor 1 gene (α)* – Gene do receptor de estrogênio 1 (α)

ESR2 - *Estrogen Receptor 2 gene (β)* – Gene do receptor de estrogênio 2 (β)

FBS - *Fetal Bovine Serum* – Soro fetal bovino

FDA - *Food and Drug Administration*

FIPE - Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* – Glicerol-3-fosfato desidrogenase

GATA3 - Fator de transcrição de ação "trans" específico de células T

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor 2* - Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico

HER3 - *Human Epidermal growth factor Receptor 3* - Receptor tipo 3 do fator de crescimento epidérmico

HER4 - *Human Epidermal growth factor Receptor 4* - Receptor tipo 4 do fator de crescimento epidérmico

IHC - Imunohistoquímica

IAR - Inibidor de Aromatase

IA - *Inhibitory avoidance* – Esquiva inibitória

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase* – Proteína quinases ativadas por mitógenos

METABRIC - *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*

MTOR - *Mechanistic Target of Rapamycin* - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

PBS - *Phosphate-buffered solution*

PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase* - Fosfatidilinositol-3-quinase

PPT - *Propyl Pyrazole Triol*

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog* - Fosfatase homóloga a tensina

RE - Receptor de Estrogênio

RE α - Receptor de Estrogênio alfa

RE β - Receptor de Estrogênio beta

RNAi - *Ribonucleic Acid Interference* – Ácido ribonucleico de interferência

RNAm - *Messenger Ribonucleic Acid* - Ácido ribonucleico mensageiro

RP - Receptor de progesterona

RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SD - *Standard Deviations* – Desvio padrão

SERM - *Selective Estrogen Receptor Modulator* - Modulador seletivo do receptor de estrógeno

siRNAs - *small interfering RNAs*

TAM - Tamoxifeno

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TOR - Toremifeno

UEA - Unidade de Experimentação Animal

WST - *Water Soluble Tetrazolium Salt*

5FU - 5 Fluoro-Uracil

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

h - horas

kg – quilograma

μl – microlitro

ml – mililitro

μM – micromolar

mM - milimolar

mg – miligrama

g – gramas

s - segundos

SUMÁRIO

NOTA DO AUTOR.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES.....	22
2.2 CÂNCER DE MAMA.....	26
2.3 TAMOXIFENO.....	29
2.4 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E CÂNCER DE MAMA.....	31
2.5 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E TRATAMENTO COM TAMOXIFENO.....	33
2.6 RECEPTORES TIROSINA QUINASE E CÂNCER DE MAMA.....	33
2.7 RECEPTORES TIROSINA QUINASE E RECEPTORES DE ESTROGÊNIO.....	34
2.8 VIAS DE SINALIZAÇÃO E CÂNCER DE MAMA.....	36
2.9 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AO TAMOXIFENO.....	38
2.9.1 RE α e TAMR.....	40
2.9.2 RE β e TAMR.....	40
2.9.3 Família HER e TAMR.....	41
2.10 TAM E COGNIÇÃO.....	44
2.10.1 Estudos clínicos: TAM e cognição.....	44
2.10.2 Estudos pré-clínicos: TAM e cognição.....	47
2.11 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO TAM NA COGNIÇÃO.....	48
2.11.1 RE, TAM e memória.....	49
2.12 MEMÓRIA E ESQUIVA INIBITÓRIA.....	51
3. MARCO TEÓRICO.....	53
4. JUSTIFICATIVA.....	55
5. OBJETIVOS.....	57
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO.....	57
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7. ARTIGO 1- Capítulo 1.....	79
8. ARTIGO 2 – Capítulo 2.....	101
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	125

11. ANEXO – Experimentos adicionais artigo 2.....	126
--	------------

NOTA DO AUTOR:

Durante o desenvolvimento das pesquisas que levaram a esta tese, tínhamos como objetivo inicial a realização de estudos que explorassem os potenciais efeitos do agente antiestrogênico Tamoxifeno em modelos de função cognitiva. Informações desta natureza, tratando-se de pacientes que muitas vezes apresentam longa evolução, são de fundamental importância. Assim o fizemos e obtivemos resultados de grande interesse.

Contudo, e para minha sorte, surgiu a oportunidade de realizar estudos complementares à tese em um importante laboratório de pesquisas do câncer na Alemanha. Embarquei, então, nesta nova etapa, na qual fui surpreendida por uma oportunidade ímpar de aprofundar estudos sobre mecanismos de resistência ao Tamoxifeno em câncer de mama.

Esta experiência foi maravilhosa e me permitiu ganhar experiência com técnicas em laboratório, às quais não tinha sido exposta anteriormente. Além da relevância das perguntas que desejávamos responder sobre a ação do Tamoxifeno, fomos vencidos pela riqueza dos resultados obtidos.

E então surgiu o dilema. Como acomodar dois projetos simultâneos sobre o Tamoxifeno, um deles sobre seus receptores e mecanismos de resistência, e o outro sobre seus potenciais efeitos cognitivos, tendo como base um modelo em roedores? Meu orientador e eu, decidimos, em respeito à forma e sem prejuízo do conteúdo, dividir a tese em 2 capítulos. O capítulo 1 englobando o material produzido durante o doutorado sanduíche, e o capítulo 2 com o material sobre efeitos cognitivos do Tamoxifeno.

1. INTRODUÇÃO

Câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente no mundo, sendo o tumor mais comum em mulheres (PARKIN et al., 2005). As taxas de incidência desta neoplasia variam bastante nas diferentes regiões do mundo. No Brasil, as incidências de câncer de mama são muito elevadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, possivelmente devido fatores ambientais, como dieta rica em gordura e carne vermelha, consumo de álcool e tabagismo, e fatores genéticos da população destas regiões (INCA 2016). Apesar dos avanços no tratamento do câncer de mama, as taxas de morbidade e mortalidade continuam sendo muito elevadas e estão relacionadas à alta heterogeneidade da neoplasia mamária (INCA 2016).

Nos últimos anos, com o advento de novos conhecimentos de biologia molecular, o câncer de mama passou a ser subdividido em subtipos moleculares de acordo com a expressão de marcadores específicos (PEROU et al., 2000; Cancer Genome Atlas Network 2012). Os principais marcadores utilizados na decisão terapêutica no câncer de mama são os receptores hormonais (estrógeno e progesterona), a expressão de receptor de superfície da família do EGFR denominado EGFR-2 ou HER-2 e a quantificação percentual de atividade proliferativa pelo ki-67 (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD 2016).

Devido a sua alta heterogeneidade, o câncer de mama possui vários subgrupos prognósticos ainda pouco estudados. Nós chamados “triplo-negativos”, ou seja, os tumores sem a expressão marcadores hormonais ou amplificação de receptores HER-2, há hoje vários subgrupos identificados, como, por exemplo, tumores cujo crescimento é mais dependente da ação de andrógenos, ou com maior expressão de marcadores imunológicos, dentre outros (Figura 1) (PRAT; PEROU, 2009).

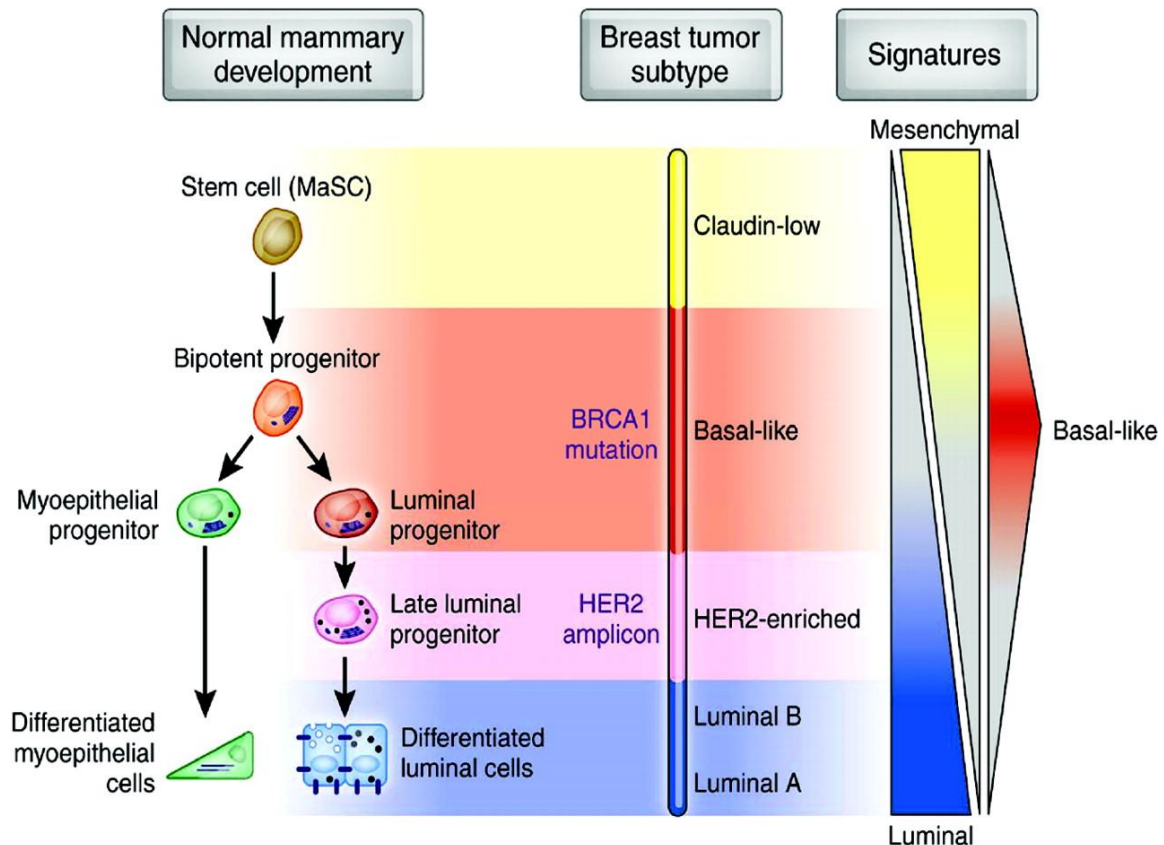


Figura 1. Desenvolvimento mamário e sua relação com os subtipos de câncer de mama (PRAT; PEROU, 2009).

O avanço da tecnologia tem permitido um maior conhecimento do câncer de mama e com isto a descoberta de novos tratamentos cada vez mais específicos e eficazes (ENGEBRAATEN et al., 2013; TOSS et al., 2015). Porém, estes tratamentos muitas vezes causam efeitos adversos e geram resistência após períodos de tratamento mais prolongados (FORETOVA et al., 2010).

Aproximadamente 70% das mulheres com câncer de mama apresentam expressão de receptores de estrogênio (RE) ou receptores de progesterona (RP) positivos no tumor (ENGEBRAATEN et al., 2013). Em consequência, estas pacientes recebem terapia hormonal, sendo o tamoxifeno (TAM) um dos tratamentos mais utilizados (DEL RE et al., 2012; NCCN, 2009; EBCTCG, 2005; DAVIES et al., 2013). O TAM possui efeito agonista ou antagonista em RE, dependendo do tecido em questão. No tecido mamário, ele age como antagonista, ligando-se aos RE das células de câncer de mama e inibindo sua proliferação (BRENTANI; FELDMAN, 1995; SENGUPTA; JORDAN, 2008). Em contraste, no endométrio ele possui ação agonista, estimulando a proliferação celular, o que pode aumentar o risco de neoplasia endometrial (KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

Até o presente, foram identificados dois tipos de RE, o RE α e o RE β . O RE α é utilizado como marcador diagnóstico, prognóstico e para a escolha do tratamento de pacientes com câncer de mama (KARAMOUZIS et al., 2016). Já o RE β não tem sua ação ainda totalmente elucidada (PALMIERI et al., 2002; HARRINGTON et al., 2003; ESCANDE et al., 2006). Estudos sugerem que os RE β podem modular a atividade de transcrição dos RE α , inibindo a proliferação celular (OMOTO et al., 2003; REESE et al., 2014). E por apresentarem baixa expressão em células de tumores mamários, são considerados como supressores tumorais (BARDIN et al., 2004; GALLO et al., 2012; PIPERIGKOU et al., 2016).

Além disto, estudos sugerem que a expressão de RE β esteja associada a uma melhor resposta ao tratamento com TAM em células de câncer de mama (TREECK et al., 2010; SUN et al., 2014). E que estes receptores atuam através de vias de sinalização envolvendo PTEN, AKT e MAPK, interagindo com receptores HER2 e HER3, no sentido de aumentar a resposta ao tratamento com TAM (WU et al., 2011; LINDBERG et al., 2011). Modelos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a existência de uma relação entre a expressão de RE e receptores HER, o que influencia na resposta dos tumores mamários ao TAM (LINDBERG et al., 2011; BLOWS et al., 2010). Por atuarem pelas mesmas vias de sinalização, como MAPK, AKT, PTEN, os RE podem ativar receptores HER e os receptores HER, por sua vez, também podem ativar os RE (OSBORNE; SCHIFF, 2011).

Os RE e os receptores HER também estão envolvidos na resistência adquirida ao tratamento com TAM (MA et al., 2016). Mais de 50% das pacientes que respondem inicialmente ao tratamento com TAM tornam-se resistentes a esta terapêutica (EBCTCG, 2005; DAVIES et al., 2013). A perda de expressão dos RE α , a alta expressão de variante RE α 36 e a ligação do TAM aos RE α com ação agonista são alguns mecanismos conhecidos que induzem resistência em pacientes com câncer de mama ER α + (JOHNSTON et al., 1995; ARPINO et al., 2004; THRANE et al., 2013). O papel dos RE β na resistência adquirida ao TAM ainda é pouco conhecida. Alguns estudos sugerem que a baixa expressão de RE β esteja associada à ocorrência de resistência ao TAM em células ER α + (ESSLIMANI-SAHLA et al., 2004; CHEN et al., 2005; PITTA et al., 2013). Porém, esta relação não foi observada em outros estudos (SHAW et al., 2006; SPEIERS et al., 1999). Além disto, a expressão elevada dos receptores HER e a ativação das vias de AKT, MAPK também estão associadas ao desenvolvimento de resistência do TAM (BLOCK et al., 2012, GHAYAD et al., 2010).

O melhor conhecimento do perfil genético e da expressão gênica de tumores de mama é de extrema importância para que se obtenha um maior entendimento do papel dos RE na

doença, para que se possa tornar o tratamento personalizado, diminuir efeitos adversos e evita a ocorrência de resistência (GONZALEZ-ANGULO et al., 2007; RASTELLI et al., 2008; MITTENDORF et al., 2016). Devido ao crescente interesse no papel dos RE β e a falta de estudos conclusivos sobre sua função na resposta ao tratamento do câncer de mama, é importante que o papel dos RE β e suas interações com RE α e receptores HER na resposta ao tratamento com TAM seja melhor estudado.

Diversos efeitos adversos relacionados ao tratamento com TAM têm sido extensivamente investigados em estudos clínicos e experimentais, porém o efeito do mesmo na função cognitiva ainda é pouco conhecido (CHEN et al., 2014; BOELE et al., 2015; GANZ et al., 2016). Pacientes tratadas com TAM apresentam mais danos cognitivos comparadas a pacientes submetidas a quimioterapia e pacientes saudáveis (BENDER et al., 2006; CHEN et al., 2014; GANZ et al., 2016). Em estudos pré-clínicos foram demonstradas alterações de memória e aprendizado após tratamento com TAM (CHEN et al., 2002; WALKER et al., 2011), porém os mecanismos pelos quais o TAM causa déficits cognitivos ainda não estão estabelecidos.

Como já mencionado, o TAM se liga aos RE evitando a interação com o estrogênio, podendo ativar ou inibir proliferação celular (BRENTANI; FELDMAN, 1995; WILLIAMS; STANCEL, 1996), porém no hipocampo a resposta dos RE ao TAM ainda é desconhecida.

Alguns estudos sugerem que o uso de agonistas de RE α e de RE β podem causar dano ou melhora na memória de roedores, e esta resposta depende do regime de tratamento e do teste comportamental utilizado (JACOME et al., 2010; TALEBI et al., 2010; PISANI et al., 2016). Portanto, novos estudos devem ser realizado com o objetivo de elucidar o papel dos RE nos déficits cognitivos causados pelo tratamento com TAM.

No capítulo 1 desta tese, avaliamos inicialmente a expressão dos RE β em dois bancos de dados, o METABRIC (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium) e o TCGA (The Cancer Genome Atlas), uma vez que ambos possuem RNAm de pacientes com câncer de mama e pacientes saudáveis (Cancer Genome Atlas, 2012). Nosso objetivo foi o de analisar se a sua expressão possui valor prognóstico ou preditivo de resposta no câncer de mama. Após, realizamos testes *in vitro* em células MCF7 e T47D, as quais representam tumores mamários com expressão positiva para RE e RP. Nosso objetivo nesta etapa do estudo foi verificar como a expressão de RE, e RE β em particular, e de receptores HER influenciam na resposta ao TAM. Inicialmente, foram tratadas células MCF7 e T47D com quatro concentrações distintas de TAM por 24h, 48h e 72h. Após, avaliamos a viabilidade

celular e os níveis de RNAm dos RE, receptores HER e de proteínas que participam das vias de sinalização que envolvem AKT, MAPK e PTEN.

Na etapa seguinte, para avaliarmos a influência dos RE β na proliferação tumoral e suas interações com os RE α e receptores HER, silenciámos os genes dos RE α e RE β nas células MCF7 e avaliamos novamente a viabilidade celular e os níveis de RNAm dos RE, receptores HER e das proteínas acima mencionadas. Por fim, com o objetivo de verificar o papel dos RE β e suas interações com os outros receptores na resistência adquirida ao TAM, analisamos a expressão dos níveis de RNAm dos RE, receptores HER e das vias de AKT, MAPK e PTEN em células MCF7 resistentes ao tratamento com TAM. Estas células MCF7 foram tornadas resistentes ao tratamento com TAM, após incubação com baixas doses de TAM por aproximadamente 12 meses. Em paralelo, foram cultivadas células MCF7 parentais, as quais serviram de controle para estes experimentos.

No capítulo 2 da tese, com o intuito de verificar a ligação entre terapia endócrina e alterações cognitivas, investigamos o efeito agudo de TAM, e sua interação com os receptores de estrogênio em modelo animal de memória motivada emocionalmente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Capítulo 1

Esta revisão da literatura esta focada nos aspectos relacionados ao papel do receptor de estrogênio beta no câncer de mama e na resposta ao tratamento com tamoxifeno. Também foram focados na relação entre receptores de estrogênio, alpha e beta, receptores HER e as vias de sinalização Akt, PTEN e MAPK na resposta ao tratamento com tamoxifeno. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed, no período de 1987 a 2016. As buscas foram realizadas através dos termos: “breast cancer”, “estrogen receptors”, “ErbB receptors”, “tamoxifen”, “Akt”, “PTEN”, “MAPK”, “tamoxifen resistance”, e suas combinações. As referências bibliográficas dos artigos encontrados foram revisadas para localizar outros estudos não contemplados na busca. A revisão sistemática está representada na figura 2.

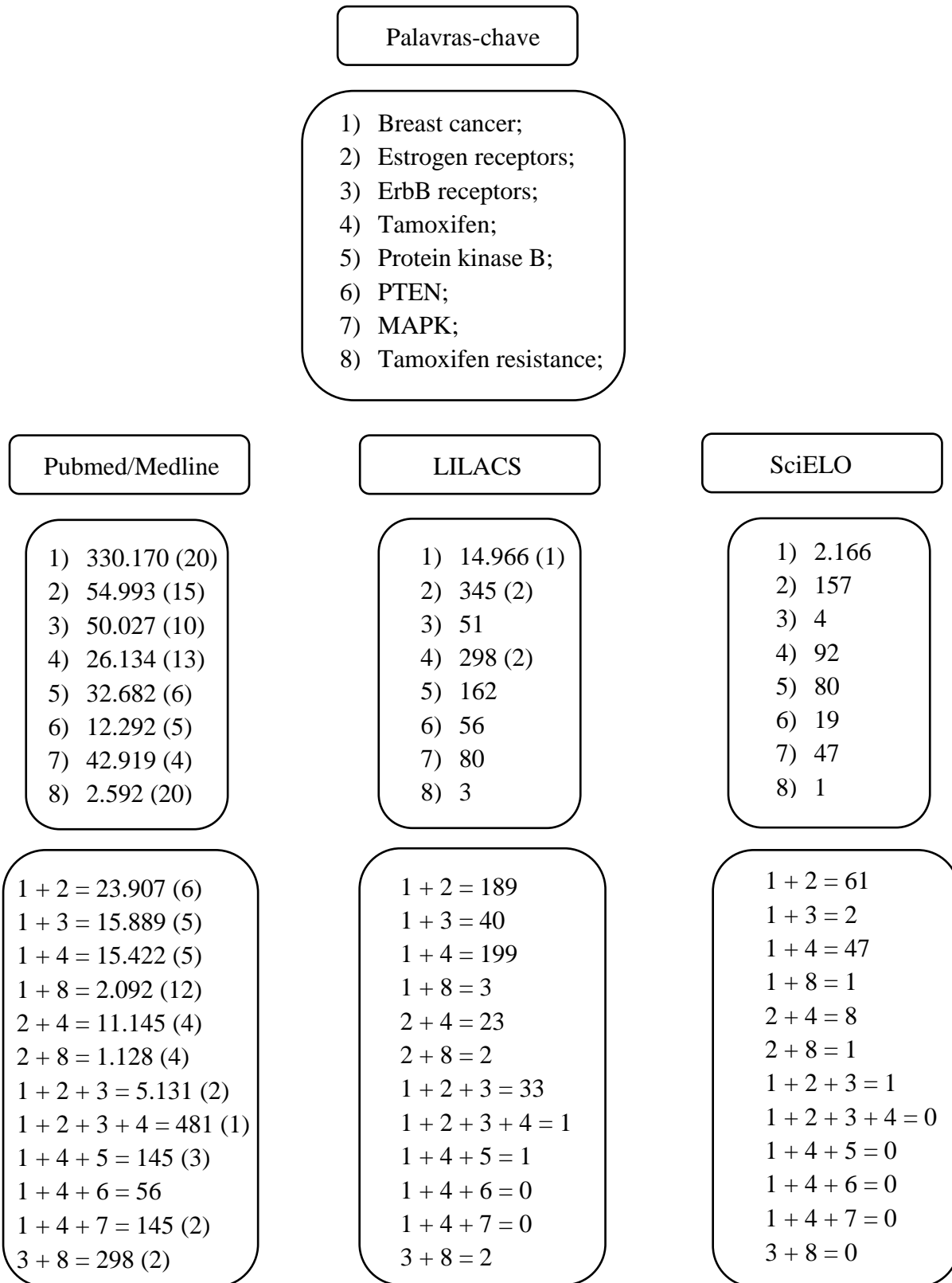


Figura 2. Estratégia de busca de referências bibliográficas do capítulo 1. O número de referências selecionadas está entre parênteses. Fonte: Adaptado pela autora (2016).

Capítulo 2

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados a déficits de memória causados pelo tratamento com tamoxifeno. Também focados no papel dos receptores de estrogênio, alpha e beta, nos danos de memória causados pelo tamoxifeno. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO, PubMed no período de 1900 a 2016. Foram realizadas buscas através dos termos: “breast cancer”, “estrogen receptor”, “estrogen receptor alpha”, “estrogen receptor beta”, “tamoxifen”, “memory”, “cognition”, “hippocampus”, e suas combinações. As referências bibliográficas dos artigos encontrados foram revisadas para localizar outros estudos não contemplados na busca. A revisão sistemática está representada na figura 3.

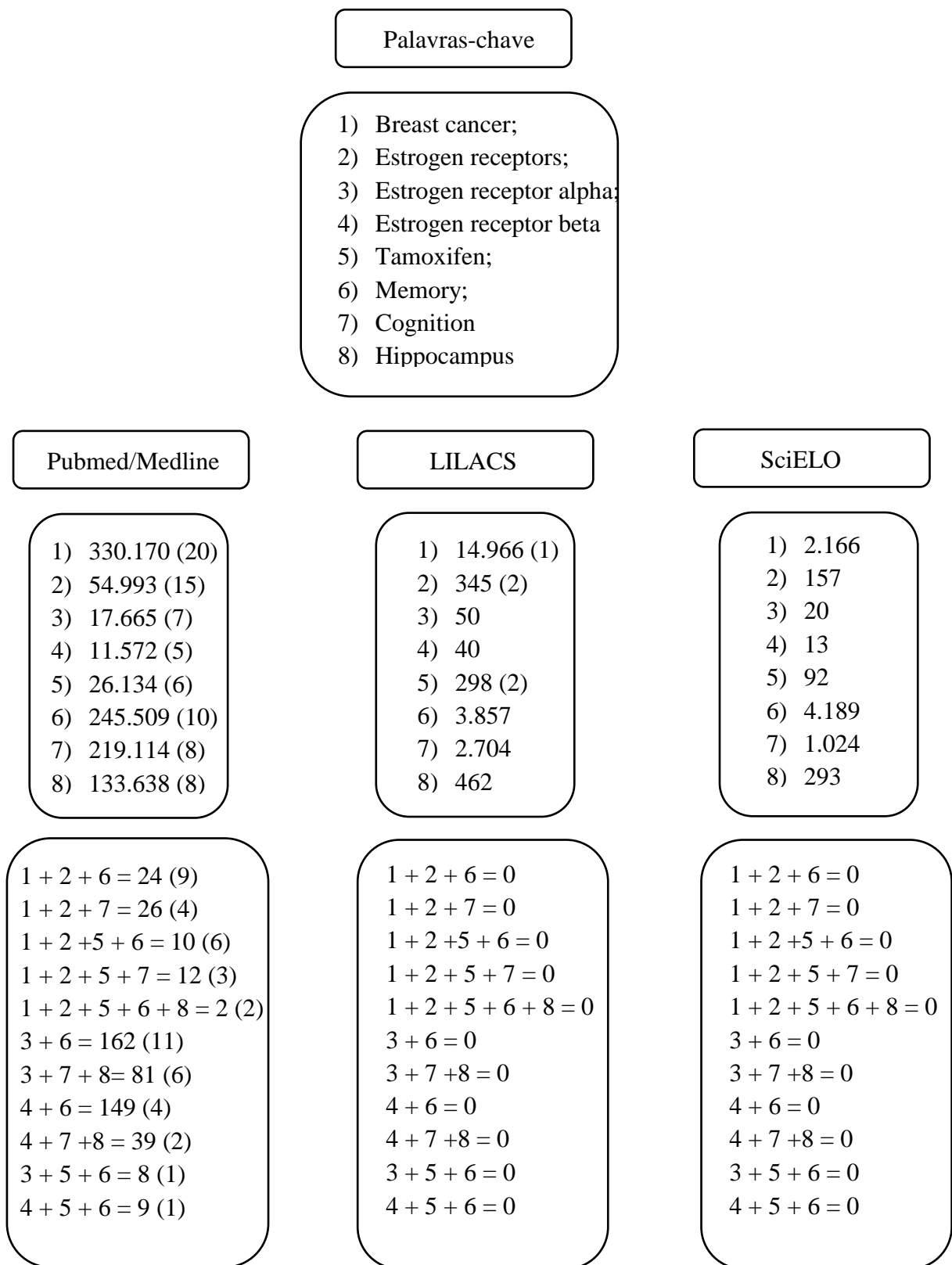


Figura 3. Estratégia de busca de referências bibliográficas do capítulo 2. O número de referências selecionadas está entre parênteses. Fonte: Adaptado pela autora (2016).

2.2 Câncer de mama

Câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente no mundo, sendo o tumor mais comum em mulheres (23%) (PARKIN et al., 2005). As taxas de incidência desta neoplasia variam bastante nas diferentes regiões do mundo. No Brasil as incidências de câncer de mama são muito altas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, e apesar dos avanços no tratamento do câncer de mama as taxas de mortalidade continuam sendo muito elevadas (INCA 2016). Este número elevado de mortes está relacionado ao fato do câncer de mama ser uma doença muito heterogênea, e ainda hoje poucos marcadores diagnósticos e prognósticos são conhecidos, dentre os principais se encontram o RE, RP e HER2 (ENGEBRAATEN et al., 2013).

O câncer de mama pode ser classificado de acordo com seu perfil de expressão gênica em 5 diferentes subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2, Basal e Normal (Tabela 1) (PEROU et al., 2000; Cancer Genome Atlas Network 2012). Em 2009, com o surgimento do teste com micro-arranjos de DNA denominado PAM50, baseado na expressão gênica de 50 genes, os 5 subtipos conhecidos de câncer de mama foram divididos em 4 subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2 e Basal (PARKER et al., 2009; PRAT et al., 2015).

Os subtipos luminais expressam genes presentes nas células luminais do tecido mamário normal e representam a maioria dos cânceres de mama. O subtipo Luminal A apresenta positividade para RE, e RP, negatividade para HER2 e baixa expressão de KI67 (GOLDHIRSCH et al., 2013). Normalmente, pacientes deste subtipo possuem mutações nos genes PIK3CA, GATA3 e MAP3K1 (Cancer Genome atlas Network 2012). Estes compreendem aproximadamente 40% de todos os cânceres de mama e possuem um bom prognóstico devido à possibilidade do uso de terapia hormonal (Cancer Genome Atlas Network 2012; ENGEBRAATEN et al., 2013).

O subtipo luminal B se distingue do Luminal A por ter menor expressão de RE, não expressar ou apresentar maior expressão de KI67 e ser positivo para HER2 (GOLDHIRSCH et al., 2013). Este pode ser tratado com combinações de tratamentos dependendo da expressão dos marcadores. Tumores RE e KI67 positivos, e HER2 negativos normalmente são tratados com combinação de terapia endócrina e quimioterapia, e tumores RE e HER2 positivos, e KI67 negativos são tratados com quimioterapia, endócrino terapia, e terapia anti-HER2 (TOSS et al., 2015).

Sendo aproximadamente 15% dos tumores de mama, o subtipo HER2 apresenta quantidade variável de receptores hormonais, geralmente sendo RE e RP negativos, mas possuindo superexpressão do protooncogene HER2 (TOSS et al., 2015). Pacientes HER2 positivas vem apresentando uma grande melhora no prognóstico com o uso do anticorpo monoclonal anti-HER2, esta terapia alvo age no gene HER2 inibindo o crescimento das células neoplásicas (Cancer Genome Atlas Network 2012; ENGEBRAATEN et al., 2013).

O câncer de mama basal representa aproximadamente 15% dos casos de câncer de mama e possui a tendência de afetar pacientes jovens. É reconhecido por apresentar um padrão de expressão gênica bastante semelhante das células epiteliais basais do tecido mamário saudável apresentando alta expressão de queratinas 5 e 17, e laminina (TOSS et al., 2015; ENGEBRAATEN et al., 2013). Ainda, possuem superexpressão de EGFR e mutações no gene TP53 (CIDADO et al., 2013; SHAH et al., 2012). Contudo, estes tumores apresentam características semelhantes às células tronco tumorais ou células progenitoras (RICARDO et al., 2011; DE BEÇA et al., 2013). Devido sua negatividade para os receptores hormonais (RE, RP) e baixa ou nenhuma expressão de HER2, esta neoplasia muitas vezes é classificada como triplo negativa.

Os tumores triplo-negativos normalmente acometem mulheres jovens que se encontram na pré-menopausa, e que apresentam mutação no gene BRCA1 e 2 (LINDNER et al., 2013; ENGEBRAATEN et al., 2013; KROENKE et al., 2014). Tumores triplo-negativos geralmente apresentam características do subtipo basal e tumores basais normalmente são classificados como triplo-negativos (CIDADO et al., 2013). Pela ausência de marcadores específicos para este subtipo de câncer de mama, o tratamento consiste em quimioterapia e por isto apresenta um pior prognóstico.

O subtipo normal possui padrão de expressão gênica similar as células epiteliais normais, tecido adiposo e outras células não-epiteliais, mas não apresentam genes associados com proliferação (SORLIE et al., 2001).

Tabela 1. Classificação dos subtipos de câncer de mama.

Subtipos de câncer de mama	IHC	Tratamento	Incidência (%)	Prognóstico
Luminal A	RE+, PR+, HER2-, Ki67↓	Terapia endócrina podendo ser acompanhada de quimioterapia	40	Melhor prognóstico, ↑ sobrevida, ↓ recorrência
Luminal B	RE+, PR+, HER2-, Ki67↑	Terapia endócrina + Quimio	24	Bom prognóstico, ↑ sobrevida
	RE+, PR+, HER2+, Ki67-	Terapia endócrina + Quimio + Terapia anti-HER2		
HER2	RE-, PR-, HER2+	Quimio + Terapia anti-HER2	15	Prognóstico ruim, recorrência frequente
Basal	RE-, PR-, HER2-	Quimio	15	Pior prognóstico, muito agressivo
Normal	Genes basais, mioepiteliais, tecido adiposo	Quimio	2	Bom prognóstico

(GOLDHIRSCH et al., 2013; NORUM et al., 2014; Adaptado de TOSS et al., 2015)

Os diferentes subtipos moleculares de câncer de mama possuem diferentes fatores de risco, incidências, prognósticos, e sensibilidade aos diferentes tratamentos (PHIPPS et al., 2011(a); PHIPPS et al., 2011(b); RITTE et al., 2012).

Diversos fatores de risco têm surgido como possíveis causadores desta neoplasia, dentre eles fatores genéticos, como história familiar e história prévia de câncer de mama, e fatores ambientais, como dieta, fumo, consumo de álcool, uso de hormônios, e exposição à radiação ionizante (ROMAN et al., 2014; ARCE-SALINAS et al., 2014; TRENTHAM-DIETZ et al., 2014; NYANTE et al., 2014). Porém em muitos casos de carcinoma mamário diagnosticados, estes fatores de risco não estão presentes (CAREY et al., 2009; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2005).

Os tratamentos de rotina para câncer de mama consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormônio terapia e terapia alvo (PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD 2016). Porém, como previamente explicado, devido os diferentes perfis de expressão gênica do câncer de mama, os tratamentos muitas vezes não são eficazes e causam muitos efeitos adversos (FORETOVA et al., 2010).

Por esta razão, diversos pesquisadores têm focado seus interesses no melhor conhecimento do perfil genético e da expressão gênica de tumores de mama para assim obter um maior entendimento da doença e tornar seu tratamento cada vez mais personalizado.

2.3 Tamoxifeno

Estimativas demonstram que mais de dois terços das mulheres com câncer de mama possuem RE ou RP positivos, e estas pacientes recebem terapia hormonal como tratamento adjuvante, ou como tratamento primário quando o câncer de mama for metastático (DEL RE et al., 2012; DIAB et al., 2000; NCCN, 2009). Portanto, terapias hormonais são de extrema importância para a grande maioria das pacientes com câncer de mama.

Estes tumores estrogênio positivos (RE+) dependem da sinalização de estrogênio para sua proliferação e sobrevivência, e podem ser tratados por terapia anti-estrogênio com tamoxifeno (TAM) ou inibidores de aromatase (IA).

Tamoxifeno é o tratamento padrão para câncer de mama primário e avançado, e vem demonstrando bons resultados na clínica (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG), 2005; DAVIES et al., 2013). O uso de TAM como tratamento adjuvante para câncer de mama foi aprovado em 1977 pelo FDA (US Food and Drug Administration), e subsequente o mesmo órgão aprovou seu uso como profilaxia do carcinoma mamário em mulheres pré e pós-menopausa com alto risco de desenvolver a doença (DEL RE et al., 2012).

O uso de TAM por 5 anos, tratamento padrão atualmente, reduz o risco anual de recorrência do câncer de mama em 39% das pacientes (EBCTCG, 2005). Porém, em estudo mais atual foi demonstrado que o uso de TAM por 10 anos após o diagnóstico de câncer de mama obteve maior redução na recorrência e mortalidade do câncer de mama quando comparada ao uso de TAM por 5 anos (DAVIES et al., 2013).

Tamoxifeno é um pró-fármaco que necessita ser metabolizado pelas células do fígado para formar metabólitos ativos que irão exercer suas funções de agonista ou antagonista de estrogênio (ANTUNES et al., 2015). A atividade farmacológica do TAM depende de diferentes fatores como: tecido no qual o receptor está expresso, tipo de receptor no qual ocorre a interação, e objetivo celular final mensurado. Podendo agir como agonista do estrogênio, estimulando proliferação de células do endométrio aumentando a chance de

desenvolvimento de neoplasia endometrial, ou agindo como antagonista, se ligando aos RE das células de câncer de mama humano inibindo sua proliferação celular (BRENTANI; FELDMAN, 1995; WILLIAMS; STANCEL, 1996).

Na via clássica, o estrogênio se liga aos RE, e este ligante irá se ligar aos elementos de resposta ao estrogênio ativando a transcrição de genes que promovem e regulam proliferação e sobrevivência celular, angiogênese e metástase (AO et al., 2011).

O TAM é metabolizado nas células do fígado pelo citocromo P450, onde a subunidade CYP2D6 converte TAM em seus metabólitos ativos, como 4-hidroxitamoxifeno e endoxifeno que são até 100 vezes mais ativos que TAM. Estes metabólitos ativos se ligam aos RE das células de câncer de mama, alterando a conformação do complexo formado naturalmente pelo estrogênio. Consequentemente, não ocorre a ligação aos elementos de resposta ao estrogênio e a transcrição dos genes que promovem proliferação e sobrevivência celular são bloqueadas. Assim, impedindo o aumento do tumor, sua recorrência e metástase (Figura 4) (SENGUPTA; JORDAN, 2008).

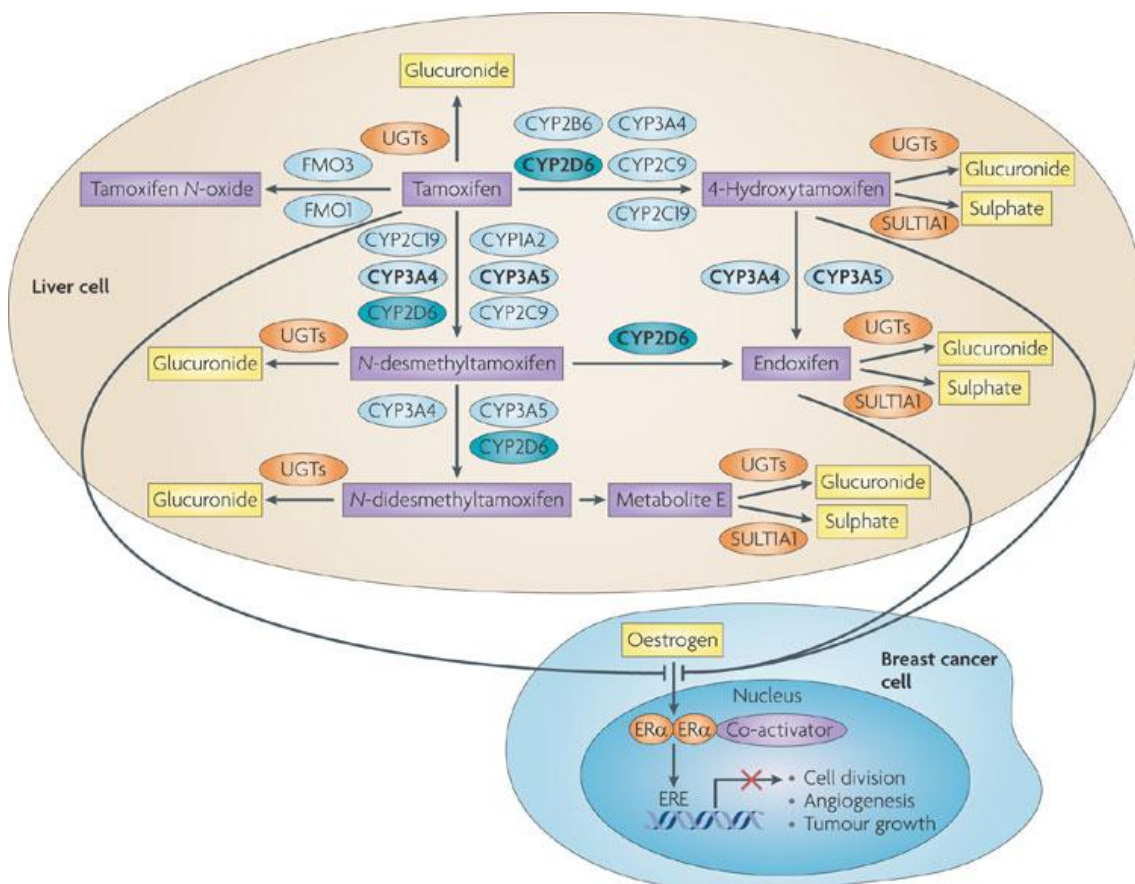


Figura 4. Vias de ação do TAM no câncer de mama (HOSKINS et al., 2009).

2.4 Receptores de estrogênio e câncer de mama

Existem dois tipos de RE, RE α e RE β , sendo o RE α de maior afinidade com estrogênio. Ambos são membros da superfamília de receptores nucleares, e mesmo sendo codificados por genes em cromossomos diferentes, apresentam estruturas proteicas com homologia considerável (FOX et al., 2008).

Estes receptores apresentam estrutura composta por 6 domínios: A-F (Figura 5). O domínio A/B ou N-terminal possui a região responsável pela ativação transcricional do RE na ausência de ligantes, denominada de região AF-1 (OSBORNE et al., 2001). Conhecido como domínio de ligação ao DNA (DBD, DNA-binding domain), o domínio C está localizado na porção central da molécula, e atua na dimerização do receptor e na ligação do RE a sequências específicas no DNA (KUMAR; THOMPSON, 1999; ZWART et al., 2010). O domínio D é o local de articulação entre os domínios C e E, e inclui a região de sinalização de localização nuclear (NORRIS et al., 1997; ZWART et al., 2010). Também chamado de domínio de ligação ao ligante (LBD, ligand-binding domain), o domínio E é o segundo sítio de sinalização de localização nuclear (ZWART et al., 2010). É responsável pela dimerização do receptor, pelo reconhecimento do hormônio e dos SERMs e pela seletividade e especificidade da resposta desencadeada, realizada através da ativação do sítio AF-2 (TZUKERMAN et al., 1994; ZWART et al., 2010). O domínio F, localizado na região C-terminal da molécula, modula as ações de AF-1 e AF-2 (TZUKERMAN et al., 1994; OSBORNE et al., 2001).

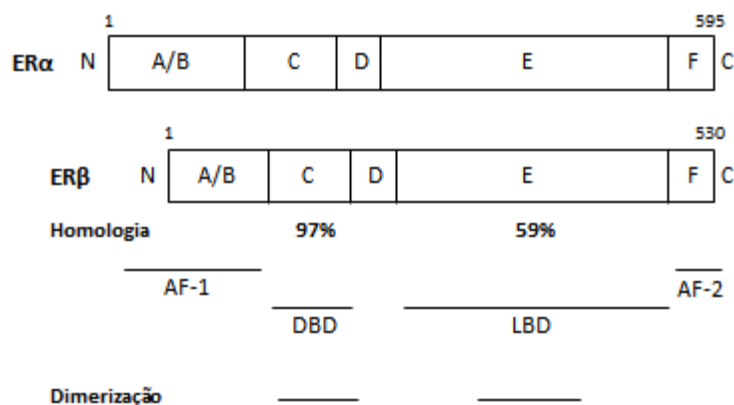


Figura 5. Representação esquemática dos domínios dos RE α e RE β (Adaptado de FOX et al., 2008).

RE α está presente em 40-70% dos tumores mamários (COLDITZ, 1998; OSBORNE, 1998) e sua presença tem sido utilizada como marcador diagnóstico, prognóstico e para escolha de tratamento (KARAMOUZIS et al., 2016).

Existem 5 isoformas de RE β , RE β 1-5, estas apresentam similaridade na estrutura primária dos genes e diferem a partir da região C-terminal (LEUNG et al., 2006). RE β 1, RE β 2 e RE β 5 são as isoformas encontradas no câncer de mama. Diversos estudos sugerem que o RE β é capaz de modular a atividade transcricional do RE α inibindo proliferação celular (PETTERSON et al., 2000; OMOTO et al., 2003; REESE et al., 2014).

Preferencialmente, os RE α e RE β formam heterodímeros para exercer suas funções biológicas (COWLEY et al., 1997). Estes receptores podem ativar os mesmos genes por serem estruturalmente similares, porém também ativam genes específicos exercendo diferentes funções biológicas (PAECH et al., 1997; SAVILLE et al., 2000; EVERS et al., 2014). O RE β 1 é capaz de se ligar diretamente ao estrogênio mas também pode formar heterodímeros com RE α para exercer suas funções (HUANG et al., 2014), porém os RE β 2 e RE β 5 necessitam formar heterodímeros com RE β 1 para modular sua atividade transcricional, ou com RE α para antagonizar suas ações (LEUNG et al., 2012; POWELL et al., 2012).

A presença de RE β 1 está relacionada com maior sobrevida das pacientes, enquanto a expressão positiva de RE β 2 e RE β 5 esta associada com pior resposta clínica (ROSIN et al., 2014; WIMBERLY et al., 2014).

Os níveis de RE podem variar no tecido normal de acordo com a paciente e sua idade. Normalmente, o RE α é pouco expresso em tecido mamário normal enquanto o RE β é expresso por aproximadamente 85% das células epiteliais mamárias (HUANG et al., 2015).

No processo de carcinogênese mamária ocorre o oposto, é observada uma superexpressão do RE α e uma diminuição na expressão do RE β (JARZABEK et al., 2005; BIECHE et al., 2001; BORGQUIST et al., 2008). Este desbalanço entre os RE está associado ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama (CLEMONS; GLOSS, 2001; KHAN et al., 1994; JARZABEK et al., 2005; SUN et al., 2014). Por apresentar baixa expressão em células de tumores mamários e inibir o potencial proliferativo do RE α , o RE β é atualmente considerado supressor de tumor.

2.5 Receptores de estrogênio e tratamento com tamoxifeno

Estudos prévios evidenciaram que a expressão de RE β aumenta a resposta ao tratamento com TAM em células de câncer de mama, assim como a coexpressão de RE α e RE β está associada com maior ação proliferativa de TAM (HOPP et al., 2004; MURPHY et al., 2005; TREECK et al., 2010; SUN et al., 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram que a expressão de RE β atua através das vias de PTEN e Akt, e também através dos receptores HER2/HER3 para melhorar a resposta ao tratamento com TAM (WU et al., 2011; LINDBERG et al., 2011). Porém, discordando destes achados, foi demonstrado que a alta expressão de RE β esta relacionada a uma pior resposta a terapia hormonal e pior prognóstico das pacientes (GUO et al., 2014(a)).

Madeira e colegas não encontraram diferenças na expressão do RE β em amostras de pacientes antes e 26 dias após os tratamentos com IA, TAM e placebo (MADEIRA et al., 2013). Corroborando este achado, a expressão de RE β também não foi alterada quando comparadas amostras de pacientes antes e 3 meses após tratamento com TAM. Apenas os níveis do RE α foram diminuídos após o tratamento com TAM (MILLER et al., 2006).

Como não há consenso sobre o papel do RE β na resposta ao tratamento com terapia hormonal, novos estudos sobre o assunto se fazem necessários (MAEHLE et al., 2009; RIZZA et al., 2014).

2.6 Receptores tirosina quinase e câncer de mama

A família do receptor do fator de crescimento epidérmico (Human epidermal growth factor receptor, HER1), denominada de família HER, é constituída por 4 receptores tirosina quinase transmembrana: EGFR/HER1/ErbB1, HER2/c-erbB2, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4, que atuam em diversos processos celulares incluindo proliferação, diferenciação, migração, e invasão (ARTEAGA, 2003; HOLBRO et al., 2003).

Mutações ou amplificações nestes receptores são frequentemente encontradas no câncer (DEY et al., 2015; FERRARI et al., 2016). Estes receptores quando estimulados formam homo ou heterodímeros para exercer suas funções, atuando através de diferentes vias de sinalização e assim diversificando suas ações biológicas (Figura 6).

No câncer de mama, os dímeros atuam de diferentes maneiras, o homodímero de HER2 altera polaridade celular, o heterodímero HER2/EGFR induz proliferação e invasão celular, e heterodímeros HER2/HER3 aumentam as funções metabólicas do tumor, induzem proliferação, invasão e sobrevivência celular (SUO et al., 2002; KONECNY et al., 2003; OSBORNE; SCHIFF, 2011).

HER2 funciona como um receptor universal para os outros membros da família HER, e quando amplificado causa uma superexpressão do receptor na superfície das células do câncer de mama, estimulando proliferação, invasão e sobrevivência tumoral através da ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K/Akt (SLAMON et al., 1987; GRAUS-PORTA et al., 1997; MOASSER, 2007; DEY et al., 2015).

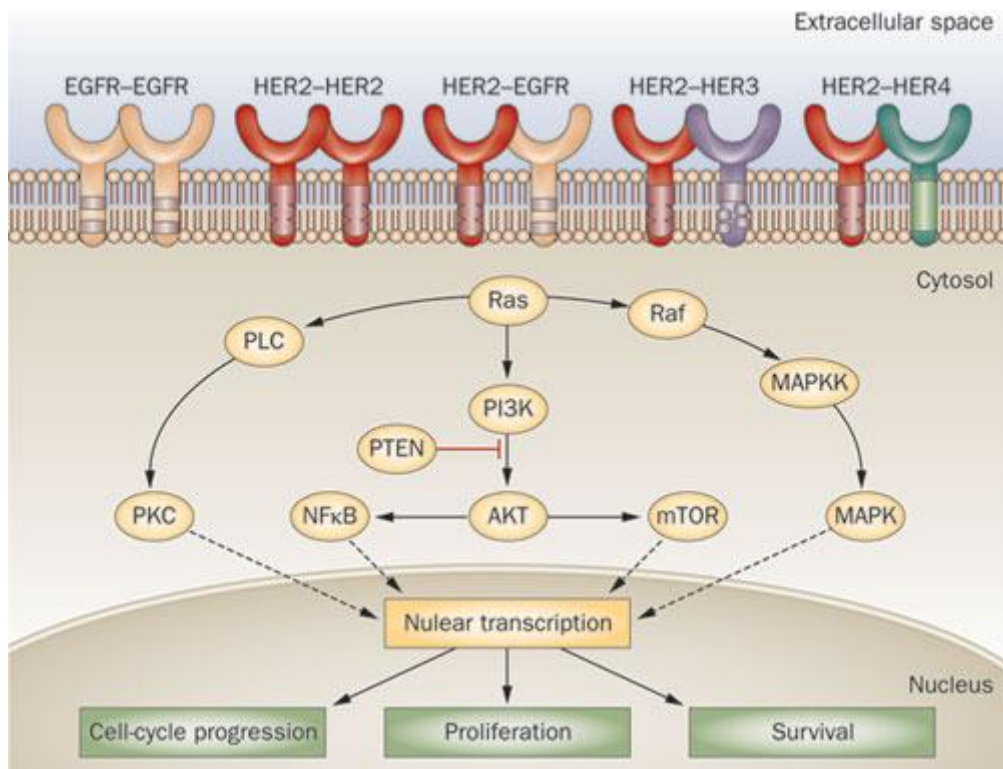


Figura 6. Diferentes vias de sinalização ativadas pelos homo e heterodímeros de receptores HER (FORNARO et al., 2011).

2.7 Receptores tirosina quinase e receptores de estrogênio

Modelos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a existência de “cross-talk” entre os RE e receptores HER (LINDBERG et al., 2011; BLOWS et al., 2010). Os RE podem atuar como

ativadores e reguladores da família HER e receptores HER podem ativar, através de fosforilação, os RE (OSBORNE; SCHIFF, 2011) (Figura 7).

Estudos prévios demonstraram que a expressão de RE em pacientes HER2 positivas modifica o perfil clínico, prognóstico e resposta ao tratamento nestas pacientes (BLOWS et al., 2010; GARCIA-FERNANDES et al., 2012).

Em pacientes com câncer de mama, foi constatado por IHC (imunohistoquímica) que a expressão de RE β em pacientes com câncer de mama esta correlacionada positivamente com expressão de HER2 (UMEKITA et al., 2006; GUO et al., 2014(b)), porém o RE α não teve correlação com HER2 (GUO et al., 2014(b)).

Lindberg e colegas demonstraram que em células MCF7 e T47D induzidas para expressar RE β , a expressão de Akt e HER2/HER foi diminuída, enquanto a expressão de PTEN foi aumentada, e com isto as células responderam melhor ao tratamento com TAM. Os autores sugerem que RE β esta associado com melhor resposta ao tratamento ao TAM e esteja atuando através da inibição de HER2/HER3, e pelas vias de PTEN e Akt (LINDBERG et al., 2011). Estes estudos evidenciam que o “cross-talk” entre RE e receptores HER esta atuando diretamente na resposta ao tratamento do câncer de mama.

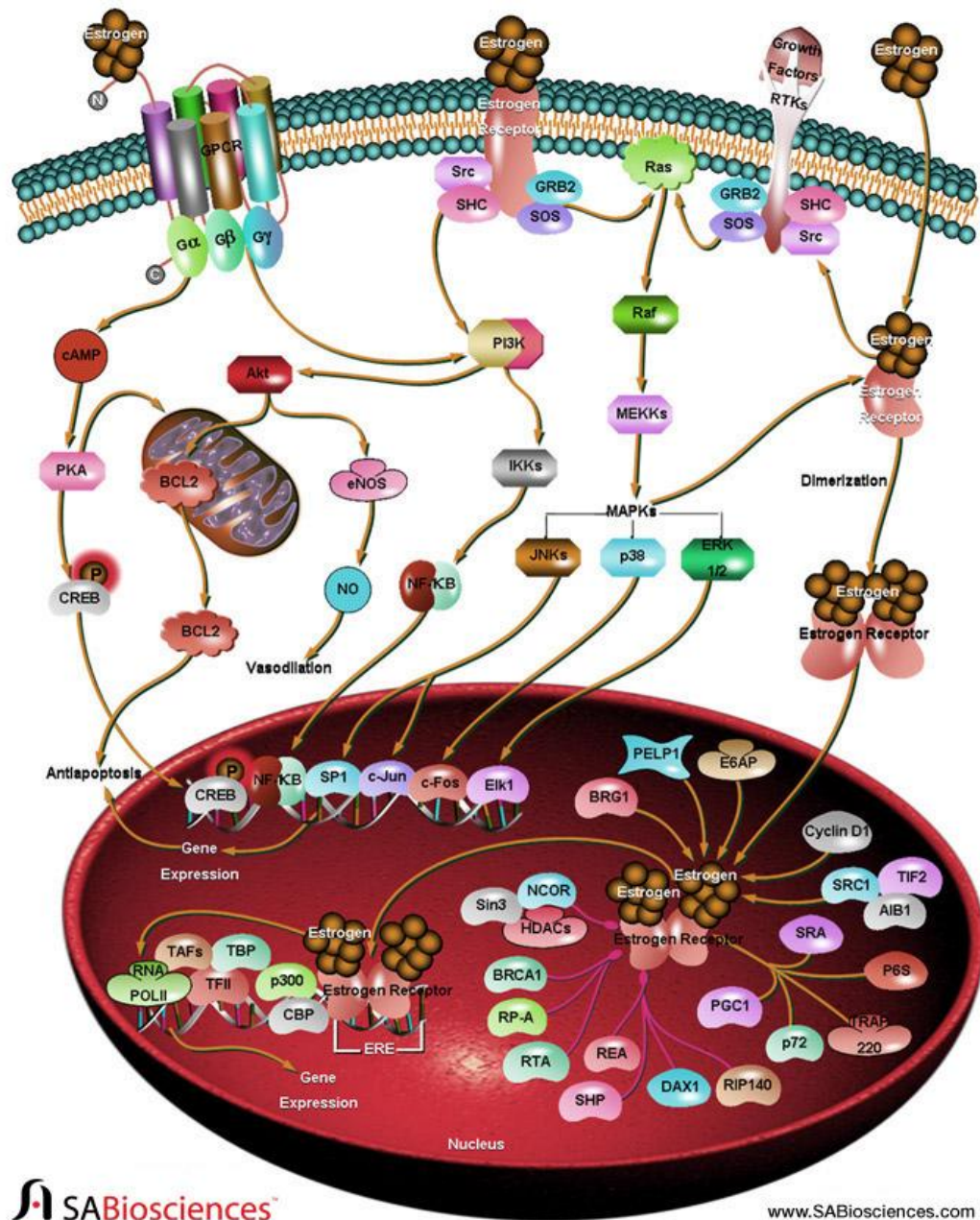


Figura 7. Via de sinalização do estrogênio demonstrando as interações entre RE e receptores HER (SABiosciences).

2.8 Vias de sinalização e câncer de mama

No câncer de mama são observadas modificações no estado de fosforilação do RE α induzidas por quinases como MAPK e Akt, que causam desregulação nas funções biológicas destes receptores (KATO et al., 1995; CAMPBELL et al., 2001).

A via de sinalização de Akt está ativada em neoplasias mamárias RE α + e sua superexpressão causa desregulação no padrão de ligação do RE α , levando a perda ou ganho de expressão de genes regulados por estrogênio, e assim aumentando a proliferação celular (BHAT-NAKSHATRI et al., 2008). Além de estar associada ao desenvolvimento do câncer de mama, a ativação de Akt também está relacionada com resposta ao tratamento com TAM (BOSTNER et al., 2013; KIRKEGAARD et al., 2005; CLARK et al., 2002).

A atividade de Akt no câncer de mama está relacionada a mutações em PTEN e superexpressão de HER2 (CLARK et al., 2002). Mutações e inativação de PTEN são encontradas em diferentes subtipos de câncer de mama, e também estão associadas à predisposição para o desenvolvimento de carcinogênese mamária (FEILOTTER et al., 1999; SCHWARZENBACH et al., 2012; WU et al., 2013; EBBESEN et al., 2016; BOELENIS et al., 2016). A indução de PTEN em células de câncer de mama inibe ativação de Akt causando inibição de proliferação celular e induzindo apoptose (GUO et al., 2015).

Outra via de sinalização que possui papel importante no câncer de mama são as vias ERK1 (MAPK3) e ERK2 (MAPK1). ERK1/2 são membros da via MAPK que possuem ações na proliferação e sobrevivência celular (FANGER, 1999). Em amostras de pacientes com câncer de mama é observada uma superexpressão da via de MAPK quando comparadas a amostras de pacientes saudáveis (SIVARAMAN et al., 1997). Ainda, as vias de ERK1/2 estão envolvidas tanto na via dos RE quanto na via de HER em carcinoma mamário (KRONBLAD et al., 2005; MARTIN et al., 2005). As vias de sinalização discutidas acima, Akt, MAPK e PTEN, estão demonstradas na figura 8.

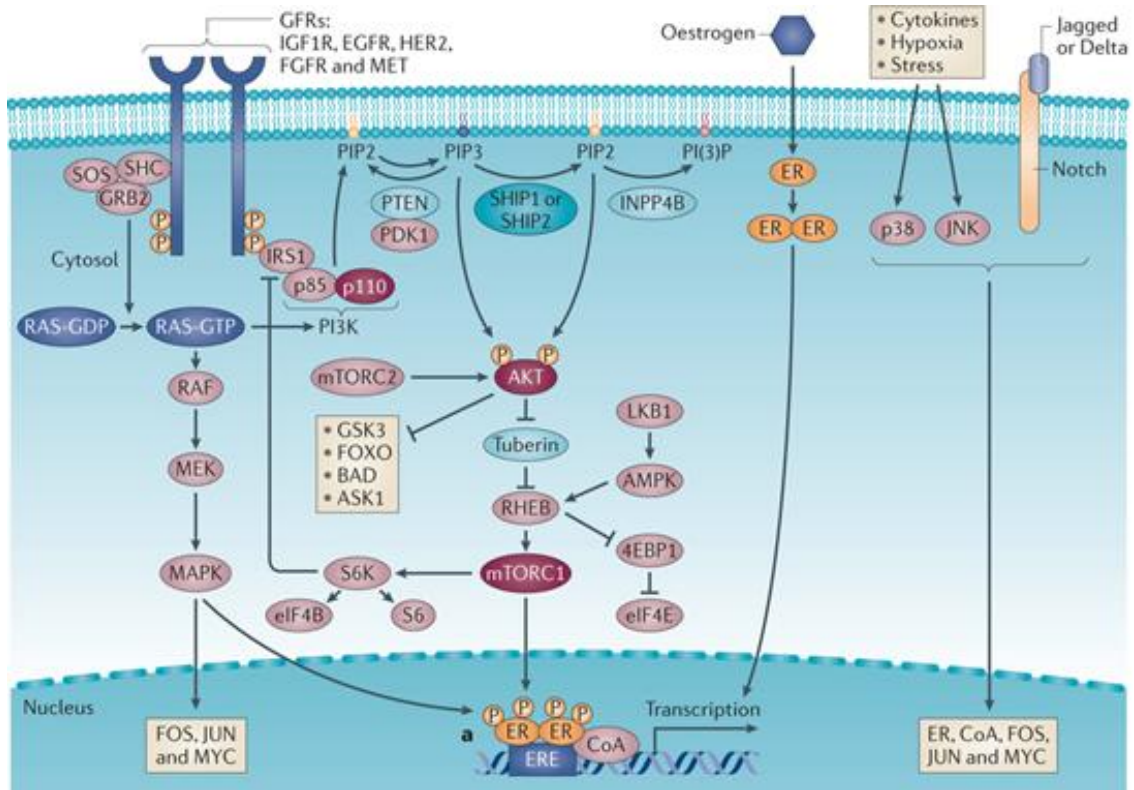


Figura 8. Vias de sinalização ativadas nos tumores de mama estrogênio positivos (MA et al., 2015).

2.9 Resistência adquirida ao tamoxifeno

Tamoxifeno é um antagonista de RE que competitivamente inibe a ligação de estrogênio com o RE, inibindo a ativação de RE, e por isto é utilizado como tratamento adjuvante de primeira linha para pacientes RE α + (DEL RE et al., 2012; NCCN, 2009). Porém, mais de 50% das pacientes com doença metastática não respondem ao tratamento de primeira linha com TAM, e muitas das pacientes que respondem ao tratamento inicialmente se tornam resistentes (EBCTCG, 2005; DAVIES et al., 2013).

A resposta ao tratamento com TAM, sensibilidade ou resistência ao tratamento, é influenciada por fatores intrínsecos, fatores extrínsecos, como uso concomitante de outra medicação, e por fatores associados ao surgimento do tumor, como superexpressão de receptores HER (Figura 9) (BARDIA; STEARNS, 2010).

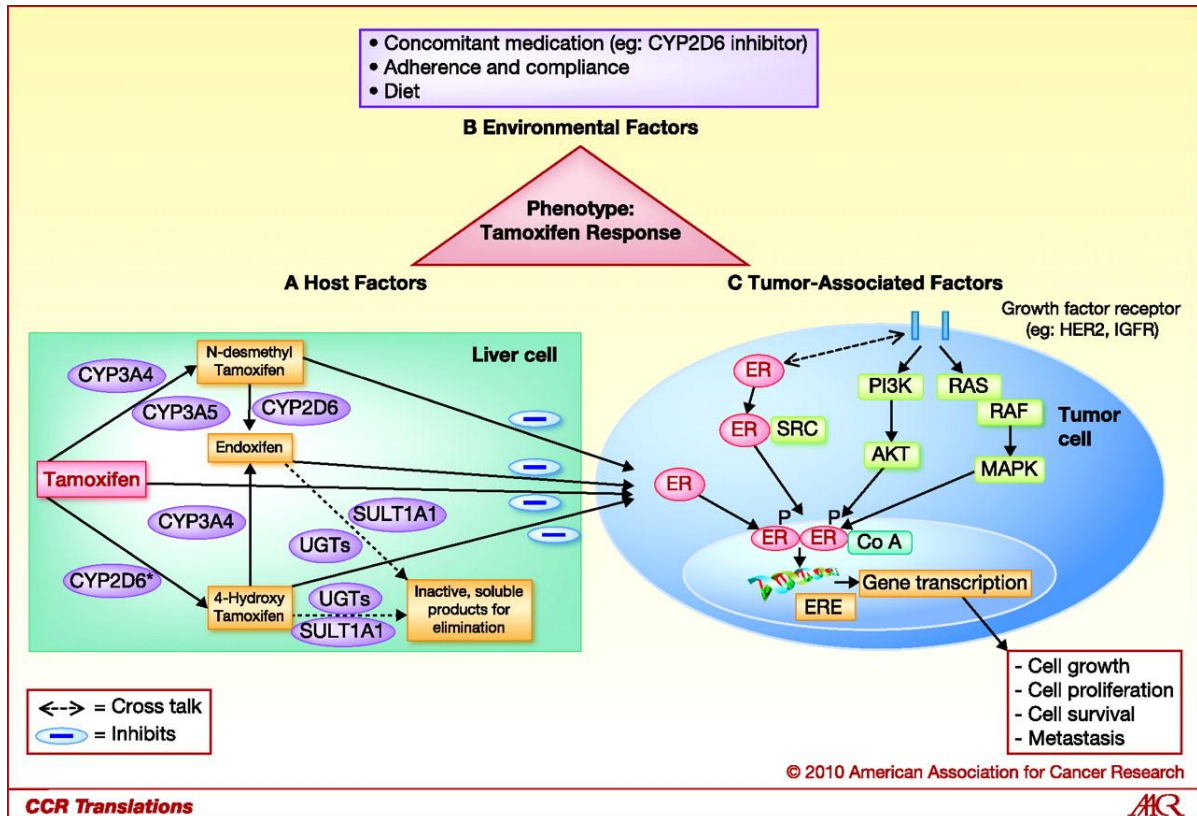


Figura 9. Fatores que influenciam a resposta ao tratamento com TAM (BARDIA;STEARNS, 2010).

Mecanismos de resistência intrínseca ao TAM podem ocorrer devido à falta de expressão de RE α e inativação de alelos do citocromo P450 2D6 (CYP2D6). Esta mutação em CYP2D6 impossibilita que o TAM seja convertido em endoxifeno, seu metabólito mais ativo, diminuindo assim a resposta ao tratamento com TAM (HOSKINS et al., 2009; ANTUNES et al., 2012).

Após um período prolongado de exposição ao TAM muitas pacientes desenvolvem resistência adquirida ao tratamento. Esta resistência pode ocorrer através de uma simples seleção celular ou por um processo mais complexo que envolve uma alteração celular causada pelo fármaco seguida pela seleção de um novo fenótipo celular (RABENOELINA et al., 2002).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a frequente ocorrência de resistência adquirida ao tratamento com TAM em pacientes RE $+$, dentre eles estão o aumento da sinalização via receptor HER2 (KNOWLDEN et al., 2003; SHOU et al., 2004; RIGGINS et al., 2007), expressão alterada de cofatores de RE (VIENONEN et al., 2003), expressão alterada de RE β (BORGQUIST et al., 2008), perda da expressão de RE (GUTIERREZ et al., 2005), e hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR (FU et al., 2014; MILLER et al., 2011).

2.9.1 RE α e resistência ao TAM

Perda de expressão dos RE α e alta expressão de RE α 36, variante do RE α , durante o tratamento com TAM, são mecanismos que induzem resistência em pacientes com câncer de mama ER α + (JOHNSTON et al., 1995; ZHANG; WANG, 2013).

Outro mecanismo conhecido de resistência ao tratamento com TAM é através da ligação do TAM ao RE α com ação agonista. Esta ligação pode causar a transativação de membros da família de receptores HER que através de vias de sinalização diminuem os efeitos inibitórios de TAM nas células neoplásicas (ARPINO et al., 2004; THRANE et al., 2013).

Thrane e colegas verificaram que células MCF7 resistentes ao TAM apresentaram baixos níveis de RE α , expressão aumentada de EGFR, aumento na fosforilação de HER3, e ativação de ERK. Porém, o uso de inibidor de EGFR e inibidor de ERK não foram capazes de reverter completamente à resistência adquirida. Os autores sugerem que a ação agonista de TAM no RE α , juntamente com o aumento na sinalização de EGFR e ERK, mantêm a proliferação celular que confere resistência nestas células (THRANE et al., 2013).

2.9.2 RE β e resistência ao TAM

Diversos estudos tem demonstrado o papel importante do RE β no processo de resistência adquirida ao tratamento com TAM. O TAM pode se ligar ao RE β diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e com isso aumentando crescimento e sobrevivência celular (RAZANDI et al., 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram associação entre baixos níveis de RE β e ocorrência de resistência ao TAM em células ER α + (ESSLIMANI-SAHLA et al., 2004; HOPP et al., 2004; CHEN et al., 2005). Pacientes sensíveis ao tratamento com TAM apresentaram maior expressão de RE β total quando comparadas as pacientes que adquiriram resistência ao TAM (MURPHY et al., 2002). Além disto, foi verificado que a re-expressão de RE β em células MCF7 resistentes ao tratamento com TAM foi capaz de reverter a resistência tornando as células sensíveis ao TAM (PITTA et al., 2013).

Porém, contrariando estes achados, Speiers e colegas mostraram que a resistência ao tratamento com TAM esta associada a uma superexpressão de RE β (SPEIERS et al., 1999). Ainda, Shaw e colegas não encontraram diferenças nos níveis de RE β quando comparadas células MCF7 sensíveis e resistentes ao TAM (SHAW et al., 2006).

Estes autores observaram que células resistentes ao tratamento com TAM apresentam expressão reduzida de RE α (RNAm e proteína), porém não apresentam modificações nos níveis de RE β . Os níveis de RE β continuam sendo baixos assim como nas células MCF7 não tratadas. Com estes resultados, os autores sugerem que o RE β não exerce função independente na resistência ao tratamento com TAM, mas sim a alteração na razão entre os RE α /RE β pode ser um dos mecanismos de resistência adquirida ao TAM (SHAW et al., 2006).

Devido estes resultados controversos, novos estudos são necessários para elucidar o papel do RE β na resposta ao tratamento com TAM.

2.9.3 Família HER e resistência do TAM

Outro mecanismo de resistência bastante pesquisado é a interação entre os RE e receptores HER, na qual as células resistentes podem alternar entre as vias destes receptores como alternativa para sobrevivência celular (YIN et al., 2014).

Moi e colegas induziram tumores mamários em ratos e dividiram os animais em 2 grupos de tratamento, 14 dias de TAM oral ou veículo. Após o período de tratamento os animais foram sacrificados e analisados. O volume tumoral dos animais tratados com TAM era menor, e os níveis de RNAm e proteína de HER2 e HER3 estavam aumentados comparados ao grupo controle. Com estes resultados os autores propõem que HER2 e HER3 são estimulados pelo tratamento com TAM e podem ter papel fundamental na resposta ao tratamento com TAM (MOI et al., 2012).

Em amostras de pacientes com câncer de mama metastático foi observada amplificação de HER2, expressão de EGFR, baixa expressão de RE e pior resposta ao tratamento com TAM (ARPINO et al., 2004). Células MCF7 e T47D resistentes ao tratamento com TAM (MCF7/TAMR e T47D/TAMR) apresentaram expressão elevada de HER2 e ativação de Akt. As células T47D/TAMR também apresentaram expressão de EGFR e ativação de ERK1/2, e estas quando tratadas com Gefitinibe (inibidor de EGFR) voltaram a

responder ao tratamento com TAM. As células MCF7/TAMR demonstraram apenas ativação de Akt, e nestas células a resistência ao TAM foi revertida pelo uso de inibidor de Akt (BLOCK et al., 2012).

Ghayad e colegas desenvolveram duas linhagens celulares resistentes ao TAM derivadas de células MCF7. Ambas linhagens apresentaram ativação das vias PI3K/Akt e MAPK, expressão aberrante de HER4 e ativação de EGFR, HER2 e HER3, mesmo apresentando fenótipos distintos (GHAYAD et al., 2010).

Estes resultados mostram o quanto as células de câncer de mama são heterogêneas e evidência a importância de se conhecer o perfil de expressão gênica das células resistentes para assim utilizar o tratamento apropriado para cada paciente.

Frequentemente células resistentes ao tratamento com TAM apresentam superexpressão ou hiperativação da via de EGFR e de seus efetores ERK1/2 (MUSGROVE; SUTHERLAND, 2009; JIANG et al., 2014). Células MCF7 resistentes ao TAM apresentaram superexpressão de EGFR e HER2, porém não apresentaram diferença na expressão de HER3 quando comparadas as células MCF7 parentais. Além disso, foram encontrados heterodímeros ativados de EGFR/HER2 e EGFR/HER3 associados a níveis aumentados de ERK1/2 ativados. Tanto o uso de inibidores de receptores HER, como o uso de inibidores de ERK, diminuíram atividade de ERK1/2 inibindo proliferação das células resistentes. Demonstrando que a proliferação destas células MCF7 resistentes ao TAM é mediada pela ação de heterodímeros de EGFR que age através da ativação de ERK1/2 (KNOWLDEN et al., 2003).

Corroborando estes achados, Zheng e colegas mostraram que o tratamento com TAM induz rapidamente a ativação de ERK1/2 em células MCF7 e T47D causando diminuição da proliferação celular. Além disto, demonstraram que a inibição de EGFR teve efeitos opostos aos causados pelo TAM, inibindo ERK1/2 e apoptose (ZHENG et al., 2007).

Células MCF7 resistentes ao TAM e induzidas para não expressar RE α após tratamento com Gefitinibe apresentaram perfil de expressão gênica modificado comparadas às células antes do tratamento. As células voltaram a expressar RE α , e tiveram aumento na expressão de RE β e nos níveis de MEK1/2 e p-ERK1/2, com isto revertendo a resistência ao tratamento com TAM.

Estes resultados sugerem um papel importante do “cross talk” entre RE, EGFR e da via de MAPK no desenvolvimento de resistência ao tratamento com TAM (Figura 10) (ZHANG et al., 2015).

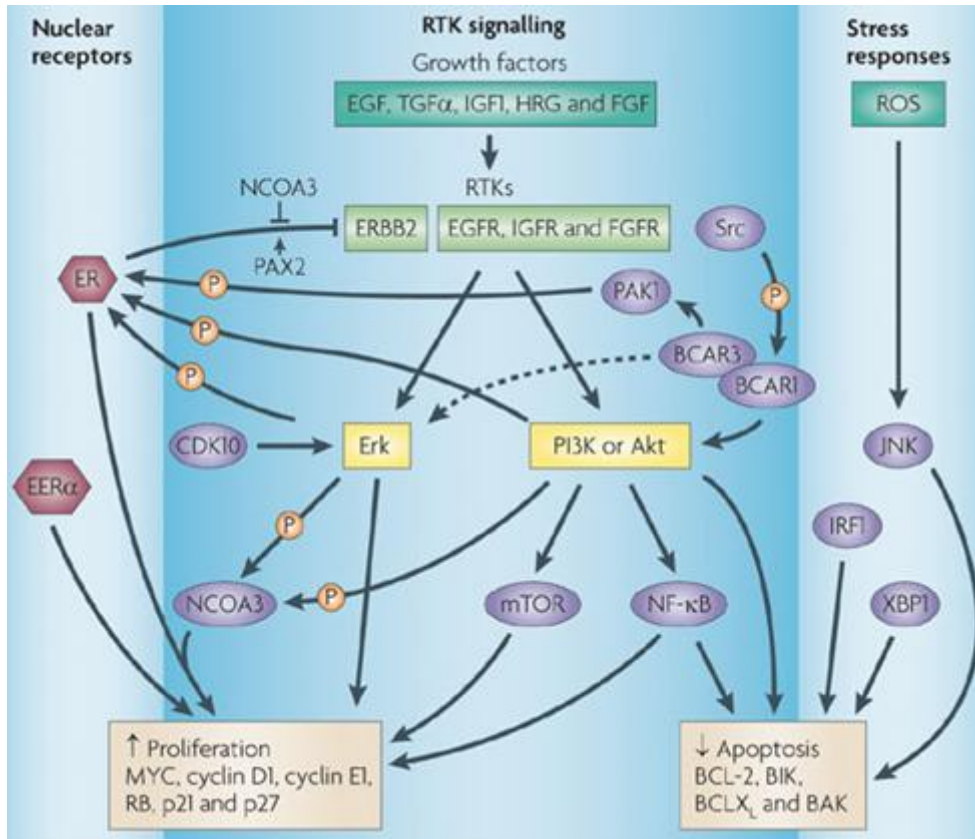


Figura 10. Mecanismos de resistência adquirida ao tratamento com TAM: através da modulação dos RE, das vias compensatórias dos receptores tirosina quinase (RTK) e respostas de estresse (MUSGROVE; SUTHERLAND, 2009).

Expressão de altos níveis de ERK1/2 foi relacionada com menor tempo de recorrência da doença em pacientes com câncer de mama (WATSON et al., 2010) e pior resposta ao tratamento com TAM (MCGLYNN et al., 2009).

Porém, contrariando estes achados, foi verificado que as vias ERK1/2 foram associadas a um melhor prognóstico em pacientes com câncer de mama, e também a uma melhor resposta ao tratamento com TAM. Ainda, tanto ERK1/2 quanto sua proteína ativada, fosfo-ERK1/2, foram positivamente correlacionadas com expressão de proteínas relacionadas ao RE e negativamente associadas a HER2 e HER4 (JERJEES et al., 2014).

Alguns autores propõem que o uso de inibidores de ERK1/2 juntamente com terapia hormonal pode ser uma opção de tratamento para melhorar a resposta ao tratamento com TAM e evitar o desenvolvimento de resistência (KRONBLAD et al., 2005). Porém, como os resultados são controversos, novos estudos necessitam ser realizados para elucidar o papel da via de MAPK no câncer de mama.

2.10 Tamoxifeno e cognição

O uso de tamoxifeno como tratamento adjuvante com ação hormonal para câncer de mama possui grande capacidade de cura em mulheres com a doença em estágio precoce, porém por apresentar ações tanto de agonista como de antagonista, dependendo do tecido no qual o TAM irá se ligar, seu uso é fortemente associado a diversos efeitos adversos. Os efeitos adversos mais comuns são ondas de calor, eventos tromboembólicos, espessamento e carcinoma endometrial, e déficits cognitivos (PAGANINI-HILL; CLARK, 2000; JENKINS et al., 2004; VOGEL, 2009; HERNANDEZ et al., 2009; CORTESI et al., 2009).

Estudos clínicos vem demonstrando forte associação entre o uso de TAM e a ocorrência de alterações cognitivas (BENDER et al., 2006; PHILLIPS et al., 2011; CHEN et al., 2014; GANZ et al., 2016). Porém, alguns autores falharam em mostrar esta relação (JENKINS et al., 2006; HERMELINK et al., 2008; BRECKENRIDGE et al., 2012). Ainda, o tempo de duração dos déficits cognitivos causados pelo tratamento com TAM é controverso. Foram observados danos cognitivos transitórios causados pelo uso de TAM, que cessam após o término do tratamento (JENKINS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2011), e também déficits persistentes, que permanecem depois do final do tratamento (BENDER et al., 2006).

2.10.1 Estudos clínicos: TAM e cognição

Em 1998, van Dam e colegas realizaram um estudo para avaliar a prevalência de déficits cognitivos em pacientes com câncer de mama submetidos a tratamento quimioterápico, com alta dose e dose padrão, juntamente com TAM e em pacientes com câncer de mama estágio I sem tratamento com terapia adjuvante sistêmica. A função cognitiva das pacientes foi avaliada com bateria tradicional de testes neuropsicológicos e fatores como, estado de saúde, qualidade de vida, comportamento do tipo ansioso e depressão também foram considerados através de diferentes testes. Os resultados revelaram alterações cognitivas em 32% das pacientes que receberam altas doses de quimioterápico juntamente com TAM, em 17% das pacientes tratadas com dose padrão de quimioterapia juntamente com TAM, e em 9% das pacientes não submetidas a terapia adjuvante sistêmica. Os autores relacionaram estes achados a uma possível toxicidade ao sistema nervoso causada pelas doses altas dos

quimioterápicos, e não demonstraram uma piora relacionada ao uso de TAM nas funções cognitivas (VAN DAM et al., 1998).

Estudo prospectivo comparou a performance neuropsicológica de 85 mulheres com câncer de mama submetidas a quimioterapia, 43 mulheres com câncer de mama recebendo tratamento hormonal ou radioterapia e 49 mulheres saudáveis. Os testes cognitivos foram realizados antes do tratamento, 6 e 18 meses após o tratamento. Os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos períodos de avaliação. Apenas foi verificada uma tendência de melhora nos danos cognitivos ao longo do tempo em todos os grupos. Evidenciando novamente que as disfunções cognitivas pós-tratamento sistêmico são transitórias (JENKINS et al., 2006).

Pacientes que receberam TAM como parte do tratamento quimioterápico apresentaram declínios cognitivos mais severos e tiveram maiores danos de memória quando comparadas a mulheres com câncer de mama que receberam apenas quimioterapia. Além disso, os autores propõem que os déficits de memória causados pelo TAM podem ser persistentes (BENDER et al., 2006).

No ano de 2007, foram comparadas as funções cognitivas de 31 pacientes com câncer de mama tratadas com terapia hormonal, TAM ou anastrozole (inibidor de aromatase (IAR)) por pelo menos 3 meses. Os resultados demonstraram que as mulheres submetidas ao tratamento com anastrozole apresentaram mais déficits de memória e aprendizado quando comparadas as mulheres tratadas com TAM, porém devido ao pequeno tamanho amostral os autores sugerem que novos estudos devem ser realizados visando confirmar estes dados (BENDER et al., 2007).

Hermelink e colegas compararam os efeitos da quimioterapia convencional e tratamento hormonal, TAM ou IAR, na função cognitiva de 101 pacientes com câncer de mama. As mulheres foram testadas em 12 testes cognitivos antes e durante o tratamento quimioterápico, e 1 ano após o início da terapia. Os autores não encontraram relação significativa entre terapia com TAM ou IAR e danos cognitivos em nenhum dos períodos avaliados. Além disso, a indução de menopausa causada pelos tratamentos demonstrou efeitos favoráveis na habilidade de execução de funções (HERMELINK et al., 2008).

Estudo realizado com mulheres idosas (≥ 65 anos) com câncer de mama avaliou a relação entre função cognitiva e tratamento com moduladores seletivos do receptor de estrogênio, TAM ou Raloxifeno. Os resultados não demonstraram diferenças significativas nas performances cognitivas das pacientes submetidas aos diferentes tratamentos, porém estas pacientes apresentaram padrões similares nos declínios cognitivos (LEGAULT et al., 2009).

Debess e colegas examinaram a função cognitiva de 120 pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia ou TAM, e 208 mulheres saudáveis. Os testes neuropsicológicos foram realizados anteriormente ao tratamento adjuvante e 6 meses após o término do tratamento. Antes e após terapia adjuvante, as mulheres com câncer de mama obtiveram performances cognitivas similares as mulheres saudáveis, assim discordando dos achados anteriores que consideraram as alterações cognitivas como efeitos adversos do tratamento quimioterápico (DEBESS et al., 2010).

Phillips e colegas indicaram associação entre danos cognitivos e tratamento com TAM em pacientes com câncer de mama pós-menopausa. Porém, os autores demonstraram que estes efeitos negativos sobre a cognição são em grande parte anulados após cessar o tratamento, assim evidenciando que estes danos não são permanentes (PHILLIPS et al., 2011).

Estudo realizado em 2012 não evidenciou relação entre terapia hormonal e déficits cognitivos mensurados por testes objetivos em pacientes sobreviventes de câncer de mama. Porém, estas pacientes reportaram problemas de atenção no trabalho e déficits cognitivos recorrentes nas suas rotinas (BRECKENRIDGE et al., 2012).

Chen e colegas demonstraram déficits cognitivos em pacientes com câncer de mama RE+ tratadas com TAM. As pacientes tratadas com TAM apresentaram danos de memória e no processamento de informação. Os autores sugerem que os déficits cognitivos associados ao uso de TAM ocorrem pela ação antagonista do TAM nos RE presentes nas áreas cerebrais responsáveis pela memória, como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (CHEN et al., 2014).

Boele e colegas demonstraram que pacientes tratadas com TAM apresentaram maiores danos na memória e linguagem, e reportaram pior percepção de suas capacidades cognitivas quando comparadas a pacientes com câncer de mama submetidas a cirurgia e radioterapia, e a mulheres saudáveis (BOELE et al., 2015).

Estudo atual mostrou que pacientes submetidas a tratamentos com IAR ou TAM apresentaram déficits cognitivos mais severos que pacientes não submetidas a terapia hormonal (GANZ et al., 2016).

2.10.2 Estudos pré-clínicos: TAM e cognição

O modelo animal permite o estudo sistemático dos mecanismos fisiológicos envolvidos no declínio cognitivo causado pelo tratamento sistêmico na ausência de câncer e outros fatores confundidores.

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos déficits cognitivos é essencial para o desenvolvimento e melhora de estratégias de tratamentos. Como já citado nos estudos clínicos, os resultados inconclusivos do efeito do TAM nas funções cognitivas também foi verificado em estudos experimentais.

Chen e colegas avaliaram os efeitos dos tratamentos hormonais com TAM e toremifeno (TOR), na capacidade cognitiva de camundongos. Os animais foram submetidos as tarefas de esQUIVA inibitória e labirinto em T para mensurar a aquisição, consolidação e reaquisição de memória e aprendizado. Os resultados demonstraram que o TAM causou danos na consolidação e reaquisição de memória, porém não interferiu na aquisição de memória, já o TOR causou declínio em todos os aspectos mensurados. Além disso, ambos os fármacos causaram déficits de aprendizado. Os autores sugerem que estes achados corroboram as evidências clínicas de déficits cognitivos em pacientes tratadas com terapia endócrina (CHEN et al., 2002(a)).

Baseado nestes achados, o mesmo grupo demonstrou que a administração sistêmica de TAM e TOR causou déficits na reaquisição, porém não na consolidação de memória espacial de camundongos através do teste de labirinto de Morris (CHEN et al., 2002(b)).

Esmaeli e colegas investigaram os efeitos de TAM sozinho ou em combinação com estradiol na memória de camundongos. Os autores mostraram que o TAM impediu a consolidação e reaquisição de memória, porém este dano foi evitado pelo tratamento com estradiol (ESMAELI et al., 2009).

Walker e colegas realizaram um estudo para analisar os efeitos da administração repetida dos agentes antineoplásicos TAM, metotrexato e 5FU sozinhos ou em combinação na memória e aprendizado de camundongos. As drogas foram administradas uma vez por semana durante 3 semanas e 2 dias após o término do tratamento os animais foram submetidos ao teste de “*autoshaping*”, que mensura a aquisição e retenção de respostas de aprendizado. Os resultados mostraram que a administração repetida de TAM causou danos na aquisição e retenção do aprendizado, e quando combinados os fármacos metotrexato e 5FU também

geraram déficits na retenção de respostas de aprendizado, sendo a magnitude destas respostas dependente da dose de metotrexato aplicada (WALKER et al., 2011).

Contrariando achados prévios, foi observado em ratas ovariectomizadas uma melhora na capacidade cognitiva após tratamento com TAM (VELAZQUEZ-ZAMORA et al., 2012; ZABIHI et al., 2014). Ainda, TAM pode prevenir os danos de memória e aprendizado causados pela escopolamina, antagonista de receptores muscarínicos (KARIMI et al., 2015).

Estudo atual demonstrou que microinjeções intracaniais de TAM no hipocampo de ratas causou danos de memória. Ainda, os autores evidenciaram que os efeitos inibitórios de TAM na memória são mediados pelos receptores colinérgicos nicotínicos do hipocampo (TAJIK et al., 2016). Estes resultados contraditórios demonstraram a importância da realização de novos estudos para estabelecer os efeitos de TAM na memória.

2.11 Possíveis mecanismos de ação do TAM na cognição

Os mecanismos pelos quais o tratamento com TAM induz danos cognitivos ainda não estão completamente entendidos, e poucos fatores têm sido propostos como possíveis mecanismos para a ocorrência desta situação.

TAM pode agir através de receptores expressos no hipocampo induzindo danos cognitivos. Tajik e colegas mostraram que receptores colinérgicos nicotínicos do hipocampo modulam as ações de TAM induzindo danos na formação de memória (TAJIK et al., 2016).

Estrogênio modula as funções cerebrais através de sua ação nos RE, e alterações na expressão e ativação destes receptores também estão associadas a danos cognitivos (FUGGER et al., 2000; JACOME et al., 2010; PISANI et al., 2016).

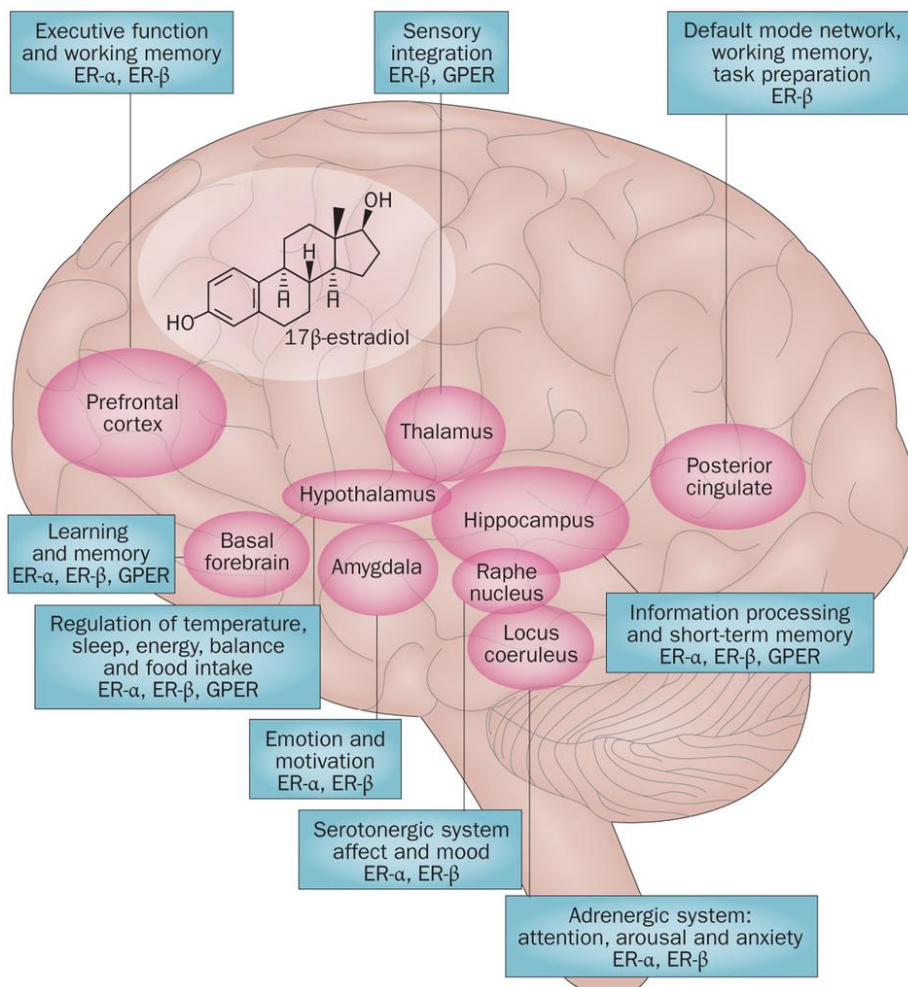
O efeito de TAM no sistema nervoso central parece depender da quantidade de estrogênio disponível. TAM parece possuir efeito agonista nos RE, assim como o estrogênio, modulando morfologia cerebral (GONZALEZ-BURGOS et al., 2012; SILVA et al., 2000; ERNST et al., 2002) e melhorando a memória (VELAZQUEZ-ZAMORA et al., 2012) quando a disponibilidade de estrogênio é baixa ou na ausência de estrogênio.

Diferente destes achados, Chen e colegas sugerem que ação antagonista de TAM nos RE presentes em áreas cerebrais responsáveis pela memória podem estar relacionadas aos danos cognitivos causados pelo uso de TAM (CHEN et al., 2014). Porém, estes autores não identificaram se as pacientes que participaram do estudo eram classificadas como pré-

menopausa ou pós-menopausa. Novos estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos responsáveis pelos danos de memória induzidos pelo TAM.

2.11.1 RE, TAM e memória

Estrogênio pode modular as funções hipocâmpais e funções cognitivas através de sua rápida ação nos RE, RE α e RE β , ambos receptores presentes no cérebro de humanos e roedores (PEREIRA et al., 2014; BRINTON et al., 2015; LYNCH et al., 2016; PISANI et al., 2016) (Figura 11).



Nature Reviews | Endocrinology

Figura 11. Distribuição dos RE no cérebro (BRINTON et al., 2015).

No hipocampo o RE β está mais expresso que o RE α , porém como a atividade transcricional de RE α é maior, mesmo com baixos níveis de estrogênio, o RE α é preferencialmente ativado (FOSTER, 2012).

Os RE possuem papel importante na função hipocampal, onde atuam na potenciação e na formação sináptica dos neurônios (DAY et al., 2005; LIU et al., 2008; SPENCER-SEGAL et al., 2012). Fugger e colegas observaram que o silenciamento do RE α causou danos em tarefas de memória dependentes de hipocampo, enquanto o silenciamento do RE β não demonstrou efeitos nas funções cognitivas de roedores (FUGGER et al., 2000).

Resultados contrastantes foram observados sobre o efeito dos agonistas de RE na memória. Frye e colegas indicaram que o agonista de RE α foi capaz de melhorar a memória espacial, dependente de hipocampo, de ratas fêmeas, e este mesmo efeito não foi observado quando utilizado agonista de RE β (FRYE et al., 2007).

Contrariando estes achados, foi demonstrado que apenas o uso de agonista de RE β apresentou efeitos positivos na memória. Ratas fêmeas que receberam injeções com agonista de RE β apresentaram melhora na memória quando testadas nas tarefas dependentes de hipocampo (RHODES; FRYE, 2006).

TAM se liga aos RE evitando a interação com o estrogênio, podendo ativar ou inibir proliferação celular (BRENTANI; FELDMAN, 1995; WILLIAMS; STANCEL, 1996). No hipocampo a resposta dos RE ao TAM ainda é desconhecida.

Em 2010, foi verificado o efeito do tratamento intrahipocampal com diferentes doses de TAM, agonista de RE α (PPT, propyl pyrazol thiol) e tratamento combinado de TAM + PPT na função cognitiva de ratos Wistar machos. Os resultados demonstraram que as doses mais altas utilizadas no tratamento com TAM, PPT e também na combinação de TAM + PPT causaram déficits na aquisição de memória e de aprendizado (TALEBI et al., 2010).

Jacome e colegas observaram que o uso de agonista do RE β melhorou a memória de reconhecimento em ratas ovariectomizadas, demonstrando o papel do RE β na modulação da memória (JACOME et al., 2010).

Pisani e colegas sugerem que o uso de agonistas de RE α e agonista de RE β podem causar tanto dano como melhora na memória de ratas, e esta resposta desencadeada irá depender do regime de tratamento (dose e tempo), assim como do tipo de teste comportamental utilizado (PISANI et al., 2016). Portanto, novos estudos devem ser realizado com o objetivo de elucidar o papel dos RE nos déficits cognitivos causados pelo tratamento com TAM.

2.12 Memória e esQUIVA inibitória

O aprendizado é definido como o processo onde novas informações são adquiridas e a memória é definida como o processo no qual estas informações são retidas (BEAR et al., 2002).

A memória é constituída pela aquisição, formação, conservação e evocação de informações. Esta não é adquirida na sua forma definitiva, ela passa por processos nos quais as novas informações são consolidadas e estocadas (MCGAUGH, 1966; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; MCGAUGH, 2000).

Memória pode ser classificada de acordo com sua duração (curta e longa duração) e de acordo com seu conteúdo (declarativa ou procedual) (IZQUIERDO, 2002). Muller e Pilzecker sugeriram em 1900 que a formação memórias permanentes necessita de muito tempo, e durante este período a memória esta vulnerável e pode ser interrompida ou substituída por outras informações (MULLER; PILZECKER, 1900; MCGAUGH, 1966).

As memórias são classificadas em dois tipos principais, de curta ou longa duração. As memórias de curta duração, são independentes da síntese de novas proteínas e RNA, duram de 1 a 3 horas, enquanto as memórias de longa duração, que são dependentes da síntese de RNA e proteína e podem permanecer por horas até anos (MCGAUGH, 1966; IZQUIERDO et al., 1998; MCGAUGH, 2000). As memórias de longa duração não são formadas imediatamente no momento em que são adquiridas, para a formação desta memória é necessário que ocorra a consolidação, processo que dura aproximadamente 3 a 8 horas (CAROZZI et al., 2008).

Em relação ao conteúdo, as memórias podem ser declarativas ou de procedurais. As memórias declarativas são episódicas (fatos vivenciados) ou semânticas (conhecimentos adquiridos de outras formas), e estas são processadas pelo hipocampo e pelo córtex entorrinal. As memórias procedurais envolvem habilidades motoras e sensoriais e estão relacionadas ao núcleo caudado e ao cerebelo. Elas podem ser formadas através de aprendizados não-associativos (resposta a um único estímulo) ou associativos (resposta a estímulos associados) (IZQUIERDO, 2002).

A primeira forma de aprendizado associativo foi descrita por Pavlov, chamado de condicionamento clássico. Para mensurar o aprendizado por condicionamento, uma tarefa usualmente utilizada é a esQUIVA inibitória. Nesta tarefa os animais aprendem a não descer de uma plataforma afim de evitar um leve choque elétrico em suas patas, sendo que este aprendizado acontece normalmente em uma única sessão. Após o animal ser exposto ao

estímulo, o grau de memória adquirido é testado. Quanto mais tempo (latência) o animal permanecer na plataforma, mais eficiente será a formação da memória (Figura 12).

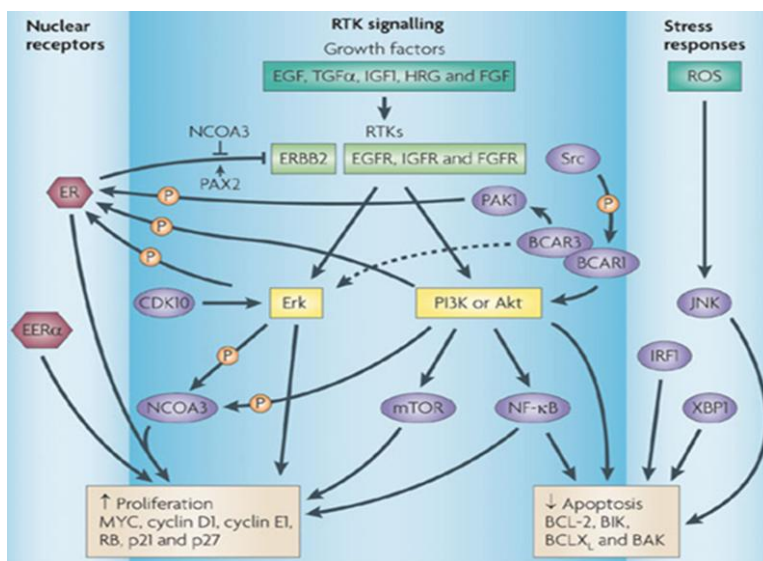
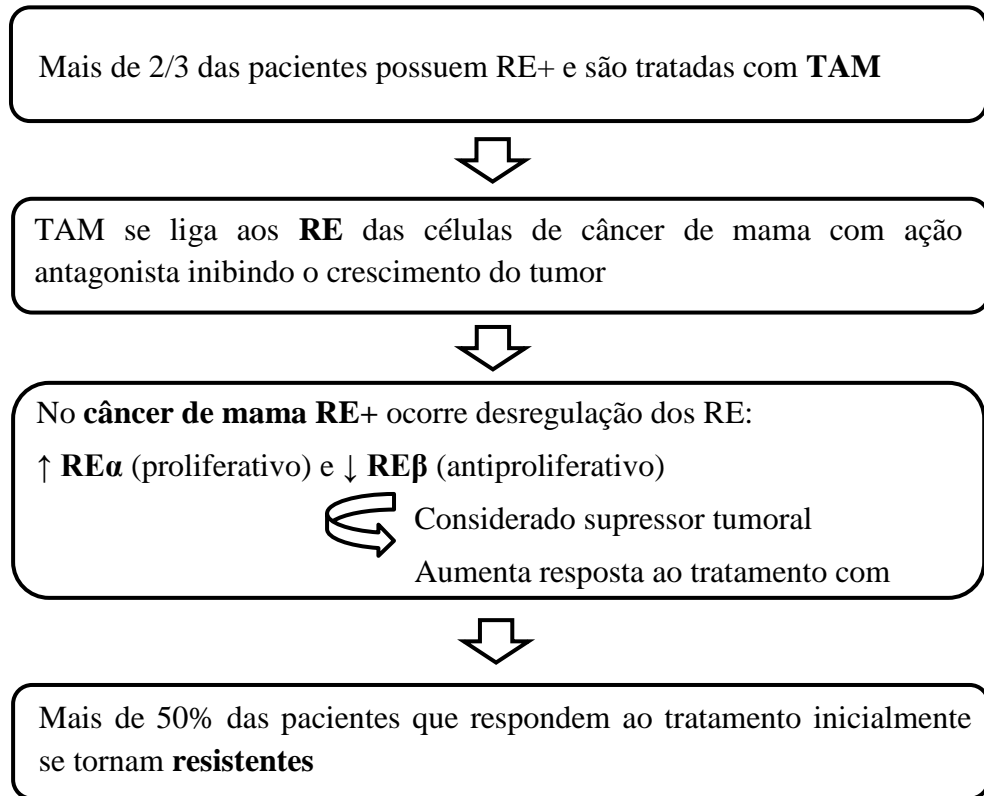


Figura 12. Esquiva inibitória.

A esquiva inibitória tem sido vastamente utilizada por mensurar distintos tempos de memórias declarativas, como memória de curta e longa duração e também o processo de extinção, aprendizado que inibe a memória original (GOLD et al., 1986). Ainda apresentam vantagens como sua rápida aquisição de informação na sessão de treino e seu aprendizado dependente da integridade da região CA1 do hipocampo, região responsável pela cognição (GOLD, 1986; EICHENBAUM, 1996; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 1999). Portanto estudos que visam avaliar alterações de memória relacionadas a danos no hipocampo tem esta tarefa aversiva como uma boa ferramenta.

3. MARCO TEÓRICO

Capítulo 1



Expressão modificada de RE β
 Interação entre RE e receptores HER
 Expressão alterada das vias de sinalização

É de extrema importância que o papel dos RE β e suas interações com RE α e receptores HER na resposta ao tratamento com TAM seja elucidado, pois TAM é amplamente utilizado, possui excelentes resultados clínicos e baixo custo associado.

Capítulo 2

Diversos estudos tem demonstrado **déficits cognitivos** associados ao tratamento com **Tamoxifeno**



Extremamente debilitantes

Interferindo diretamente na qualidade de vida



TAM se liga aos **RE** podendo ativar ou inibir proliferação celular



No **hipocampo** a resposta dos RE ao TAM ainda é desconhecida: agonistas de **RE α** e de **RE β** podem causar dano ou melhora na **memória**, esta resposta depende do regime de tratamento e teste comportamental utilizado



Novos estudos devem ser realizado com o objetivo de elucidar o papel dos RE nos déficits cognitivos causados pelo tratamento com TAM

4. JUSTIFICATIVA

Capítulo 1

Câncer de mama é um problema de saúde pública no mundo, por apresentar alta prevalência e mortalidade. Muitas pacientes com câncer de mama expressam receptores hormonais e por isso a terapia hormonal é de extrema importância.

TAM é hoje um dos tratamentos mais utilizados para pacientes portadores de tumores de mama positivos para receptores de estrogênio e apresenta resultados muito satisfatórios. É eficaz, tem baixo custo e fácil administração. Porém, muitas das pacientes que inicialmente respondem ao tratamento com TAM tornam-se resistentes com o uso prolongado.

Como o câncer de mama é uma doença muito heterogênea, mesmo tumores do mesmo subtipo molecular, com perfis biológicos similares, apresentam diferentes respostas ao mesmo tratamento. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar estas diferentes respostas das neoplasias mamárias ao tratamento com TAM, porém ainda não estão totalmente compreendidos.

Nos estudos disponíveis na literatura, há evidência de que os RE β possuem efeito supressor no câncer de mama e sua presença parece estar relacionada a uma maior resposta ao tratamento com TAM. Além disso, os RE β parecem interagir com os RE α e com receptores HER, modulando as respostas ao TAM. Contudo, estes efeitos são ainda pouco claros e merecem aprofundamento.

Uma vez que o TAM é ainda amplamente utilizado, possui excelente índice terapêutico e excelentes resultados clínicos, é de extrema importância que o papel dos RE β na resposta ao tratamento com TAM seja elucidado. Este é o objetivo do capítulo 1 desta tese.

Capítulo 2

O número de pacientes com câncer que estão livres da doença está aumentando rapidamente devido ao diagnóstico prematuro da doença e aos tratamentos mais eficazes. Os déficits cognitivos associados ao tratamento anticâncer são extremamente debilitantes para o

paciente, interferindo diretamente na sua qualidade de vida. Portanto, um melhor entendimento sobre os efeitos da terapia contra o câncer nas funções cognitivas é de extrema importância. Além disso, este melhor conhecimento permitirá o desenvolvimento e aplicação de novas estratégias de intervenção clínica.

Pacientes tratadas com TAM apresentam mais danos cognitivos comparadas a pacientes submetidas a quimioterapia e pacientes saudáveis (BENDER et al., 2006; CHEN et al., 2014; GANZ et al., 2016). Esta relação entre TAM e déficits cognitivos encontrada em diferentes estudos clínicos tem mantido a atenção de muitos pesquisadores devido a importância que a terapia hormonal possui no tratamento de pacientes com câncer de mama.

Estudos pré-clínicos demonstraram a ligação entre o uso de TAM e déficits de memória e aprendizado (CHEN et al., 2002; WALKER et al., 2011), porém poucos estudos demonstram possíveis mecanismos pelos quais o TAM induz estes déficits cognitivos e este assunto ainda não está compreendido.

Com o intuito de verificar a ligação entre terapia endócrina e alterações cognitivas, neste estudo iremos investigar o efeito agudo de TAM, terapia hormonal usualmente utilizada no tratamento de câncer de mama, e sua interação com os receptores de estrogênio em modelo animal de memória motivada emocionalmente.

O modelo animal proposto para este projeto é baseado em estudos prévios do grupo e os períodos de avaliação dos testes comportamentais estão de acordo com a literatura (REIRIZ et al., 2006; LIEDKE et al., 2009; WALKER et al. 2011; BLANK et al., 2016).

Será utilizada a gavagem como via de administração da droga, pois este método é o mais semelhante ao uso clínico do fármaco, e também devido o TAM ser um pró-fármaco, que necessita ser metabolizado pelo organismo para gerar suas formas terapêuticas ativas. O TAM possui pouca atividade até ser metabolizado no fígado pelo citocromo P450 e gerar metabólitos ativos que são até 100 vezes mais ativos que o composto original (TAM) (DEL RE et al., 2012).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Capítulo 1

Estudar a expressão dos RE β e suas interações com RE α e receptores HER em células de câncer de mama sensíveis ao TAM e em variante resistente ao mesmo.

Capítulo 2

Avaliar o efeito agudo de TAM e sua interação com os RE sobre a função neurocomportamental de ratas.

5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Capítulo 1

5.2.1 Analisar a expressão de RE β em pacientes com câncer de mama nos bancos de dados TCGA e METABRIC.

5.2.2 Analisar a expressão de RNAm dos RE (RE α e RE β), receptores HER (EGFR, HER2, HER3 e HER4), e das vias de PTEN, AKT, MAPK (ERK1/2) em células MCF7 e T47D pré e pós tratamento com TAM, através da técnica de RT-PCR.

5.2.3 Avaliar a viabilidade celular das células MCF-7 e T47D após o tratamento com TAM, através do ensaio de viabilidade celular utilizando o reagente WST.

5.2.4 Analisar a expressão de RNAm dos RE (RE α e RE β), receptores HER (EGFR, HER2, HER3 e HER4), e das vias de PTEN, Akt, MAPK (ERK1/2) em células MCF7 resistentes ao tratamento com TAM, através da técnica de RT-PCR.

5.2.5 Analisar a expressão de RNAm dos RE (RE α e RE β), receptores HER (EGFR, HER2, HER3 e HER4), e das vias de PTEN, Akt, MAPK (ERK1/2) em células MCF7 após silenciamento dos genes do RE α e RE β , pela técnica de interferência por RNA (RNAi), através da técnica de RT-PCR.

5.2.6 Avaliar a viabilidade celular das células MCF-7 após silenciamento dos genes do RE α e RE β pela técnica de interferência por RNA (RNAi), através do ensaio de viabilidade celular utilizando o reagente WST.

Capítulo 2

5.2.7 Avaliar os efeitos da administração oral de TAM, dose única, sobre a consolidação da memória aversiva de curta e longa duração, e persistência de memória através da tarefa de esquiva inibitória em ratas;

5.2.8 Avaliar os efeitos da administração de agonistas do RE α , (PPT) e RE β (DPN), nos efeitos da administração oral de TAM, dose única, sobre a consolidação da memória, através da tarefa de esquiva inibitória em ratos.

6. REFERÊNCIAS

ANTUNES, M. V. et al. Endoxifen levels and its association with CYP2D6 genotype and phenotype: evaluation of a southern Brazilian population under tamoxifen pharmacotherapy. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 34, p. 422-431, 2012.

AO, A. et al. Response of estrogen receptor-positive breast cancer tumorspheres to antiestrogens treatment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 18810, 2011.

ARCE-SALINAS, C. et al. Overweight and obesity as poor prognostic factors in locally advanced breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 146, n. 1, p. 183-188, 2014.

ARPINO, G. et al. HER-2 amplification, HER-1 expression and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 17, p. 5670-5676, 2004.

ARTEAGA, C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. **Seminars in Oncology**, v. 30, p. 3-14, 2003.

BARDIA, A.; STEARNS, V. Personalized Tamoxifen: a step closer but miles to go. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 17, p. 4308-10, 2010.

BARDIN, A. et al. Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. **Endocrinology Related Cancer**, v. 11, n. 3, p. 537-551, 2004.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed, Porto Alegre: Artmed. 2002.

BENDER, C. M. et al. Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in breast cancer. **Psychooncology**, v. 15, n. 5, p. 422-430, 2006.

BENDER, C. M. et al. Memory impairments with adjuvant Anastrozole versus tamoxifen in women with early-stage breast cancer. **Menopause**, v. 14, n. 6, p. 995-8, 2007.

BHAT-NAKSHATRI, P. et al. AKT Alters Genome-Wide Estrogen Receptor Binding and Impacts Estrogen Signaling in Breast Cancer. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 24, p. 7487-7503, 2008.

BIECHE, I. et al. Quantification of estrogen receptor α and β expression in sporadic breast cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 8109–8115, 2001.

BLANK, M. et al. TrkB blockage in the hippocampus after training or retrieval impairs memory: protection from consolidation impairment by histone deacetylase inhibition. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, n. 3, p. 159-65, 2016.

BLOCK, M. et al. Inhibition of the AKT/mTOR and erbB pathways by gefitinib, perifosine and analogs of gonadotropin-releasing hormone I and II to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 5, p. 1845-1854, 2012.

BLOWS, F.M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, p. e1000279, 2010.

BOELE, F. W. et al. Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. **Menopause**, v. 22, n. 1, p. 17-25, 2015.

BOELEN, M. C. et al. PTEN loss in E-Cadherin-Deficient mouse mammary epithelial cells rescues apoptosis and results in development of classical invasive lobular carcinoma. **Cell Reports**, v. 16, n. 8, p. 2087-101, 2016.

BORGQUIST, S. et al. Oestrogen receptors α and β show different associations to clinicopathological parameters and their co-expression might predict a better response to endocrine treatment in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, p. 197-203, 2008.

BOSTNER, J. et al. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 137, n. 2, p. 397-406, 2013.

BRECKENRIDGE, L. M. et al. Cognitive limitations associated with tamoxifen and aromatase inhibitors in employed breast cancer survivors. **Psychooncology**, v. 21, n. 1, p. 43–53, 2012.

BRENTANI, M.; FELDMAN, J. Receptores esteróidicos em neoplasias hormônio-dependentes. In: ABRÃO, F. S. (Ed.). Tratado de oncologia genital e mamária. São Paulo: Roca, 1995 cap. 9.

BRINTON, R. D. et al. Perimenopause as a neurological transition state. **Nat Rev Endocrinol**, v. 11, n. 7, p. 393-405, 2015.

CAMPBELL, R. A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 9817-24, 2001.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, p. 61-70, 2012.

CAREY, K. A.; CAREY, L. A. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 9, n. 2, p. S73-S81, 2009.

CAROZZI, V. et al. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. **Europe Journal of Cancer**, v. 45, n. 4, p. 656-65, 2008.

CHEN, B. et al. Potential of endogenous estrogen receptor B to influence the selective ER modulator ERB complex. **International Journal of Oncology**, v. 27, p. 327-335, 2005.

CHEN, D. et al. Tamoxifen and toremifene impair retrieval, but not acquisition, of spatial information processing in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 417-421, 2002.

CHEN, D. et al. Tamoxifen and toremifene cause impairment of learning and memory function in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n.1-2, p. 269-276, 2002.

CHEN, X. et al. Decision-making impairments in breast cancer patients treated with tamoxifen. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 449-56, 2014.

CIDADO, J.; BEAVER, J. A.; PARK, B. H. Needles in a haystack: finding recurrent genomic changes in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 1, p. 304, 2013.

CLARK, A. S. et al. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, n. 9, p. 707-17, 2002.

CLEMONS, M.; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, p. 276-85, 2001.

COLDITZ, G. A. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 814-23, 1998.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet**, V. 358, P. 1389–1399, 2005.

CORTESI, L. et al. Distribution of second primary malignancies suggests a bidirectional effect between breast and endometrial cancer: a population-based study. **International Journal of Gynecology**, v. 19, n. 8, p. 1358-1363, 2009.

COWLEY, S.M. et al. Estrogen Receptors α and β form heterodimers on DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 19858–62, 1997.

DAVIES, C. et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. **Lancet**, v. 381, p. 9869, 2013.

DAY, M. et al. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. **Behavior Brain Research**, v. 164, n. 1, p. 128–131, 2005.

DE BEÇA, F. F. et al. Cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 3, p. 187-191, 2013.

DEBESS, J. et al. Cognitive function after adjuvant treatment for early breast cancer: a population-based longitudinal study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 1, p. 91-100, 2010.

DEL RE, M. Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 5, p. 442-450, 2012.

DEY, N. et al. A critical role for HER3 in HER2-amplified and non-amplified breast cancers: function of a kinase-dead RTK. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 4, p. 733-750, 2015.

DIAB, S.G.; ELLEDGE, R. M.; CLARK, G.M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 7, p. 550–556, 2000.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v. 365, n. 9472, p. 1687–717, 2005.

EBBESSEN, S. H. et al. PTEN loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. **Proceeding of the National Academy of Sciences of USA**, v. 113, n. 11, p. 3030-5, 2016.

EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for “place”? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 187-95, 1996.

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K.; BORRESEN-DALE, A.L. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1064-1074, 2013.

ERNST, T. et al. The effects of tamoxifen and estrogen on brain metabolism in elderly women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 8, p. 592–597, 2002.

ESCANDE, A. et al. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1459-69, 2006.

ESMAELI, B. et al. Tamoxifen disrupt consolidation and retrieval of morphine-associated contextual memory in male mice: interaction with estradiol. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 2, p. 191-201, 2009.

ESSLIMANI-SAHLA, M. et al. Estrogen receptor beta (ER beta) levels but not ER beta cx variant helps to predict tamoxifen resistance in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 17, p. 5769-76, 2004.

EVERS, N. M. et al. Cell proliferation and modulation of interaction of estrogen receptors with coregulators induced by ER α and ER β agonists. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 376-85, 2014.

FANGER, G. R. Regulation of the MAPK family members: role of subcellular localization and architectural organization. **Histology and Histopathology**, v. 14, n. 3, p. 887-94, 1999.

FEILOTTER, H.E. et al. Analysis of the 1010q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 79, n. 5-6, p. 718-23, 1999.

FERRARI, A. et al. A whole-genome sequence and transcriptome perspective on HER2-positive breast cancers. **Nature Communications**, v. 13, p. 12222, 2016.

FORETOVA, L. et al. Genetic testing and prevention of hereditary cancer at the MMCI - over 10 years of experience. **Clinical Oncology**, v. 23, p. 388-400, 2010.

FORNARO, L. et al. Anti-HER agents in Gastric Cancer: from bench to bedside. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 7, p. 369-83, 2011.

FOSTER, T. C. Role of estrogen receptor α and β expression and signaling on cognitive function during aging. **Hippocampus**, v. 22, n. 4, p. 656-69, 2012.

FOX, E. M.; DAVIES, R. J.; SHUPNIK, M. A. ER β in breast cancer – Onlooker, passive player, or active protector? **Steroids**, v. 73, n. 11, p. 1039-1051, 2008.

FU, X. et al. Overcoming endocrine resistance due to reduced PTEN levels in estrogen receptor-positive breast cancer by co-targeting mammalian target of rapamycin, protein kinase B, or mitogen-activated protein kinase kinase. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 430, 2014.

FUGGER, H. N. et al. Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. **Brain Research**, v. 883, n. 2, p. 258-64, 2000.

FRYE, C. A.; DUFFY, C. K.; WALF, A. A. Estrogen and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 88, n. 2, p. 208-16, 2007.

GALLO, D. et al. Estrogen receptor beta in cancer: an attractive target for therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 19, p. 2734-57, 2012.

GANZ, P.A. et al. Impact of Adjuvant Endocrine Therapy on Quality of Life and Symptoms: Observational Data Over 12 Months From the Mind-Body Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 8, p. 816-24, 2016.

GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. Survival and clinicopathological characteristics of breast cancer patient according to different tumour subtypes as determined by hormone receptor and Her2 immunohistochemistry. a single institution survey spanning 1998 to 2010. **Breast**, v. 21, n; 3, p. 366-73, 2012.

GHAYAD, S. E. et al. Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/AKT signaling pathways. **International Journal of Cancer**, v. 26, n. 2, p. 545-562, 2010.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioural and Neural Biology**, v. 46, n. 1, p. 87-98, 1986.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, p. 2206-2223, 2013.

GONZALEZ-ANGULO, A.M. et al. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 608, p. 1-22, 2007.

GONZALEZ-BURGOS, I. et al. Selective estrogen receptor modulators regulate dendritic spine plasticity in the hippocampus of male rats. **Neural Plasticity**, v. 2012, p. 309494, 2012.

GRAUS-PORTA, D. et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 7, p. 1647-55, 1997.

GUO, L. et al. Significance of ER β expression in different molecular subtypes of breast cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 23, p. 9:20, 2014. A

GUO, L. et al. Significance of ER β expression in different molecular subtypes of breast cancer. **Diagnostic Pathology**, v. 23, p. 9:20, 2014. B.

GUO, Y. et al. Thymosin alpha 1 suppresses proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Apoptosis**, v. 20, n. 8, p. 1109-21, 2015.

GUTIERREZ, M.C. et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: Relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 11, p. 2469–2476, 2005.

HARRINGTON, W.R. et al. Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 206, n. 1-2, p. 13-22, 2003.

HOLBRO, T.; CIVENNI, G.; HYNES, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. **Experimental Cell Research**, v.284, n. 1, p. 99-110, 2013.

HERMELINCK, K. et al. Short-term effects of treatment –induced hormonal changes on cognitive function in breast cancer patients. **Cancer**, v. 113, n. 9, p. 2431-2439, 2008.

HERMELINK, K. et al. Two different sides of “chemobrain”: determinants and nondeterminants of self-perceived cognitive dysfunction in a prospective, randomized, multicenter study. **Psychooncology**, v. 19, n. 12, p. 1321-1328, 2010.

HERNANDEZ, R. K. et al. Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. **Cancer**, v. 115, n. 19, p. 4442-4449, 2009.

HOPP, T. A. et al. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 22, p. 7490-9, 2004.

HOSKINS, J. M.; CAREY, L. A.; MCLEOD, H. L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. **Nature Reviews of Cancer**, v. 9, n. 8, p. 576-86, 2009.

HUANG, B. et al. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. **Proceeding of the National Academy of Sciences of USA**, v. 111, n; 5, p. 1933-8, 2014.

HUANG, B.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J. Å. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 418, n. 3, p. 240-4, 2015.

INCA. INCA- Instituto Nacional do Câncer – Estimativa 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> >.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **Trends in Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 423-6, 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long term memory. **Behavior Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Artmed 2002.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

JACOME, L. F. et al. Estradiol and ER β agonists enhance recognition memory, and DPN, an ER β agonist, alters brain monoamines. **Neurobiol Learn Mem.** 2010 Nov 94(4):488-98.

JARZABEK, K. et al. Distinct mRNA, protein expression, patterns and distribution of oestrogen receptors α and β in human primary breast cancer: Correlation with proliferation marker Ki-67 and clinicopathological factors. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 18, p. 2924-2934, 2005.

JENKINS P.A. et al. Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. **Psychooncology**, v. 13, n. 1, p. 61-66, 2004.

JENKINS, V. et al. A 3-year prospective study of the effects of adjuvant treatments on cognition in women with early stage breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 828-834, 2006.

JERJEES, D. A. et al. ERK1/2 is related to oestrogen receptor and predicts outcome in hormone-treated breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 147, n. 1, p. 25-37, 2014.

JIANG, Y. et al. Snail and Slug mediate tamoxifen resistance in breast cancer cells through activation of EGFR-ERK independent of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Molecular and Cell Biology**, v. 6, n. 4, p. 352-4, 2014.

JOHNSTON, S. R. et al. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. **Cancer Research**, v. 55, n. 15, p. 3331-8, 1995.

KARAMOUZIS, M. V. et al. Targeting androgen/estrogen receptors crosstalk in cancer. **Trends in Cancer**, v. 2, n. 1, p. 35-48, 2016.

KARIMI, S. [et al.](#) The effects of tamoxifen on spatial and nonspatial learning and memory impairments induced by scopolamine and the brain tissues oxidative damage in ovariectomized rats. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, p. 196, 2015.

KATO, S. et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. **Science**, v. 270, n. 5241, p. 1491-4, 1995.

KATZENELLENBOGEN, B.S. et al. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 279-85, 2000.

KHAN, S. A. et al. Estrogen receptor expression of benign breast cancer epithelium and its association with breast cancer. **Cancer Research**, v. 54, p. 993-997, 1994.

KIRKEGAARD, T. et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. **The Journal of Pathology**, v. 207, n. 2, p. 139-46, 2005.

KNOWLTON, J. M. et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 1032–1044, 2003.

KONECNY, G. et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 95, n. 2, p. 142-53, 2003.

KROENKE, C. H. et al. Race and breast cancer survival by intrinsic subtype based on PAM50 gene expression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 3, p. 689-699, 2014.

KRONBLAD, A. et al. ERK1/2 inhibition increases antiestrogen treatment efficacy by interfering with hypoxia-induced downregulation of ERα: a combination therapy potentially targeting hypoxic and dormant tumor cells. **Oncogene** 2005;24(45):6835–6841.

Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. **Steroids**, v. 64, n. 5, p. 310-9, 1999.

LEUNG, Y. K. et al. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 103, n. 35, p. 3162–3167, 2006.

LEGAULT, C. et al. Effects of Tamoxifen and Raloxifen on memory and other cognitive abilities: Cognition in the study of Tamoxifen and Raloxifen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 31, p. 5144-5152, 2009.

LEUNG, Y. K. et al. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. **Steroids**, v. 77, n. 7, p. 727-37, 2012.

LIEDKE, P. E. et al. Systemic administration of doxorubicin impairs aversively motivated memory in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.94, n.2, p. 239-43, 2009.

LINDBERG, K. et al. Estrogen receptor β represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 2, p. R43, 2011.

LINDNER, R. et al. Molecular phenotypes in triple negative breast cancer from African American patients suggest targets for therapy. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. 71915, 2013.

LIU, F. et al. Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 334-343, 2008.

LYNCH, J. F. et al. Hippocampal cytosolic estrogen receptors regulate fear generalization in females. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 130, p. 83-92, 2016.

MA, C.X. et al. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 261-75, 2015.

MA, C.X. Prognostic and predictive biomarkers of endocrine responsiveness for estrogen receptor positive breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 882, p. 125-54, 2016.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, n. 3742, p. 351-8, 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory-a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-51, 2000.

MADEIRA, M. et al. Estrogen receptor alpha/beta ratio and estrogen receptor beta as predictors of endocrine therapy responsiveness-a randomized neoadjuvant trial comparison between anastrozole and tamoxifen for the treatment of postmenopausal breast cancer. **BMC Cancer**, v. 13, p. 425, 2013.

MARTIN, L. A. et al. Elevated ERK1/ERK2/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation. **Endocrine Related Cancer**, p. S75-84, 2005.

MCGLYNN, L. M. et al. Ras/Raf-1/MAPK pathways mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 1487-95, 2009.

MILLER, W. R. et al. Oestrogen receptor beta and neoadjuvant therapy with tamoxifen: prediction of response and effects of treatment. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 9, p. 1333-8, 2006.

MILLER, T. W. et al. A gene expression signature from human breast cancer cells with acquired hormone independence identifies MYC as a mediator of antiestrogen resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 2024-34, 2011.

MINISINI, A. et al. What is the effect of systemic anticancer treatment on cognitive function? **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 5, p. 273-282, 2004.

MITTENDORF, E.A. et al. The Neo-Bioscore update for staging breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: Incorporation of prognostic biologic factors into staging after treatment. **JAMA Oncology**, v. 2, n. 7, p. 929-36, 2016.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6469–6487, 2007.

MOI, L. L. H. et al. Steroid receptor coactivators, HER-2 and HER-3 expression is stimulated by tamoxifen treatment in DMBA-induced breast cancer. **BMC Cancer**, v. 15, p. 12:247, 2012.

MULLER, G. E.; PILZECKER, A. Experimentelle Beitrage zur Lehre vom Gedaechnis. **Z. Psychol Ergaenzungsband**, v. 1, p. 1-300, 1900.

MURPHY, L. C. et al. Inducible urregulation of oestrogen receptor-beta 1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, V. 20, p. 553, 66, 2005.

MURPHY, L. C. et al. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to denovo tamoxifen resistance in human breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 12, p. 1411-6, 2002.

MUSGROVE, E. A.; SUTHERLAND, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews of Cancer**, v. 9, n. 9, p. 631–643, 2009.

NCCN Practice Guidelines in Oncology (v.1.2009): Breast cancer (Available at <http://www.nccn.org>; last accessed October 19, 2009)

NORRIS, J. D, et al. Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 6, p. 747-54, 1997.

NORUM, J. H.; ANDERSEN, K.; SORLIE, T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. **British Journal of Surgery**, v. 101, n. 8, p. 925-938, 2014.

NYANTE, S. J. et al. Cigarette smoking and postmenopausal breast cancer risk in a prospective cohort. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 9, p. 2339-2347, 2014.

OMOTO, Y. et al. Estrogen receptor (ER) β 1 and ER β cx/ β 2 inhibit ER α function differently in breast cancer cell line MCF7. **Oncogene**, v. 22, p. 5011–20, 2003.

OSBORNE, C. K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 3, p. 227-38, 1998.

OSBORNE, C. K. et al. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 4338s-4342s, 2001.

OSBORNE, C. K.; SCHIFF, R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 233-47, 2011.

PAECH, K. et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. **Science**, v. 277, p. 1508-10, 1997.

PAGANINI-HILL, A.; CLARK, L. J. Preliminary assessment of cognitive function in breast cancer patients treated with tamoxifen. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 64, n. 2, p. 165–176, 2000.

PALMIERI, C. et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 9, p. 1-13, 2002.

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 1160–7, 2009.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **Cancer J Clin**, v. 55, n. 2, p.74-108, 2005.

PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD. PDQ Cancer information summaries: Breast Cancer Treatment [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002-2016.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor α . **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 1-9, 2014.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-52, 2000.

PETTERSSON, K.; DELAUNAY, F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. **Oncogene**, v. 19, p. 4970–8, 2000.

PHILLIPS, K-A. et al. Cognitive function in postmenopausal breast cancer patients one year later after completing adjuvant endocrine therapy with letrozole and/or tamoxifen in the BIG 1-98 trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, n. 1, p. 221-226, 2011.

PHIPPS, A. I. et al. Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 103, n. 6, p. 470-477, 2011.

PHIPPS, A. I. et al. Body size, physical activity, and risk of triple-negative and estrogen-receptor-positive breast cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers and Prevention**, v. 20, n. 3, p. 454-463, 2011.

PIPERIGKOU, Z. et al. Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. **Matrix Biology**, 2016.

PISANI, S. L. et al. Estrogen receptor-Selective Agonists modulate learning in female rats in a dose- and task-specific manner. **Endocrinology**, v. 157, n. 1, p. 292-303, 2016.

PITTA, C. A. et al. Reversal of ER- β silencing by chromatin modifying agents overrides acquired tamoxifen resistance. **Cancer Letters**, v. 337, n. 2, p. 167-76, 2013.

POWELL, E. et al. Identification of estrogen receptor dimer selective ligands reveals growth-inhibitory effects on cells that co-express ER α and ER β . **PLoS ONE**, v. 7, p. e30993, 2012.

PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S26-35, 2015.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. **Nature Medicine**, v. 15, p. 842-844, 2009.

RABENOELINA, F. et al. Effect of prolonged hydroxytamoxifen treatment of MCF7 cells on mitogen activated kinase cascade. **International Journal of Cancer**, v. 98, n. 5, p. 698-706, 2002.

RASTELLI, F.; Crispino, S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. **Tumorigenesis**, v. 94, n. 3, p. 370-83, 2008.

RAZANDI, M. et al. Tamoxifen regulates cell fate through mitochondrial estrogen receptor beta in breast cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 27, p. 3274-85, 2013.

REESE, J. M. et al. ER β 1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ER α -positive and negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, p. 749, 2014.

REIRIZ, A. B. et al. Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 16, p. 5000, 2006.

RHODES, M. E.; FRYE, C. A. ERbeta-selective SERMs produce mnemonic-enhancing effects in the inhibitory avoidance and water maze tasks. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 2, p. 183-91, 2006.

RICARDO, S. et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 11, p. 937-946, 2011.

RIGGINS, R. B. et al. Pathways to tamoxifen resistance. **Cancer Letters**, v. 256, n. 1, p. 1-24, 2007.

RITTE, R. et al. Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. R76, 2012.

RIZZA, P. et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research**, v. 16, p. R21, 2014.

ROMAN, M. D. et al. Tobacco smoking patterns and differential food effects on prostate and breast cancers among smokers and nonsmokers in Córdoba, Argentina. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 4, p. 310-318, 2014.

ROSIN, G. et al. Oestrogen receptors b1 and bcx have divergent roles in breast cancer survival and lymph node metas-tasis. **British Journal of Cancer**, v. 111, p. 918–926, 2014.

SAVILLE, B. et al. Ligand-cell- and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. **Journal of Biology Chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5379-87, 2000.

SCHAGEN, S. B. et al. Late effects of adjuvant chemotherapy on cognitive function: a follow-up study in breast-cancer patients. **Annals of Oncology**, v. 13, n. 9, p. 1387–1397, 2002.

SCHWARZENBACH, H. et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. **Clinical Cancer Research**, v. 18, p. 5719-30, 2012.

SENGUPTA, S.; JORDAN, V. C. Selective estrogen modulators as an anticancer tool: mechanisms of efficiency and resistance. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 630, p. 206-19, 2008.

SHAH, S. P. et al: The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, p. 395-399, 2012.

SHAW, L. E. et al. Changes in oestrogen receptor-alpha and -beta during progression to acquired resistance to tamoxifen and fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in MCF7 human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 1, p. 19-32, 2006.

SHOU, J. et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 96, n. 12, p. 926-35, 2004.

SILVA, I. et al. Estrogen, progesterone and tamoxifen increase synaptic density of the hippocampus of ovariectomized rats. **Neuroscience Letters**, v. 291, n. 3, p. 183–186, 2003.

SIVARAMAN, V. S. et al. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 7, p. 1478-83, 1997.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v. 235, p. 177-82, 1987.

SORLIE, T. et al. Gene expression pattern of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SPEIRS, V. et al. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen breast cancer patients. **Cancer Research**, v. 59, n. 21, p. 5421-4, 1999.

SPENCER-SEGAL, J. L. et al. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. **Neuroscience**, v. 202, p. 131-46, 2012.

SUN, X. et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. **Oncogene**, v. 9, 2014.

SUO, Z. et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. **Journal of Pathology**, v. 196, n. 1, p. 17-25, 2002.

TAJIK, A. et al. Activation of the dorsal hippocampal nicotinic acetylcholine receptors improves tamoxifen-induced memory retrieval impairment in adult female rats. **Neuroscience**, v. 327, p. 1-9, 2016.

TALEBI, A. et al. The Role of Estrogen Receptors on Spatial Learning and Memory in CA1 Region of Adult Male Rat Hippocampus. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 2, p. 183-91, 2010.

THRANE, S. et al. Estrogen receptor α is the major driving factor for growth in tamoxifen-resistant breast cancer and supported by HER/ERK signaling. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 1, p. 71–80, 2013.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, p. 60, 2015.

TREECK, O. et al. Estrogen receptor β exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 3, p. 557–565, 2010.

TRENTAM-DIETZ, A. et al. Modification of breast cancer risk according to age and menopausal status: a combined analysis of five population-based case-control studies. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 145, n. 1, p. 165-175, 2014.

TZUKERMAN, M. T. et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. **Molecular Endocrinology**, v. 8, p. 21-30, 1994.

UMEKITA, Y. et al. Expression of wild-type estrogen receptor β protein in human breast cancer: specific correlation with HER2/neu overexpression. **Pathology International**, v. 56, n. 8, p. 423-7, 2006.

VAN DAM, F. S. A. M. et al. Impairment of cognitive function in women receiving adjuvant treatment for high-risk breast cancer: high-dose versus standard-dose chemotherapy. **Journal of National Cancer Institute**, v. 90, n. 3, p. 210–18, 1998.

VELAZQUEZ-ZAMORA, D. A.; GARCIA-SEGURA, L. M.; GONZALEZ-BURGOS, I. Effects of selective estrogen receptor modulators on allocentric working memory performance and on dendritic spines in medial prefrontal cortex pyramidal neurons of ovariectomized rats. **Hormones and Behavior**, v. 61, n. 4, p. 512-7, 2012.

VIENONEN, A. et al. Regulation of nuclear receptor and cofactor expression in breast cancer cell lines. **European Journal of Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 469–479, 2003.

VOGEL, V. G. The NSABP study of Tamoxifen and Raloxifen (STAR) trial. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 9, n. 1, p. 51-60, 2009.

WALKER, E. A. et al. Effects of repeated administration of chemotherapeutic agentstamoxifen, methotrexate, and 5-fluorouracil on the acquisition and retention of a learned response in mice. **Psychopharmacology**, v. 217, n. 4, p. 539-548, 2011.

WATSON, C. et al. High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. **American Journal of Pathology**, v. 177, n. 5, p. 2205-15, 2010.

WILLIAMS, C. L.; STANCEL, G. M. Estrogênios e progestogênios. In: Hardman, J.G. et al. (Ed.). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 1055.

WIMBERLY, H. et al. ERb splice variant expression in four large cohorts of human breast cancer patient tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 146, n. 3, p. 657–667, 2014.

WU, X. et al. Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. **Breast Cancer Research**, v. 13, p. R27, 2011.

WU, Y, et al. Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN. **PLoS One**, v. 8, p. e78259, 2013.

YIN, L. et al. Disruption of the ER- α 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107369, 2014.

ZABIHI, H. et al. The effects of tamoxifen on learning, memory and brain tissues oxidative damage in ovariectomized and naïve female rats. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 219, 2014.

ZHANG, X. et al. Mechanisms of Gefitinib-mediated reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells by inducing ER α re-expression. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7835, 2015.

ZHANG, X.; WANG, Z. Y. Estrogen receptor- α variant, ER- α 36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 1990-8, 2013.

ZHENG, A.; KALLIO, A.; HARKONEN, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2764-77, 2007.

ZWART, W. et al. 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. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 8, p. 1253-61, 2010.

7. ARTIGO 1 – Capítulo 1

Manuscrito a ser submetido: Breast Cancer Research

Original Research Article

The expression of ER β and its relation with ER α and ErbB family in response to tamoxifen treatment in both sensitive and resistant cells.

Martina Lichtenfels^{1,2}, Mireia Berdiel², Stefan Wiemann².

¹ Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

² Division of Molecular Genome Analysis, German Cancer Research Centre (DKFZ), Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg, Germany

Abstract

Introduction: Approximately two-thirds of all breast cancer patients overexpress hormonal receptors, and are treated with endocrine therapy, being tamoxifen (TAM) the standard treatment. However, many of initial responders to TAM as first-line experience relapse. Several mechanisms have been proposed to explain the occurrence of acquired TAM resistance. Previous studies showed that estrogen receptor β (ER β) expression is associated with better response to tamoxifen treatment, as the co-expression of ER α and ER β is associated with TAM antiproliferative effects. Moreover, there is growing interest about the cross-talk between ERs and ErbB family in response to endocrine therapy. In the present study, we evaluate the expression of ER β and the relation of ER β with ER α and ErbB family in response to TAM treatment and in TAM resistant cells.

Methods: ER β expression was analyzed in two different databases of breast cancer patients. The mRNA levels of ER, HER receptors and PTEN, Akt and MAPK signal pathways were measured after TAM treatment, in TAM resistance cells and in cells silenced for ER genes. The cellular viability was also measured after TAM treatment, in TAM resistance cells and in cells silenced for ER genes.

Results: Breast cancer patients presented reduced ER β expression and the ER α -positive breast cancer subtypes presented lower ER β levels when compared to ER α -negative breast cancer subtypes. Cells expressing moderates levels of ER β presented better response to TAM treatment. Down-regulation of ERs induced by TAM treatment are accompanied with an increase in ErbB2 and ErbB3, reduced AKT and MAPK3 mRNA levels and increased PTEN levels. ER β modulates TAM anti-proliferative effects through MAPK3 pathway. TAM-resistant cells expressed decreased ER mRNA levels and increased EGFR, ErbB3 and ErbB4 levels.

Conclusions: These results provide additional data indicating the importance of ER β , and the relation with ER α and HER receptors, to predict TAM responsiveness.

Keywords: Breast cancer; Estrogen receptor alpha; Estrogen receptor beta; ErbB receptors; Tamoxifen; Drug resistance.

Introduction

Breast cancer is the most important cancer-related cause of death in women all over the world [1]. Approximately two-thirds of all breast cancer patients overexpress the estrogen receptor α (ER α), making it an excellent candidate for endocrine therapy [2]. Two estrogen receptors (ER) have been identified, ER α and ER β . ER α plays an important role in the proliferation and progression of breast cancer cells [3, 4], however the role of ER β in breast cancer has not yet been clearly established. ER β is considered a tumor suppressor because its expression is up-regulated in normal tissue [5] and down-regulated in breast tumor tissue [6, 7]. Moreover, previous literature demonstrated that ER β can modulate ER α action decreasing sensitivity to estrogen and inhibiting proliferation [8, 9]. ER α is used in clinical setting as a marker to decide for endocrine treatment of breast cancer, being tamoxifen (TAM) the standard treatment.

TAM is a selective estrogen receptor modulator (SERM) that can present mixed agonist and antagonist effects on ER. In breast cancer, TAM acts as an ER antagonist that competitively inhibits the binding of estrogen to ER, thus repressing the activation of ER, and inhibiting breast cancer proliferation. However, despite being very effective in breast cancer treatment, one-third of initial responders to TAM as first-line experience relapse even through an unchanged ER α status [10, 11].

Currently, ER β has also been considered a marker of endocrine response. Lower expression of ER β is found in TAM-resistant tumors [12] and high expression of ER β is associated with better response to TAM treatment [13] and better clinical outcome in ER α positive breast cancer patients [14].

Other important receptors involved in response to endocrine therapy are the receptors tyrosine kinase (RTKs). The epidermal growth-factor receptor (EGFR) family belongs to the RTK family and has been receiving attention in the last years in the context of breast cancer. The ErbB (or HER) family of proteins consists of four receptors: EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4 (ErbB1-4), and upon ligand binding the HER receptors form homo- and/or heterodimers, to activate downstream signaling pathways [15]. There is growing interest about the cross-talk between ERs and HER receptors in response to endocrine therapy. In breast cancer, EGFR, ErbB2 and ErbB3 overexpression are frequently related with resistance to endocrine therapy [16, 17]. Indeed, some studies showed that treatment with ErbB inhibitors were partially capable to reverse TAM resistant [18, 19]. Lindberg and colleagues showed that induced expression of ER β down-regulate HER2/HER3

expression and increase response to TAM treatment [13], suggesting that TAM can act through ER β and/or HER receptors as compensatory pathways.

In the current study, we characterized the expression of ER β and evaluated the relation of ER β with ER α and ErbB family in response to TAM treatment and in TAM resistant cells with the aim of improve treatment and highlight mechanisms of acquired resistance.

Materials and methods

Patient data analysis

Two datasets which included mRNA expression data for human primary breast tumors and healthy women were analyzed. Normalized and matched mRNA expression data from the METABRIC study (Curtis et al., 2012; Dvinge et al., 2013) was used to analyze differential expression of mRNA of ER β gene in breast cancer subgroups. Normalized mRNA expression data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) was used for analysis of ER β expression in an independent breast cancer patient dataset (Cancer Genome Atlas, 2012).

Cell culture and development of TamR MCF-7 cell line

The human breast cancer cell lines, MCF-7 and T47D cancer cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). MCF-7 cells were cultured in MEM without phenol red supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine and 1% sodium pyruvate (Invitrogen, CA, USA). MCF7 cell resistant to TAM (TAMR) were developed by culturing parental cells (WT) in the presence of 5 mM 4-hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for approximately 1 year. Parental cells (WT) were cultured in parallel to resistant ones without addition of TAM. T47D cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% sodium pyruvate. MCF-7 WT and TAMR cells were cultured between passages 100 and 120, as it takes 1 year to develop the resistant cells. Other cell lines were cultured between passages 5 and 20. Cells were cultured in medium without antibiotics. Multiplex human cell authentication as well as contamination tests of the cell lines were performed at the DKFZ Core Facility.

Tamoxifen treatment

MCF7 and T47D cells were seeded 1×10^5 cells/well in six-well tissue culture plates for 24h and then treated with 4-hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 1 μ M, 5 μ M, 7.5 μ M, or 10 μ M during 24h, 48h and 72 hours. Control cells were treated with addition of

ethanol 100%. After treatments cells were lysed in Tryzol reagent (Invitrogen, CA, USA), then RNA was extracted and cDNA was synthesized for RT-PCR measurement. For viability test, cell were seeded 5×10^3 cells/well in 96 well tissue culture plates for 24h, treated with the same conditions and then prepared for viability test.

Cell viability

Cell viability was assessed 24h, 48h and 72h after tamoxifen treatment and 72h after transfection with siRNAs using tetrazolium-based WST reagent from Roche (Roche, Penzberg, Germany). After 3h of incubation with respective reagent, absorbance was measured at 460 nm for WST.

Transfections with siRNAs

All transfections were performed in antibiotic free media using a siRNA according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA). Combination siRNA knockdowns were transfected to a final concentration of 20 nM. For silencing of ER α and ER β , pools of four small interfering RNAs (siRNAs) were used.

Quantitative RT-PCR for protein-coding genes

RevertAid_H Minus First Strand cDNA synthesis kit from Fermentas (Karlsruhe, Germany) was used for the synthesis of cDNA according to the manufacturer's instructions. Sequences of primers and the respective UPL probe numbers (Roche, Penzberg, Germany) are given in Table 1. *ACTB* and *GAPDH* were used as mRNA housekeeping genes. Gene expression results were analysed using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ algorithm [20] and shown as fold changes compared to control cells.

Table 1. Primers for RT-PCR

Gene	Primer sequence
RE α	Forward: 5'-AGACATGAGAGCTGCCAACC-3' Reverse: 5'-GCCAGGCACATTCTAGAAGG-3'
RE β	Forward: 5'-TCACATCTGTATGCGAACC-3' Reverse: 5'-CGTAAACTTCCGAAGTCGG-3'
EGFR	Forward: 5'-CTCCAGGAAGCCTACCGTGAT-3' Reverse: 5'-GTCTTTGTGTTCCCGGACAT-3'
ErbB2	Forward: 5'-AAAGGCCCAAGACTCTCTCC-3' Reverse: 5'-CAAGTACTCGGGGTCTCCA-3'
ErbB3	Forward: 5'-GTCATGAGGGCGAACGAC-3' Reverse: 5'-AGAGTCCCAGGACACACTGC-3'

ErbB4	Forward: 5'-GAAGAGGATTTGGAAGATATGATG-3' Reverse: 5'-ACAGCAGGAGTCATCAAAAATCTC-3'
Akt	Forward: 5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3' Reverse: 5'-CTTAATGTGCCCGTCCTTGT-3'
PTEN	Forward: 5'-GGGAAGTAAGGACCAGAGAC-3' Reverse: 5'-TCCAGATGATTCTTTAACAGGTACG-3'
MAPK1	Forward: 5'-TCTGGCAGGCAGGCAGGCAAT-3' Reverse: 5'-TGACCGGGAGGAGGAAGGAAGA-3'
MAPK3	Forward: 5'-TCAGAGCGCCACCCTGGAA-3' Reverse: 5'-TGAGGCCCGGAGGATCTGG-3'
ACTB	Forward: 5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3' Reverse: 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'
GAPDH	Forward: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Statistical Analysis

Patient data analysis

Welch's t-test was performed to detect significant differential expression changes between the breast cancer subgroups. mRNA expression levels were categorized based on distribution quartiles into low (<Q1), medium (Q1eQ3) and high (>Q3) expression group. Fisher's exact test was used to test association between mRNA groups and categorical clinicopathological factors.

Cell culture experiments

Mean values \pm standard deviations (SD) were calculated. The results of in vitro tests were analyses using ANOVA followed by t-test. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software or SPSS. All tests were two-sided tests. P values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patients data

First, we asked whether endogenous expression levels of ER β were associated with cancer. To this end we analyzed data from the METABRIC study (Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium), publically available cohort of 939 breast tumors [21], and

data from TCGA study (The Cancer Genome Atlas, 2012), available cohort of 369 breast cancer patients.

Normalized and matched mRNA expression data from the METABRIC study was used to analyze differential expression of mRNA and target genes in breast cancer subtypes. This analysis identified low levels of ER β in breast cancer patients compared to healthy women ($p < 0.0001$) (Fig. 1A). Comparisons between the breast cancer subgroups showed significant difference in ER β expression. LumA and LumB subtypes presented lower levels of RE β compared to HER2 and Basal ($p < 0.0001$) (Fig. 1B). We observed the same results analyzing normalized sequencing mRNA data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) (Fig. 2A and 2B). TCGA was used for analysis of target gene in an independent breast cancer patient dataset.

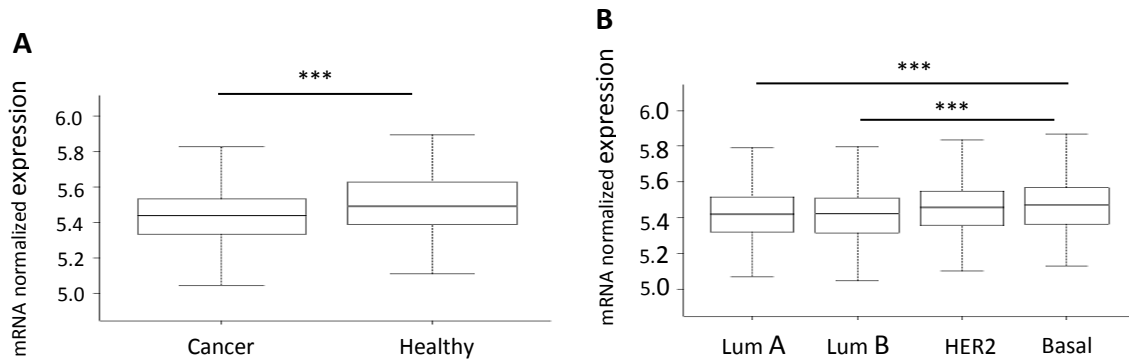


Fig. 1 METABRIC (A) ESR2 in whole tumor tissue (939 patients), (B) ESR2 in the different breast cancer subtypes (LumA: 466; LumB: 268; HER2: 87; Basal: 118).

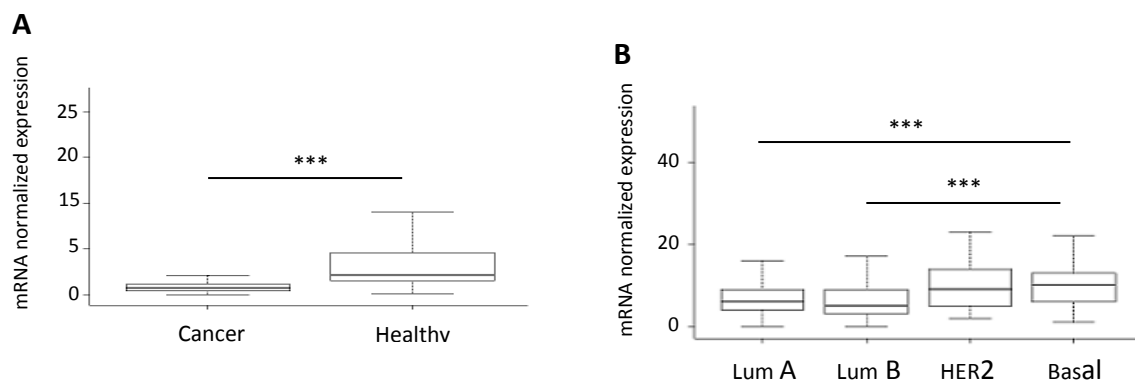


Fig. 2 TCGA (A) ESR2 in whole tumor tissue (369 patients), (B) ESR2 in the different breast cancer subtypes (LumA: 183; LumB: 97; HER2: 34; Basal: 55).

Effects of TAM on the proliferation of MCF-7 and T47D cells

To determine the effects of TAM on the proliferation of MCF-7 and T47D cells, we treated these cells with different doses of TAM for different periods and then used the WST assay to evaluate cell proliferation (Fig. 3A and 3B). The results revealed that all concentrations of TAM for 24h and 48h inhibited T47D cells proliferation. However in MCF7 cells treatment with TAM during 24h and 48h only inhibited proliferation with the higher doses of 7.5 and 10 μ M. Tamoxifen treatment for 72h increased the inhibitory effects of TAM in T47D cells, and the decreased proliferation was associated with an increase of TAM concentration. In MCF7 cells, TAM treatment during 72h inhibited cell proliferation with all concentrations, being more pronounced with higher concentrations of TAM (7.5 and 10 μ M).

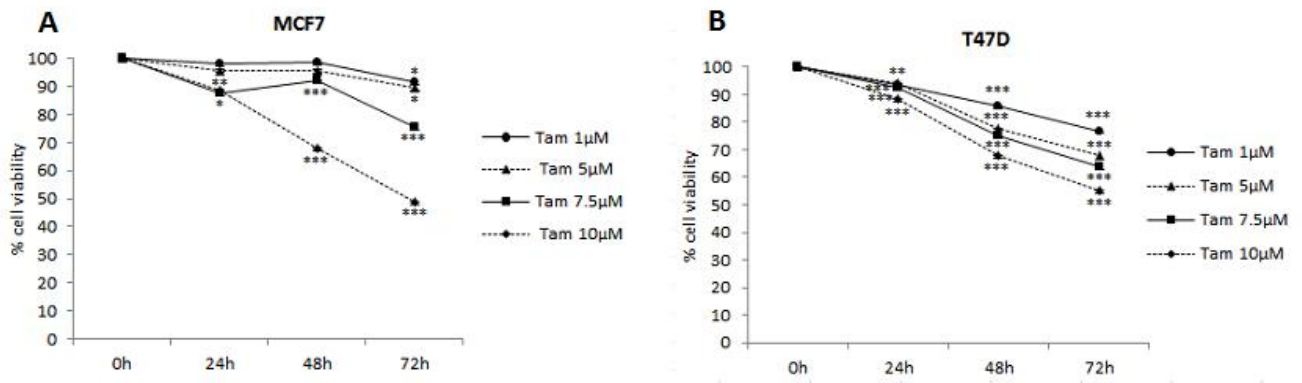


Fig. 3 Dose curve and time course of the effect of tamoxifen on the proliferation of MCF-7 and T47D cells./ Proliferative response to TAM. Cells were cultured for 24h, 48h and 72h in defined medium containing the indicated concentrations of TAM. Relative viability was determined from normalized absorbancy as compared to control. (A) MCF-7 cells treated with tamoxifen, (B) T47D cells treated with TAM. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

TAM down-regulate ER α mRNA and ER β mRNA levels in MCF-7 and T47D cells

The results revealed that, compared with control group mRNA levels of ER α and ER β were down-regulated in TAM treated groups. Following TAM treatment for 24h, MCF7 and T47D cells presented different results. ER α mRNA level was significantly down-regulated with the highest dose of TAM ($p < 0.05$) in MCF7 cells, whereas the ER β mRNA levels were not significantly different compared to control (Fig. 4A and 4C). In T47D cells was the contrary, ER α levels were similar to control, and ER β levels were down-regulated with the lower doses of TAM ($p < 0.05$) (Fig. 4B and 4D). However, ER α and ER β mRNA levels were down-regulated in a similar manner in MCF7 and T47D with TAM treatment for 48h and 72h. In MCF7 TAM treated cells the ER α mRNA levels exhibited more proliferation inhibition compared to control, whereas in T47D TAM treated cells the ER β mRNA levels was more down-regulated (Fig. 4A, 4B, 4C, 4D).

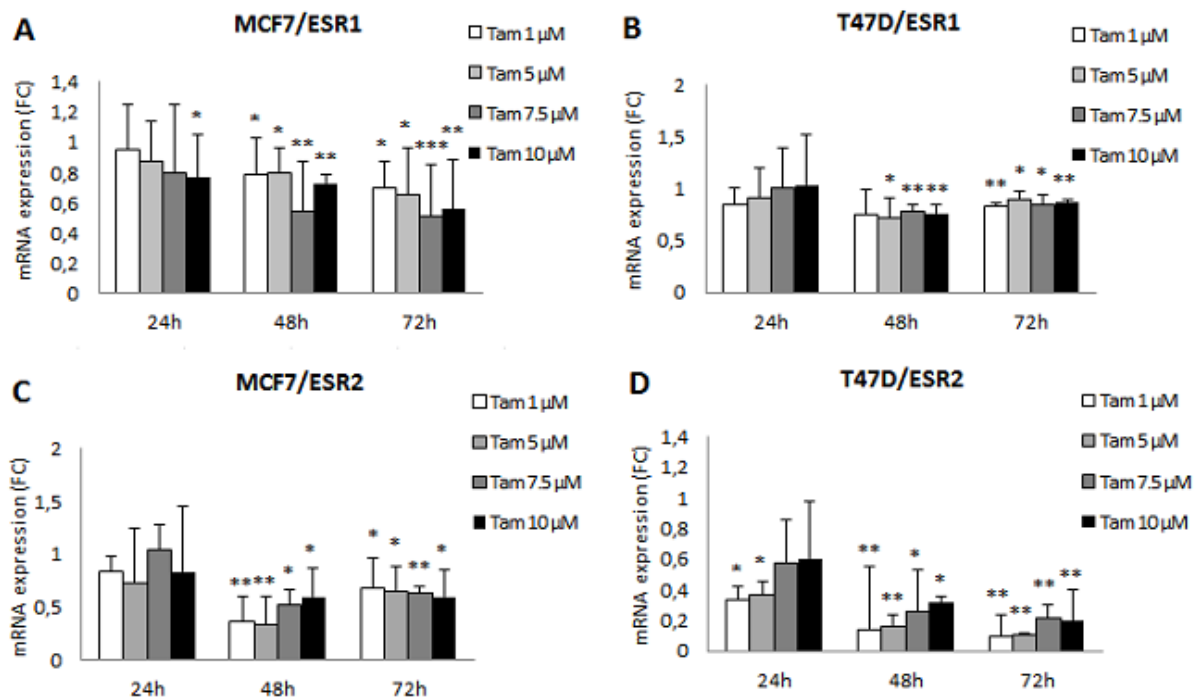


Fig. 4 Dose curve and time course of the effect of tamoxifen on the mRNA expression of ER in MCF-7 and T47D cells. Cells were cultured for 24h, 48h and 72h in defined medium containing the indicated concentrations of TAM. Gene expression results from TAM treated cells were analysed using the $2^{(-\Delta\Delta Ct(T))}$ algorithm and shown as fold changes compared to control cells. qRT-PCR of (A) ESR1 in MCF7 cells, (B) ESR1 in T47D cells, (C) ESR2 in MCF7 cells, (D) ESR2 in T47D cells. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

Down-regulation of ER α mRNA and ER β mRNA levels was accompanied by an up-regulation of ErbB2 mRNA and ErbB3 mRNA levels in MCF7 and T47D cells

In T47D and MCF7 cells, the reduced ER mRNA levels with longer TAM treatment was accompanied by an increase in ErbB2 and ErbB3 mRNA levels (Fig. 5C, 5D, 5E and 5F). In both cell lines, TAM treatment did not alter EGFR mRNA levels (Fig. 5A and 5B). ErbB4 levels respond differently to TAM treatment in T47D and MCF7 cells. In T47D cells, ErbB4 mRNA levels after 24h of treatment are up-regulated however with longer treatment the expression of ErbB4 begins to decrease (Fig. 5H). The ErbB4 mRNA decreasing occurs along with the increasing of ErbB2 mRNA levels. In MCF7 cells, ErbB4 mRNA expression is up-regulated during the 3 time points (Fig. 5G).

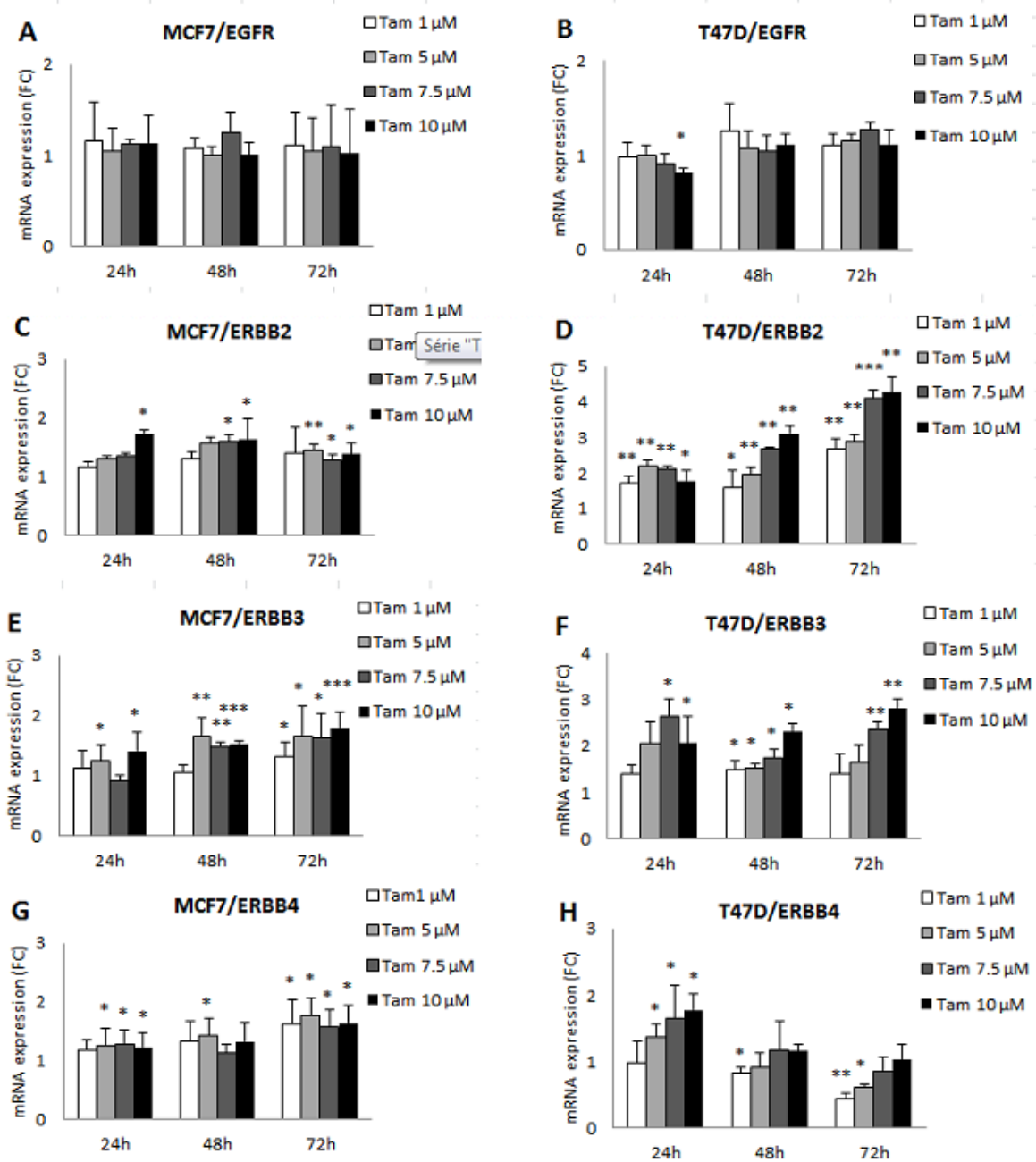


Fig. 5 Dose curve and time course of the effect of tamoxifen on the mRNA expression of HER receptors in MCF-7 and T47D cells. Cells were cultured for 24h, 48h and 72h in defined medium containing the indicated concentrations of TAM. Gene expression results from TAM treated cells were analyzed using the $2^{-(\Delta\Delta Ct(T))}$ algorithm and shown as fold changes compared to control cells. qRT-PCR of (A) EGFR in MCF7 cells, (B) EGFR in T47D cells, (C) ErbB2 in MCF7 cells, (D) ErbB2 in T47D cells, (E) ErbB3 in MCF7 cells, (F) ErbB3 in T47D cells, (G) ErbB4 in MCF7 cells, (H) ErbB4 in T47D cells. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

TAM down-regulated the mRNA expression of AKT and MAPK3 pathway and up-regulated PTEN

MCF7 and T47D cell lines presented the same expression pattern of AKT, PTEN, MAPK1 and MAPK3 mRNA after TAM treatment. In both cell lines, after treatment with 7.5 μ M and 10 μ M TAM for 48h and 72h, the mRNA levels of AKT was reduced compared with the expression levels detected in the control group (Fig. 6A and 6B). The mRNA levels of PTEN increased during the 3 time points with 7.5 μ M and 10 μ M TAM (Fig. 6C and 6D). The decrease in AKT mRNA levels and increase in PTEN mRNA levels was accompanied by a down-regulation of ERs and up-regulation of ErbB2, and ErbB3 mRNA expression. MAPK1 mRNA levels were unchanged after TAM treatment (Fig. 6E and 6F), however TAM induced a decreasing in MAPK3 mRNA levels with the higher concentrations (7.5 μ M and 10 μ M) for 72h in MCF7 and T47D cells (Fig. 6G and 6H).

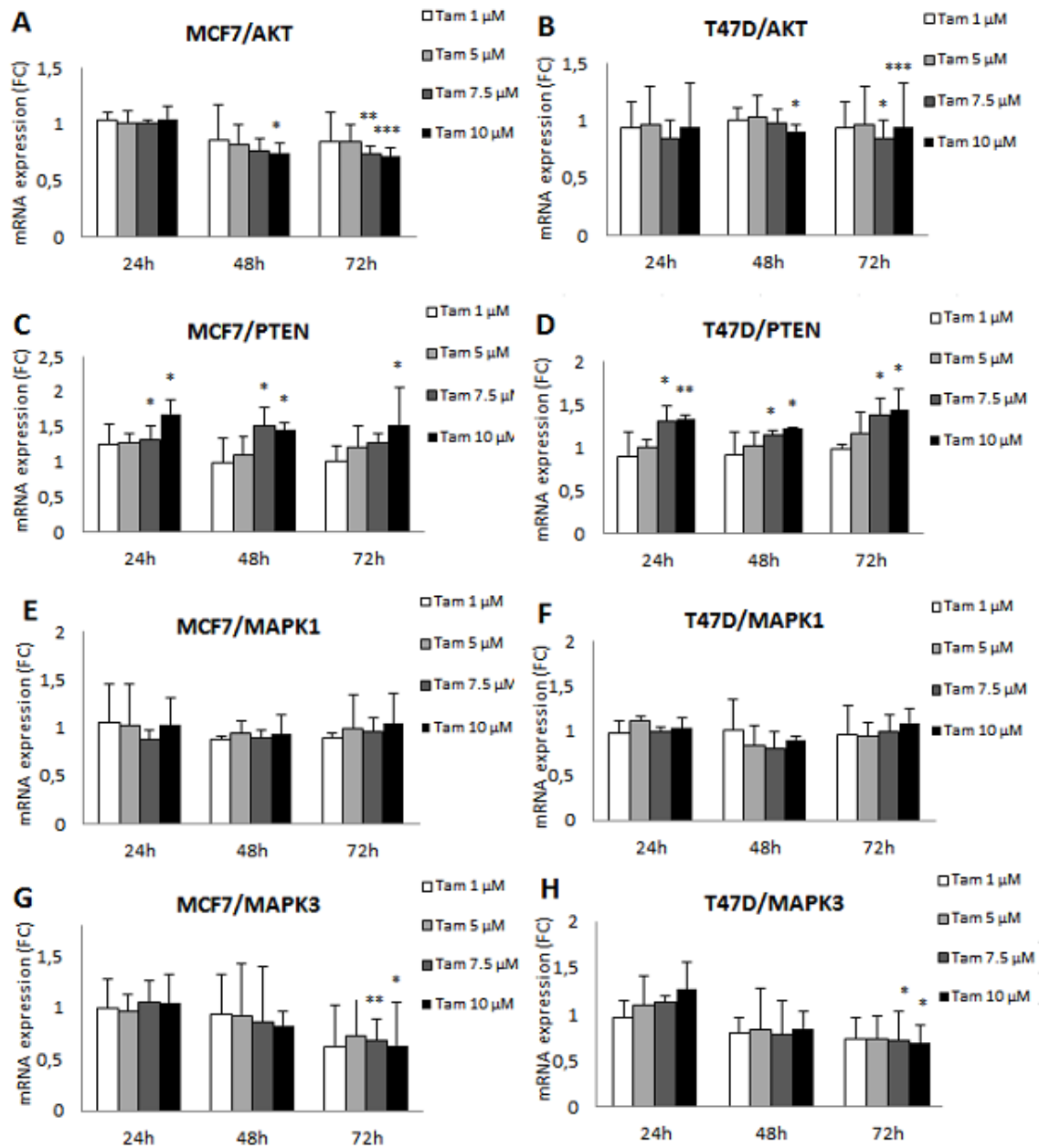


Fig. 6 Dose curve and time course of the effect of tamoxifen on the mRNA expression of signaling pathways in MCF-7 and T47D cells. Cells were cultured for 24h, 48h and 72h in defined medium containing the indicated concentrations of TAM. Gene expression results from TAM treated cells were analysed using the 2(-Delta-Delta-Ct(T)) algorithm and shown as fold changes compared to control cells. qRT-PCR of (A) AKT in MCF7 cells, (B) AKT in T47D cells, (C) PTEN in MCF7 cells, (D) PTEN in T47D cells, (E) MAPK1 in MCF7 cells, (F) MAPK1 in T47D cells, (G) MAPK3 in MCF7 cells, (H) MAPK3 in T47D cells.

ERs knockdown decrease cell proliferation in MCF7 cells

We assessed whether silencing of ER α and ER β affected cell proliferation in MCF7 cells. Silencing of both ER decreased cell proliferation, however ER α knockdown induced more anti-proliferative effects in MCF7 cells compared to ER β knockdown (Fig. 7).

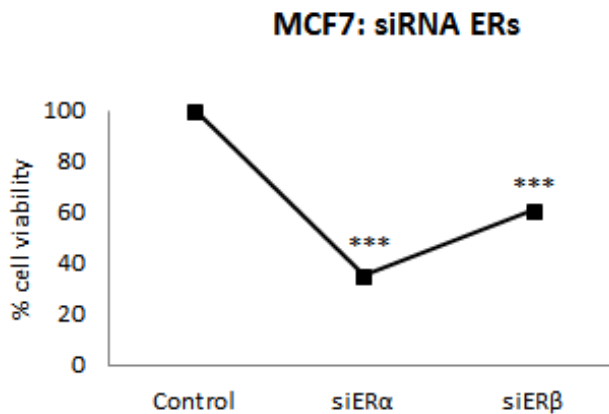


Fig. 7 Effect of ER α and ER β knockdown on the proliferation of MCF-7 cells. Cells were cultured in defined medium containing 20 nM of a pool of four small interfering RNAs specific for ER α or ER β knockdown. Relative viability was determined from normalized absorbancy as compared to control. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

ERs knockdown confirms the ER contribution in modulating ErbB family and ER action through AKT, MAPK signaling pathways in MCF7 cells

To investigate receptor-specific gene regulations we silenced the ER α and ER β in MCF7 cells (Fig. 8). Silencing of the endogenous ER β mRNA levels were confirmed by a reduction of 80% of its mRNA levels ($p < 0.001$). ER β knockdown had no effect on HER receptor however significantly decreased MAPK3 mRNA levels in MCF7 cells. ER α knockdown was effective, reducing its mRNA levels by 80-90% ($p < 0.001$). Silencing of endogenous ER α mRNA levels induced increase of EGFR mRNA levels and reduced AKT levels. ErbB2, ErbB3, ErbB4, PTEN and MAPK1 mRNA levels were not affected by ERs knockdown.

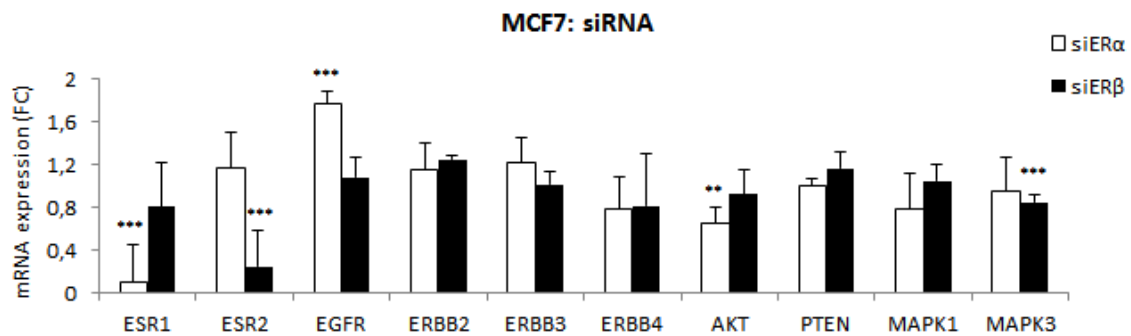


Fig. 8 Effects of ER α and ER β knockdown on mRNA levels of ERs, HER receptors and signaling pathways. Transcript levels were relatively quantified by means of qRT-PCR and analysed using the $2^{(-\Delta\Delta Ct(T))}$ algorithm and shown as fold changes compared to control cells. White bars illustrate the effect of stable knockdown of ER α and black bars show the effect of ER β silencing. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

MCF7 Resistant cells

To investigate the mechanism underlying the TAM-resistance in MCF-7 cells (MCF7/TAMR), we performed qRT-PCR to examine the mRNA levels of ERs, HER receptors, PTEN, AKT, MAPK1 and MAPK3 (Fig. 9). In MCF7/TAMR cells the mRNA levels of ER α , ER β and ErbB2 were downregulated when compared to parental MCF7 cells. In contrast, EGFR, ErbB3 and ErbB4 mRNA levels were up-regulated in MCF7/TAMR cells. All the signalling pathways analyzed were down-regulated in MCF7/TAMR cells.

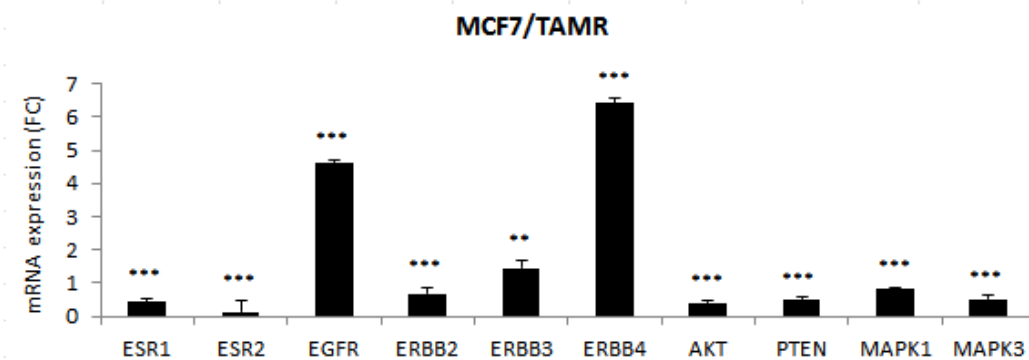


Fig. 9 qRT-PCR of ERs, HER receptors and signaling pathways of MCF7 cells resistant to TAM. Resistant cells were developed by culturing parental cells in the presence of 5 mM 4-hydroxytamoxifen for approximately 1 year and parental cells were cultured in parallel for comparisons. Gene expression results from TAM resistant cells were analysed using the $2^{(-\Delta\Delta Ct(T))}$ algorithm and shown as fold changes compared to parental cells. Error bars represent standard error for three experiments with three replicates each. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). ANOVA and T-test.

Discussion

In this study, we initially aimed to highlight the importance of ER β in breast cancer and further we investigate the role of ER β in response to TAM treatment in ER α -positive breast cancer cells. The role of ER α in breast cancer is well established however the role of ER β is still unclear. Different studies demonstrated lower levels of ER β in breast cancer patients and they have been considering the ER β as a tumor suppressor [6, 7]. In line with previous findings, our analyses of METABRIC and TCGA databases showed reduced ER β expression in breast cancer patients compared to healthy women. Indeed, the ER α -positive breast cancer subtypes presented lower ER β levels when compared to ER α -negative breast cancer subtypes. The differential expression of ER β among the molecular subtypes of breast cancer might indicate a possible role of ER β as an independent prognostic marker of breast cancer [22, 23]. However, is necessary to evaluate the relationship between these differential ER β expression with clinic-pathological parameters from patients to elucidate this hypothesis.

Nowadays ER β has also been considered a marker of endocrine response [12, 13, 14]. To determine the importance of ER β in response to TAM treatment we first selected 4 concentrations of TAM and treated two ER α -positive cell lines, MCF7 and T47 cells, during 3 periods of time (24h, 48h and 72h) and then we silenced the genes of ERs in the same cell lines. Our results showed that ER α and ER β mRNA levels were down-regulated in TAM treated cells compared to control cells. After 24h TAM treatment induced down-regulation in ER α levels in MCF7 cells, whereas in T47D cells was the contrary, only ER β mRNA levels were reduced. After TAM treatment for 48h and 72h both cell lines presented down-regulation of ER α and ER β mRNA levels. However in MCF7 cells the TAM induced inhibition of ER α mRNA levels was more pronounced and in T47D cells TAM treatment affects more the ER β mRNA levels. T47D cells presented more ER β expression in basal conditions compared to MCF7 cells [24, 25]. The basal expression of ER β in cell lines can explain the differential down-regulation of ERs in MCF7 and T47D cells found in our experiment. Corroborating these findings, in T47D cells all concentrations of TAM treatment for 24h and 48h inhibited cell proliferation, however in MCF7 cells treatment with TAM during 24h and 48h only inhibited proliferation with the higher doses. With 72h of TAM treatment, the inhibitory effects of TAM in T47D cells were increased and in MCF7 cells all concentrations of TAM inhibited proliferation. These results are in agreement with previous findings demonstrating that expression of ER β increases the response to TAM treatment [13, 26, 27]. These findings corroborate previous works indicating a possible role of ER β as a

prognostic marker of breast cancer [22, 23]. However our results are preliminary and further studies are necessary to confirm these findings.

There is growing interest about the cross-talk between ERs and ErbB family in response to endocrine therapy [13, 28]. In our study, we found a down-regulation of the ERs accompanied by an increasing in the ErbB2 and ErbB3 mRNA levels in MCF7 and T47D cells after TAM treatment. This observation is in accordance with studies demonstrating an important role of ErbB2/ErbB3 in response to endocrine therapy and suggesting that ErbB2 and ErbB3 can be used as target to enhance TAM response [29]. Indeed, the current study showed that combined treatment with ErbB2 inhibitors or dual ErbB2/EGFR inhibitors with anti-estrogens increased the response to anti-estrogens in MCF7 cells [28]. Contrary to the hypothesis that EGFR can mediate the effects of TAM as a compensatory pathway, when ER are down-regulated in our work the EGFR mRNA levels were not altered during TAM treatment. Expression of ErbB4 presented a different expression pattern in response to TAM. Zhu and colleagues showed a positive correlation between ER and ErbB4 in breast tumors [30]. In our experiment, TAM up-regulated ErbB4 mRNA levels as ErbB2 and ErbB3 mRNA levels and are inversely correlated with ERs levels in MCF7 cells. However, in T47D cells TAM treatment for 24h increase ErbB4 mRNA levels and after 48h and 72h TAM down-regulated ErbB4 levels along with an increase of ErbB2 levels.

We also evaluated the main signaling pathways involved in ER and HER cascade. Both cell lines presented reduced AKT and MAPK3 mRNA levels and increased PTEN along with a down-regulation of ER mRNA levels and up-regulation of ErbB2 and ErbB3 levels. The inverse correlation between ER and ErbB2/ErbB3 influencing changes in Akt and PTEN levels are in agreement with Lindberg and colleagues that demonstrated reduced Akt and ErbB2/ErbB3 levels and increased PTEN expression after ER β re-expression [13]. No difference in MAPK1 mRNA levels was found.

To assess the receptor-specific gene regulations of ERs in response to TAM we silenced ER α and ER β genes through siRNA in MCF7 cells. Trecek and colleagues showed an increased proliferation on MCF7 cells associated to ER β suppression, and the authors considered the ER β a tumor suppressor gene [31]. Contrary to these findings, we observed anti-proliferative effects of ER β knockdown in MCF7 cells. ER β knockdown significantly reduced MAPK3 mRNA levels. These findings can explain our previous results that demonstrated down-regulation of ER β along with reduced MAPK3 levels and decreased proliferation in response to TAM treatment. Therefore, we suggest that ER β modulates TAM anti-proliferative effects through MAPK3 pathway. As expected ER α knockdown demonstrated more anti-proliferative

effect in MCF7 cell compared to ER β silencing. ER α silencing induced increased EGFR mRNA levels and decreased Akt levels with effects on proliferation. Reduced Akt levels exhibited after TAM treatment might be explained by the ER α down-regulation. Corroborating our result, Silva and colleagues indicated that inhibition of Akt activity restored apoptotic responses to TAM [32]. Increased EGFR level in response to ER α silencing was not seen after TAM treatment probably because the down-regulation of ER α in response to TAM treatment is not as strong as the ER α knockdown.

Finally, we investigated the expression of ERs and HER receptors in our MCF-7/TAMR cells. Many authors evidenced reduced ER α and ER β levels and increased HER receptors levels in MCF7 cells resistant to TAM treatment [33, 17, 19, 34]. Our MCF7 resistant cells also expressed decreased ER α and ER β mRNA levels and increased EGFR, ErbB3 and ErbB4 levels. The increased mRNA levels of EGFR in resistant cells can be explained by the down-regulation of ER α . This result corroborates the hypothesis that a cross-talk between ERs and HER family may influence the development of TAM resistance. Combination of TAM and HER inhibitors can be potential therapeutic strategies for ER-positive breast cancer, preventing the development of resistance [28, 35, 36, 37, 38]. However, contrasting with previous works, we observed reduced ErbB2 mRNA levels in our MCF7/TAMR [16, 18]. We also revealed reduced mRNA levels of Akt, PTEN, MAPK1 and MAPK3 in MCF7/TAMR cells. The decreased Akt levels found in MCF7/TAMR cells can be explained by the reduced ER α mRNA levels and decreased MAPK3 levels might be associated to down-regulation of ER β . With these results, we clarified that in our MCF7/TAMR cells TAM induced down-regulation of ERs through Akt and MAPK3 pathways. Many studies revealed activation and overexpression of Akt and MAPK related to HER receptors overexpression in TAM resistance [16, 17, 19]. We observed the contrary in our cells, though, despite the overexpression of EGFR, ErbB3 and ErbB4, the mRNA levels of Akt, MAPK1 and MAPK3 are down-regulated in our MCF7 resistant cells. The above finding might be explained by the down-regulation of ErbB2 mRNA levels found in our resistant cells. Most of the TAM resistant cells with Akt and MAPK activation presented up-regulation of ErbB2 and it is possible that ErbB2 is involved in activation of both signaling pathways [16, 17].

We intended to test the same effects on protein level through western blot analysis, but we were not able to detect ER β -band in most of the samples and in some samples the antibody detected 4 different bands. We tried different ER β antibodies and concentrations in different cell types to optimize our western blot protocol. However, these efforts did not succeed and we had to restrict our study to the mRNA level.

Conclusion

In summary, reduced ER β expression in breast cancer patients and differential expression between different molecular subtypes of breast cancer suggests a possible role of ER β as a tumor suppressor in ER+ breast cancer. Cells expressing moderate levels of ER β presented better response to TAM treatment. Down-regulation of ERs induced by TAM treatment are accompanied with an increase in ErbB2 and ErbB3, reduced AKT and MAPK3 mRNA levels and increased PTEN levels. Anti-proliferative effects of ER β knockdown in MCF7 cells are accompanied by a significant reduction in MAPK3 levels. We hypothesized that ER β modulates TAM anti-proliferative effects through MAPK3 pathway. Our MCF7 cells resistant to TAM expressed decreased ER α and ER β mRNA levels and increased EGFR, ErbB3 and ErbB4 levels. These results corroborates previous works showing low levels of ER β in TAMR cells and the cross-talk between ERs and HER family influencing the development of TAM resistance. Taken together, these results provide additional data indicating the importance of ER β to predict TAM responsiveness.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. *Int J Cancer* 2015, 136(5):E359-86. doi: [10.1002/ijc.29210](https://doi.org/10.1002/ijc.29210)
2. Vargo-Gogola T, Rosen JM: **Modelling breast cancer: one size does not fit all**. *Nat Rev Cancer* 2007, 7: 659–672. doi: [10.1038/nrc2193](https://doi.org/10.1038/nrc2193)
3. Pearce ST, Jordan VC: **The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer**. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, 50(1):3–22. doi: [10.1016/j.critrevonc.2003.09.003](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.003)
4. Lacroix M, Leclercq G: **Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update**. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 83:249–289. doi: [10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc](https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc)
5. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: **Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:5925–5930.
6. Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H: **Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors**. *Cancer Res* 2001, 61(6):2537-2541.
7. Skliris G, Munot K, Bell S, Carder P, Lane S, Horgan K, Lansdown M, Parkes A, Hanby A, Markham A, Speirs V: **Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyltransferase inhibitors in a cell line model**. *J Pathol* 2003, 201:213–220. doi: [10.1002/path.1436](https://doi.org/10.1002/path.1436)

8. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G: **Mechanisms of estrogen action.** *Physiol Rev* 2001, 81:1535-1565.
9. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling.** *Oncogene* 2000, 19:4970–8. doi: [10.1038/sj.onc.1203828](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203828)
10. Osborne CK: **Steroid hormone receptors in breast cancer management.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, 51:227-238.
11. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, 9(9):631–643. doi: [10.1038/nrc2713](https://doi.org/10.1038/nrc2713)
12. Chen B, Gajdos C, Dardes R, Kidwai N, Johnston SRD, Dowsett M, Jordan VC: **Potential of endogenous estrogen receptor B to influence the selective ER modulator ERbB complex.** *Int J Oncol* 2005, 27:327-335.
13. Lindberg K, Helguero LA, Omoto Y, Gustafsson JA, Haldosen LA: **Estrogen receptor β represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity.** *Breast Cancer Res* 2011, 13(2):R43, 2011. doi: [10.1186/bcr2865](https://doi.org/10.1186/bcr2865)
14. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA: **ER β in breast cancer: onlooker, passive player, or active protector?** *Steroids* 2008, 73:1039-1051. doi: [10.1016/j.steroids.2008.04.006](https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.04.006)
15. Yarden Y, Sliwkowski MX: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(2):127–137. doi: [10.1038/35052073](https://doi.org/10.1038/35052073)
16. Block M, Gründker C, Fister S, Kubin J, Wilkens L, Mueller MD, Hemmerlein B, Emons G, Günthert AR: **Inhibition of the AKT/mTOR and erbB pathways by gefitinib, perifosine and analogs of gonadotropin-releasing hormone I and II to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells.** *Int J Oncol* 2012, 41(5):1845-1854. doi: [10.3892/ijo.2012.1591](https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1591)
17. Ghayad SE, Vendrell JA, Larbi S, Dumontet C, Bieche I, Cohen PA: **Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/AKT signaling pathways.** *Int J Cancer* 2010, 126(2):545-562. doi: [10.1002/ijc.24750](https://doi.org/10.1002/ijc.24750)
18. Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JMW, Harper ME, Barrow D, Wakeling AE, Nicholson R: **Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells.** *Endocrinology* 2003, 144(3):1032-1044. doi: [10.1210/en.2002-220620](https://doi.org/10.1210/en.2002-220620)
19. Thrane S, Lykkesfeldt AE, Larsen MS, Sorensen BS, Yde CW: **Estrogen receptor a is the major driving factor for growth in tamoxifen-resistant breast cancer and supported by HER/ERK signaling.** *Breast Cancer Res Treat* 2013, 139:71–80. doi: [10.1007/s10549-013-2485-2](https://doi.org/10.1007/s10549-013-2485-2)
20. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods* 2001, 25:402-408. doi: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262)
21. Dvinge H, Git A, Gräf S, Salmon-Divon M, Curtis C, Sottoriva A, Zhao Y, Hirst M, Armisen J, Miska EA, Chin SF, Provenzano E, Turashvili G, Green A, Ellis I, Aparicio S, Caldas C: **The shaping and functional consequences of the microRNA**

- landscape in breast cancer.** *Nature* 2013, 497(7449):378-82. doi: 10.1038/nature12108
22. Maehle BO, Collett K, Tretli S, Akslen LA, Grotmol T: **Estrogen receptor beta--an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer?** *APMIS* 2009, 117(9):644-50. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02510.x
 23. Guo L, Meng J, Yilamu D, Jakulin A, Fu M, Wang B, Abulajiang G: **Significance of ER β expression in different molecular subtypes of breast cancer.** *Diagn Pathol* 2014, 23(9):20. doi: 10.1186/1746-1596-9-20
 24. Vladusic AE, Hornby FK, Guerra-Vladusic J, LUPU R: **Expression and regulation of estrogen receptors in human breast tumors and cell lines.** *Oncology Reports* 2000, 7:157-167.
 25. García Pedrero JM, Del Rio B, Martínez-Campa C, Muramatsu M, Lazo PS, Ramos S: **Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors.** *Mol Endocrinol* 2002, 16(5):947-60. doi: 10.1210/mend.16.5.0830
 26. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:1566-1571. doi: [10.1073/pnas.0308319100](https://doi.org/10.1073/pnas.0308319100)
 27. Hodges-Gallagher L, Valentine CD, El Bader S, Kushner PJ: **Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, 109:241-250. doi: [10.1007/s10549-007-9640-6](https://doi.org/10.1007/s10549-007-9640-6)
 28. Chakraborty AK, Mehra R, Digiovanna MP: **Co-targeting ER and HER family receptors induces apoptosis in HER2-normal or overexpressing breast cancer models.** *Anticancer Res* 2015, 35(3):1243-50.
 29. Moi LLH, Flågeng MH, Gjerde J, Madsen A, Røst TH, Gudbrandsen OA, Lien EA, Mellgren G: **Steroid receptor coactivators, HER-2 and HER-3 expression is stimulated by tamoxifen treatment in DMBA-induced breast cancer.** *BMC Cancer* 2012, 12:247. doi: 10.1186/1471-2407-12-247
 30. Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS, Williams CC, Pandey AK, Marrero L, Vadlamudi RK, Jones FE: **Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells.** *Cancer Res* 2015, 66(16):7991-7998. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-05-4397](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4397)
 31. Treeck O, Lattrich C, Springwald A, Ortmann O: **Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, 120:557-565. doi: 10.1007/s10549-009-0413-2
 32. Silva J, Cavazos DA, Donzis E, Friedrichs WE, Marciniak R, de Graffenried LA: **Akt-induced tamoxifen resistance is associated with altered FKHR regulation.** *Cancer Invest* 2007, 25(7):569-573. doi: [10.1080/07357900701513538](https://doi.org/10.1080/07357900701513538)
 33. Arpino G, Green SJ, Allred DC, Lew D, Martino S, Osborne CK, Elledge RM: **HER-2 amplification, HER-1 expression and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study.** *Clin Cancer Res* 2004, 10(17):5670-5676. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-04-0110](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0110)

34. Zhang X, Zhang B, Liu J, Liu J, Li C, Dong W, Fang S, Li M, Song B, Tang B, Wang Z, Zhang Y: **Mechanisms of Gefitinib-mediated reversal of tamoxifen resistance in MCF-7 breast cancer cells by inducing ER α re-expression.** *Sci Rep* 2015, 5:7835. doi: 10.1038/srep07835
35. Morrison G, Fu X, Shea M, Nanda S, Giuliano M, Wang T, Klinowska T, Osborne CK, Rimawi MF, Schiff R: **Therapeutic potential of the dual EGFR/HER2 inhibitor AZD8931 in circumventing endocrine resistance.** *Breast Cancer Res Treat* 2014, 144(2):263-272. doi: 10.1007/s10549-014-2878-x
36. Pancholi S, Lykkesfeldt AE, Hilmi C, Banerjee S, Leary A, Drury S, Johnston S, Dowsett M, Martin LA: **ERBB2 influences the subcellular localization of the estrogen receptor in tamoxifen-resistant MCF-7 cells leading to the activation of AKT and RPS6KA2.** *Endocr Relat Cancer* 2008, 15(4):985-1002. doi: 10.1677/ERC-07-0240
37. Sonne-Hansen K, Norrie IC, Emdal KB, Benjaminsen RV, Frogne T, Christiansen J, Kirkegaard T, Lykkesfeldt AE: **Breast cancer cells can switch between estrogen receptor α and ErbB signaling and combined treatment against both signaling pathways postpones development of resistance.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, 121:601–613. doi: 10.1007/s10549-009-0506-y
38. Kim S, Lee J, Oh SJ, Nam SJ, Lee JE: **Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells.** *Oncol Rep* 2015, 34(3):1613-1619. doi: 10.3892/or.2015.4116

8. ARTIGO 2 – Capítulo 2

Submission BBR_2016_247 received by Behavioural Brain Research ^



Behavioural Brain Research
qua 02/11, 02:44
Você

Responder |

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: BBR_2016_247

Title: The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha

Journal: Behavioural Brain Research

Dear Miss. Lichtenfels,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Behavioural Brain Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=BBR and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Behavioural Brain Research

BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH



Martina Lichtenfels | My Journals | Log Out

Home Reports



Due to a system upgrade, EVISE will be unavailable on 17 November 2016 between 6:30 and 13:00 GMT.

My Author Tasks

[Start New Submission](#)

[Click here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

[The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha](#)

Current status: Under Review (08/Nov/2016)

BBR_2016_247
Editor-in-Chief: Stephen Maren

Article Type: Research Paper
Initial submission : 01/Nov/2016

Manuscrito submetido: Behavior Brain Research

Número do manuscrito: BBR_2016_247

Original Research Article

The anticancer estrogen receptor antagonist tamoxifen impairs consolidation of inhibitory avoidance memory through estrogen receptor alpha

Martina Lichtenfels^{a,b,c}, Arethusa da Silva Dornelles^{a,b}, Fernanda dos Santos Petry^{a,b}, Martina Blank^{a,b,d}, Caroline Brunetto de Farias^{a,e}, Rafael Roesler^{a,b}, Gilberto Schwartzmann^{a,f}

^a Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Division of Molecular Genome Analysis, German Cancer Research Centre (DKFZ), Heidelberg, Germany

^d Center for Molecular Structural Biology, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^e Children's Cancer Institute, 90420-140 Porto Alegre, RS, Brazil

^f Department of Internal Medicine, School of Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author: Martina Lichtenfels, Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2350 (2 andar Centro de Pesquisas Básicas), 90035-003 Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 51 96982303; Fax: + 55 51 33083121.

E-mail address: martinalichtenfels@hotmail.com

Abstract

Over two thirds of women with breast cancer have tumors positive for hormone receptors, and these patients undergo treatment with endocrine therapy, being tamoxifen the most widely used agent. Despite being very effective in breast cancer treatment, tamoxifen is associated with side effects that include cognitive impairments. However, the specific aspects and mechanisms underlying these impairments remain to be characterized. Here we have investigated the effects of tamoxifen and interaction with estrogen receptors on formation of memory for inhibitory avoidance (IA) conditioning in female rats.

In the first experiment, Wistar female rats received a single oral dose of tamoxifen (1, 3, or 10 mg/kg) or saline by gavage immediately after training and were tested for memory retention 24h after training. In the second experiment, rats received a subcutaneous injection with estrogen receptor α agonist or estrogen receptor beta agonist 30 minutes before the training. After training, rats received a single oral dose of tamoxifen 1 mg/kg and were tested 24h after training. In the third experiment, rats were trained and tested 24h later. Immediately after test, rats received a single dose of tamoxifen (1 mg/kg) or saline by gavage and were given four additional daily test trials followed by a reminder. Tamoxifen at 1 mg/kg impaired memory retention when given immediately after training and the estrogen receptor alpha agonist improved the tamoxifen-related memory impairment. Moreover, Tamoxifen caused delayed memory extinction. These findings indicate that estrogen receptors regulate the early phase of memory consolidation and the effects of tamoxifen on memory consolidation.

Keywords: Tamoxifen; SERM; Estrogen receptor; Inhibitory avoidance; Memory; Cognition.

1. Introduction

Breast cancer is the most important cancer-related cause of death in women all over the world [1]. More than two thirds of breast cancer tumors are positive for hormone receptors, and endocrine therapy is included in the treatment of these patients, being tamoxifen (TAM) the standard treatment [2]. TAM is a selective estrogen receptor modulator (SERM) that can present mixed agonist and antagonist effects on estrogen receptors (ER). In breast cancer, TAM acts mostly as an ER antagonist that competitively inhibits the binding of estrogen to ER, thus inhibiting the activation of ER, and is thus commonly used as a first-line adjuvant treatment for estrogen receptor (ER α)-positive patients [3]. Despite being very effective in breast cancer treatment, tamoxifen has been associated with many side effects such as an increasing risk of endometrial and uterine cancer development [4, 5], thromboembolic events [6], and cognitive deficits [7, 8]. Clinical studies reported cognitive impairments during and after the use of TAM for breast cancer treatment [7, 8]. Patients treated with TAM presented decrements in memory, visuospatial functioning, visual memory, processing speed and verbal learning [9, 10]. These cognitive dysfunctions influence negatively their quality of life and the maintenance of normal daily activities. In contrast, other studies did not find cognitive problems related to TAM treatment [11, 12].

Several mechanisms have been proposed to explain the occurrence of cognitive dysfunctions related to breast cancer treatment, among them increases in cytokine levels [13, 14], low levels of estrogen and testosterone [15, 16], and persistent neuroinflammation [17]. However, the role of these mechanisms remain unclear. Both estrogen receptor subtypes are expressed in the hippocampus of rodents and humans. Estrogen receptor β (ER β) levels are higher than estrogen receptor α (ER α) levels, however ER α is transcriptionally more active than ER β [18, 19, 20, 21]. Some studies demonstrated the importance of the ER in mediating the effects of estrogen on memory [22, 23, 24]. However few studies focused the interest in the role of the ER α and ER β in TAM associated memory deficits [25]. In the present study we have investigated the effects of TAM on inhibitory avoidance (IA) memory and the role of the ER α in TAM related memory deficits in female rats.

2. Methods

2.1 *Animals*

One hundred twenty two adult female Wistar rats (2-3 months old; 180-250g at the time of the experiment) were obtained from the Institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS) and maintained at the university hospital experimental animal facility (UEA, CPE-HCPA). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, maintained on a 12h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C and allowed ad libitum access to standardized pellet food and water. Behavioral procedures were performed during the light phase of the cycle. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching (DBCA, published by CONCEA, MCTI). All experimental procedures were carried out to minimize animal's discomfort and designed to reduce the number of rats required. The protocol was approved under protocol number 130328 by the HCPA Institutional Animal Care Committee.

2.2 *Drug treatments*

Animals in the control group received a single oral dose by gavage of saline solution 0,9%, whereas those in experimental groups received a single oral dose by gavage of 1 mg/kg, 3 mg/kg and 10 mg/kg tamoxifen (Sigma-Aldrich). Agonist of ER α , Propyl pyrazole triol (PPT, 1 mg/kg), and ER β agonist, diarylpropionitrile (DPN, 1 mg/kg), were injected subcutaneously. The doses of PPT and DPN correspond to effective doses that have been reported in several previous works [26, 27, 28, 29, 30].

2.3 *Inhibitory avoidance (IA)*

Single-trial step-down IA is an established model of fear-motivated conditioning. In this task, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). The general procedures for IA behavioral training and retention test were described in previous reports [31, 32, 33]. The IA training apparatus was a 50 x 25 x 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall. On training trials, rats were placed on

the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with a digital chronometer. Immediately after stepping down on the grid, rats received three times a 0.4-mA footshock, and were removed from the apparatus immediately afterwards. In test trials, animals were placed again the platform and the latency to step down was measured and used as an estimate of memory retention.

In the experiment examining possible drug effects on reconsolidation, rats were given up to 5 test trials. The animals that did not step down to the grid floor within 180 s during the 24 h test trial (“reactivation session”) were gently led by experimenter to the grid floor. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA memory retention.

In the first experiment (memory consolidation, immediate posttraining treatment), rats received a single dose of tamoxifen (1, 3, and 10 mg/kg) or saline immediately after IA training and were tested 24 h after training for memory retention. In the second experiment, rats were injected subcutaneously with estrogen receptor alpha or estrogen receptor beta agonists 30 minutes before IA training. Immediately after the training, rats received a single dose of 1 mg/kg tamoxifen or saline and were tested 24 h after training for memory retention.

In the third experiment (memory extinction, treatment immediately after the first test), rats were given IA training and 24 h later a first retention test (Test 1), which also served as extinction training, was carried out. Immediately after Test 1, a single dose of 1 mg/kg tamoxifen or saline was given and retention was tested again once a day during 4 consecutive days (Tests 2, 3, 4, and 5). Immediately after Test 5, rats received a weaker reminder footshock (0.3-mA) and were tested again 24 h later [34]. Fig. 1 shows a diagram of the design of the experiments used in this study.

Fig. 1 should be inserted here

2.4 Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. Nonparametric tests were used to analyze retention test latencies because several rats reached the 180 s cut off. Comparisons of training and retention test step-down latencies between control and drug-treated groups were performed using Kruskal–Wallis analysis of variance and Mann–Whitney U tests [31, 33, 34]. Wilcoxon tests were also used to compare step-down latencies on different behavioral trials within each group. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

No significant differences were observed between groups in training trial latencies in any experiment. As seen in Fig. 2, TAM 1 mg/kg produced memory impairment in female rats ($p < 0.05$). Immediate post-training administration of TAM 1mg/kg blocked memory retention, whereas TAM at either 3 or 10 mg/kg had no effect, although the dose of 3 mg/kg fell short of significance (3 mg/kg, $p = 0.077$; 10 mg/kg, $p = 0.467$).

Fig. 2 should be inserted here

The second experiment examined the role of ER α and ER β agonists in the TAM-induced memory impairment. TAM (1 mg/kg) impaired memory consolidation when compared to control, as seen in experiment 1. Administration of a ER α agonist improved this memory impairment ($p < 0.05$), whereas the administration of an ER β agonist had no effect ($p = 0.543$ when compared to the saline-treated group (Fig. 3).

Fig. 3 should be inserted here

The third experiment examined the possible effects of TAM on memory extinction, and results are shown in Fig. 4 There were no significant differences between groups (Test 1, $p = 0.806$; Test 2, $p = 0.870$; Test 3, $p = 0.514$; Test 4, $p = 0.624$; Test 5, $p = 0.514$; TR, $p = 0.682$). However, within-group comparisons showed that control animals had a significant decline in latencies between Test 1 and Test 3 ($p < 0.05$), Test 1 and Test 4 ($p < 0.05$), and

Test 1 and Test 5 ($p = 0.05$), indicating the occurrence of extinction. In contrast, step-down latencies in TAM-treated rats did not significantly decrease after Test 1 (Test 1 vs. Test 3 $p = 0.374$; Test 1 vs. Test 4 $p = 0.445$; Test 1 vs. Test 5 $p = 0.386$). These findings suggest TAM delayed extinction.

Fig. 4 should be inserted here

4. Discussion

Tamoxifen is an ER antagonist that inhibits the proliferation of breast cancer cells [1]. The use of TAM as adjuvant treatment with hormone activity for breast cancer has a great healing ability in women at the early stage of the disease [35]. However, the use of TAM is associated with cognitive deficits. In the present study we demonstrated that a single administration of TAM impairs IA memory consolidation impairment in female rats at the lower dose used (1 mg/kg), whereas higher doses had no effect. In addition, despite the apparent inability of TAM to affect extinction in our experiment comparing the two groups, comparisons within groups showed that TAM delayed delayed extinction.

Previous studies demonstrated memory consolidation deficits in mice treated with acute injections of TAM at the doses of 1 mg/kg and 10 mg/kg [36, 37, 38]. Chen and colleagues evaluated the effect of TAM (1, 3, 10 mg/kg) and Toremifen (TOR; 3, 10, 30 mg/kg) in the cognitive ability of rodents. TAM at the doses of 1 or 10 mg/kg impaired memory consolidation and retrieval, but not acquisition, whereas TOR at any dose impaired all memory phases evaluated [36]. Based on these findings, the same group showed spatial memory deficits following systemic administration of TAM or TOR in mice [37]. TAM at 10 mg/kg also impaired mice memory consolidation and retrieval in a conditioned place preference (CPP) paradigm [38]. Some of the discrepancies between the results of these studies might be related to differences in species and tasks. Perhaps more importantly, our study is the first to show that TAM administered orally can impair memory consolidation.

Previous rodent studies demonstrating memory deficits induced by TAM used subcutaneous or intraperitoneal injections [36, 37, 38 39, 40]. Oral administration was chosen because it mimics the route of administration used clinically by patients and because TAM is a prodrug that needs to be metabolized by cytochrome P450 in liver to generate active metabolites, such as endoxifen and 4-hydroxytamoxifen more potent than TAM [41].

A number of studies evaluating the effects of estrogen on memory showed that hormonal treatment produce an inverse U-shaped dose-response curve where specific doses are optimal, whereas lower and higher doses are ineffective [21, 42, 43, 44, 45, 46] The activation or blocking of ER may explain the complex dose and time–response related to hormonal treatments [23, 47]. Estrogen can modulate hippocampal function and memory through its rapid action on both estrogen receptors, estrogen receptor-alpha ($ER\alpha$) and estrogen receptor-beta ($ER\beta$) [48, 49, 50]. Previous studies related the blocking of ERs, using estrogen inhibitors, with hippocampal structure modification and memory problems. Prange-kiel and

Rune demonstrated that the treatment with Letrozole causes decreased density and lower synapses of spines on hippocampus through its action on ER α and ER β [51]. Tamoxifen treatment also impaired memory in female rats through estrogen blockade [25]. Nonetheless, our result implicates ER in modulating the effects of TAM in the early phase of consolidation of IA memory. Corroborating these findings, we demonstrated memory improvement after treatment with ER α agonist. Memory consolidation deficits caused by TAM were reverted with the use of ER α agonist but not with ER β agonist. This result is in accordance to previous work that showed memory improvement on the object placement task after treatment with ER α agonist, but not with ER β agonist [23]. Few previous studies have proposed candidate mechanisms for TAM-induced cognitive changes. We demonstrated the influence of ER in modulating the action of tamoxifen on consolidation of IA memory.

Many animal models have been used to investigate the effect of TAM on memory function. Ovariectomized female animals or male animals are often used to study the pharmacological effects of antiestrogenic drugs in absence of hormonal changes that may influence the results [36, 40]. However, we showed memory impairments associated with TAM treatment in intact female rats, suggesting that TAM affect memory function regardless of hormonal variations. Female rats may be a model which better represents features of clinical observations. In fact, in clinical practice TAM is used as antiestrogenic therapy for women with breast cancer not only in postmenopausal, many patients are premenopausal, demonstrating that variation in menstrual cycle is recurrent during the treatment. Clinical studies evidenced cognitive problems related to TAM treatment in both premenopausal and postmenopausal breast cancer patients [9].

In summary, the present study shows that a single oral administration of a low dose of TAM can impair the early phase of memory consolidation as well as extinction, and highlights a role for ER α in mediating TAM-induced memory impairment.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant numbers 484185/2012-8, 303276/2013-4, and 400705/2014-1 to R.R); the National Science Foundation (IOS 1121886 to M.B.P.); the Children's Cancer Institute (ICI); the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA); and the South American Office for Anticancer Drug Development. The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 136 (2015) E359-86.
- [2] EBCTCG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer and recurrence in 15-year survival: an overview of the randomized trials. *Lancet*. 365 (2005) 1687–1717.
- [3] B. Huang, M. Warner, J.A. Gustafsson, Estrogen receptors in breast cancer carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 15 (2015) 240-244.
- [4] L. Cortesi, E. De Matteis, I. Rashid, C. Cirilli, M. Proietto, F. Rivasi, M. Federico, Distribution of second primary malignancies suggests a bidirectional effect between breast and endometrial cancer: a population-based study. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 19 (2009) 1358-1363.
- [5] V.G. Vogel, The NSABP study of Tamoxifen and Raloxifen (STAR) trial. *Exp. Rev. Anticancer. Ther.* 9 (2009) 51-60.
- [6] R.K. Hernandez, H.T. Sorensen, L. Pedersen, J. Jacobsen, T.L. Lash, Tamoxifen treatment and risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism: a Danish population-based cohort study. *Cancer*. 115 (2009) 4442-4449.
- [7] F.W. Boele, C.M. Schilder, M.L. de Roode, J.B. Deijen, S.B. Schagen, Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause*. 22 (2014) 17-25.
- [8] Y. Zheng, J. Luo, P. Bao, H. Cai, Z. Hong, D. Ding, J.C. Jackson, X.O. Shu, Q. Dai, Long-term cognitive function change among breast cancer survivors. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 146 (2014) 599-609.
- [9] S.A. Castellon, P.A. Ganz, J.E. Bower, L. Petersen, L. Abraham, G.A. Greendale, Neurocognitive performance in breast cancer survivors exposed to adjuvant chemotherapy and tamoxifen. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 26 (2004) 955-969.
- [10] C.M. Bender, S.M. Sereika, S.L. Berga, V.G. Vogel, A.M. Brufsky, K.K. Paraska, C.M. Ryan, Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in women with breast cancer. *Psychooncol.* 15 (2006) 422–430.
- [11] K. Hermelink, V. Henschel, M. Untch, I. Bauerfeind, M.P. Lux, K. Munzel, Short-term effect of treatment-induced hormonal changes on cognitive function in breast cancer

- patients: results of a multicenter, prospective, longitudinal study. *Cancer*. 113 (2008) 2431-2439.
- [12] J. Debess, J.O. Riis, M.C. Engebjerg, M. Ewertz, Cognitive function after adjuvant treatment for early breast cancer: a population-based longitudinal study. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 121 (2010) 91–100.
- [13] N. Tsavaris, C. Kosmas, M. Vadiaka, P. Kanelopoulos, D. Boulamatsis, Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br. J. Cancer*. 87 (2002) 21–27.
- [14] P.A. Ganz, J.E. Bower, L. Kwan, S.A. Castellon, D.H. Silverman, C. Geist, E.C. Breen, M.R. Irwin, S.W. Cole, Does tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) play a role in post-chemotherapy cerebral dysfunction? *Brain. Behav. Immun.* 30 (2013) S99-S108.
- [15] C.M. Bender, K.K. Paraska, S.M. Sereika, C.M. Ryan, S.L. Berga, Cognitive function and reproductive hormones in adjuvant therapy for breast cancer: a critical review. *J. Pain. Symptom. Manage.* 21 (2001) 407–424.
- [16] V.A. Jenkins, D.J. Bloomfield, V.M. Shilling, T.L. Edginton, Does neoadjuvant hormone therapy for early prostate cancer affect cognition? Results from a pilot study. *BJU Int.* 96 (2005) 48–53.
- [17] T.L. Briones, J. Woods, Dysregulation in myelination mediated by persistent neuroinflammation: Possible mechanisms in chemotherapy-related cognitive. *Brain. Behav. Immun.* 35 (2014) 23–32.
- [18] P.J. Shughrue, M.V. Lane, I. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor alpha and beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388 (1997) 507–525.
- [19] S.W. Mitra, E. Hoskin, J. Yudkovitz, L. Pear, H.A. Wilkinson, S. Hayashi, D.W. Pfaff, S. Ogawa, S.P. Rohrer, J.M. Schaeffer, B.S. McEwen, S.E. Alves, Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinol.* 144 (2003) 2055–2067.
- [20] K.L. Mitterling, J.L. Spencer, N. Dziedzic, S. Shenoy, K. McCarthy, E.M. Waters, B.S. McEwen, T.A. Milner, Cellular and subcellular localization of estrogen and progestin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 518 (2010) 2729–43.
- [21] T.C. Foster, Role of estrogen receptor α and β expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus*. 22 (2012) 656–69.

- [22] H.N. Fugger, T.C. Foster, J. Gustafsson, E.F. Rissman, Novel effects of estradiol and estrogen receptor alpha and beta on cognitive function. *Brain. Res.* 883 (2000) 258-64.
- [23] C.A. Frye, C.K. Duffy, A.A. Walf, Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88 (2007) 208–16.
- [24] M.I. Boulware, J.D. Heisler, K.M. Frick, The memory-enhancing effects of hippocampal estrogen receptor activation involve metabotropic glutamate receptor signaling. *J. Neurosci.* 33 (2013) 5184-94.
- [25] F. Wang, Y.F. Song, J. Yin, Z.H. Liu, X.D. Mo, D.G. Wang, L.P. Gao, Y.H. Jing, Spatial memory impairment is associated with hippocampal insulin signals in ovariectomized rats. *PLoS. One.* 9 (2014) e104450.
- [26] J. Frasor, D.H. Barnett, J.M. Danes, R. Hess, A.F. Parlow, B.S. Katzenellenbogen, Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinol.* 144 (2003) 3159-3166.
- [27] T.D. Lund, T. Rovis, W.C. Chung, R.J. Handa, Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinol.* 146 (2005) 797-807.
- [28] M. Le Saux, T. Di Paolo, Chronic estrogenic drug treatment increases preproenkephalin mRNA levels in the rat striatum and nucleus accubens. *Psychoneuroendocrinol.* 30 (2005) 251-260.
- [29] M.A. Zeidan, S.A. Igoe, C. Linnman, A. Vitalo, J.B. Levine, A. Klibanski, J.M. Goldstein, M.R. Milad, Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. *Biol. Psychiatry.* 70 (2011) 920-927.
- [30] N. Qu, L. Wang, Z.C. Liu, Q. Tian, Q. Zhang, Oestrogen receptor α agonist improved long-term ovariectomy-induced spatial cognition deficit in young rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16 (2013) 1071:1082.
- [31] P.F.C. Jobim, T.R. Pedroso, R.R. Christoff, A. Werenicz, N. Maurmann, G.K. Reolon, R. Roesler, Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impair formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97 (2012) 105-112.
- [32] F.S. Petry, A.S. Dornelles, M. Lichtenfels, F.E. Valiati, C.B. de Farias, G. Schwartzmann, M.B. Parent, R. Roesler, Histone deacetylase inhibitions prevents the impairing effects of hippocampal gastrin-releasing peptide receptor antagonism on memory consolidation and extinction. *Behav. Brain. Res.* 307 (2016) 46-53.

- [33] R. Roesler, T. Luft, S.H. Oliveira, C.B. Farias, V.R. Almeida, J. Quevedo, F. Dal Pizzol, N. Schroder, I. Izquierdo, G. Schwartsmann, Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacol.* 51 (2006) 350-357.
- [34] R. Roesler, G.K. Reolon, N. Maurmann, G. Schwartsmann, N. Schröder, O.B. Amaral, S. Valvassori, J. Quevedo, A phosphodiesterase 4-controlled switch between memory extinction and strengthening in the hippocampus. *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 91.
- [35] EBCTCG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10801 women in 17 randomised trials. *Lancet.* 378 (2011) 1707-1716.
- [36] D. Chen, C.F. Wu, B. Shi, Y.M. Xu, Tamoxifen and toremifene impair retrieval, but not acquisition, of spatial information processing in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72 (2002) 417-421.A.
- [37] D. Chen, C.F. Wu, B. Shi, Y.M. Xu, Tamoxifen and toremifene cause impairment of learning and memory function in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71 (2002) 269-276.B.
- [38] B. Esmaeili, Tamoxifen disrupt consolidation and retrieval of morphine-associated contextual memory in male mice: interaction with estradiol. *Psychopharmacol.* 204 (2009) 191-201.
- [39] E.A. Walker, J.J. Foley, R. Clark-Vetri, R.B. Raffa, Effects of repeated administration of chemotherapeutic agentstamoxifen, methotrexate, and 5-fluorouracil on the acquisition and retention of a learned response in mice. *Psychopharmacol.* 217 (2011) 539-548.
- [40] D.A. Velazquez-zamora, L.M. Garcia-segura, Gonzalez-burgos, 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 (2012) 512-517.
- [41] M. Del Re, A. Michelucci, P. Simi, R. Danesi, Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer. Treat. Reviews.* 38 (2012) 442-450.
- [42] J.L. McGaugh, Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain. Res. Bull.* 23 (1989) 339-345.
- [43] T.C. Foster, Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. *Front. Neuroendocrinol.* 26 (2005) 51-64.

- [44] A.E. Clipperton, J.M. Spinato, C. Chernetz, D.W. Pfaff, E. Choleris, Differential effects of estrogen receptor alpha and beta specific agonists on social learning of food preferences in female mice. *Neuropsychopharmacol.* 33 (2008) 2362—2375.
- [45] L.A. Bean, L. Ianov, C.T. Foster, Estrogen receptors, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist.* 20 (2014) 534-545.
- [46] K.S.J. Ervin, E. Mulvale, N. Gallagher, V. Roussel, E. Choleris, Activation of the G protein-coupled estrogen receptor, but not estrogen receptor α and β , rapidly enhances social learning. *Psychoneuroendocrinol.* 58 (2015) 51-66.
- [47] X. Han, K.K. Aenlle, L.A. Bean, A. Rani, S.L. Semple-Rowland, A. Kumar, T.C. Foster, Role of estrogen receptor α and β in preserving hippocampal function during aging. *J. Neurosci.* 33 (2013) 2671-83.
- [48] L.M. Pereira, C.P. Bastos, J.M. de Souza, F.M. Ribeiro, G.S. Pereira, Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor α . *Neurobiol. Learn. Mem.* 114 (2014) 114-119.
- [49] J.F. Lynch, P. Winiecki, T. Vanderhoof, D.C. Riccio, A.M. Jasnow, Hippocampal cytosolic estrogen receptors regulate fear generalization in females. *Neurobiol. Learn. Mem.* 130 (2016) 83-92.
- [50] S.L. Pisani, S.L. Neese, J.A. Katzenellenbogen, S.L. Schantz, D.L. Korol, Estrogen receptor-Selective Agonists modulate learning in female rats in a dose- and task-specific manner. *Endocrinol.* 157 (2016) 292-303.
- [51] J. Prange-Kiel, G.M. Rune, Direct and indirect effects of estrogen on rat hippocampus. *Neurosc.* 138 (2006) 765-772.

Legends for figures

Fig. 1 Schematic diagram showing the design of the experiments used in the present study.

Fig. 2 A single systemic administration of a low dose of TAM immediately after IA training produces memory retention impairment. Rats received an oral administration of saline (n=13) or different doses of TAM (1 mg/kg, n = 10; 3 mg/kg, n = 9; 10 mg/kg, n = 11) immediately after IA training. Retention was tested 24h later. Data are showed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ compared to controls

Fig. 3 Administration of an ER α agonist before training prevented the memory impairment caused by TAM treatment. Rats received subcutaneous injection of PPT, DPN or saline 30 minutes before training and oral administration of saline (n=10) or 1 mg/kg TAM (n= 10) immediately after IA training. Retention was tested 24h later. Data are showed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ compared to controls

Fig. 4 Administration of TAM (1 mg/kg) delays IA memory extinction. Rats were trained and given an administration of saline (n = 10) or TAM (1 mg/kg, n = 10) was given immediately after Retrieval (T1). Rats were tested for retention 2 (T2), 3 (T3), 4 (T4), and 5 (T5) days after treatment. Immediately after test 5, rats were given a reminder footshock and tested again 24h later (TR). Data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to Test 1 (within group comparisons)

Figure 1

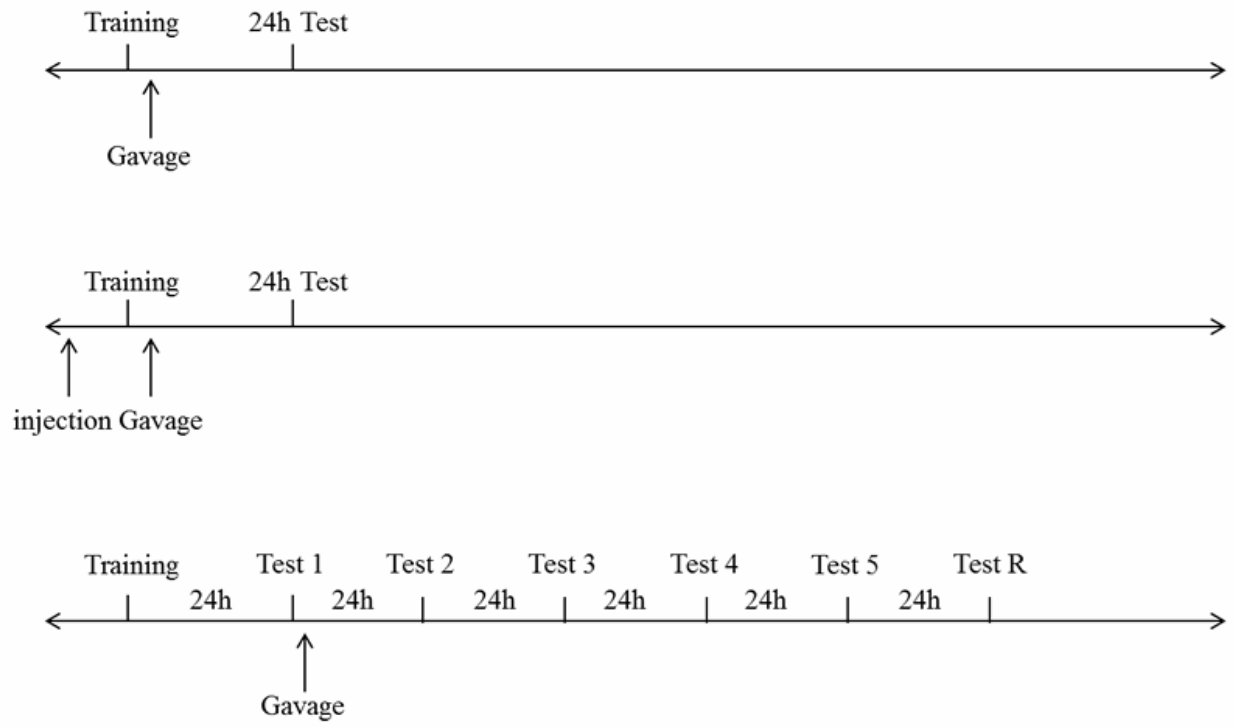


Figure 2

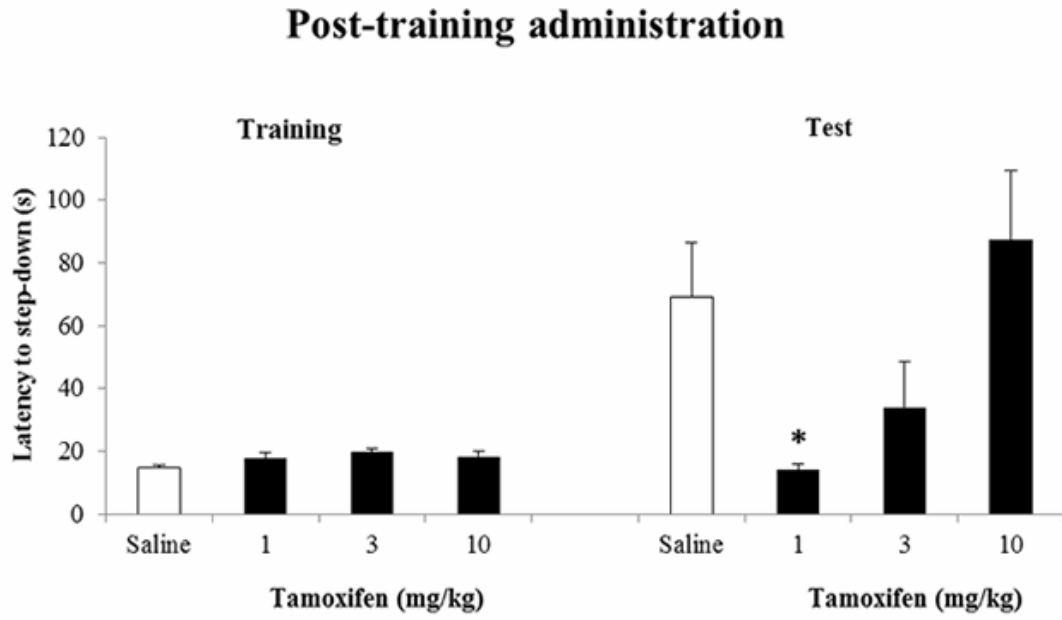


Figure 3

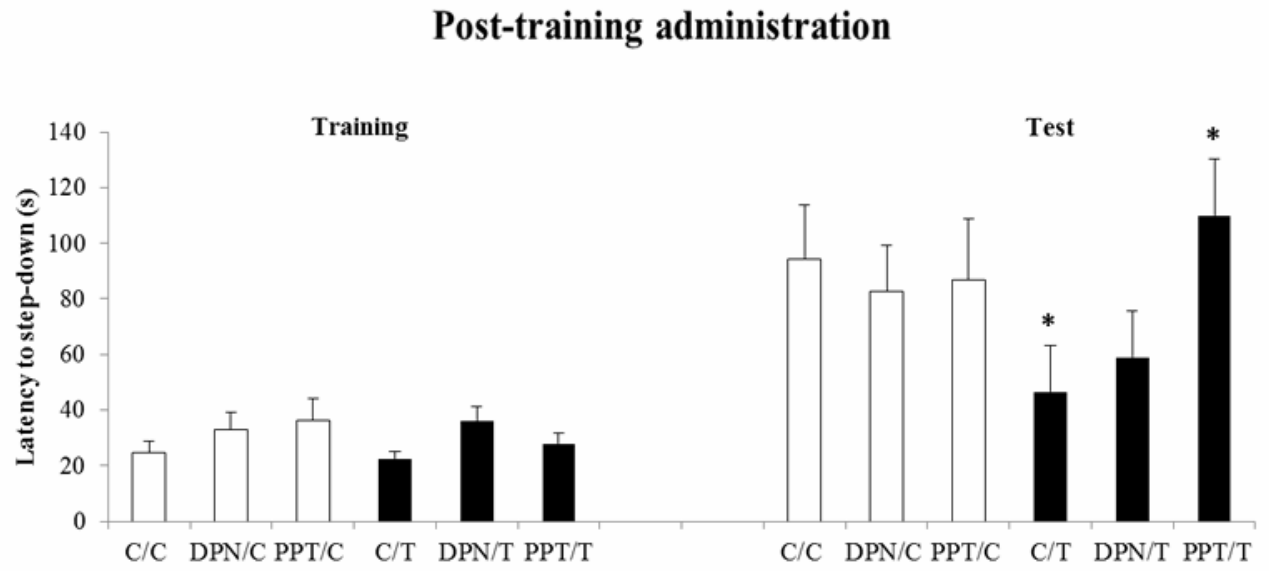
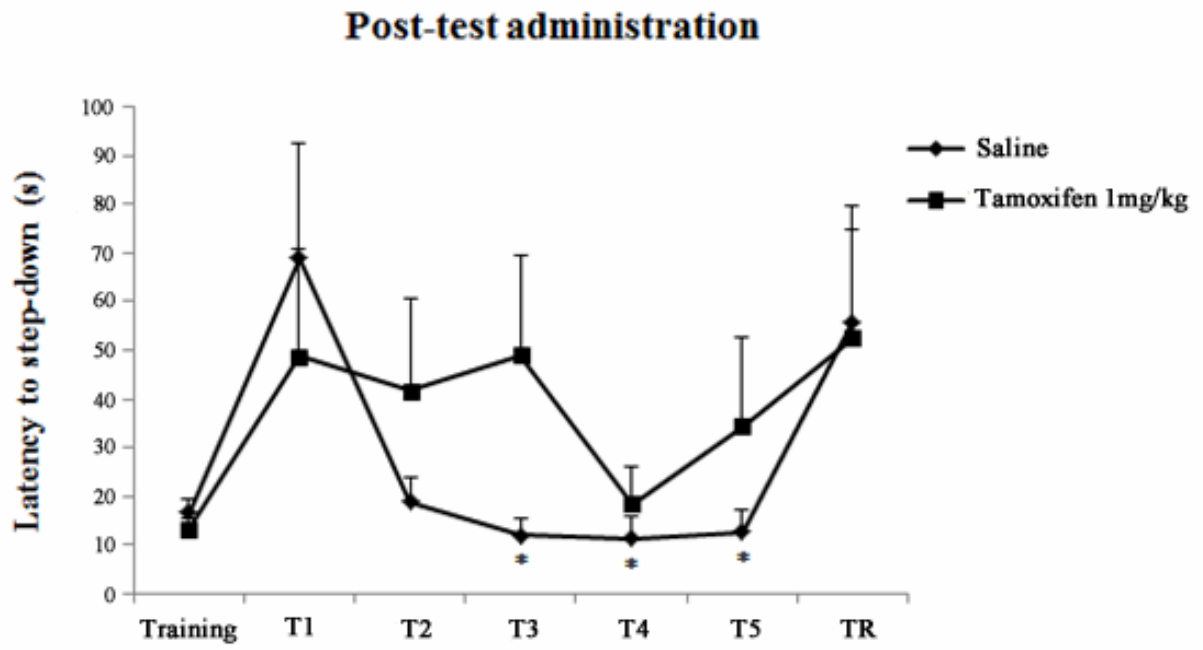


Figure 4



9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo 1

A expressão reduzida do RE β em pacientes com câncer de mama comparadas as pacientes saudáveis, juntamente com a menor expressão do RE β nos subtipos de câncer de mama RE+, analisadas em dois bancos de dados, corrobora a ideia do RE β como supressor tumoral em tumores RE+.

Neste estudo, observamos que o tratamento com TAM diminui os níveis de RNAm dos RE β com efeitos antiproliferativos. Esta diminuição nos níveis do RE β foi acompanhada por um diminuição nos níveis de RNAm do RE α , Akt e MAPK3 e aumento nos níveis de RNAm de ErbB2, ErbB3 e PTEN. Demonstrando importante papel do RE β , e suas interações com RE α e receptores HER, na resposta ao tratamento com TAM. Sugerindo, assim, o uso do RE β como potencial marcador prognóstico para o câncer de mama RE+. Além disto, concluímos que células que expressam níveis moderados do RE β apresentaram melhor resposta ao tratamento com TAM.

Demonstramos também efeitos antiproliferativos tanto com silenciamento do RE β quanto com silenciamento do RE α . Os efeitos antiproliferativos causados pelo silenciamento do gene do RE β em células MCF7 foram acompanhados por uma redução nos níveis de MAPK3. Sugerindo que RE β modula as ações antiproliferativas de TAM através da via de MAPK3.

Por fim, a análise de nossas células MCF-7 resistentes ao tratamento com TAM mostrou diminuição nos níveis de RNAm dos RE α , RE β , ErbB2, PTEN, Akt, MAPK1 e MAPK3, e aumento na expressão de EGFR, ErbB3, e ErbB4. Este resultado corrobora achados prévios demonstrando baixa expressão do RE β em células resistentes ao TAM, e a relação entre RE e receptores HER influenciando o desenvolvimento de resistência adquirida.

Capítulo 2

Neste estudo demonstramos que baixa concentração de TAM, 1 mg/kg, é capaz de induzir danos na consolidação de memória, enquanto as doses mais altas, 3 e 10 mg/kg, não apresentaram efeitos na memória. Demonstrando que diferentes concentrações de TAM possuem diferentes efeitos na cognição.

Além disso, utilizamos a via oral para administração do TAM, como esta é a via de administração utilizada na clínica simulamos a mesma metabolização do TAM em nosso experimento. Estudos que encontraram déficits cognitivos com diferentes concentrações de TAM das utilizadas em nosso estudo apresentaram outras vias de administração do TAM, e isto pode explicar os resultados discrepantes encontrados.

Também demonstramos que o efeito inibitório de TAM na consolidação de memória é modulado pelos RE. Conseguimos observar neste estudo que em condições fisiológicas normais, o TAM possui efeito antagonista no RE α causando danos na consolidação de memória de longa duração, e que o uso de agonista do RE α reverte estes danos.

Outro achado relevante de nosso estudo foi à capacidade do TAM em afetar a extinção da memória quando realizadas comparações dentro do grupo tratado com TAM.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Capítulo 1

Para estabelecer o RE β como marcador tumoral (supressor tumoral) em tumores ER+, novos estudos, com populações distintas, devem ser realizados.

Observamos em nosso estudo um importante papel do RE β , e suas interações com RE α e receptores HER, na resposta ao tratamento com TAM. Portanto, também se faz necessária a realização de novos estudos afim de confirmar a hipótese do RE β como potencial marcador prognóstico para o câncer de mama RE+.

Com os resultados da expressão dos receptores em nossas células resistentes ao TAM, podemos sugerir que tratamentos combinados de TAM e inibidores de HER possam levar a melhores resultados em pacientes resistentes ao TAM. Estudos com o objetivo de testar diferentes inibidores de HER juntamente com TAM poderão ser realizados, no sentido de prevenir e reverter à resistência adquirida ao TAM.

Capítulo 2

A realização de novos estudos em animais utilizando TAM oralmente seria de grande interesse para verificar se a via de administração influencia nos efeitos do TAM em diferentes tipos de memórias utilizando tarefas diversificadas.

Também seria interessante a realização de um novo estudo idêntico ao nosso experimento, porém utilizando ratas ovariectomizadas, para definir se a falta de estrogênio pode interferir no efeito do TAM na consolidação de memória.

Neste estudo mostramos que TAM afeta a extinção da memória, porém como este resultado foi observado apenas nas comparações dentro do grupo tratado com TAM, e não quando comparado ao grupo controle, se faz necessário o melhor entendimento da ação do TAM sobre a extinção.

11. ANEXO – Experimentos adicionais artigo 2

Introduction

Tamoxifen (TAM) is a selective estrogen receptor modulator (SERM) that presented agonist and antagonist effects on estrogen receptors (ER). Despite being very effective in breast cancer treatment, tamoxifen has been associated with many side effects including cognitive deficits [1, 2]. Clinical studies reported cognitive impairments during and after the use of TAM for breast cancer treatment [1, 2]. These cognitive dysfunctions influence negatively their quality of life and the maintenance of normal daily activities. Several mechanisms have been proposed to explain the occurrence of cognitive dysfunctions related to breast cancer treatment, however, these mechanisms remains unclear. Neurotrophin levels decrease might be related to memory problems caused by TAM treatment. Brain derived neurotrophic factor (BDNF), member of a family of neurotrophic factor, has important roles in maintenance and survival of the central nervous system (CNS) [3, 4]. Several studies have demonstrated the influence of BDNF on memory formation [5, 6], consolidation [7, 8] and persistence [9]. Therefore, it is possible that TAM causes deregulation on BDNF levels leading to memory deficits. In these additional experiments we have investigated the effects of TAM on short memory consolidation using inhibitory avoidance (IA) conditioning in female rats and evaluate the hippocampal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Methods

Memory consolidation

Rats received a single dose of 1 mg/kg tamoxifen or vehicle by gavage 3 h after IA training and were tested 24 h after training for memory retention.

Hippocampal BDNF quantification

One hour after the tests, rats used in the first experiment (memory consolidation, immediate posttraining treatment), were euthanized for BDNF measurement.

BDNF measurement

One hour after behavioral testing on the first experiment, rats were euthanized by decapitation, brains were removed and the hippocampus were separated and stored frozen at -80°C for BDNF measurement. The animals that were not used for BDNF quantification were euthanized with an overdose of Ketamine and Xylazine. Hippocampal samples were homogenized in phosphate-buffered solution (PBS) with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM ethyleneglycoltetraacetic acid. BDNF levels were measured by anti-BDNF sandwich-ELISA, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, USA). The manufacturer instructions were applied to develop the kit, to the calibration method and to the measurement of the samples. The amount of BDNF was determined by absorbance in 450 nm. The total quantity of protein was determined by Bradford method (1976) and the BDNF concentration was expressed as picogram (pg) of BDNF per ml of total protein. The results were calculated in accordance with BDNF standard curve obtained in each test and analyzed in SOFTmax Pro versão 3.1.1 program [5].

Statistical Analysis

Data are presented as means + SEM. Comparisons of training and retention test step-down latencies between control and drug-treated groups were performed using Kruskal–Wallis analysis of variance and Mann–Whitney U tests [10, 11]. Differences between hippocampal BDNF levels were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

Figure 4 shows the effect of TAM administration performed 3h after the training session. As shown in the figure, TAM did not impair memory consolidation. The results showed no significant difference between TAM 1mg/kg dosage and control group ($p=0.604$).

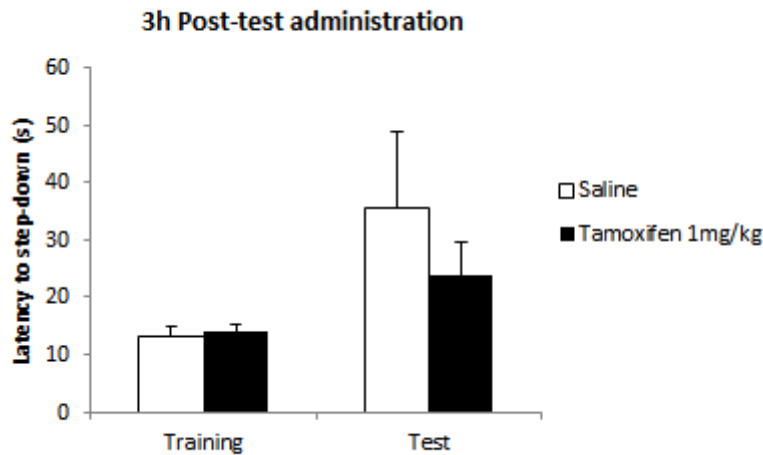


Fig. 4. Single systemic treatment with 1 mg/kg tamoxifen did not cause memory consolidation deficits when the tamoxifen were administered 3 h after the training. TAM (N=10) or saline (N=10) were administered 3h after IA training. Retention was tested 24h later. Data are showed as mean + S.E.M.

We also verified whether hippocampal BDNF levels are associated with IA memory deficits. Hippocampal BDNF levels were measured in these female rats that received different doses of TAM, 1mg/kg, 3 mg/kg and 10 mg/kg, and in control group. All groups presented similar results ($p=0.502$) (Figure 5), demonstrating that hippocampal BDNF levels are not related to IA memory impairment.

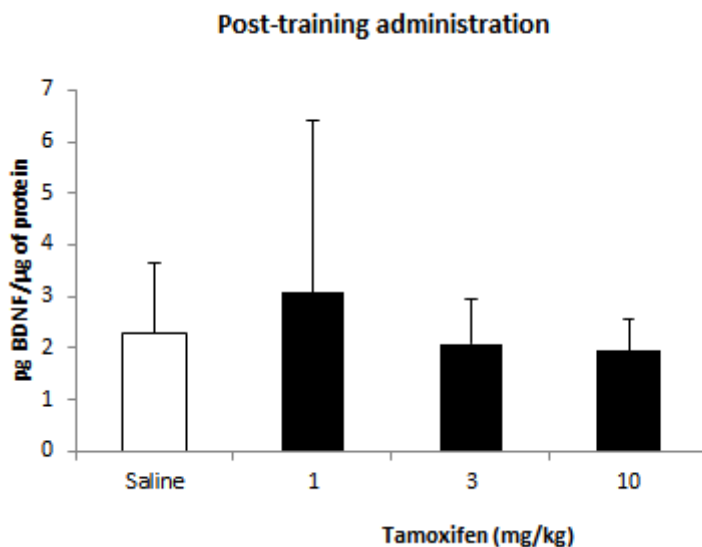


Fig. 5. Hippocampal BDNF levels were similar in all groups. Animals used in experiment 1 for IA memory consolidation trials were euthanized one hour after IA tests for hippocampal BDNF measurement. BDNF were measured using ELISA KIT. Data are presented as mean + S.E.M.

Discussion

Contrary to our result showing that administration of TAM 1 mg/kg immediately after IA training session causes memory deficits, the late administration of TAM 1 mg/kg after training session in IA conditioning did not impair memory consolidation. These results provide experimental support that the time of TAM administration is essential in the development of consolidation memory deficits. The time dependent effect of TAM on memory demonstrated in this study is in agreement with previous findings using hormonal treatments. Estrogen treatment administered immediately after behavioral trial enhanced memory, however when the treatment was delayed (45 minutes and 2h) after a sample trial, estrogen presented no effect on memory [12, 13].

The mechanisms of action of TAM on memory function are still poor understood. We examined the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in TAM-related cognitive impairment. BDNF has important roles in regulating the survival and differentiation of neuronal populations in the central nervous system (CNS), dendritic and axonal growth and long-term potentiation [3, 4]. In brain, BDNF and its receptors are regulated by ovarian hormones, such estrogen, and alterations in estrogen levels influences the BDNF levels [14, 15, 16]. Previous literature evidenced that BDNF plays an essential role on short and long-term memory formation, and on persistence of long-term memory using hippocampus-dependent learning task [5, 8, 9, 17]. We analyzed BDNF levels on hippocampus of female rats treated with different doses of TAM and control group after IA conditioning. Hippocampal BDNF levels were similar in all groups, even rats that presented memory impairment in IA conditioning didn't shown alterations in BDNF levels.

References

- [1] F.W. Boele, C.M. Schilder, M.L. de Roode, J.B. Deijen, S.B. Schagen, Cognitive functioning during long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause*. 22 (2014) 17-25.
- [2] Y. Zheng, J. Luo, P. Bao, H. Cai, Z. Hong, D. Ding, J.C. Jackson, X.O. Shu, Q. Dai, Long-term cognitive function change among breast cancer survivors. *Breast. Cancer. Res. Treat.* 146 (2014) 599-609.
- [3] J.Savitz, M. Solms, R. Ramesar, The molecular genetics of cognition: dopamine, COMT, and BDNF. *Genes. Brain. Behav.* 5 (2006) 311–328.
- [4] D.K. Binder, H.E. Scharfman, Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 22 (2004) 123-31.
- [5] M. Alonso, M.R.M. Vianna, A.M. Depino, T.M. Souza, P. Pereira, G. Szapiro, H. Viola, F. Pitossi, I. Izquierdo, J.H. Medina, BDNF–Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short-and Long-Term Memory Formation. *Hippocampus*. 12 (2002) 551–560.
- [6] M. Alonso, P. Bekinschtein, M. Cammarota, M.R.N. Vianna, I. Izquierdo, J.H. Medina, Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn. Mem.* 12 (2005) 504–510.
- [7] C.R. Furini, J.I. Rossato, L.L. Bitencourt, J.H. Medina, I. Izquierdo, M. Cammarota, b-Adrenergic Receptors Link NO/sGC/PKG Signaling to BDNF Expression During the Consolidation of Object Recognition Long-Term Memory. *Hippocampus*. 20 (2010) 672–683.
- [8] M. Blank, A.S. Dornelles, A. Werenicz, L.A. Velho, D.F. Pinto, A.C. Fedi, N. Schroder, R. Roesler, Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 111 (2014) 1-8.
- [9] P. Bekinschtein, M. Cammarota, C. Katche, I. Slipczuk, J.I. Rossato, A. Goldin, I. Izquierdo, J.H. Medina, BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *PNAS*. 105 (2008) 2711-2716.
- [10] P.F.C. Jobim, T.R. Pedroso, R.R. Christoff, A. Werenicz, N. Maurmann, G.K. Reolon, R. Roesler, Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impair formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97 (2012) 105-112.

- [11] R. Roesler, T. Luft, S.H. Oliveira, C.B. Farias, V.R. Almeida, J. Quevedo, F. Dal Pizzol, N. Schroder, I. Izquierdo, G. Schwartsmann, Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacol.* 51 (2006) 350-357.
- [12] T. Inagaki, C. Gautreaux, V. Luine, Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Hormon. Behav.* 58 (2010) 415-426.
- [13] V.N. Luine, L.F. Jacome, N.J. Maclusky, Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinol.* 144 (2003) 2836-44.
- [14] J.M. Wessels, N.A. Leyland, S.K. Agarwal, W.G. Foster, Estrogen induced changes in uterine brain-derived neurotrophic factor and its receptors. *Hum. Reprod.* 30 (2015) 925-936.
- [15] G.S. Moreno-Piovano, J. Varayoud, E.H. Luque, J.G. Ramos, Long-term ovariectomy increases BDNF gene methylation status in mouse hippocampus. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 144 (2014) 234-252.
- [16] C. Matsuki, M. To, Y. Kondo, H. Sugiyama, Y. Yamamoto, T. Shimizu, Y. Kamata, J. Saruta, K. Tsukinoki, Associations between brain-derived neurotrophic factor and estradiol in women's saliva. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 35 (2014) 236-241.
- [17] P. Bekinschtein, M. Cammarota, L.M. Igaz, L.R. Bevilaqua, I. Izquierdo, J.H. Medina, Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron.* 53 (2007) 261-77.