



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DO EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA COM TAMOXIFENO
NA ATIVIDADE COLINÉRGICA E ANTIOXIDANTE DO HIPOCAMPO DE RATAS
OVARIETOMIZADAS**

ISABELLA CALVO BRAMATTI

**CASCAVEL - PARANÁ
2017**

ISABELLA CALVO BRAMATTI

**ESTUDO DO EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA COM TAMOXIFENO
NA ATIVIDADE COLINÉRGICA E ANTIOXIDANTE DO HIPOCAMPO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, área de concentração Fármacos e Medicamentos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Brugin Marek

CASCAVEL – PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B811e Bramatti, Isabella Calvo

Estudo do efeito da coadministração da quercetina com tamoxifeno na atividade colinérgica e antioxidante do hipocampo de ratas ovariectomizadas. / Isabella Calvo Bramatti. — Cascavel, 2017.
69 f.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. Colinesterases. 2. Estresse oxidativo. 3. Flavonoide. 4. SERM. I. Marek, Carla Brugin. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.
CDD 20.ed. 615.10711
CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9^a/965

ISABELLA CALVO BRAMATTI

ESTUDO DO EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA COM
TAMOXIFENO NA ATIVIDADE COLINÉRGICA E ANTIOXIDANTE DO
HIPOCAMPO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Profa. Dra. Carla Brugin Marek

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Carla Brugin Marek
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE
Orientador



Profa. Dra. Silmara Baroni
15ª Regional de Saúde
Maringá - Paraná



Prof. Dr. Ana Maria Itinose
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE

Cascavel - PR
2017

BIOGRAFIA

Nascida em Cascavel, Paraná, no ano de 1992, realizou o ensino fundamental e médio no Curso e Colégio Ideal. Graduada no Curso de Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste em 2014. Mestranda no curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas pela Unioeste na linha de pesquisa de Fármacos e Medicamentos, com enfoque em Toxicologia Celular. Integrante do grupo de pesquisa em Toxicologia Celular, com ênfase em Mecanismos de Toxicidade.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus por ter me concedido calma, sabedoria e fé para trilhar esse caminho.

Agradeço aos meus pais, Dileta e Regisson, e minha irmã Ana Laura, por me apoiarem e confiarem em mim, proporcionando-me amor e carinho mostrando-se solícitos para qualquer desafio que surgia.

Agradeço a minha orientadora, Professora Doutora Carla Brugin Marek, pela paciência de orientar uma aluna e agradeço imensamente a oportunidade e os conhecimentos adquiridos nessa jornada. À professora Doutora Ana Maria Itinose por sempre ajudar nas horas necessárias. E a Professora Mestre Fernanda Coleraus Silva que, além de colega de profissão e pesquisa, contribuiu imensamente para a conclusão e se tornou uma verdadeira amiga que levarei comigo.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxicologia que contribuíram com, não só a realização do trabalho em laboratório, mas também em manter a sanidade, com boas conversas risadas e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao apoio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF) e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Aos membros do Laboratório de Toxicologia Celular, ao Centro de Assistência em Toxicologia (CEATOX) e do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilização e contribuição para este trabalho.

ESTUDO DO EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DA QUERCETINA COM TAMOXIFENO NA ATIVIDADE COLINÉRGICA E ANTIOXIDANTE DO HIPOCAMPO DE RATAS OVARIETOMIZADAS

Tamoxifeno é classificado como um modulador seletivo dos receptores de estrogênio (SERM), sendo muito utilizado no tratamento contra o câncer de mama. A quercetina tem particularmente despertado interesse, principalmente por sua ação antioxidante a qual supostamente poderia vir a minimizar os danos causados pelo tamoxifeno. Devido à falta de estudos sobre a coadministração da quercetina com o tamoxifeno e a ambiguidade sobre a ação de ambos no cérebro, o objetivo deste estudo foi elucidar o efeito sobre a atividade colinérgica e defesa antioxidante. No estudo, ratas ovariectomizadas foram separadas em grupos e tratadas com tamoxifeno (5 mg.Kg^{-1}), quercetina ($22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$) e a coadministração de tamoxifeno (5 mg.Kg^{-1}) mais quercetina ($22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). O hipocampo foi isolado e utilizado para a determinação da atividade da acetilcolinesterase, butirilcolinesterase da superóxido dismutase e catalase e dos marcadores de dano oxidativo (lipoperoxidação e dosagem de grupamentos tióis). Foi possível observar a ação oxidante do tamoxifeno no hipocampo, onde agiu como antagonista nos receptores de estrogênio, aumentando a lipoperoxidação, os níveis de tióis e diminuindo a atividade da catalase; além de um efeito colinérgico com a diminuição da atividade da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Quando coadministrada a quercetina com o tamoxifeno, pode-se observar que em uma situação de estresse oxidativo, a quercetina age como pró-oxidante na dose estudada.

STUDY OF THE COADMINISTRATION EFFECT OF QUECETIN WITH TAMOXIFEN AT THE CHOLINERGIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY AT THE HIPPOCAMPUS OF OVARIECTOMIZED RATS

Tamoxifen is classified as a selective estrogen receptor modulator, with much use in the treatment of breast cancer. Quercetin has aroused interest, mainly for its antioxidant action, which may minimize the damage caused by tamoxifen. Due to the lack of studies about the coadministration of quercetin with tamoxifen, the objective of this study was to elucidate the effect upon the cholinergic activity and antioxidant defense. At the study, ovariectomized rats were separated into groups and treated with tamoxifen (5 mg.Kg^{-1}), quercetin ($22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$) and the coadministration of tamoxifen (5 mg.Kg^{-1}) plus quercetin ($22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$). The hippocampus was isolated and utilized for the determination of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity, superoxide dismutase and catalase activity, and the oxidative damage markers (lipid peroxidation and dosage of thiols groups). It was possible observe the oxidant effect of tamoxifen at the hippocampus, where acted like an antagonist at the estrogen receptors, increasing the lipid peroxidation, levels of thiol groups and attenuating catalase activity; in addition to a cholinergic effect, with the decrease of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. When coadministered the quercetin with tamoxifen, it can be seen that at a situation of oxidative stress, the quercetin acts like pro oxidant in the studied.

Keywords: cholinesterases, flavonoid, oxidative stress, SERM

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivo Específico	17
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERM).....	18
3.2	Tamoxifeno	19
3.2.1	Efeito do tamoxifeno no Sistema Nervoso Central	21
3.2.2	Efeito do tamoxifeno no estresse oxidativo.....	22
3.3	Quercetina.....	23
3.3.1	Efeito da quercetina no Sistema Nervoso Central	26
3.3.2	Efeito da quercetina no estresse oxidativo	27
3.4	Interação entre Tamoxifeno e Quercetina	28
4.	ARTIGO FINAL	31
5.	CONCLUSÕES GERAIS.....	54
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXO I	63
	ANEXO II.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades enzimáticas, indicadores de lipoperoxidação, níveis de óxido nítrico e de cálcio extra e intramitocondriais em hipocampo de ratas ovariectomizadas.....	49
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do trans-1-[p-β(dimetil-amino)etoxi-fenil]1,2-difenil-1-buteno (tamoxifeno; isômero Z). Fonte: Adaptado de JORDAN (2003).....	20
Figura 2. Estrutura química da 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona (quercetina). Fonte: Adaptado de CASA-GRAJALES (2015).	24
Figura 3. Atividades da acetil- (A) e butirilcolinesterase (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas.	50
Figura 4. Atividades da superóxido dismutase (A) e catalase (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas.....	51
Figura 5. Quantidade de malonaldeído (A) e tióis (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas	52
Figura 6. Níveis de óxido nítrico extramitocondrial (A); óxido nítrico intramitocondrial (B); cálcio extramitocondrial (C) e cálcio intramitocondrial (D) no hipocampo de ratas ovariectomizadas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

4-OHTAM	4-Hidroxitamoxifeno
AChE	Acetilcolinesterase
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ER	Receptores de estrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SERM	Modulador Seletivo dos Receptores de Estrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

A depleção de folículos ovarianos, a interrupção da menstruação e a depleção dos níveis de estrogênio são os principais efeitos característicos da menopausa, que ocorre geralmente em mulheres após os 50 anos de idade. O estrogênio, além de exercer ações no sistema reprodutivo feminino, possui vários efeitos sobre a memória e aprendizagem, agindo sob a cognição de acordo com o sistema neural envolvido ou outras variáveis como o estado de estresse celular. A queda acentuada de estrogênio faz com que as mulheres no período pós-menopausa desenvolvam distúrbios funcionais, como picos de calor, disfunção sexual e atrofia genital, além do aumento da incidência de doenças como a osteoporose e doenças cardiovasculares.

A menopausa é também uma das suspeitas de relação com a Doença de Alzheimer, o tipo mais comum de demência e doença neurodegenerativa, atingindo mais de 49 milhões de pessoas no mundo, sendo mais prevalente em mulheres do que em homens, provavelmente devido à privação de estrogênio.

Conseqüentemente, terapias com moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERM) estão sendo cada vez mais utilizadas. SERM são uma classe de compostos que interagem com os receptores de estrogênio (ER) e podem gerar um efeito agonista ou antagonista em tecidos diferentes, devido à complexidade da sinalização do receptor a diferente distribuição nos tecidos, a especificidade com o ligante e as interações com coativadores ou coressores. O tamoxifeno é classificado como um SERM e vem sendo utilizado no tratamento do câncer de mama desde a década de 1970. No entanto, embora possua eficaz potencial terapêutico devido a sua atividade antiestrogênica no tecido mamário, o tratamento prolongado com tamoxifeno pode causar graves efeitos adversos, como a hiperplasia e o carcinoma endometrial, cirrose e esteatose hepática não alcoólica, como também, problemas cognitivos como confusão mental, deterioração da memória verbal e perda da memória visual.

Diante dos efeitos adversos gerados pelo tamoxifeno, a coadministração de substâncias alternativas com possíveis efeitos protetores demonstra-se atraente. Uma classe de substâncias que tem se destacado são os flavonoides, já que estão amplamente distribuídos em vegetais e frutas. Dentro da classe dos flavonoides, a quercetina tem particularmente despertado interesse, principalmente por sua ação antioxidante a qual supostamente poderia vir a minimizar os danos causados pelo tamoxifeno. Outra ação também importante é a sua atividade inibitória sobre

algumas enzimas do sistema citocromo P450, responsáveis pela biotransformação do tamoxifeno em alguns de seus metabólitos ativos, o que leva a alteração da biodisponibilidade do tamoxifeno e conseqüentemente, a resposta fisiológica. Além disso, a quercetina possui habilidade em eliminar radicais livres e quelar íons metálicos, oferecendo um amplo potencial terapêutico na prevenção e tratamento de doenças cuja etiologia pode ser advinda do estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, artrite, inflamações, além de infecções bacterianas e virais.

Devido à importância que a presença de estrogênio exerce sobre a realização das funções cerebrais e a ocorrência de doenças neurodegenerativas, além da ambigüidade da ação tanto do tamoxifeno quanto da quercetina nessa região, um estudo sobre os efeitos da administração da quercetina na terapia com tamoxifeno se torna necessário. Como o hipocampo tem um papel essencial na memória e aprendizagem, além de ser uma das primeiras áreas afetadas no cérebro por doenças neurodegenerativas, essa região foi escolhida para ter a atividade colinérgica e as defesas antioxidantes endógenas estudadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito antioxidante sobre o sistema colinérgico da coadministração da quercetina com o tamoxifeno no hipocampo de ratas ovariectomizadas.

2.2 Objetivo Específico

- Medir a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) no hipocampo;
- Medir a atividade da catalase e superóxido dismutase no hipocampo;
- Medir a lipoperoxidação e quantidade de grupos tióis no hipocampo;
- Medir os níveis de óxido nítrico e cálcio extra e intramitocondrial.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio (SERM)

A menopausa é caracterizada por uma depleção gradual dos folículos ovarianos, interrupção da menstruação e uma diminuição intensa dos níveis séricos de estrogênio, e atinge mulheres com, em média, 50 anos de idade (ROCCA, GROSSARDT & SHUSTER, 2011). O estrogênio é o hormônio feminino que além de ser responsável pelo crescimento, diferenciação e função em diferentes tecidos, também é importante para a regulação e homeostase de lipídios e metabolismo de carboidratos, desenvolvimento ósseo, resposta imune, sistema cardiovascular e sistema nervoso central (SNC) podendo afetar, por exemplo, o desenvolvimento de neurônios e alterar as funções comportamentais e cognitivas (SELINA et al., 2015; LEE et al., 2014). Além de aumentar a predisposição a doenças cardiovasculares, do esqueleto e neurodegenerativas, a deficiência de estrogênio aumenta disfunções metabólicas podendo aumentar os níveis de obesidade, síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (XU, LOVRE & MAUVAIS-JARVIS, 2016).

Devido à importância desse hormônio em diversos tecidos, se tornou essencial a realização de reposição hormonal ou de estrogênio em patologias associadas à sua deficiência. A terapia de reposição hormonal melhora a qualidade de vida na menopausa em mulheres, e está relacionada com a ação estrogênica em ER presentes nos tecidos (WELTON et al., 2008). Os ER pertencem à superfamília de receptores nucleares, existindo subtipos como ER- α , ER- β e ER- γ , sendo dois deles subtipos principais, os ER- α e ER- β . O ER- α é expresso predominantemente em tecidos reprodutivos (útero, mamas, ovários), no fígado e no SNC, e o ER- β é mais expresso em outros tecidos como ossos, endotélio, pulmões, trato urogenital, ovários e próstata. Sugere-se que o câncer de mama esteja relacionado com a atividade estrogênica em ER presentes em células tumorais no tecido mamário (DIEZ-PEREZ, 2006). Consequentemente, terapias com SERM que possuem afinidade com os ER distribuídos em diferentes tecidos, estão sendo cada vez mais utilizados (JORDAN et al., 2014).

SERM são uma classe de compostos que interagem com os ER e podem gerar um efeito agonista ou antagonista dependendo do tecido onde se localizam, devido à complexidade da sinalização do receptor, a diferente distribuição dos tipos de receptores nos tecidos, a especificidade com o ligante e as interações com coativadores ou coressoradores (XU, LOVRE & MAUVAIS-JARVIS, 2016). Já foram

descritas mais de 70 moléculas pertencentes a cinco grupos químicos: trifeniletílenos (tamoxifeno), benzotiofenos (raloxifeno), tetrahidronaftílenos (lasofoxifeno), indols (bazedoxifeno e pibendoxifeno) e benzopiranos (ormeloxifeno) (DIEZ-PEREZ, 2006).

O estrogênio, além das ações já citadas, possui vários efeitos sobre a memória e aprendizagem, interferindo na cognição de acordo com o sistema neural envolvido ou outras variáveis como o estado de estresse celular (PISANI et al., 2015). A perda de estrogênio que ocorre na menopausa é uma das suspeitas de possuir relação com a Doença de Alzheimer (DA), que é o tipo de demência mais comum e de doença neurodegenerativa. Esta doença atinge mais de 49 milhões de pessoas no mundo, tendo maior prevalência em mulheres do que em homens, provavelmente devido a essa privação de estrogênio (PINES, 2016). Num estudo realizado por Shao et al. (2012) foi descoberto que mulheres tratadas com estrogênio nos primeiros 5 anos do início da menopausa tiveram um risco 30% menor de desenvolver DA.

Apesar do uso de SERM como neuroprotetores apresentar limitações devido a sua ação em receptores de estrogênio de outros órgãos, estudos vêm sendo realizados utilizando a terapia hormonal para a neuroproteção contra doenças neurodegenerativas, mostrando que essa terapia, em mulheres saudáveis, leva a uma melhora na memória e um aumento na função cognitiva devido a ação do estradiol, além de também aumentar o volume de hipocampo (LORD et al., 2008); em modelos experimentais com neurodegeneração previne a perda de neurônios, que leva a perda cognitiva (DONCARLOS, AZCOITIA & GARCIA-SEGURA, 2009), podendo exercer ações neuroprotetoras através do controle da inflamação do cérebro (KARIMI et al., 2015); e, possui ação protetora também em modelos animais com Parkinson e DA (MORISSETTE et al., 2008; CARROL & PIKE, 2008). No entanto, quanto maior o tempo de privação de estrogênio, menor ação neuroprotetora a terapia hormonal possui (SUZUKI et al., 2007).

3.2 Tamoxifeno

O tamoxifeno ou trans-1-[p-β(dimetil-amino)etoxi-fenil]1,2-difenil-1-buteno é um isômero trans substituído do trifeniletileno (Figura 1), com atividade antiestrogênica na terapia antiestrogênica de mama (JORDAN, 2006). Após ser absorvido pelo trato gastrointestinal, é distribuído ligado a proteínas plasmáticas, particularmente à albumina (em torno de 99%), e devido ao seu caráter altamente lipofílico é bem distribuído nos tecidos, sendo a sua concentração nos tecidos de 10

a 60 vezes mais alta do que a concentração presente no plasma (MAREK, ITINOSE & BRACHT, 2010; BINKHORST et al., 2015) e é metabolizado por várias enzimas do sistema citocromo p450 (CYP). Após sofrer metabolização hepática forma o 4-hidroxitamoxifeno (4-OHTAM) e o N-desmetiltamoxifeno, que são os dois principais metabólitos primários produzidos e que posteriormente são biotransformados em 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno).

Os metabólitos ativos, endoxifeno e 4-OHTAM, possuem até 100 vezes maior afinidade aos ER e de 30 até 100 vezes maior potência na supressão da proliferação celular do que o tamoxifeno e o endoxifeno possui ainda uma afinidade 10 vezes maior que o 4-OHTAM (SHIN, CHOI & LI, 2006; WELZEN et al., 2015). Embora de grande interesse clínico devido à possibilidade de estar intimamente associado aos efeitos adversos gerados pelo tamoxifeno, o N-desmetiltamoxifeno possui baixa afinidade aos ER, não possuindo eficiente potencial terapêutico. A eliminação dos metabólitos ocorre através da bile, fezes e urina (BINKHORST et al., 2015).

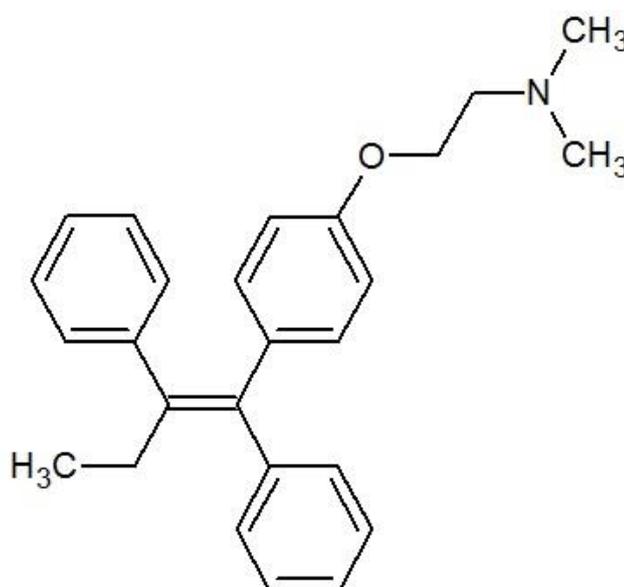


Figura 1. Estrutura química do trans-1-[p-β(dimetil-amino)etoxy-fenil]1,2-difenil-1-buteno (tamoxifeno; isômero Z). Fonte: Adaptado de JORDAN (2003).

A classificação do tamoxifeno como um SERM se deve a sua atividade moduladora, com efeitos agonista ou antagonista ao estrogênio em diferentes tecidos que possuem ER. Essa terapêutica vem sendo utilizada há mais de três décadas no tratamento do câncer de mama em mulheres com ER positivos nos tumores. Quando administrado durante cinco anos demonstrou reduzir a recorrência e mortalidade em mulheres na peri e pós menopausa (GOETZ, KAMAL & AMES,

2008; CLINES, CHOKSI & POZNAK, 2015). Seu efeito terapêutico no tratamento do câncer de mama se deve à ação antiestrogênica no tecido mamário, ocorrendo ativação de proteínas co-reguladoras repressoras, inibindo a proliferação de células tumorais através da ligação em ER (OSENÍ et al., 2008). Além de ser eficaz na terapêutica no tecido mamário, possui também uma ação osteoprotetora, protegendo contra a perda óssea ao aumentar a densidade mineral óssea, diminuindo assim a ocorrência de fraturas (CLINES, CHOKSI & POZNAK, 2015).

No entanto, o tratamento prolongado com tamoxifeno pode causar graves efeitos adversos, como a hiperplasia e o carcinoma endometrial (RONG, HILAKIVI & CLARKE, 2015), o desenvolvimento de cirrose e esteatose hepática não alcoólica (JAIN, THANKI & JAIN, 2013) como também, o aumento do risco do desenvolvimento de diabetes mellitus (LIPSCOMBE et al., 2012). Esses efeitos adversos são, possivelmente em decorrência da alteração do fluxo de elétrons da cadeia respiratória, do estresse oxidativo, da lipoperoxidação (NAZAREWICZ et al., 2007; MAREK et al., 2011), das alterações acentuadas no metabolismo lipídico e da glicose (HOZUMI, KAQANO & MIYATA, 1997) e da depleção de enzimas antioxidantes (RABINOWICH & SHIBOLET, 2015).

3.2.1 Efeito do tamoxifeno no Sistema Nervoso Central

Os efeitos do tamoxifeno no SNC são provavelmente facilitados pela habilidade do medicamento de cruzar a barreira hematoencefálica e se acumular no cérebro, podendo ter uma ação ambígua nos receptores, o que irá refletir na cognição dos pacientes (PALMER et al., 2008). Existem evidências que mostram que o tratamento com tamoxifeno pode causar problemas cognitivos, como confusão, deterioração da memória verbal, dificuldade em tomar decisões (DENK et al., 2015), perda da memória visual e habilidades visuo-espaciais (BENDER et al., 2006). Há também uma diminuição na atividade do córtex frontal e parietal e uma redução no tamanho do hipocampo, sugerindo uma ação antagonista nessas regiões (EBERLING et al., 2004). O tempo de início e duração da terapia hormonal interfere na velocidade com que acontece o declínio cognitivo (MACLENNAN et al., 2006).

No entanto, o tamoxifeno pode também agir de maneira agonista melhorando as deficiências de memória e aprendizagem induzidas por algum outro medicamento, possivelmente devido a sua interação com o sistema colinérgico (KARIMI et al., 2015). Newhouse et al., (2013) comprovaram essa interação ao

mostrar a habilidade do tamoxifeno de restaurar a atividade da colina acetiltransferase no hipocampo de modelos experimentais ovariectomizados.

Quando administrado em pequenas doses o tamoxifeno pode aumentar a neuroproteção em modelos com dano isquêmico (ZOU et al., 2015), melhorar os déficits neurológicos, reduzindo o tamanho do tecido infartado e os danos comportamentais (MEHTA et al., 2003). O tamoxifeno também pode proteger contra danos na medula espinhal, reduzir o edema, a perda de neurônios e de mielina, o que resulta em uma melhor recuperação locomotora (TIAN et al., 2009). Apesar dos estudos realizados exaltando a ação neuroprotetora do tamoxifeno, O'Neil et al. (2004) demonstraram que o tratamento não aumenta significativamente o crescimento ou a complexidade morfológica dos neurônios do córtex e do hipocampo. Espeland et al. (2010) relataram um pequeno efeito negativo nas funções cognitivas em mulheres que estão na pós menopausa por 1 ou 3 anos.

Com relação às doenças neurodegenerativas mais comuns, Bourque et al. (2007) mostraram que, com o uso de tamoxifeno, há uma prevenção da função dopaminérgica dose-dependente, enquanto que Latourelle et al., (2010) evidenciaram perda da propriedade neuroprotetora do estrogênio contra o Parkinson em pacientes com câncer de mama tratadas com o tamoxifeno. Já no caso da DA há estudos que indicam que o tamoxifeno possa diminuir o risco da doença ao demonstrar uma proteção neuronal contra a toxicidade β -amilóide (O'NEIL et al., 2004).

3.2.2 Efeito do tamoxifeno no estresse oxidativo

A geração das espécies reativas de oxigênio (ERO), um produto do metabolismo de energia aeróbio, é mantida em níveis fisiológicos pela atividade de componentes antioxidantes. Um desequilíbrio das ERO resulta no estresse oxidativo, caracterizado pela alteração da função mitocondrial, diminuição da atividade protéica, dano no DNA e indução da apoptose (RAMOS & WITKIN, 2016).

No período da pós menopausa, a queda dos hormônios ovarianos induz o estresse oxidativo e apoptose em vários tecidos, apresentando um aumento nas concentrações séricas de marcadores, como a lipoperoxidação (YAZGAN et al., 2016). Com o início do tratamento, devido a sua hidrofobicidade, o tamoxifeno se acumula rapidamente nas bicamadas fosfolipídicas das membranas o que pode intensificar o processo de estresse oxidativo. Esse mecanismo contribui para a apoptose das células cancerígenas, porém também acarreta consequências, como o

aumento da resistência ao tratamento com tamoxifeno e a ocorrência dos eventos adversos (BEKELE et al., 2016).

Estudos mostram que o tamoxifeno modula a função da mitocôndria, principal fonte de ERO, agindo como um potente inibidor do transporte de elétrons, aumentando a lipoperoxidação mitocondrial, diminuindo a glutatona e a atividade da superóxido dismutase (SOD) mitocondrial; porém, a resposta difere de tecido para tecido (PARVEZ et al., 2008). Johnson et al., (2007) relataram que as mitocôndrias do cérebro, fígado, coração e rim de ratos possuem estruturas e atividades metabólicas diferentes, como atividade das enzimas antioxidantes e concentração de cálcio, devido aos seus respectivos proteomas mitocondriais, e o grau de toxicidade do tamoxifeno depende da condição metabólica do paciente (MOREIRA et al., 2011). O metabólito 4-OHTAM também mostrou capacidade de reduzir a lipoperoxidação induzida em mitocôndrias cerebrais *in vitro* (MOREIRA et al., 2004).

No fígado, o estresse oxidativo leva a hepatotoxicidade devido à formação das ERO e deficiência da oxidação dos ácidos graxos. Diminui, também, as defesas antioxidantes hepática com a diminuição da atividade da glutatona peroxidase, da catalase e da SOD e, com o aumento da lipoperoxidação (ALBUKHARI et al., 2009). Ações estas, também, observadas no rim de ratos tratados com tamoxifeno (TABASSUM et al., 2007).

No cérebro, a maioria das doenças neurodegenerativas são consequências dos níveis excessivos de oxidação e apoptose que ocorrem através do aumento da despolarização mitocondrial, entrada de Ca^{2+} e produção excessiva de ERO e espécies reativas de nitrogênio. No cérebro total de ratas ovariectomizadas foi observado uma diminuição na lipoperoxidação e aumento da atividade da glutatona peroxidase quando tratadas com tamoxifeno (DAJAS et al., 2015; YAZGAN et al., 2016). Porém existem estudos que demonstram uma ação antagonista no hipocampo, afetando as funções mitocondriais e gerando estresse oxidativo (NOBAKHT, NAJAFZADEH & SHARGH, 2009).

3.3 Quercetina

Hoje em dia, vem se dando muita atenção ao consumo de alimentos como estratégia contra várias doenças devido aos seus constituintes fitoquímicos, dentre eles os flavonoides. Estes possuem vários efeitos benéficos, como a prevenção de doenças crônicas e no tratamento de processos inflamatórios, bacterianos e virais, com poucos eventos adversos (NABAVI et al., 2015).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) (Figura 2) é um membro da família dos flavonoides, que se encontra presente na nutrição humana, estando distribuída em várias frutas e vegetais como, alface, pimenta, cebola, tomate, brócolis e maçã, e também em bebidas como, no chá e vinho tinto (DAJAS et al., 2015).

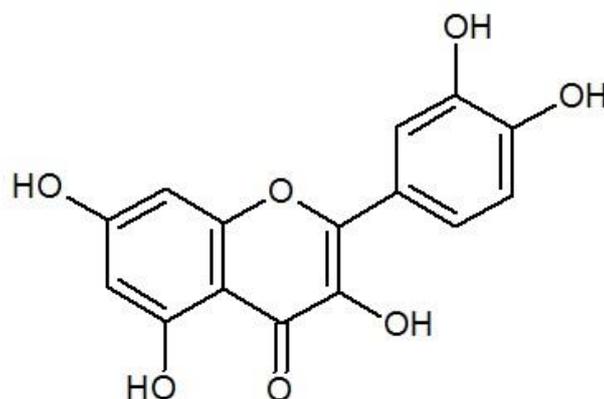


Figura 2. Estrutura química da 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona (quercetina).
Fonte: Adaptado de CASA-GRAJALES (2015).

A quercetina possui várias atividades biológicas e farmacológicas, como anticancerígena, anti-inflamatórias, anti-esclerótica, anti-trombótica, anti-hipertensiva, entre outras (DAJAS et al., 2015). Acredita-se que as fontes alimentares contribuem para uma ingestão diária de quercetina estimada em aproximadamente de 6 a 18 mg/dia variando conforme a dieta do indivíduo. Na forma de suplemento dietético, trabalhos mostram o consumo de doses que variam de 50 a 1000 mg/dia (GUO & BRUNO, 2015). A biodisponibilidade da quercetina varia de acordo com a fonte alimentar, estando presente principalmente em suas formas conjugadas extensivamente ligadas à albumina, enquanto que a sua forma livre está presente em concentrações muito baixas (DAJAS et al., 2015).

Apesar de existir em diversas fontes na forma de aglicona, a quercetina da dieta é principalmente apresentada na sua forma glicosídica, sendo as mais frequentes: 3-O-glicosídeo (isoquercetina), 3-O-rutinosídeo (rutina), 3-O-thamnosídeo (quercitrina) e 3-O-galactosídeo (hiperosídeo) (DAJAS et al., 2015). Os metabólitos quercetina-3-glucuronídeo e quercetina-3-sulfatada são os principais encontrados na circulação sanguínea (GIBELLINI et al., 2011). A maioria dos metabólitos derivados da quercetina é excretada pela via biliar, mas devido a sua

baixa solubilidade em água, que não favorece a difusão passiva, uma parte da quercetina absorvida no epitélio intestinal sofre efluxo para o lúmen intestinal, enquanto outros derivados são excretados pela via renal após sofrer metabolismo hepático (GUO & BRUNO, 2015).

A quercetina possui efeitos vasodilatadores podendo diminuir a pressão arterial em vários modelos de animais, de forma dose-dependente. Esse efeito anti-hipertensivo observado em animais foi também observado em humanos. Pode ser devido a vários mecanismos como a diminuição no estresse oxidativo, interferência no sistema de renina-angiotensina-aldosterona e/ou melhora na função vascular (LARSON et al., 2012). Um estudo de Duarte et al. (2001) mostrou que em modelos experimentais com hipertensão, a quercetina após 5 semanas de tratamento reduziu a pressão sanguínea, aumentou a atividade da glutathione peroxidase no fígado e reduziu a lipoperoxidação no plasma e no fígado; porém não mostrou esses mesmos efeitos em modelos experimentais normotensos, onde indivíduos saudáveis receberam suplementação diária, com diferentes concentrações de quercetina durante duas semanas e apresentaram diferentes concentrações no plasma de acordo com a dose, porém não foi observado ação antioxidante, anti-inflamatória ou de alteração no metabolismo (EGERT et al., 2008). A quercetina também pode exercer um papel protetor contra doenças cardiovasculares, inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo a pressão sanguínea e a agregação de plaquetas (DUARTE et al., 2001; EGERT et al., 2008).

O efeito anti-inflamatório da quercetina é causado pela inibição de enzimas e de mediadores inflamatórios. Ela inibe também a produção e a liberação de histamina e de outros mediadores alérgicos (MLCEK et al., 2016). As ações antioxidante e anti-inflamatória da quercetina podem agir contra alguns mecanismos moleculares envolvidos na obesidade (NABAVI et al., 2015). Dados mostram que apesar do efeito anti-inflamatório, em algumas situações *in vivo*, esta pode agir como pró-inflamatório. Pessoas com pancreatite e asma estão mais vulneráveis a esses efeitos devido a uma indução da bradicinina na traqueia e no pâncreas o que faz a quercetina aumentar seus níveis no plasma (NICOLAU, DOVICH I & CUTTLE, 2013).

Além disso, a quercetina possui uma ação osteoprotetora, aumentando a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos e inibindo a perda óssea em ratas ovariectomizadas. Liang et al. (2011) relataram a capacidade de reverter parcialmente a osteopenia em ratos diabéticos, possivelmente devido a propriedade

antioxidante da quercetina e de sua habilidade em diminuir a glicose sérica com mecanismo não esclarecido.

3.3.1 Efeito da quercetina no Sistema Nervoso Central

O estresse oxidativo está associado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, devido à possibilidade em causar dano no núcleo dos neurônios e no ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, diminuir a atividade de enzimas antioxidantes e aumentar os produtos da lipoperoxidação (ANSARI et al., 2009). A quercetina tem habilidade de atravessar a barreira hematoencefálica e chegar a todas as regiões do cérebro, podendo ser neuroprotetora ou neurotóxica (MAALIK et al., 2014). Este flavonoide contribui significativamente para a proteção de células neuronais contra a neurotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo. Células do hipocampo de camundongos mostraram-se protegidas contra a toxicidade oxidativa induzida por glutamato, pela inibição da produção de ERO e diminuição da lipoperoxidação. O tratamento crônico com quercetina demonstrou reverter as deficiências cognitivas causadas pelo envelhecimento e intoxicação por álcool (ANSARI et al., 2009), melhorar os níveis de ansiedade, da função cognitiva pela modulação de atividades enzimáticas (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2015), e interagir com o sistema colinérgico ao inibir a atividade da acetilcolinesterase e da bunitilcolinesterase de forma dose-dependente. Dong et al. (2014) demonstraram a ação protetora da quercetina, na dose de 50 mg/Kg, contra o edema no cérebro em modelos experimentais de ratos com hemorragia subaracnóide, apresentando um aumento da atividade das enzimas antioxidantes e diminuição da lipoperoxidação, prevenindo também a apoptose hipocampal. O mesmo estudo envolvendo uma dose menor, de 10 mg/Kg, não mostrou a mesma ação protetora. Em modelos *in vitro* de neurodegeneração a quercetina pode apresentar efeitos protetores e de toxicidade, possivelmente devido a uma possível diferença no tempo de administração (OSSOLA et al., 2008).

A necessidade da administração de repetidas doses para obter o efeito neuroprotetor sugere a dificuldade da quercetina em atingir o cérebro em concentrações efetivas. Resultados de experimentos crônicos indicam uma necessidade de concentrações acumulativas para obter uma eficácia farmacológica (DAJAS et al., 2015), pois apesar de, em doses apropriadas, poder atenuar o estresse oxidativo e melhorar a atividade do hipocampo, em uma situação instável ela exibe efeitos pró-oxidante que acabam por prejudicar a cognição (XIA et al.,

2015). Jazvinscak et al. (2012) demonstraram esse efeito pró-oxidante também ao verificar que o uso de quercetina não afetou a sobrevivência neural, mas sim provocou uma redução da glutathiona intracelular nos neurônios.

Embora apresente benefícios contra as doenças neurodegenerativas ao exercer um efeito inibitório contra a acetilcolinesterase (MAALIK et al., 2014), com relação a DA, Ansari et al. (2009) relataram que em concentrações muito baixas, até 1 μM , e em concentrações altas como 20 μM e 40 μM , não houve proteção contra a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo β -amilóide, proteína que sofre alteração estrutural e agregação na DA.

3.3.2 Efeito da quercetina no estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, que podem ser reduzidos pelo oxigênio gerando as ERO, e as defesas antioxidantes. A superprodução de fatores pró-oxidantes causa vários efeitos deletérios, como a lipoperoxidação, dano oxidativo no DNA e dano protéico (CASA-GRAJALES & MURIEL, 2015). A quercetina é um dos mais abundantes flavonoides com maior capacidade antioxidante, modulando a expressão de diferentes enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido dismutase, aumentando os níveis intracelulares de glutathiona (RUIZ et al., 2015). Estudos *in vitro* mostram que é o flavonoide mais potente captador de ERO e de espécies reativas de nitrogênio. Essas propriedades antioxidantes são atribuídas à presença de dois farmacóforos na molécula da quercetina, um grupo catecol e um grupo hidroxila. A captação de ERO não somente previne a ocorrência do estresse oxidativo, mas também ajuda na atividade anti-inflamatória (BOOTS, HAENEM & BAST, 2008).

A dupla ação da quercetina, antioxidante e pró-oxidante, depende do estado oxidativo da célula, dos metabólitos formados e da dose administrada. Provavelmente quando o sistema antioxidante se torna ineficiente, a superprodução de ERO altera o estado redox da célula e ativa a apoptose (RUIZ et al., 2015). Ruiz et al. (2015) demonstraram essa ambiguidade ao concluir que a quercetina afeta negativamente na função mitocondrial no coração e na eritropoiese em ratos. Hisieh et al. (2010) relataram que o tratamento com 70 mg/Kg de quercetina por 28 semanas agrava os efeitos celulares causados pelo câncer renal.

Um estudo feito com ratos diabéticos mostrou que o tratamento por 14 dias com 10 mg/Kg/dia de quercetina reverteu apenas os efeitos causados pela diabetes

na atividade da glutathione oxidase do cérebro e da glutathione peroxidase no fígado, porém aumentou 20% na lipoperoxidação no fígado e agiu negativamente nas enzimas antioxidantes do rim e coração (SANDERS, RAUSCHER & WATKINS, 2001). Em ratas com hipercolesterolemia, a administração de quercetina demonstrou diminuir o estresse oxidativo na aorta, ao diminuir a lipoperoxidação (KAMADA et al., 2005). No fígado, o poder antioxidante da quercetina é demonstrado ao causar inibição da lipoperoxidação e efeitos na glutathione peroxidase (SEUFI et al., 2009).

A quercetina protege também as células gástricas contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido, através da inibição da produção das ERO, da regulação do influxo de Ca^{+2} nas células e da inibição do potencial da membrana de mitocôndrias, o que acaba por inibir a apoptose (HU et al., 2015). Em diferentes modelos experimentais, a quercetina demonstrou seu poder antioxidante, como no plasma de modelos com artrite reumatoide, a quercetina em uma dose de 150 mg/Kg demonstrou aumentar a capacidade antioxidante, e em ratas hipertensas melhorou o relaxamento endotelial de vasos, através da redução da atividade da glutathione peroxidase e da lipoperoxidação (GUARDI et al., 2015; DUARTE et al., 2001). No cérebro, Costa et al. (2016), assumiram que a concentração de quercetina encontrada está na escala nanomolar, muito abaixo do necessário para exercer uma atividade antioxidante direta, sendo preciso administrar uma dose muito maior. Porém a segurança do uso prolongado de suplementos antioxidantes na saúde humana ainda é muito debatida (MAALIK et al., 2014).

3.4 Interação entre Tamoxifeno e Quercetina

Diante dos efeitos adversos gerados pelo tamoxifeno, a coadministração de substâncias alternativas com possíveis efeitos protetores demonstra-se atraente (SCOTT et al., 2006). Os efeitos farmacológicos dos fitoquímicos presentes em alimentos veem sendo extensamente estudados, especialmente a supressão de espécies reativas de oxigênio pelos antioxidantes presentes nestes alimentos. Dentre esses fitoquímicos, os flavonoides têm tido muito destaque devido aos efeitos farmacológicos, como anti-tumoral, anti-diabético, hipolipemiante, entre outros (LIN et al., 2014). Estudos indicam que alguns nutrientes antioxidantes, como as vitaminas A, C e E minimizam os efeitos tóxicos produzidos pelas drogas antineoplásicas e interferem positivamente na resposta ao tratamento (DOS SANTOS & CRUZ, 2001). Devido a esses fatores, vem sendo estudado o uso concomitante do tamoxifeno com o flavonoide quercetina.

A resposta sinérgica da associação entre o tamoxifeno e a quercetina tem sido foco de vários estudos que visam diminuir a resistência das células tumorais às múltiplas drogas utilizadas no tratamento do câncer de mama, esperando-se melhorar a eficácia antitumoral (DUYSEN & LOCKRIDGE, 2008). A exposição de células MCF-7 de carcinoma de mama humano à doses de 0,5 μ M de quercetina com tamoxifeno inibiu, após 24 horas, o crescimento das células tumorais, induziu a apoptose de células MCF-7 multiresistentes a drogas, via alterações em nível mitocondrial e melhoraram a sensibilidade das células MCF-7 ao tamoxifeno (KAVITHAA et al., 2014). Wang et al. (2015) demonstraram que além da quercetina aumentar a sensibilidade, também consegue converter a resistência de células cancerosas mamárias ao tamoxifeno. Oh et al., (2010) atribuíram essa conversão à inibição da angiogênese através da supressão da expressão de uma proteína (Pin-1), sugerindo o uso da quercetina como agente terapêutico no tratamento do câncer de mama resistente ao tamoxifeno. O uso concomitante de tamoxifeno e quercetina também demonstrou regular o crescimento tumoral em diversas células cancerosas como no câncer de pulmão, no melanoma e no câncer de laringe (CALTAGIRONE et al., 1997; PIANTELLI et al. 1995; FERRANDINA et al., 1998). Ma et al. (2004) observaram que além do tamoxifeno inibir o crescimento celular do tumor de próstata através da modulação da angiogênese, a coadministração com a quercetina potencializou os seus efeitos antineoplásicos.

Além do efeito direto da quercetina nas ações terapêuticas do tamoxifeno, este flavonoide possui também a habilidade de aumentar a biodisponibilidade oral do tamoxifeno, pela redução do metabolismo primário deste. Shin, Choi & Li (2006) observaram que após a administração por via oral de 10 mg/kg de tamoxifeno e quercetina nas doses de 2,5; 7,5 e 15 mg/kg em ratas houve aumento da biodisponibilidade do tamoxifeno e do seu metabólito (4-OHTAM) nas coadministrações com 2,5 e 7,5 mg/kg de quercetina. O aumento da biodisponibilidade do tamoxifeno e do 4-OHTAM, pode ser explicado devido a quercetina ser um potente inibidor competitivo das isoformas 3A do citocromo P450. Inibição demonstrada por estudos *in vitro* com microsomas hepáticos e intestinais com 1 a 10 μ M de quercetina, e estudos *in vivo* com as doses de 2, 10 e 20 mg/Kg (UMATHE et al., 2008). Considerando a importância das isoformas 3A/4/5 do citocromo P450 no metabolismo do tamoxifeno (SINGH, FRANCIS & MICHAEL, 2011) essa ação inibitória da quercetina nas isoformas 3A do citocromo P450

explicaria as alterações na biodisponibilidade e no metabolismo de primeira passagem do tamoxifeno.

Com relação aos efeitos hepatotóxicos do tamoxifeno Jain, Thanki & Jain, (2013) coencapsularam o tamoxifeno com quercetina em nanopartículas poliméricas conseguindo assim diminuir o estresse oxidativo e a consequente hepatotoxicidade do tamoxifeno. Isto melhorou a eficácia antitumoral e aumentou a biodisponibilidade das duas substâncias, *in vitro* e *in vivo*. Embora o objetivo do estudo fosse demonstrar a melhor eficácia das nanopartículas, pode ser observado que quando administrada quercetina associada ao tamoxifeno, mesmo quando não coencapsulados em nanopartículas, a atividade scavenger *in vitro* da quercetina se mostrou benéfica diante dos efeitos adversos do tamoxifeno. A quercetina também produziu um efeito hipoglicêmico além de reduzir os efeitos hepatotóxicos induzidos por outros medicamentos (CHENG, SHEN & WU, 2009).

4. ARTIGO FINAL

Efeito pró-oxidante da quercetina em hipocampo de ratas ovariectomizadas tratadas com tamoxifeno

Isabella Bramatti, Fernanda Coleraus Silva, Fernando Campos Salles,
Ana Maria Itinose, Carla Brugin Marek

*Artigo a ser submetido para o The Journal of Clinical Endocrinology and
Metabolism*

Efeito pró-oxidante da quercetina em hipocampo de ratas ovariectomizadas
tratadas com tamoxifeno

Isabela Calvo Bramatti¹, Fernanda Coleraus Silva¹, Fernando Marques
Salles², Ana Maria Itinose³ e Carla Brugin Marek^{1*}

¹Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil

²Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua
Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil

³ Centro de Assistência em Toxicologia (CEATOX), Hospital Universitário do
Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves 3224, 85806470, Cascavel, Brasil

***Correspondência ao autor:** Carla Brugin Marek, Laboratório de Toxicologia
Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619,
85819110, Cascavel, Brasil. Tel/Fax +55 (45)3321-5429; E-mail:
carla.marek@unioeste.br

Resumo

Background: Em mulheres no período pós-menopausa o estrogênio mostra influência significativa nas funções cognitivas. A reposição hormonal tem ajudado na proteção contra esta deterioração cognitiva, onde os SERMs têm sido a droga de escolha, dentre eles o tamoxifeno, que também é utilizado na quimioprevenção em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama. A terapia com antioxidantes também tem sido abordada como possível opção para o tratamento e na prevenção de doenças neurodegenerativas. O efeito da coadministração dessas substâncias é desconhecido.

Métodos: No estudo, ratas ovariectomizadas foram separadas em grupos e tratadas com tamoxifeno (5 mg.Kg⁻¹), quercetina (22,5 mg.Kg⁻¹) e a coadministração de tamoxifeno (5 mg.Kg⁻¹) e quercetina (22,5 mg.Kg⁻¹). O hipocampo foi isolado e utilizado para a determinação das atividades da acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, da superóxido dismutase e catalase. Os marcadores de dano oxidativo, lipoperoxidação e tióis, além no NO e Ca⁺² também foram avaliados.

Resultados: No grupo tratado com tamoxifeno houve diminuição nas atividades da acetil- e butirilcolinesterase (p < 0,001), aumento na quantidade de grupos tióis e diminuição dos níveis de NO. Por outro lado, a quercetina quando coadministrada com o tamoxifeno mostrou aumentar a atividade da acetil- e butirilcolinesterase, diminuir a quantidade de grupos tióis e aumentar tanto o Ca⁺² quanto o NO, mostrando um efeito pró-oxidante.

Conclusão: Nas doses estudadas, a ação pró-oxidante da quercetina se sobrepôs ao efeito neuroprotetor do tamoxifeno, inviabilizando a sua co-administração para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

Abstract

Background: In postmenopausal women, estrogen shows a significant influence on cognitive functions. Hormonal replacement has helped to protect against this cognitive deterioration, where SERMs have been the main choice, like tamoxifen, which is also used in chemoprevention in women with high risk to develop breast cancer. Antioxidant therapy has also been addressed as a possible option for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases. The effect of coadministration of these substances is unknown.

Methods: At this study, ovariectomized rats were separated into groups and treated with tamoxifen (5 mg.Kg⁻¹), quercetin (22,5 mg.Kg⁻¹) and their coadministration, tamoxifen (5 mg.Kg⁻¹) plus quercetin (22,5 mg.Kg⁻¹). The hippocampus was isolated and used for determination of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, superoxide dismutase and catalase activities. The markers of oxidative damage, lipoperoxidation and thiols, such as nitric oxide and Ca⁺² were also evaluated.

Results: The group treated with tamoxifen shown a decrease in acetyl- and butyrylcholinesterase activities ($p < 0,001$), increase the amount of thiol groups and decrease at NO levels. On the other hand, quercetin when administered with tamoxifen showed an increase in acetyl- and butyrylcholinesterase activities, decrease the amount of thiol groups and increase both Ca⁺² as NO, showing a pro-oxidant effect.

Conclusion: At the studied doses, the pro-oxidant action of quercetin overlapped the neuroprotective effect of tamoxifen, making its co-administration unfeasible for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

Keywords: Neurodegenerative disease, oxidative stress, SERM

1. Introdução

O declínio cognitivo é bem reconhecido durante o envelhecimento. Em mulheres no período pós-menopausa o estrogênio mostra influência significativa nas funções cognitivas (1), exercendo efeito tanto na neuroquímica quanto na microestrutura das regiões cerebrais cruciais para o desenvolvimento, aprendizagem e memória (2). A reposição hormonal com moléculas estrogênicas tem ajudado na proteção contra esta deterioração cognitiva, onde os moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) têm sido a droga de escolha (3). Dentre os SERMs, o tamoxifeno (TAM), também utilizado na quimioprevenção em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (4), apesar da sua ação antioxidante no cérebro (5), não é considerado neuroprotetor (6). Estudos mostram que o TAM aumenta a expressão do mRNA da colina acetiltransferase em neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, aumentando assim a atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima reguladora dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (7,8). Assim como a acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase (BuChE) também participa da regulação colinérgica (9), regulação fundamental, considerando que a acetilcolina participa de importantes funções relativas ao aprendizado e memória (10).

Outra substância, como o flavonoide quercetina, também afeta a atividade colinérgica, com ação neuroprotetora. Sua ação parece ser ou por inibição direta da acetil- e da butirilcolinesterase, onde a transmissão sináptica é aumentada por redução da hidrólise da acetilcolina no cérebro (11); ou pela sua ação *scavenging* de espécies reativas de oxigênio e de radicais livres (12), já que as atividades da acetil- e butirilcolinesterase podem ser mediadas pelo estresse oxidativo (13) e estas, também, estão relacionadas com a patofisiologia das doenças neurodegenerativas.

Embora com resultados ainda inconsistentes, a terapia com antioxidantes tem sido abordada como possível opção para o tratamento e na prevenção de doenças neurodegenerativas (14). Estudo realizado por Marek et al., (2016) sugere a capacidade da quercetina mediar a ação do tamoxifeno sobre a acetilcolinesterase em diferentes regiões do cérebro, particularmente no hipocampo, onde mostrou ter uma ação mais contundente. Assim, o presente trabalho verificou o efeito da quercetina sobre a atividade da acetil- e butirilcolinesterase no hipocampo de ratas ovariectomizadas tratadas com tamoxifeno. O mecanismo relacionado à

lipoperoxidação foi investigado, assim como a participação do cálcio e os níveis de óxido nítrico nesse processo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e delineamento experimental

Para o experimento foram utilizados ratos da linhagem Wistar, fêmeas, em idade adulta, ovariectomizadas bilateralmente e pesando entre 200 e 220 g. Todos os animais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta padrão de laboratório (Algomix[®]), receberam água a vontade durante todo o período experimental, ficando alojados em caixas de polipropileno em ambiente climatizado ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas e com exaustão do ar. No momento do experimento, as ratas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos com 12 animais em cada. Todos os animais foram tratados diariamente por gavagem durante 14 dias. O grupo controle [CON]: recebeu óleo de canola (1 ml.Kg^{-1} de peso animal, p.a.), grupo tamoxifeno [TAM]: recebeu 5 mg.Kg^{-1} p.a. de tamoxifeno; grupo quercetina [QUER]: recebeu $22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ p.a. de quercetina e grupo tamoxifeno + quercetina [TAM+Q]: recebeu 5 mg.Kg^{-1} p.a. de tamoxifeno mais $22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ p.a. de quercetina. O tamoxifeno (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e a quercetina (Farmácia Bioativa, Paraná, Brasil) foram solubilizados em óleo de canola sendo as suas doses baseadas em Marek et al., 2016.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Todos os procedimentos experimentais seguiram os requisitos éticos de experimentação animal e tiveram o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE).

2.1.1 Cirurgia de ovariectomia

Todas as ratas foram anestesiadas com 100 mg.Kg^{-1} de cloridrato de ketamina p.a. (Ketamin: Cristália, Brasil) e 15 mg.Kg^{-1} p.a. de cloridrato de xilazina (Anasedan: Vetbrands, Brasil) por via intraperitoneal. Em condições assépticas foi realizada a ovariectomia bilateral. Inicialmente foi feita uma incisão abdominal, a pele do abdome foi cortada e o peritônio aberto. Em seguida as artérias de ambos os ovários foram pinçadas e amarradas para a retirada dos ovários. Na seguida, os ovários foram retirados, o músculo e a pele foram suturados.

Após a cirurgia, as ratas receberam uma gota de dipirona (50 mg.mL^{-1} , Medley Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil) como analgésico.

2.2 Isolamento do hipocampo e preparo dos homogenatos

O tratamento foi iniciado após um mês da realização da cirurgia de ovariectomia, para que ocorresse normalização dos níveis hormonais. Após 14 dias de tratamento, os animais foram deixados em jejum de 12 horas, sendo posteriormente eutanasiados com overdose de cloridrato de ketamina e de xilazina. O cérebro foi retirado, sendo isolado logo em seguida o cerebelo. O córtex foi dividido em duas partes, o hipocampo de cada hemisfério foi isolado rapidamente e reunidos para a realização dos homogenatos. Todos os procedimentos foram realizados em banho de gelo e ambiente climatizado em $18^\circ \text{ C} \pm 2^\circ \text{ C}$.

2.2.1 Homogenato para AChE, BuChE, catalase e tióis

Os hipocampos foram picotados em pedaços pequenos e homogeneizados em Dounce com tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) e KCl 1,15%, divididos em dois tubos: em um tubo foi adicionado Triton-X 100 e centrifugado a 1.085 g por 10 minutos seguido de outra centrifugação de 2.377 g por 15 minutos. O sobrenadante foi armazenado para dosagem da AChE, BuChE, catalase e tióis (15,16). O segundo tubo foi submetido à centrifugação de 2.377 g por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado para dosar a lipoperoxidação (17).

2.2.2 Homogenato para superóxido dismutase (SOD), cálcio e óxido nítrico (NO_x)

Os hipocampos foram picotados em pedaços pequenos e homogeneizados em Dounce com meio de isolamento de mitocôndrias (pH 7,4) no qual continha sacarose 100 mM, KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, KH_2PO_4 1 mM e albumina 0,2%. Após completa homogeneização, o homogenato foi centrifugado a 695 g por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada e nela adicionada sacarose 0,25 M e 0,5% de Triton-X 100 (pH 8,5). Este homogenato foi armazenado para a dosagem de SOD (18). O restante do sobrenadante foi centrifugado a 10.028 g por 10 minutos. O sobrenadante desta centrifugação foi armazenado para as dosagens de cálcio e óxido nítrico extramitocondrial (NO_{ext}). O pellet foi suspenso no meio de

isolamento de mitocôndrias e armazenado para a determinação de cálcio e de óxido nítrico intramitocondrial (NO_{int}) (19).

Em todos os homogenatos foram feitas as dosagens de proteínas de acordo com metodologia descrita por Lowry et al. (1951), sendo os resultados expressos em miligrama de proteína por mililitro de homogenato.

2.3 Determinação das atividades enzimáticas

2.3.1 Atividade da AChE

A atividade foi medida através do método de Ellman et al. (1961). Para o meio de reação o equivalente a 0,25 mg de proteína do homogenato, tampão fosfato 114 mM (pH 8,0) e 0,5 mM de DTNB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foram adicionados e incubados em banho maria a 37°C por 2 minutos e 30 segundos. A reação foi iniciada pela adição do substrato de iodeto de acetiltiocolina 0,5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A mudança de extinção molar registrada a 405 nm durante 60 segundos a cada 10 segundos. A atividade enzimática da AChE foi expressa em nanomol por minuto por mg de proteína.

2.3.2 Atividade da BuChE

As atividades da BuChE foram realizadas de acordo com Ellman et al. (1961), utilizando 0,5 mM de DTNB (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 1,0 mM de propioniltiocolina (PTh, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato 114 mM (pH 8,0). A quantidade dos homogenatos adicionados a reação foram o equivalente a 0,25 mg de proteína. A reação foi iniciada com a adição do substrato e lida em 405 nm durante 120 segundos a cada 20 segundos. Os resultados foram expressos em nmol de substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína.

2.3.3 Atividade da SOD

A determinação da atividade da SOD foi realizada de acordo com Nandi & Chatterjee (1988) com pequenas adaptações. A técnica se baseia na inibição da autooxidação do pirogalol em meio básico. O meio de reação continha tampão Tris-HCl 50 mM com EDTA 1 mM (pH 8,5), 0,13 mM de pirogalol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 0,08 mg de proteína do homogenato. A autooxidação foi lida em 420 nm durante 2 minutos com *delay time* de 1 minuto e 30 segundos. Os

resultados foram expressos em unidades (U) por mg de proteína, onde cada U equivale a 50% da autooxidação do pirogalol.

2.3.4 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi analisada de acordo com metodologia descrita por Aebi (1974). Foi adicionado tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) com aproximadamente 0,9 mg de proteína do homogenato ao meio de reação. Após adição de peróxido de hidrogênio 10 mM a reação foi lida a 240 nm durante 30 segundos. Os resultados foram expressos em micromol por minuto por mg de proteína.

2.4 Determinação de marcador de danos oxidativos

2.4.1 Lipoperoxidação (LPO)

A determinação da lipoperoxidação foi realizada de acordo com a metodologia de Ohkawa et al. (1979), cujo princípio é medir a quantidade de malondialdeído bis que se complexa ao ácido tio barbitúrico (TBA, Merck Darmstadt, Alemanha). O homogenato foi diluído em água destilada (1:2) e desproteínizado com 8,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após adicionar TBA 0,067% o meio de reação foi incubado a 96°C durante 60 minutos. Após resfriamento, foi adicionado n-butanol:piridina (15:1) e centrifugado a 2.377 g por 10 minutos. A fase orgânica foi lida em 535 nm. O malondialdeído (MDA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 200 µM foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em nanomols por mg de proteína.

2.4.2 Tióis

A dosagem de tióis foi realizada através da metodologia descrita por Ellman et al. (1961). Para o meio de reação foi utilizado tampão fosfato 114 mM (pH 8,0), 0,5 mM de DTNB e aproximadamente 0,25 mg de proteínas do homogenato. Após 2 minutos e 30 segundos em banho maria 37°C a reação foi lida em 405 nm. Os resultados foram expressos em nanomol por mg de proteína.

2.5 Determinação dos níveis de NO_x

Os níveis de nitrato e nitrito (NO_x), produtos finais da conversão do óxido nítrico, foram medidos de acordo com metodologia descrita por Miranda et al. (2001)(21). Foi realizada uma curva padrão de 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 60; 70;

80 μM de nitrito de sódio. Para o preparo das amostras foi adicionado 200 mM de ZnSO_4 no homogenato e centrifugado a 10.028g durante 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 300 μL de 2% VCl_3 (em HCl 1M), 150 μL de 0,1% *N*-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato e 150 μL de sulfanilamida (em HCl 5%). Após incubação à 37°C durante 55 minutos, os níveis de nitrito foram determinados em espectrofotômetro a 540 nm. Os níveis de nitrito e nitrato foram expressos em μmolar de NO_x .

2.6 Determinação de cálcio

O cálcio foi determinado através de metodologia bioquímica com aparelho AU680 Beckman Coulter®, onde os íons de cálcio reagem com Arzenazo III gerando um complexo colorido, que é lido a 660/700 nm. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro por grama de tecido.

2.7 Análise Estatística

O software utilizado para as análises estatísticas foi o Statistica7®. Os diferentes valores entre os grupos tratados e seus respectivos controles foram avaliados usando One-way ANOVA seguido do teste de post-hoc de Fischer, sendo utilizado pra análise das variáveis não paramétricas o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (SEM). Foi aceito como estatisticamente significativo $p < 0,05$.

3. Resultados

A Tabela 1 mostra os valores encontrados para as atividades enzimáticas, para os indicadores de lipoperoxidação e para os níveis de óxido nítrico e cálcio intra e extramitocondriais.

3.1 Atividades da AChE e BuChE

A Figura 3 mostra as atividades da acetil- e da butirilcolinesterase, respectivamente. As duas enzimas tiveram suas atividades diminuídas no grupo tratado apenas com tamoxifeno com diferença de 31,34 nmol.min⁻¹.mg ptna⁻¹ de unidades ($p < 0,001$) para a AChE (Figura 3A) e de 32,18 nmol.min⁻¹.mg ptna⁻¹ de unidades ($p < 0,001$) para a BuChE (Figura 3B). Já a adição de quercetina com o tamoxifeno aumentou significativamente a BuChE ($p < 0,05$) e também a AChE apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$). A Figura 1 também mostra que a quercetina quando administrada isoladamente interfere na atividade da AChE ($p < 0,05$), e a BuChE também sofre forte influência deste flavonoide ($p < 0,05$), diminuindo a atividade das colinesterases.

3.2 Atividades da SOD e catalase

A Figura 4A mostra que a atividade da SOD não apresentou nenhuma alteração com os diferentes tratamentos ($p > 0,05$). O mesmo foi observado na atividade da catalase, onde os grupos também não sofreram nenhuma alteração na atividade (Figura 4B).

3.3 Marcador de danos oxidativos

A quantidade de malondialdeído não se mostrou alterada no grupo tratado com tamoxifeno mais quercetina, entretanto o grupo que recebeu apenas a quercetina mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, o mesmo aconteceu com o grupo tratado com tamoxifeno, apresentando um aumento dos níveis de malondialdeído ($p < 0,001$) (Figura 5A). Já a quantidade de tióis no grupo tamoxifeno se mostrou aumentada em 30,46 nmol.mg ptna⁻¹ de unidades ($p < 0,001$) comparado ao grupo controle. Quando se introduziu a quercetina junto ao tamoxifeno, os tióis tiveram uma diminuição de 25,36 nmol.mg ptna⁻¹ de unidades ($p < 0,005$) em relação ao grupo tamoxifeno (Figura 5B).

3.4 Níveis de NOx e cálcio (intra e extramitocondriais)

A Figura 6A mostra que o tratamento com tamoxifeno diminuiu significativamente o NO extramitocondrial ($50,97 \pm 1,94$ μ molar de NO, $p < 0,001$) quando comparado com o grupo controle ($70,97 \pm 2,23$ μ molar de NO). O mesmo ocorre com o grupo tratado apenas com quercetina, que tem seus níveis diminuídos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,005$). Enquanto que com o tratamento conjunto com quercetina, estes níveis são praticamente restabelecidos ($67,88 \pm 2,41$ μ molar de NO, $p < 0,001$). Por outro lado, o NO intramitocondrial não se mostrou alterado em nenhum tratamento, Figura 4B. Na mesma figura se observa que o tamoxifeno não altera os níveis de cálcio extra e intramitocondriais (Figura 6C e 6D, respectivamente), no entanto o grupo que recebeu tamoxifeno mais quercetina teve o cálcio intramitocondrial aumentado significativamente (Figura 6D).

4. Discussão

Nossos resultados demonstram que a quercetina interfere na ação do tamoxifeno sobre o sistema colinérgico, particularmente sobre a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Estes achados são importantes considerando a relevância do sistema colinérgico nas doenças neurodegenerativas, em especial na doença de Alzheimer. Embora diferentes mecanismos pareçam estar envolvidos na etiologia desta doença, a terapia normalmente está associada com a busca em aumentar os níveis de acetilcolina. Como na mulher, usualmente a manutenção dos níveis de acetilcolina, em condições naturais, é modulada pelo estrogênio, é correto assumir a possibilidade do tamoxifeno também modular o sistema colinérgico.

Em princípio, a expressão das enzimas colinérgicas nos neurônios colinérgicos pode ser modulada pelo estrogênio através da ação clássica envolvendo proteínas ligantes de DNA, as quais estão envolvidas na regulação transcripcional, e pela ativação não clássica, incluindo proteínas quinases (PKA, MAPK) e proteínas ligantes de elementos responsivos a cAMP (CREB) (2;22).

Em modelos animais desprovidos de estrogênio, o tamoxifeno mostra efeitos no tecido cerebral semelhantes aos animais com estrogênio (23). Isto foi observado no presente estudo, onde os grupos tratados apenas com tamoxifeno mostraram diminuição nas atividades da acetil- e butirilcolinesterase, concordando com estudos anteriores que mostraram essa ação moduladora no córtex, cerebelo e hipocampo de ratas ovariectomizadas quando comparadas com ratas com estrogênio (8). Porém, o aumento na atividade da acetil- e butirilcolinesterase encontrado no tratamento com quercetina mais o tamoxifeno foi um achado surpreendente, considerando a habilidade dos compostos flavônicos em inibir as enzimas colinérgicas (24). No entanto, não se pode esclarecer o mecanismo envolvido com os dados disponíveis.

Outro achado importante foi o efeito do tamoxifeno sobre a lipoperoxidação. Apesar de alguns estudos mostrarem que o tamoxifeno por si só seja capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (25, 26) no presente estudo a quantidade de tióis foi menor no hipocampo de ratas ovariectomizadas, enquanto que com tamoxifeno o nível de tióis mostrou-se aumentado. Isto pode indicar um efeito protetor do tamoxifeno contra os danos oxidativos na ausência de estrogênio. Os grupos tióis protegem as funções celulares contra estes radicais livres, evitando a lipoperoxidação (27).

Já a quercetina, com reconhecida atividade antioxidante, quando administrada com o tamoxifeno mostrou que a sua utilização diminuiu a quantidade de tióis. Isto pode estar relacionado à sua característica complexa que inclui ambos efeitos, antioxidantes e pró-oxidantes. Em estudo *in vitro* com cérebro de ratos a quercetina atingiu 50% do seu efeito antioxidante máximo na concentração de 0,322 mM para a inibição da lipoperoxidação, e de 0,374 mM e 0,284 mM para a atividade *scavenger* de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente. Concentrações acima destas levaram a efeitos pró-oxidantes (28). Seu efeito pró-oxidante parece estar relacionado com a sua incapacidade em lidar com as EROs por um longo período. Elevadas concentrações de EROs ocasionam a sua oxidação em radicais quinona e semiquinona, potencialmente tóxicos e reativos com grupos tióis (29,30).

O Ca^{2+} também tem importância no estresse oxidativo, pois o seu aumento pode estimular o influxo do óxido nítrico sintase (NOS) que leva ao aumento da produção de NO (31). Além de que, a quercetina também pode aumentar a produção de NO pela indução da atividade da NOS endotelial ou por aumento da biodisponibilidade do NO derivado do endotélio (32, 33). O excesso de radicais livres, tanto das EROs quanto das ERNs, por sua vez interfere em diferentes processos celulares causando danos na integridade celular (34). Em particular o óxido nítrico, principal representante das ERNs, que pode agir como modulador endógeno da acetilcolinesterase por ação direta na atividade desta enzima (35).

Os achados mostram que apesar do tamoxifeno ser reconhecido por induzir a lipoperoxidação, no presente estudo a diminuição nas atividades da acetil- e butirilcolinesterase, o aumento na quantidade de grupos tióis e a diminuição dos níveis de NO indicam uma ação neuroprotetora. Por outro lado, a quercetina quando coadministrada com o tamoxifeno, apesar da propriedade antioxidante, mostrou aumentar a atividade da acetil- e butirilcolinesterase, diminuir a quantidade de grupos tióis e aumentar tanto o Ca^{+2} quanto o NO, mostrando um efeito pró-oxidante.

Assim, o maior achado no presente estudo foi que, nas doses estudadas, a ação pró-oxidante da quercetina se sobrepôs ao efeito neuroprotetor do tamoxifeno, inviabilizando a sua co-administração para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas, considerando que esta interação é complexa e que pode gerar danos neste tecido cerebral.

Conflito de interesse

Os autores relatam que não há conflito de interesse na presente pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA) pelo apoio financeiro.

5. Referências

1. Terek MC, Keser A, Dogan YH, Zeybek B, Kanit L, Ozsener S, Pogun S. The effects of hormone replacement and tamoxifen on spatial learning and active avoidance learning in ovariectomized rats. *Gineco.eu*. 2011; 7(26):188-192.
2. Norbury R, Cutter WJ, Compton J, Robertson DM, Craig M, Whitehead M, Murphy DG. The neuroprotective effects of estrogen on the aging brain. *Experimental Gerontology*. 2003; 38:109-117.
3. Xu B, Lovre D, Muvais-Jarvis, F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie*. 2016; 124: 92-97.
4. Nagalingam A, Tighiouart M, Ryden L, Joseph L, Landberg G, Saxena NK, Sharma D. Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis*. 2012; 33(4):918-930.
5. Zhang Y, Milatovic D, Aschner M, Feustel PJ, Kimelberg HK. Neuroprotection by tamoxifen in focal cerebral ischemia is not mediated by an agonist action at estrogen receptor but is associated with antioxidant activity. *Exp Neurol*. 2007; 204(2):819-827.
6. Denk F, Ramer LM, Erskine ELKS, Nassar MA, Bogdanov Y, Signore M, Wood JN, McMahan SB, Ramer MS. Tamoxifen induces cellular stress in the nervous system by inhibiting cholesterol synthesis. *Acta Neuropatho Communi*. 2015; 3(74):1-15.
7. McMillan PJ, LeMaster AM, Dorsa DM. Tamoxifen enhances choline acetyltransferase mRNA expression in rat basal forebrain cholinergic neurons. *Mol Brain Res*. 2002; 103:140-145.
8. Marek CB, Itinose AM, Takemoto QH, Toledo AG, Silva FC. Quercetin interferes in the acetylcholinesterase activity-modulated by tamoxifen in brain of the ovariectomized rats. *J Complement Med and Alt Healthcare*. 1(1):1-4.
9. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu Q, Mamczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(47):17213-17218.
10. Sarter M & Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005; 6:48-56.
11. Abdalla FH, Cardoso AM, Pereira LB, Xhmatz R, Gonçalves JF, Stefanello N, Fiorenza AM, Gutierrez JM, Serres JDS, Zanini D, Pimentel VC, Vieira JM, Schetinger MRC, Morsch VM, Mazzanti CM. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Mol Cell Biochem*. 2013; 381:1-8.
12. Ishisaka A, Ichikawa S, Sakakibara H, Piskula MK, Nakamura T, Kato Y, Ito M, Miyamoto K, Tsuji A, Kawai Y, Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Rad Bio & Med*. 2011; 51:1329-1336.
13. Melo JB, Agostinho P, Oliveira CR. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neuroscience Research*. 2003; 45:117-127.
14. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*. 2015;24(4):325-340.

15. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7:88-95.
16. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU editor. *Methods of enzymatic analysis. 2th Ed. New York*; 1974; 2.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979; 95:351-358.
18. Nandi A, Chatterjee IB. Assay of superoxide dismutase in animal tissues. *J Biosci.* 1988; 13:305-315.
19. Madsen K, Ertbjerg P, Pedersen PK. Calcium content and respiratory control index of isolated skeletal muscle mitochondria: effects of different isolation media. *Analytical Biochemistry*. 1996; 237:37-41.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Bio Chem.* 1951; 193:265-272.
21. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2001; 5(1):62-71.
22. Köszegi Z, Szegő EV, Cheong RY, Tolod-Kemp E, Ábrahám IM. Postlesion estradiol treatment increases cortical cholinergic innervations via estrogen receptor- α dependent nonclassical estrogen signaling *in vivo*. *Endocrinology*. 2011; 152(8):3471-3482.
23. González-Burgos I, Rivera-Cervantes MC, Velázquez-Zamora DA, Feria-Velasco A, Garcia-Segura LM. Selective estrogen receptor modulators regulate dendritic spine plasticity in the hippocampus of male rats. *Neural Plast.* 2012; 2012:309494.
24. Katalinic M, Bosak A, Kovarik Z. Flavonoids as Inhibitors of Human Butyrylcholinesterase Variants. *Food Technol. Biotechnol.* 2014; 52(1):64–67.
25. Vitseva O, Flockhart DA, Jin Y, Varghese S, Freedman JE. The effects of tamoxifen and its metabolites on platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* (2005); 312:1144–1150.
26. Lee S, Lee MS, Park J, Zhang JY, Jin DI. Oxidative stress in the testis induced by tamoxifen and its effects on early embryo development in isogenic mice. *J Toxicolo Sci.* 2012; 37(4):675-679.
27. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001;60(1):358-363.
28. Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO. Antioxidative properties and effect of quercetin and its glycosylated form (rutin) on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities. *J of Evid-Based Complem& Alt Med.* 2015; 21(4):11-17.
29. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, Biasi S, Roat E, Bertoncetti L, Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidende-based complementary and alternative medicine*. 2011. 2011: 591356.
30. Lemmens KJA, Vrolijk MF, Bouwman FG, Bijgh WFF van der, Bast A, Haenen GRMM. The minor structural difference between the antioxidants quercetin and 4'-O-methylquercetin has a major impact on their selective thiol toxicity. *Int J of molecular sciences*. 2014;15:7475-7484.
31. Petrov KA, Malomouzh AI, Kovyazina IV, Krejci E, Nikitashina AD, Proskurina SE, Zobov VV, Nikolsky EE. Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via N-methyl-D-aspartate receptor activation. *European Journal of Neuroscience*. 2013; 37:181-189.

32. Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002; 135(4): 910-916.
33. Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases e NOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2006; 24(1):75-84.
34. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62:157-169.
35. Udayabanu M, Kumaran D, Nair RU, Srinivas P, Bhagat N, Aneja R, Katyal A. *Brain Research*. 2008; 1230:138-149.

Tabela 1. Atividades enzimáticas, indicadores de lipoperoxidação, níveis de óxido nítrico e de cálcio extra e intramitocondriais em hipocampo de ratas ovariectomizadas.

Indicadores	Grupos			
	CON	TAM	QUER	TAM + Q
AChE nmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹	56,17±2,49	25,83±1,50 ^{###}	49,47±1,83 [*]	31,85±0,92 [*]
BuChE nmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹	64,57±6,44	32,4±3,75 ^{###}	42,38±0,45 [#]	54,46±3,36 [*]
Catalase µmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹	39,07±2,93	21,13±2,68	34,98±5,95	11,23±0,48
SOD U.mg ptna ⁻¹	5,33±0,363	4,96±0,231	5,52±0,655	5,16±0,78
Lipoperoxidação nmol.mg ptna ⁻¹	0,523±0,066	1,00±0,09 ^{###}	0,22±0,012 [#]	1,24±0,11
Tióis nmol.mg ptna ⁻¹	58,78±6,43	89,24±2,10 ^{###}	49,60±3,14	63,88±1,89 ^{**}
NO _x extramitocondrial µmolar de NO	70,97±2,23	50,97±1,94 ^{###}	57,94±1,78 ^{**}	67,88±2,41 ^{***}
NO _x intramitocondrial µmolar de NO	49,85±0,96	52,68±1,13	48,54±1,69	54,36±1,86
Ca ⁺² extramitocondrial mg dL ⁻¹ g tecido ⁻¹	1,75±0,15	1,53±0,15	1,49±0,35	1,39±0,066
Ca ⁺² intramitocondrial mg dL ⁻¹ g tecido ⁻¹	1,33±0,041	2,53 ±0,013	2,82±0,42	5,24±0,56 ^{**}

Os valores representam a média de 3 animais ± SEM.

#p < 0,05; ###p < 0,005 e ####p < 0,001 em relação ao grupo controle.

*p < 0,05; **p < 0,005 e ***p < 0,001 em relação ao grupo tamoxifeno.

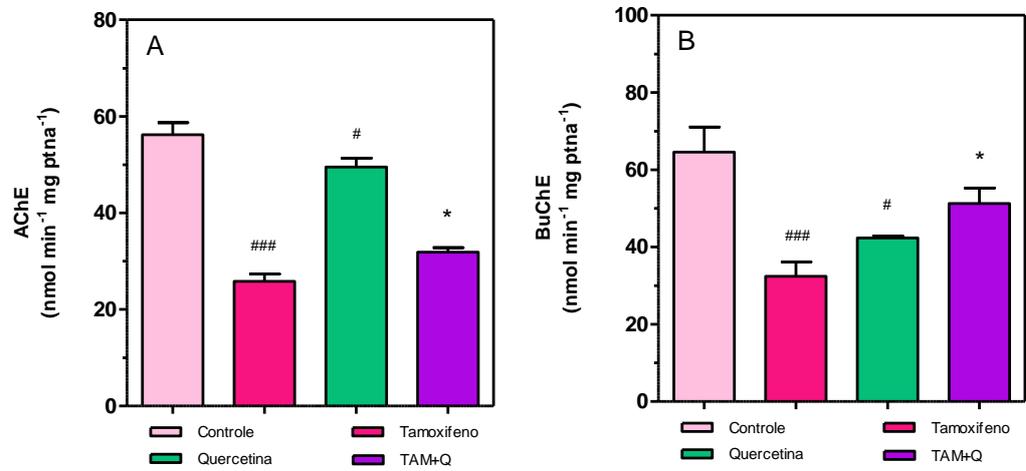


Figura 3. Atividades da acetil- (A) e butirilcolinesterase (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas.

*p < 0,05, ***p < 0,001 em relação ao grupo tamoxifeno.

p < 0,001 em relação ao grupo controle.

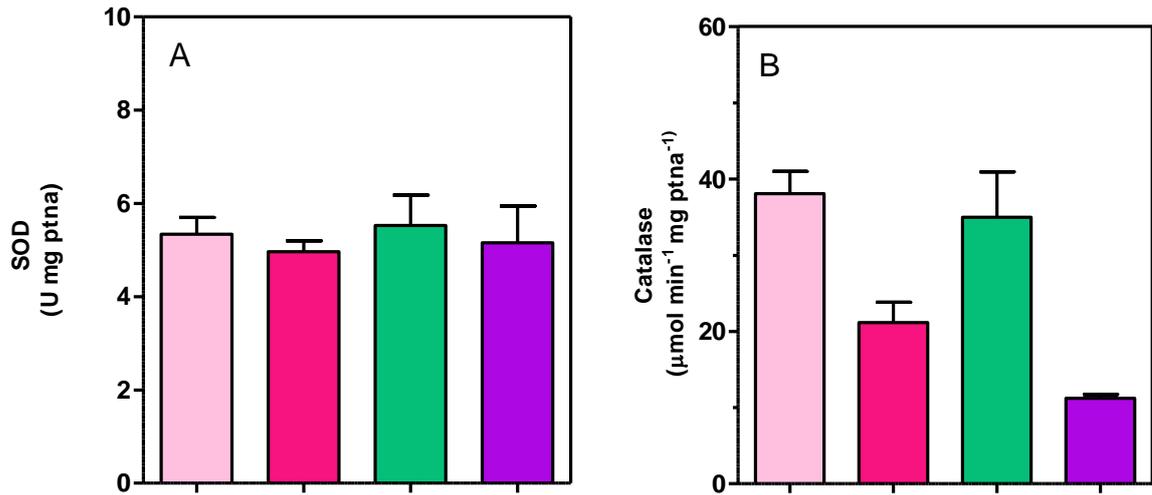


Figura 4. Atividades da superóxido dismutase (A) e catalase (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas. ■ Grupo controle ■ Grupo tamoxifeno (5 mg.Kg⁻¹) ■ Grupo quercetina (22,5 mg.Kg⁻¹) ■ Coadministração da quercetina com tamoxifeno (22,5 mg.Kg⁻¹; 5 mg.Kg⁻¹).

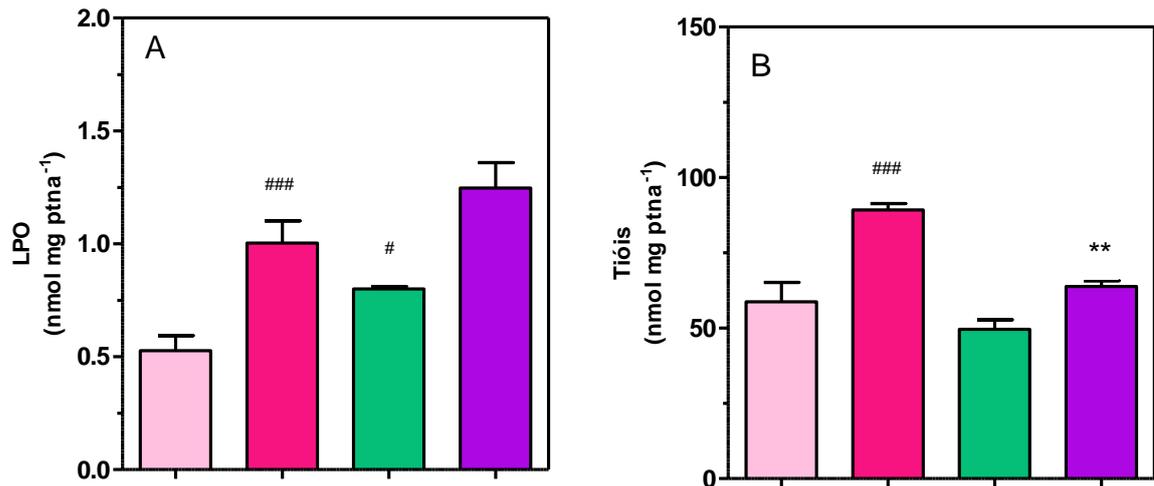


Figura 5. Quantidade de malonaldeído (A) e tióis (B) em hipocampo de ratas ovariectomizadas. ■ Grupo controle ■ Grupo tamoxifeno (5 mg.Kg⁻¹) ■ Grupo quercetina (22,5 mg.Kg⁻¹) ■ Coadministração da quercetina com tamoxifeno (22,5 mg.Kg⁻¹; 5 mg.Kg⁻¹).

**p < 0,005 em relação ao grupo tamoxifeno.

#p < 0,05 e ###p < 0,001 em relação ao grupo controle.

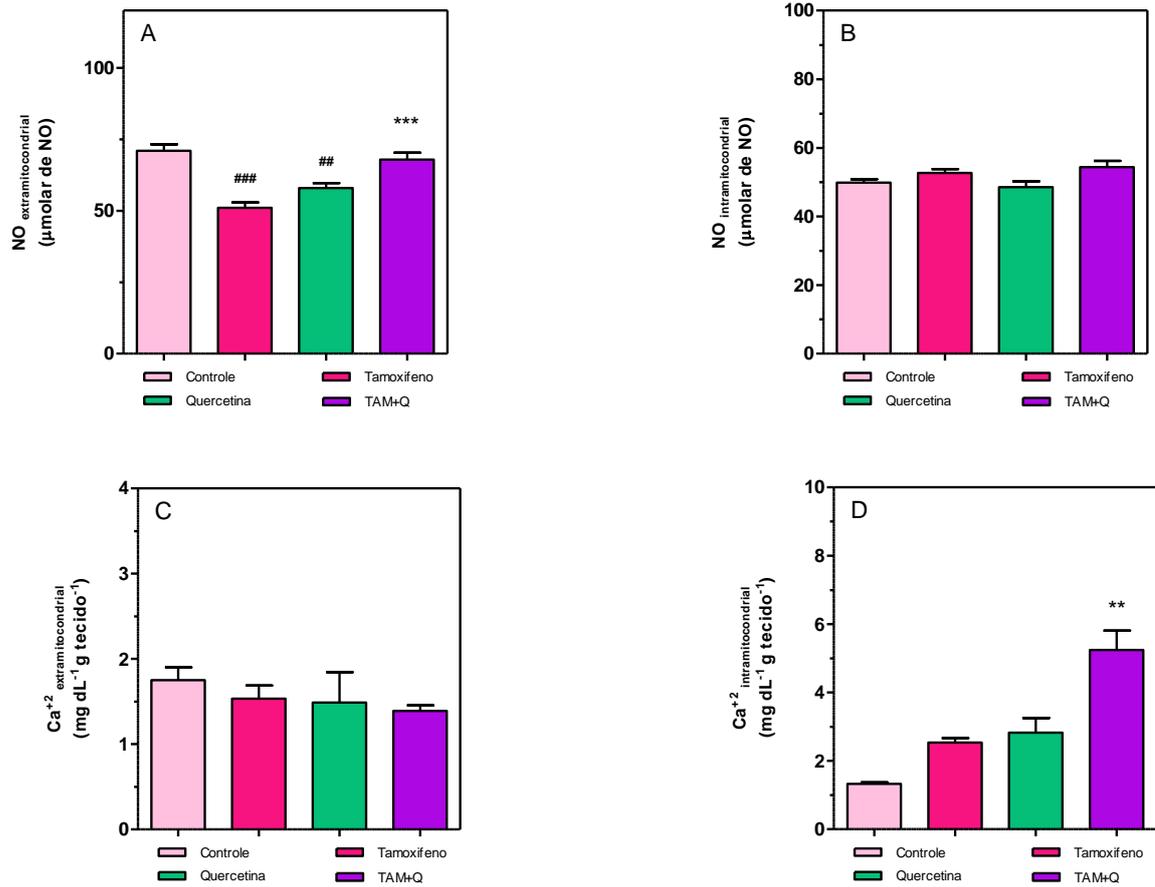


Figura 6. Níveis de óxido nítrico extramitocondrial (A); óxido nítrico intramitocondrial (B); cálcio extramitocondrial (C) e cálcio intramitocondrial (D) no hipocampo de ratas ovariectomizadas.

**p < 0,005 em relação ao grupo tamoxifeno.

##p < 0,005 e ###p < 0,001 em relação ao grupo controle.

5. CONCLUSÕES GERAIS

É possível observar que o tamoxifeno, quando administrado sozinho exerceu uma ação neuroprotetora no hipocampo, agindo como agonista nos receptores de estrogênio. No entanto quando houve a coadministração da quercetina, percebe-se que este flavonoide conhecido principalmente por sua ação antioxidante passa agir como um agente pró-oxidante nos parâmetros analisados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUKHARI, A.A.; GASHLAN, H.M.; EL-BESHBISHY, H.A.; NAGY, A.A.; ABDEL-NAIM, A.B. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1689-1695, 2009.

ANSARI, M.A.; ABDUL, H.M.; JOSHI, G.; OPII, W.; BUTTERFIELD, D.A. Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1–42): relevance to Alzheimer's disease. **J Nutri. Bioch.**, v. 20, p. 269-275, 2009.

BEKELE, R.T.; VENKATRAMAN, G.; LIU, R.; TANG, X.; MI, S.; BENESCH, M.G.K.; MACKEY, J.R.; GODBOUT, R.; CURTIS, J.M.; MCMULLEN, T.P.W.; BRINDLEY, D.N. Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance. **Sci. Rep.**, 2016.

BENDER, C.M.; SEREIKA, S.M.; BERGA, S.; BOGEL, V.G.; BRUFISKY, A.M.; PARASKA, K.K.; RYAN, C.M. Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in breast cancer. **Psycho-Oncology**, v. 15, p. 422-430, 2006.

BINKHORST, L.; KLOTH, J.S.L.; DE WIT, A.S.; DE BRUIJN, P.; LAM, M.H.; CHAVES, I.; BURGER, H.; VAN ALPHEN, R.J.; HAMBERG, P.; VAN SCHAIK, R.H.N.; JAGER, A.; KOCH, B.C.P.; WIEMER, E.A.C.; VAN GELDER, T.; VAN DER HORST, G.T.J.; MATHIJSEN, R.H.J. Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetic in mice and breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 152, p. 119-128, 2015.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.

BOURQUE, M.; LIU, B.; DLUZEN, D.E.; DI PAOLO, T. Tamoxifen protects male mice nigrostriatal dopamine against methamphetamine-induced toxicity. **Biochemical Pharmacology**. v. 74, p. 1413-1423, 2007.

CALTAGIRONE, S.; RANELLETII, F.O.; RINELLI, A.; MAGGIANO, N.; COLASANTE, A.; MUSIANI, P.; AIELLO, F.B.; PIANTELLI, M. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. **Am. J. Respi. Cell Mol. Biol.** v. 17, p. 51-59, 1997.

CARROLL, J.C.; PIKE C.J. Selective estrogen receptor modulators differentially regulate Alzheimer-like changes in female 3 \times Tg-AD mice. **Endocrinology**. v. 149, p. 2607–2611, 2008.

CASA-GRAJALES, S.; MURIEL, P. Antioxidants in liver health. **World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.**, v. 6, n. 3, p. 59-72, 2015.

CHENG, F.C.; SHEN, S.C.; WU, J.S.B. Effect of Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extraction Glucose Uptake in Rat Hepatocytes. **Journal of Food Science**. v. 74, p. H132–H138, 2009.

CLINES, G.A.; CHOKSI, P.; POZNAK, C.V. Adjuvant endocrine therapy and bone health in breast cancer. **Curr. Osteoporos Rep.** v. 13, p. 263-273, 2015.

COSTA, L.G.; GARRICK, J.M.; ROQUE, P.J.; PELLACANI, C. Mechanisms of neuroprotection by quercetin: counteracting oxidative stress and more. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016.

DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MARTÍNEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, L. **Quercetin in brain diseases: Potential and limits. Neurochemistry International**, v. 89, p. 140-148, 2015.

DENK, F.; RAMER, L.M.; ERSKINE, E.L.K.S.; NASSAR, M.A.; BOGDANOV, Y.; SIGMORE, M.; WOOD, J.N.; MCMAHON, S.B.; RAMER, M.S. Tamoxifen induces cellular stress in the nervous system by inhibiting cholesterol synthesis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 3, n. 74, p. 1-15, 2015.

DIEZ-PEREZ, A. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMS). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 50, n. 4, p. 720-734, 2006.

DONCARLOS, L.L.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, M. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 113-122, 2009.

DONG, Y.; WANG, J.; FENG, D.; QIN, H.; WEN, H.; YEN, Z.; GAO, G.; LI, C. Protective effect of quercetin against oxidative stress and brain edema in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage. **Int. J. Med. Sci.**, v. 11, n. 3, p. 282-290, 2014.

DOS SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. The antioxidante vitamin nutritional therapy and the chemotherapy treatment in oncology. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

DUARTE, J.; GALISTEO, M.; OCETE, M.A.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 221, p. 155-160, 2001.

DUYSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Whole body and tissue imaging of butyrylcholinesterase knockout mouse injected with near infrared dye labeled butyrylcholinesterase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, p. 119-124, 2008.

EBERLING, J.L.; WU, C.; TONG-TURNBEAUGH, R.; JAGUST, W.J. Estrogen and tamoxifen-associated effects on brain structure and function. **NeuroImage**, v. 21, p. 364-371, 2004.

EGERT, S.; WOLFFRAM, S.; BOSY-WESTPHAL, A.; BOESCH-SAADARMANDI, C.; WAGNER, A.E.; FRANK, J.; RIMBACH, G.; MUELLER, M.J. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentration in healthy humans. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1615-1621, 2008.

ESPELAND, M.A.; SHUMAKER, S.A.; LIMACHER, M.; RAPP, S.R.; BEVERS, T.B.; BARAD, D.H.; COKER, L.H.; GAUSSOIN, S.A.; STEFANICK, M.L.; LANE, D.S.;

MAKI, P.M.; RESNICK, S.M. Relative effects of tamoxifen, raloxifene, and conjugated equine estrogens on cognition. **Journal of Women's Health**, v. 19, n. 3, p. 371-379, 2010.

FERRANDINA, G.; ALMADORI, G.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; FELRINI, C.; CATTANI, P.; PIANTELLI, M.; SCAMBIA, G.; RANELLETI, F. Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II estrogen bindings sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. **Int. J. Cancer**, v. 77, p. 747-754, 1998.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MONTAGNA, J.P.; BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COSSARIZZA, A. Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidende-based complementary and alternative medicine**. 2011.

GOETZ, M.P.; KAMAL, A.; AMES, M.M. Tamoxifen pharmacogenomics: The role of CYP2D6 as a predictor of drug response. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 1, p. 160-166, 2008.

GUO, Y.; BRUNO, R.S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. **J. Nutri. Biochemistry**, v. 26, p. 201-210, 2015.

HOZUMI, Y.; KAWANO, M.; MIYATA, M. Severe hypertriglycerdemia caused by tamoxifen-treatment after breast cancer surgery. **Endocrine Journal**, v. 44, n. 5, p. 745-749, 1997.

HU, X.; DING, C.; ZHOU, N.; XU, C. Quercetin protects gastric epithelial cell from oxidative damage *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 115-124, 2015.

JAIN, A.K.; THANKI, K.; JAIN, S. Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in polymeric nanoparticles: Implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-induced toxicity. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, p. 3459-3474, 2013.

JAZVINSKAK, M.J.; GASPAROVIC, C.; VUKOVIC, L.; VLAINIC, J.; ZARKOVIC, N.; ORSOLIC, N. Quercetin supplementation: insight into the potentially harmful outcomes of neurodegenerative prevention. **Naunyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 385, p. 1185-1197, 2012.

JOHNSON, D.T.; HARRIS, R.A.; FRENCH, S.; BLAIR, P.V.; YOU, J.; BEMIS, K.G.; WANG, M.; BALABAN, R.S. Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, p. C689-C697, 2007.

JORDAN, V.C. Tamoxifen: A most unlikely pioneering medicine. **Drug Discovery**, v. 2, p. 205-213, 2003.

JORDAN, V.C. Tamoxifen (ICI 46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 147, p. S269-S276, 2006.

JORDAN, V.C.; MCDANIEL, R.; AGDOKE, F.; MAXIMOV, P.Y. The evolution of nonsteroidal antiestrogens to become selective estrogen receptor modulators. **Steroids**, v. 90, p. 3-12, 2014.

KAMADA, C.; DA SILVA, E.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MOON, J.H.; TERAQ, J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. **Free Radical Research**, v. 39, n.2, p. 185-194, 2005.

KARIMI, S.; HEJAZIAN, S.H.; ALIKHANI, V.; HOSSEINI, M. The effects of tamoxifen on spatial and nonspatial learning and memory impairments induced by scopolamine and the brain tissues oxidative damage in ovariectomized rats. **Adv. Biomed. Res.**, v. 4:196, 2015.

KAVITHAA, K.; SUMATHI, S.; PAULPANDI, M.; PADMA, P.R. Increased anticancer efficacy by the combined administration of quercetin in multidrug resistant breast cancer cells. **BMR Cancer research**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2014.

LARSON, A.J.; SYMONS J.D.; JALILI T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: Review of efficacy and mechanisms. **Adv. Nutritional**, v. 3, p. 39-46, 2012.

LATOURELLE, H.C.; DYBDAHL, M.; DESTEFANO, A.L.; MYERS R.H.; LASH T.L. Risk of Parkinson's disease after tamoxifen treatment. **BMC Neurology**, v. 10, n. 23, p. 1-7, 2010.

LIANG, W.; LUO, Z.; GE, S.; LI, M.; DU, J.; YANG, M.; YAN, Y.Z.; LUO, Z. Oral administration of quercetin inhibits bone loss in rat model of diabetic osteopenia. **European Journal of Pharmacology**, v, 670, p. 317-324, 2011.

LIPSCOMBE, L.L.; FISCHER, H.D.; YUN, L.; GRUNEIR, A.; AUSTIN, P.; PASZAT, L.; ANDERSON, G.M.; ROCHON, P.A. Association between tamoxifen treatment and diabetes a population-based study. **Cancer**. v. 118, n. 10, p. 2615-2622, 2012.

LEE, J.H.; JIANG, Y.; HAN, D.H.; SHIN, S.K.; CHOI, W.H.; LEE, M.J. Targeting estrogen receptors for the treatment of Alzheimer's disease. **Mol. Neurobiol.**, v. 49, p. 39-49, 2014.

LIN, Y.; LIU, L.H.; FANG, J.; YU, C.H.; XIONG, Y.K.; YUAN, K. Anti-fatigue and vasoprotective effects of quercetin-3-O-gentiobiose on oxidative stress and vascular endothelial dysfunction induced by endurance swimming rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 68, p. 290-296, 2014.

LORD, C.; BUSS, C.; LUIEN, S.J.; PRUESSNER, J.C. Hippocampal volumes are larger in postmenopausal women using estrogen therapy compared to past users, never users and men: a possible window of opportunity effect. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 1,p. 95-101, 2008.

MA, Z.S.; HUYNH, T.H.; NQ, C.P.; DO, P.T.; NQUYEN, T.H.; HUYNH, H. Reduction of CWR22 prostate tumor xenograft growth by combined tamoxifen-quercetin treatment is associated with inhibition of angiogenesis and cellular proliferation. **Int. J. Oncol.**, v. 24, n. 5, p. 1297-1304, 2004.

MAALIK, A.; KHAN, F.A.; MUMTAZ, A.; MEHMOOD, A.; AZHAR, S.; ATIF, M.; KARIM, S.; ALTAF, Y.; TARIQ, I. Pharmacological Applications of Quercetin and its

Derivatives: A Short Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 9, p. 1561-1566, 2014.

MACLENNAN, A.H.; HENDERSON, V.W.; PAINE, B.J.; MATHIAS, J.; RAMSAY, E.N.; RYAN, P.; TROCKS, N.P.; TAYLOR, A.W. Hormone therapy, timing of initiation, and cognition in women aged older than 60 years: the REMEMBER pilot study. **Menopause: The Journal of the North American Menopause Society**, v. 13, n. 1, p. 28-36, 2006.

MAREK, C.B.; ITINOSE, A.M.; BRACHT, A. Pharmacology and physiologic effects of tamoxifen. **Current Topics in Pharmacology**, v. 14, p. 55-72, 2010.

MAREK, C. B.; PERALTA, R. M.; ITINOSE, A.M.; BRACHT, A. Influence of tamoxifen on gluconeogenesis and glycolysis in the perfused rat liver. **Chemico-Biological interactions**, v. 193, n. 1 p. 22-33, 2011.

MEHTA, S.H.; DHANDAPANI, K.M.; SEVILLA, L.M.; WEBB, R.C.; MAHESH, V.B.; BRANN, D.W. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. **Neuroendocrinology**, v. 77, p. 44-50, 2003.

MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SKROVANKOVA, S.; SOCHOR, J. Quercetin and its anti-allergic immune response. **Molecules**, v.21, n. 623, p. 1-15, 2016.

MOREIRA, P.I.; CUSTÓDIO, J.B.; OLIVEIRA, C.R.; SANTOS, M.S. Hydrotamoxifen protects against oxidative stress in brain mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 195-204, 2004.

MOREIRA, P.I.; CUSTÓDIO, J.B.A.; NUNES, E.; OLIVEIRA, P.J.; MORENO, A.; SEIÇA, R.; OLIVEIRA, C.R.; SANTOS, M.S. Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 β -estradiol and tamoxifen. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 123, p. 8-16, 2011.

MORISSETTE, M.; AL SWEIDI, S.; CALLIER, S.; DI PAOLO, T. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 290, n. 1-2, p. 60-69, 2008.

NABAVI, S.F.; RUSSO, G.L.; DAGLIA, M.; NABAVI, S.M. Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! **Food Chemistry**, v.179, p. 305-310, 2015.

NAZAREWICZ, R.R.; ZENEVE, W.J.; PARIHAR, A.; LARSON, S.K.; ALIDEMA, E.; CHOI, J. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. **Cancer Research.**, v. 67, n. 3, p. 1282-1290, 2007.

NEWHOUSE, P.; ALBERT, K.; ASTUR, R.; JOHNSON, J.; NAYLOR, M.; DUMAS, J. Tamoxifen improves cholinergically modulated cognitive performance in postmenopausal women. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, p. 2632-2643, 2013.

NICOLAU, M.; DOVICH, S.S.; CUTTLE G. Pro-inflammatory effect of quercetin by dual blockade of angiotensin converting-enzyme and neutral endopeptidase in vivo. **Nutritional Neuroscience**, v.6, n.5, p. 309-316, 2003.

NOBAKHT, M.; NAJAFZADEH, N.; SHARGH, B.K. Effects of tamoxifen on morphological and ultrastructural aspects of developing hippocampus of rat. **Iranian Biomedical Journal**, v. 13, n. 4, p. 237-243, 2009

OH, S.J.; KIM, O.; LEE, J.S.; KIM, J.A.; KIM, M.R.; CHOI, H.S.; SHIM, J.H.; KAND, K.W.; KIM, Y.C. Inhibition of angiogenesis by quercetin in tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 8, p. 3227-3234, 2010.

O'NEIL, K.; CHEN, S.; BRINTON, R.D. Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. **Experimental Neurology**, v. 188, p. 268-278, 2004.

OSENI, T.; PATEL, R.; PULE, J.; JORDAN, V.C. Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. **Planta Med.**, v. 74, n. 13, p. 1656–1665, 2008.

OSSOLA, B.; KAARIAINEN, T.M.; RAASMAJA, A.; MANNISTO, P.T. Time-dependent protective and harmful effects of quercetin on 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. **Toxicology**, v. 250, p. 1-8, 2008.

PALMER, J.L.; TROTTER, T.; JOY, A.A.; CARLSON, L.E. Cognitive effects of tamoxifen in pre-menopausal women with breast cancer compared to healthy controls. **J. Cancer Surviv.**, v. 2, p. 275-282, 2008.

PARVEZ, S.; TABASSUM, H.; BANERJEE, B.D.; RAISUDDIN, S. Taurine prevents tamoxifen-induced mitochondrial oxidative damage in mice. **Journal Compilation**, v. 102, p. 382-87, 2008.

PIANTELLI, M.; MAGGIANO, N.; RICCI, R.; LAROCCA, L.M.; CAPELLI, A.; SCAMBIA, G.; ISOLA, G.; NATALI, P.G.; RANELLETTI, F.O. Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 105, n. 2, p. 248-253, 1995.

PINES, A. Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment. **Climacteric**, 2016.

PISANI, S.L.; NEESE, S.L.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; SCHANTZ, S.L.; KOROL, D.L. 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.

RABINOWICH, L.; SHIBOLET, O. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. **BioMed. Research International**, 2015.

RAMOS, B.R.A.; WITKIN, S.S. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome. **Cell Stress and Chaperones**, 2016.

RONG, H.U.; HILAKIVI, L.; CLARKE, R. Molecular mechanisms of tamoxifen associated endometrial cancer (Review). **Onco. Lett.**, v. 9, p. 1495-1591, 2015.

RUIZ, L.M.; SALAZAR, C.; JENSEN, E.; RUIZ, P.A.; TIZADO, W. QUINTANILLA, R.A.; BARRETO, M.; ELORZA, A.A. Quercetin affects erythropoiesis and heart mitochondrial function in mice. **Oxidative Med. Cell. Longev.**, v. 2015, 2015.

SABOGAL-GUÁUETA, A.M.; MUÑOZ-MANCO, J.I.; RAMÍREZ-PINEDA, J.R.; LAMPREA-RODRIGUEZ, M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G.P. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. **Neuropharmacology**, v. 93, p. 134-145, 2015.

SANDERS, R.A.; RAUSCHER, F.M.; WATKINS III, J.B. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Biochem. Molecular Toxicology**, v. 15, n.3, p. 143-149, 2001.

SEUFI, A.M.; IBRAHIM, S.S.; ELMAGHRABY, T.K.; HAFEZ, E.E. Preventive effect of the flavonoid, quercetin, on hepatic cancer in rats via oxidant/antioxidant activity: molecular and histological evidences. **J. of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, n. 80, 2009.

SHAO, H.; BREITNER, J.C.S.; WHITMER, R.A.; WANG, J.; HAYDEN, K.; WENGREEN, H.; CORCORAN, C.; TSCHANZ, J.; NORTON, M.; MUNGER, R.; WELSH-BOHMER, K.; ZANDI, P.P. Hormone therapy and Alzheimer disease dementia: New findings from the Cache County Study. **Neurology**, v. 79, n. 18, p. 1846-1852, 2012.

SCOTT, E.N.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.; BROWN, K. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: Biomarkers and choice of dose for early clinical trials. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 6, p. 525-530, 2006.

SELINA, A.K.; MURAT, K.; EMRE, K.; EMRE, K.; ISMAIL, M.; BUNYAMI, U.; CEMAL, G. The relationship between estrogen receptor and microtubule dynamics in postmenopausal rat brain. **Acta histochemica**, v. 117, p. 747–751, 2015.

SHIN, S.C.; CHOI, J.S.; LI, X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 144-149, 2006.

SINGH, MS.; FRANCIS, P.A.; MICHAEL, M. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. **The breast**, v. 20, p. 111-18, 2011.

SUZUKI, S.; BROWN, C.M.; DE LA CRUZ, C.D.; YANGM, E.; BRIDWELLM, D.A.; WISE, P.M. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 6013–6018, 2007.

TABASSUM, H.; PARVEZ, S.; REHMAN, H.; BANERJEE, B.D.; SIEMEN, D.; RAISUDDIN, S. Nephrotoxicity and its prevention by taurine in tamoxifen induced oxidative stress in mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, p. 509-518, 2007.

TIAN, D.S.; LIU, J.L.; XIE, M.J.; ZHAN, Y.; QU, W.U.; YU, Z.Y.; TANG, Z.P.; PAN, D.J.; WANG, W. Tamoxifen attenuates inflammatory-mediated damage and improves functional outcome after signal cord injury in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 1658-1667, 2009.

UMATHE, S.N.; DIXIT, P.V.; KUMAR, V.; BANSOD, K.U.; WANJARI, M.M. Quercetin pretreatment increases the bioavailability of pioglitazone in rats: Involvement of CYP3A inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1670-76, 2008.

XIA, S.F.; XIE, A.Z.; QIAO, Y.; LI, L.R.; CHENG, X.R.; TANG, X.; SHI, Y.H.; LE, G.W. Differential effects of quercetin on hippocampus-dependent learning and memory in mice fed with different diets related with oxidative stress. **Physiology & Behavior**, v. 138, p. 325-331, 2015.

XU, B.; LOVRE, D.; MUVAIS-JARVIS, F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. **Biochimie**, v. 124, p. 92-97, 2016.

ZOU, W.; FANG, C.; JU, X.; LIANG, Z.; LIU, Y.; HAN, C.; HUANG, L.; ZHANG, Q.; LI, H.; LIU, J. Estrogen and tamoxifen-induced neuroprotective effects in ischemic stroke models. **PLoS ONE**, v. 10, p 1-14, 2015.

WANG, H.; TAO, L.; QI, K.; ZHANG, H.; FENG, D.; WEI, W.; KONG, H.; CHEN, T.; LIN, Q. Quercetin reverses tamoxifen resistance in breast cancer cells. **JBUON**, v. 20, n. 3, p. 707-713, 2015.

WELTON, A.J.; VICKERS, M.R.; KIM, J.; FORD, F.; LAWTON, B.A.; MACLENNAN, A.H.; MEREDITH, S.K.; MARTIN, J.; MEADE, T.W. Health related quality of life after combined hormone replacement therapy: randomized controlled trial. **BMJ**, v. 337:a1190, p. 1-9, 2008.

WELZEN, M.E.B.; DEZENTJÉ, V.O.; VAN SCHAİK, R.H.N.; COLBERS, A.P.H.; GUCHELAAR, H.; VAN ERP, N.P.; HARTIGH, J.; BURGER, D.M.; VAN LAARHOVEN H.W.M. The effect of tamoxifen dose increment in patients with impaired CYP2D6 activity. **Ther. Drug Monit.**, v. 37, n. 4, p. 501-507, 2015.

YAZGAN, B.; YAZGAN, Y.; OVEY, I.S.; NAIROGLU, M. Raloxifene and tamoxifen reduce PARP activity, cytokine and oxidative stress levels in the brain and blood of ovariectomized rats. **J. Mol. Neurosci.**, 2016.

ANEXO I

Protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

**PARECER DE PROTOCOLO**

O protocolo intitulado "Estudo do efeito da coadministração do tamoxifeno e quercetina na acetilcolinesterase do hipocampo de ratas ovariectomizadas", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 11/09/2015



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO II

Normas da revista científica: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Checklist and Guidelines

Title Page

- ___ Full title of 120 characters or fewer that provides a concise statement of the article's major contents
- ___ Authors' full names and institutions.
- ___ Short title of 50 or fewer characters for page headings
- ___ No more than six keywords
- ___ Corresponding author's contact information
- ___ Name and address of person to whom reprint requests should be addressed
- ___ Any grants or fellowships supporting the writing of the paper
- ___ Disclosure summary

Abstract

- ___ No longer than 250 words and prepared as a [structured abstract](#).
- ___ Does not refer directly to the text or references
- ___ Describes in complete sentences the purpose, methods, results, and main conclusions
- ___ Aimed to a general audience with specialized terminology kept to a minimum.

Précis

- ___ Submit a brief description of your paper that - if your paper is accepted - will appear in the Table of Contents beneath the title and the author byline.

___ The description should be no longer than 200 characters and should serve to buttress the content of the title by simply stating what was done and what was found.

Introduction

___ An introductory statement that places the work in historical perspective, explaining its intent and significance.

The following two sections are expected in a research article:

Materials and Methods

___ Describes in sufficient detail for other investigators to repeat the work.

___ Make all appropriate resource deposits. See (link to resource deposition section) for full instructions.

Results

___ Results should briefly present the experimental data in text, tables, or figures.

Discussion

___ Focus Discussion on the interpretation and significance of the findings or information reviewed with concise objective comments that describe their relation to other work in that area.

Acknowledgments

___ Include names of people who contributed to the study but did not meet the requirements for authorship.

References

___ Use the AMA (American Medical Association) Style Guide for references. List all authors for the initial submission.

___ List references in numerical order (in parentheses) in the text and list in the same numerical order at the end of the manuscript.

___ Do not cite the following in the reference list:

- Unpublished observations
- Personal communications
- Submitted manuscripts
- Manuscripts in preparation

___ “In press” manuscripts can be included in the reference list if they meet the following criteria:

- Accepted for publication but not yet in final published form
- Can be cited with a DOI (Digital Object Identifier)
- The journal name is provided

___ *Abstracts*: If it is necessary to cite an abstract because it contains data not published elsewhere, it must be designated as such in the text and in the reference list.

___ Examples of references:

- JOURNAL CITATION: Binoux M, Hossenlopp P. Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins: comparison of human serum and lymph. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 67:509–514.
- ABSTRACT CITATION: MacLaughlin DT, Cigarros F, Donahoe PK. Mechanism of action of Mullerian inhibiting substance. Program of the 70th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA, 1988, p 19 (Abstract P1-21).
- BOOK CITATION: Bonneville F, Cattin F, Dietemann J-L. Computed tomography of the pituitary gland. Heidelberg: Springer-Verlag; 1986; 15–16.
- BOOK CHAPTER CITATION: Burrow GN The Thyroid: nodules and neoplasia. In: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA, eds. *Endocrinology and metabolism*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1987:473–507.

Legends for Figures and Tables

___ Provide all legends separately after the references.

___ Clearly and completely describe the content of the figure or table so it can be understood without reference to the text.

___ Explain any symbols or the significance of any color that is important for understanding the content

___ Use color descriptors as necessary

Tables

___ Construct tables as simply and design them to be clear without reference to the text.

___ Provide a concise heading and footnotes if needed.

Figure Guidelines

General

___ Review the detailed [Digital Art Guidelines](#).

___ Titles should be clear and informative. Use minimal wording on figures and confine explanation of figures to their legends.

___ Legends should clearly and completely describe the appropriate content

___ Color charges will apply to all submitted color figures and cannot be replaced with black and white versions after acceptance

Specifications

___ Lettering:

- Figures should be scaled to either one column (19.5 picas) or two columns (35 picas) with 8-point type.
- Lines should be a minimum of 0.5–1 point when the figure is correctly sized to its corresponding column width.

- Avoid the use of reverse type (white lettering on a darker background).
- Avoid lettering on top of shaded or textured areas.
- Default figure part labels position should be within or centered beneath their respective panels and should have consistent styling: “(a),” “(b),” and so on; “(A),” “(B), and so on.

___ Resolution:

- Low-resolution figures are not acceptable for production.
- Line art (monochrome): 600–1200 DPI
- Halftone (grayscale only): 300 DPI
- Combination (halftone with type or lines) or color: 600 DPI

___ File Format:

- Submit one file per figure.
- Preferred format is EPS, TiF, PPT, and Word (JPE and BMP, although not preferred, will be considered on a case-by-case basis).
- Fonts should be embedded in the file.

___ File Name:

- Use the following naming convention for original submission: Author Last Name, figure number, and file format extension (e.g., Smith_fig1.eps).
- Use the following naming convention for revised figures: Author Last Name, manuscript number, figure number, and file format extension (e.g., Smith_jc.2016-1234_fig1.eps)

___ Color Mode:

- Preferred color mode is RGB.

- Color density should be no more than 300%.
- All color art reproduction in print will result in author charges
- Color figures are not converted to black and white after production.

___ Shading:

- Make differing shades vary by at least 20%, *i.e.*, 25%, 45%, 65%.

___ Graphs:

- Graphs with axis measures containing very large or small numbers should convert to easily readable notations. Example: For an ordinate range of “counts per minute” values from 1,000 to 20,000, the true value may be multiplied by 10^{-3} (scale would read from 1 to 20) and the ordinate axis display “cpm ($\times 10^{-3}$).” Similarly, for a Scatchard plot with values ranging from 0.1 to 2 femtomolar (10^{-15} M), the scale may run from 0.1 to 2 with the abscissa labeled “M($\times 10^{15}$).”
- Three-dimensional bar graphs will not be published if the information they refer to is only two-dimensional.

Supplemental Data

___ The use of Supplemental Data is generally discouraged. It is preferred that data supporting an article be deposited in community-endorsed databases and their unique identifiers provided with the manuscript submission or revision.

___ Supplemental Data files should be submitted through Editorial Manager at the time of manuscript submission and will be reviewed along with the manuscript.

___ Use the following designations in the text and for each supplemental file:
Supplemental Table 1, Supplemental Table 2, etc; Supplemental Fig. 1, Supplemental Fig. 2, etc; Supplemental Materials and Methods; Supplemental Video 1, etc.