



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE A PASSAGEM DA  
GLICOSE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PARA O CÉREBRO DE RATAS  
OVARIECTOMIZADAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO**

**SUÉLYN KOERICH**

**CASCAVEL - PARANÁ  
2017**

**SUÉLYN KOERICH**

**ANÁLISE DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE A PASSAGEM DA  
GLICOSE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PARA O CÉREBRO DE RATAS  
OVARIECTOMIZADAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO**

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: Prof. Dra. Carla Brugin Marek  
Co-orientadora: Prof. Dra. Sara Cristina Sagae  
Schneider.

**CASCADEL - PARANÁ  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas – UNIOESTE – Campus Cascavel)

K82a	<p>Koerich, Suélyn. Análise do efeito da quercetina sobre a passagem da glicose do líquido cefalorraquidiano para o cérebro de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com tamoxifeno / Suélyn Koerich. --- Cascavel (PR), 2017. 83 f.: il.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Carla Brugin Marek Co-orientadora: Prof. Dra. Sara Cristina Sagae Schneider</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos. Inclui Bibliografia</p> <p>1. Flavonóides. 2. Hiperglicemia. 3. Degeneração (patologia). I. Marek, Carla Brugin. II. Schneider, Sara Cristina Sagae. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.</p> <p>CDD 20. ed. 615.321</p>
------	--

Rosângela A. A. Silva – CRB 9ª/1810

SUÉLYN KOERICH

ANÁLISE DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE A PASSAGEM DA  
GLICOSE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PARA O CÉREBRO DE  
RATAS OVARIECTOMIZADAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM  
TAMOXIFENO

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

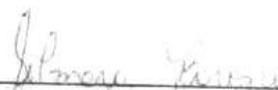
Orientador: Prof. Dra. Carla Brugin Marek

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Prof. Dra. Carla Brugin Marek  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná  
UNIOESTE  
Orientadora



---

Prof. Dra. Silmara Baroni  
15ª Regional de Saúde



---

Prof. Dra. Ana Maria Itinose  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná  
UNIOESTE

Cascavel - PR  
2017

## BIOGRAFIA RESUMIDA

Suélyn Koerich, natural de Nova Prata do Iguaçu, Paraná, Brasil, nascida em 18 de outubro de 1988, formou-se em Farmácia pela União de Ensino do Sudoeste do Paraná – Unisep, *campus* de Dois Vizinhos em Dezembro de 2010. É especialista em Farmacologia Clínica pela Universidade Paranaense – UNIPAR (2013) e possui formação pedagógica em Ciências Biológicas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR (2016). Ingressou no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*, nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve dissertação junto à linha Fármacos e Medicamentos, no Laboratório de Toxicologia Celular, orientada pela professora Dra. Carla Brugin Marek e co-orientada pela professora Dra. Sara Cristina Sagae Schneider.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desses dois anos eu sempre imaginava como seria o momento de escrever essa página e que ela seria, sem dúvida, a parte mais importante deste trabalho, afinal foram tantas pessoas que me ajudaram a concluir essa jornada.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter andado ao meu lado e ter me dado força, porque sem a fé que carrego em mim nada teria sentido. Foi o amor Dele que me conduziu.

Quero agradecer à minha família, meu bem maior e meu porto seguro, sou muito grata por proporcionarem a realização dos meus planos e por acreditarem em mim. Agradeço aos meus pais pela educação que me deram e mesmo sem muitas condições me educaram como uma pessoa de bem, que sabe que as conquistas são resultado de muito esforço e que o estudo é o bem mais precioso que podem me dar. Agradeço à minha mãe, dona Marlete, mulher guerreira e admirável, minha melhor amiga, por todas as vezes que me ouviu reclamar, chorar e falar que não conseguiria, que estava difícil, por todas as orações e incontáveis novenas. Agradeço ao meu pai, seu Elias, meu companheiro, que sempre me apoiou, que ao meu abraçar, sempre dizia: “Paciência, vai dar tudo certo”. Agradeço ao meu irmão Henrique e minha cunhada Édina, que sempre estiveram prontos para me ajudar no que fosse preciso, por me escutarem e por me darem o melhor presente que eu poderia ganhar, meu sobrinho Joaquim, que me salvou muitas vezes dessa loucura, ao receber suas fotos e vídeos.

Agradeço à minha orientadora Professora Carla Brugin Marek, por todo apoio, disponibilidade, paciência, muita paciência, por ter me ensinado a aprender, por todos os puxões de orelha dizendo pra acreditar mais em mim, por sempre me dizer que eu conseguiria, obrigada. Agradeço à Professora Ana Maria Itinose, por sua paciência, seu carinho comigo, pelas conversas e orientação. Agradeço à Professora Luciana Fariña, sempre tão dedicada e disposta a ajudar, por todo o apoio, pela atenção e pelo carinho de sempre, você tem um coração enorme e foi muito importante nesse caminho. Agradeço à Professora Ana Tereza Guimarães por me socorrer com a “tal da estatística”, sempre de bom humor, me ajudou muito mesmo. Agradeço à Professora e amiga Fernanda Coleraus por tudo, por sentar e me explicar com tanta paciência aquelas reações e cálculos que só de olhar me davam arrepios, você foi muito paciente Fer, te admiro muito. Agradeço à Professora Silmara Baroni pela disponibilidade e parceria, por dividir suas ideias e contribuir

com nosso trabalho. Agradeço ao professor e amigo Bolivar Faria pelo incentivo, inspiração desde a faculdade, você me abriu os olhos muitas vezes e mesmo sem perceber, me incentivou a continuar. Obrigada à Professora Sara Sagae, que sempre me ajudou prontamente quando precisei e sempre de maneira tão amável. Obrigada ao Professor Fabiano Sandrini por dividir suas experiências e conhecimento.

Agradeço aos amigos Julio, Angélica e Priscila. Amizade que se construiu durante esses dois anos de convivência diária. Agradeço por me “aguentar”, por me ajudar, por me ouvir, por serem parceiros, cada um com seu jeito. Construímos uma linda amizade durante esse tempo, vocês vão estar sempre no meu coração. Obrigada às colegas Fabiana, Ana Julia e Denise, que me ajudaram muito, respondendo minhas dúvidas, me ajudando com as metodologias, enfim. Um obrigada especial à Isabella, que nem imagina como foi importante na construção desse projeto, que com toda sua paciência, estava sempre ali, prof. Carla não poderia ter escolhido pessoa melhor pra eu começar a aprender. Agradeço ao Rodrigo, anjinho que Deus colocou em meu caminho nesse momento tão importante da minha vida, agradeço por todo o carinho, por me ouvir e me ajudar não só com apoio emocional, me incentivando, mas também por me ajudar com a parte estética do trabalho (kkkk), você foi incrível. Obrigada à Dani, presente que o mestrado me deu, por todas as vezes que me ouviu e incentivou e também pelas vezes que me socorreu, vai dar tudo certo Dani! Obrigada ao amigo Leandro, que conhece minha história e o quanto eu queria estar aqui, que me acompanhou e sempre incentivou. Agradeço à Marina, pela amizade e também pela ajuda com as dosagens de cobre. Obrigada aos colegas e amigos de laboratório Ana Paula, Victor, Tanielly, Diana e Geisiele por toda ajuda e companheirismo.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Não teria conseguido sem vocês.

## **APRESENTAÇÃO**

Essa dissertação é apresentada em formato misto, composta de uma revisão sobre o assunto, objetivos do trabalho, um artigo científico com dados experimentais originais e conclusão, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O artigo científico foi formatado segundo as normas propostas pelo periódico Maturitas. Trata-se de um trabalho, cuja parte experimental foi executada no Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná com o apoio da Equipe de Pesquisa em Toxicologia Celular.

## **ANÁLISE DO EFEITO DA QUERCETINA SOBRE A PASSAGEM DA GLICOSE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO PARA O CÉREBRO DE RATAS OVARIETOMIZADAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM TAMOXIFENO.**

### **RESUMO**

O tamoxifeno é classificado como modulador seletivo de receptor de estrógeno (SERM), sendo utilizado no tratamento e na prevenção do câncer de mama. Embora apresente muitos efeitos colaterais, o tamoxifeno é a terapia de escolha para o tratamento do câncer de mama no período da pós-menopausa. A quercetina, um flavonóide com potente efeito antioxidante, traz benefícios diante dos efeitos adversos gerados pelo tamoxifeno, principalmente aqueles relacionados à lipoperoxidação. O estudo do efeito neuroprotetor da quercetina sobre a bioenergética cerebral é importante para o reconhecimento dos mecanismos envolvidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do tamoxifeno sobre o metabolismo da glicose no cérebro e a influência da quercetina coadministrada com o tamoxifeno na passagem da glicose do líquido cefalorraquidiano para o cérebro de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com tamoxifeno. Para isso, ratas ovariectomizadas bilateralmente foram separadas em grupos e tratadas com óleo de canola ( $1,0 \text{ mL. Kg}^{-1}$ ), (tamoxifeno ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), quercetina ( $22,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e a coadministração de tamoxifeno ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) mais quercetina ( $22,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) por via oral, durante 14 dias. O sangue, o líquido cefalorraquidiano, o cerebelo, o córtex e o hipocampo foram coletados para a dosagem de glicose, lactato e piruvato, bem como cobre e ceruloplasmina. Foi observado que o tamoxifeno aumentou os níveis de glicose no sangue e que a coadministração com quercetina trouxe esses níveis próximos aos valores do grupo controle. No líquido cefalorraquidiano, a administração de quercetina não influenciou nos níveis de glicose e nas diferentes regiões do cérebro, tanto a quercetina isoladamente, como a coadministração da mesma com o tamoxifeno, diminuiu significativamente os valores de glicose, quando comparados ao grupo que recebeu apenas tamoxifeno. A coadministração de quercetina com o tamoxifeno mostrou-se eficaz não só na manutenção dos níveis glicêmicos, como também nos níveis de glicose cerebral.

**Palavras chaves:** Flavonóides, Hiperglicemia, Doenças Neurodegenerativas.

## ANALYSIS OF QUERCETIN'S EFFECT ON THE PASSAGE OF CEREBROSPINAL FLUID GLUCOSE FOR THE BRAIN IN OVARIECTOMIZED RATS SUBMITTED TO TREATMENT WITH TAMOXIFEN.

### ABSTRACT

Tamoxifen is classified as selective estrogen receptor modulator (SERM), being used in the treatment and prevention of breast cancer. Although presents many side effects, tamoxifen is a therapy of choice for the treatment of breast cancer in the postmenopausal period. The quercetin, a flavonoid with antioxidant potent effect, has benefits on the adverse effects caused by tamoxifen, especially those related to lipoperoxidation. The study of the neuroprotective effect of quercetin on brain bioenergetics is important for the recognition of the mechanisms involved. Thus, the objective of this work was to analyze the tamoxifen effects on glucose metabolism in the brain and the influence of quercetin coadministered with tamoxifen on passage of glucose from the cerebrospinal fluid to the brain of ovariectomized rats submitted to tamoxifen treatment. For this, bilaterally ovariectomized rats were separated into groups and treated with canola oil ( $1.0 \text{ mL.Kg}^{-1}$ ) tamoxifen ( $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), quercetin ( $22.5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) and the coadministration of tamoxifen ( $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) plus quercetin ( $22.5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ), orally for 14 days. The blood, cerebrospinal fluid, cerebellum, cortex, and hippocampus were collected for glucose lactate and pyruvate dosage as well copper and ceruloplasmin. It was observed that tamoxifen increased blood glucose levels and that co-administration with quercetin brought these levels close to the values of the control group. In cerebrospinal fluid, the quercetin administration didn't influence glucose levels and in the different brain regions, both quercetin alone such as coadministration with tamoxifen significantly decreased glucose values when compared to the group that received only tamoxifen. The coadministration of quercetin with tamoxifen was shown be effective not only in maintenance glycemic levels but also in cerebral glucose levels.

**Key words:** Flavonoid; Hyperglycemia; Neurodegenerative diseases.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
3.1 Metabolismo da glicose no cérebro .....	19
3.2 Hiperglicemia e doenças neurodegenerativas .....	24
3.3 Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas .....	28
3.4 Estrógeno e o sistema nervoso central .....	31
3.4.1 Terapia hormonal .....	33
3.5 Tamoxifeno e metabolismo da glicose .....	35
3.6 Quercetina: Mecanismo de neuroproteção.....	39
4. CAPÍTULO: ARTIGO ORIGINAL.....	43
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
6.1 Referências da revisão bibliográfica .....	66
6.2 Referências do artigo original .....	80
7 ANEXOS .....	83
7.1 Anexo I Protocolos aprovados pelo comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE).....	83

**LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA**

Figura 1	Hipótese de controle do fornecimento de energia vascular por <i>feedback</i> negativo.....	19
Figura 2	Mecanismo de distribuição e utilização da glicose por astrócitos e neurônios.....	21
Figura 3	Etiologia dos distúrbios neurodegenerativos.....	24
Figura 4	Estrutura química do isômero trans do tamoxifeno.....	34
Figura 5	Resumo dos efeitos do tamoxifeno no organismo.....	35
Figura 6	Estrutura química da 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona (quercetina).....	38

**LISTA DE TABELAS DO ARTIGO ORIGINAL**

Tabela 1	Níveis de glicose no sangue e no líquido cefalorraquidiano nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	57
Tabela 2	Teor de glicose no cerebelo, córtex e hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	58
Tabela 3	Níveis de piruvato e lactato no cerebelo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	59
Tabela 4	Níveis de piruvato e lactato no córtex nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	60
Tabela 5	Níveis de piruvato e lactato no hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	61
Tabela 6	Teor de cobre mitocondrial no cerebelo, córtex e hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	62
Tabela 7	Níveis de ceruloplasmina e cobre no plasma nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas.....	63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

4-OHTAM	4-Hidroxitamoxifeno
AMPAR	Receptor AMPA
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BHE	Barreira hematoencefálica
CAT	Catalase
CK	Ciclo de Krebs
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COMT	Catecol O-metiltransferase
COX	Ciclooxygenase
DA	Doença de Alzheimer
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DMT3	Diabetes mellitus tipo 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
E <sub>2</sub>	17β estradiol
ER	Receptores de estrógeno
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and drugs administration
GLUT	Transportador de glicose
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDH	Lactato desidrogenase
LPH	Lactase florizina hidrolase
MCT	Transportador de monocarboxilatos
NFTs	Emaranhados neurofibrilares
NMDAR	Receptor NMDA
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radical superóxido
OH	Radical hidroxila

RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SEM	Erro padrão médio
SERM	Modulador seletivo de receptor de estrogênio
SGLT	Transportador de glicose dependente de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
STZ	Estreptozotocina
SULT	Sulfotransferase
UGT	Uridina 5'-glucuroniltransferase

## 1 INTRODUÇÃO

Nas mulheres, a interrupção da menstruação e a depleção dos folículos ovarianos, característicos da menopausa, estão associados ao aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, osteoporose e diabetes mellitus.

As terapias de reposição de estrógeno são comumente utilizadas no período da pós-menopausa, devido a sua ação em receptores de estrógeno (ER) presentes em diferentes tecidos. Conseqüentemente, terapias com moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs) que possuem ação agonista e/ou antagonista nos ER distribuídos nos diferentes tecidos, são cada vez mais utilizadas.

Evidências indicam que as doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) são resultantes de um desequilíbrio metabólico, tornando a alteração no metabolismo cerebral de glicose uma característica fisiopatológica invariante nessas patologias e a sua ocorrência precede a disfunção cognitiva.

Notavelmente, uma melhor compreensão das condições fisiológicas e da regulação da homeostase da glicose, pode ajudar a esclarecer os fatores etiológicos e as conseqüências associadas ao metabolismo anormal da glicose cerebral, ajudando a estabelecer estratégias preventivas a longo prazo.

O tamoxifeno (TAM) é um SERM utilizado para o tratamento e para a prevenção do câncer de mama. Sabe-se que tanto o tamoxifeno, quanto os seus metabólitos induzem a hiperglicemia e, em condições normais, a manutenção energética da função cerebral é quase que exclusivamente dependente da glicose.

Diante dos efeitos adversos ocasionados pelo tamoxifeno, a coadministração de substâncias com possíveis efeitos protetores, mostra-se uma alternativa interessante. Uma substância que tem se destacado é a quercetina, flavonóide com potente efeito antioxidante e capacidade de reduzir significativamente a hiperglicemia induzida pelo tamoxifeno.

O estudo do efeito neuroprotetor da quercetina sobre a bioenergética cerebral é importante para o reconhecimento dos mecanismos envolvidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do tamoxifeno sobre o metabolismo da glicose no cérebro e a influência da quercetina coadministrada com o tamoxifeno na passagem da glicose do líquido cefalorraquidiano para o cérebro de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com tamoxifeno.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar o efeito da quercetina coadministrada com o tamoxifeno sobre a passagem da glicose do líquido cefalorraquidiano para o cérebro e o metabolismo desta no cérebro, em modelo de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com tamoxifeno.

### **2.2 Objetivos Específicos**

I. Analisar os níveis de glicose no sangue, no líquido cefalorraquidiano, no cerebelo, no córtex e no hipocampo;

II. Analisar os níveis de piruvato e lactato no cerebelo, no córtex e no hipocampo;

III. Analisar os níveis de cobre no cerebelo, no córtex e no hipocampo;

IV. Analisar os níveis de cobre e ceruloplasmina no sangue.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Metabolismo da glicose no cérebro

O cérebro adulto corresponde em média a 2% do peso corporal total, recebe cerca de 15% do débito cardíaco, utiliza aproximadamente 20% do consumo total de oxigênio (O<sub>2</sub>) do organismo e 25% da glicemia corporal (CHEN; ZHONG, 2013).

O consumo energético e de oxigênio no sistema nervoso, em particular no cérebro, é considerado alto, acarretando assim em uma grande quantidade de moléculas capazes de gerarem energia. A principal fonte de energia cerebral é o nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP), oriundo do metabolismo aeróbico da glicose, utilizado por neurônios para manter a homeostase cerebral (GONZALEZ-REYES *et al.*, 2016; PATET *et al.*, 2016). No entanto, outras alternativas de substratos, como corpos cetônicos, glicogênio e aminoácidos também podem ser utilizados em situações não fisiológicas, como no jejum prolongado (CHEN; ZHONG, 2013).

Para garantir o funcionamento normal do organismo, o corpo humano depende de uma regulação complexa dos níveis de glicose (RODER *et al.*, 2016). Essa regulação é o conjunto de uma ação coordenada entre hormônios e neuropeptídeos liberados principalmente pelo cérebro, pâncreas, fígado e intestino, bem como pelos tecidos adiposo e muscular (GONZALEZ-REYES *et al.*, 2016). O pâncreas tem papel fundamental na manutenção dos níveis glicêmicos, produzindo e liberando insulina e glucagon, interagindo, assim, com outros órgãos e tecidos na modulação e na secreção desses hormônios (RODER *et al.*, 2016).

O fluxo sanguíneo cerebral é regulado por astrócitos e neurônios. Acredita-se que o fluxo sanguíneo do cérebro seja modulado por um sistema de *feedback* negativo, no qual a atividade neuronal leva a uma demanda de energia, devido à utilização de ATP para restaurar íons depois da geração de potenciais de ação e sinapses (ATTWELL *et al.*, 2010). Esse uso do ATP produz um sinal metabólico que aumenta o fluxo sanguíneo e conseqüentemente, fornece mais energia (Figura 1). Esse sinal metabólico pode ser a falta de glicose, ou O<sub>2</sub>, ou a produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Além disso, outro mensageiro metabólico, o lactato, também pode aumentar o fluxo sanguíneo (IDO *et al.*, 2001).

O suprimento de energia para o sistema nervoso central (SNC) é amplamente regulado por mecanismos *feedforward*. Nesses processos, os neurônios enviam um

sinal diretamente para os vasos sanguíneos ou ativam astrócitos para a liberação de agentes vasoativos (IDO *et al.*, 2001).

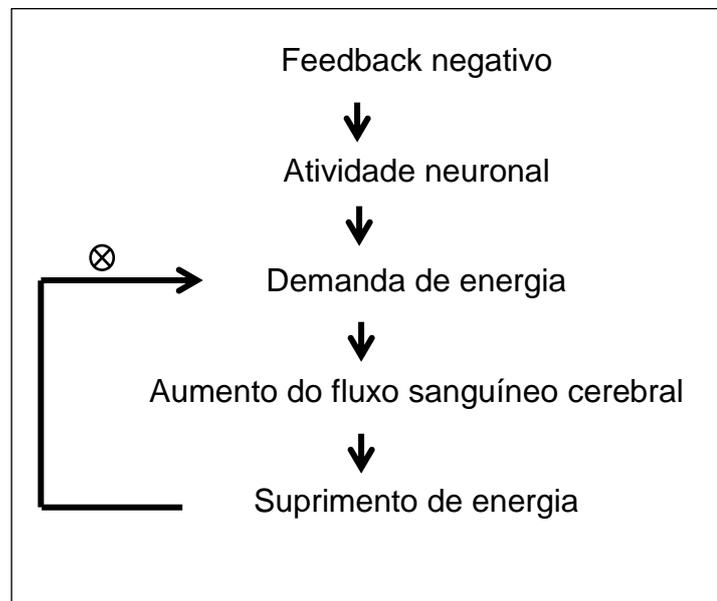


Figura 1 Hipótese de controle do fornecimento de energia vascular por *feedback* negativo.  
 Fonte: Adaptado de ATTWELL *et al.*, 2010.

O termo BHE é utilizado para descrever uma série de propriedades de vascularização que limita e que regula a troca de substâncias entre o sangue e o SNC. A permeabilidade seletiva da barreira é o resultado de uma série de características que concedem às moléculas dificuldade para penetrar no SNC, excluindo seletivamente a maioria das substâncias polares (PRASAD *et al.*, 2014). Tal permeabilidade é crucial para manter a homeostase da função neuronal, bem como proteger o SNC de lesões e de doenças (DANEMAN, 2012).

Com exceção da água, íons, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, apenas algumas moléculas lipossolúveis muito pequenas conseguem penetrar de forma íntegra a BHE. Moléculas hidrofílicas essenciais ao metabolismo, como a glicose, os aminoácidos e os componentes dos ácidos nucleicos atravessam a barreira por meio de canais especializados (DANEMAN, 2012; HLADKY; BARRAND, 2016).

Para a passagem da glicose através da barreira hematoencefálica (BHE), dois grupos independentes de proteínas transportadoras são utilizados, os transportadores independentes de sódio (GLUTs) e os transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLT) (PRASAD *et al.*, 2014).

Embora o papel dos transportadores de glicose dependentes de sódio ainda não esteja bem esclarecido, sabe-se que pertencem a uma família de proteínas transportadoras de soluto acopladas ao sódio, que realizam o transporte de glicose pela membrana plasmática por um mecanismo de transporte ativo (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004). Estão presentes em células endoteliais microvasculares cerebrais, havendo um possível envolvimento no transporte de glicose em certas condições fisiopatológicas, como na privação de glicose decorrente da isquemia (PRASAD *et al.*, 2014).

A interação entre os neurônios, os astrócitos e as células endoteliais tem uma função central no metabolismo energético neuronal. Essas células expressam diferentes tipos de GLUTs (BENARROCH, 2014), os quais são responsáveis pelo transporte de glicose independente de energia, através das membranas em todo o cérebro e na sua periferia, levando ao equilíbrio da glicose cerebral (SIMPSON *et al.*, 2008).

Esses transportadores de glicose pertencem à família SLC2A hexose e compreendem aproximadamente 14 membros identificados e caracterizados (MCEWEN; REAGAN, 2004). Porém, os transportadores predominantes no SNC envolvidos na utilização de glicose cerebral são GLUT1 e GLUT3 (SIMPSON *et al.*, 2008).

GLUT1 (gene SCL2A1) está localizado em astrócitos e células endoteliais, sendo responsável pelo transporte de glicose através da BHE e o GLUT3 (gene SCL2A3), amplamente expresso em neurônios, em diversas regiões incluindo cerebelo, córtex e hipocampo, é responsável pelo transporte de glicose do astrócito para o neurônio (BENARROCH, 2014).

A glicose incorporada via GLUT1 nos astrócitos é utilizada na glicólise e na produção de lactato. Essa ativação da glicólise nos astrócitos é resultante da atividade sináptica excitatória, desencadeando consumo de ATP e produção de lactato utilizado como fonte de energia celular (PORRAS *et al.*, 2008).

Nos neurônios, a glicose incorporada via GLUT3 é utilizada principalmente como fonte de piruvato para a produção de ATP (Figura 2), através do metabolismo oxidativo mitocondrial, utilizada para reconstruir gradientes iônicos após a transmissão glutamatérgica excitatória (SIMPSON *et al.*, 2008; BENARROCH, 2014).

O transporte de glicose através da BHE é completamente regulado e compartimentalizado, onde a expressão, a regulação e a atividade dos GLUTs

desempenham um papel fundamental na homeostase neuronal (YAN *et al.*, 2014). No entanto GLUT 1 e GLUT3 não podem ser responsabilizados por todo o transporte de glicose no SNC, pois existe uma importante contribuição de outras isoformas de GLUTs nesse mecanismo (MCEWEN; REAGAN, 2004; BENARROCH, 2014; MCEWEN).

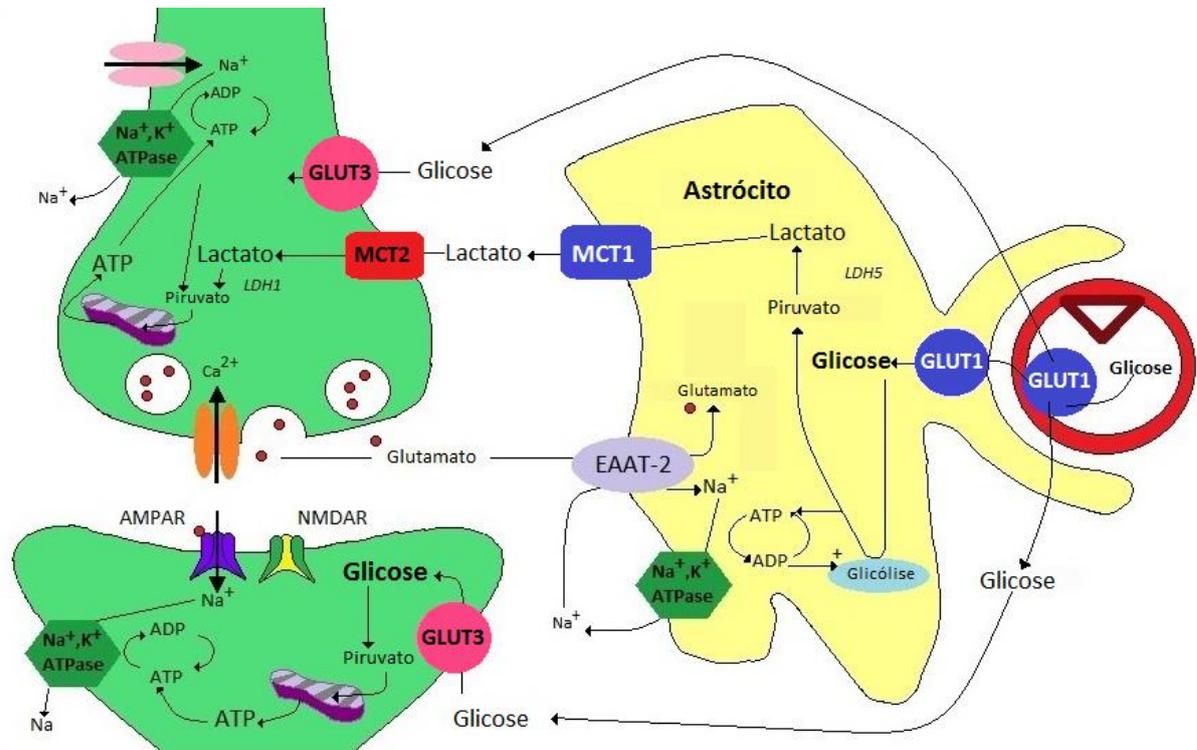


Figura 2 Mecanismo de distribuição e utilização da glicose por astrócitos e neurônios. GLUT1 é expresso tanto nas células endoteliais que formam a barreira hematoencefálica, como nos astrócitos, enquanto que GLUT3 é expresso em neurônios. Nos neurônios, a glicose incorporada através do GLUT3 é usada principalmente como fonte de piruvato para alimentar a oxidação mitocondrial. Nos astrócitos, a glicose incorporada através do GLUT1 é utilizada principalmente para glicólise e produção de lactato. MCT: Transportador de ácido monocarboxílico; LDH: Lactato desidrogenase; NMDAR: receptor NMDA; AMPAR: receptor AMPA. Fonte: Adaptado de BENARROCH, 2014.

A interação entre os neurônios e os astrócitos é essencial para manter o suprimento de energia cerebral. Os astrócitos desempenham um papel vital no transporte da glicose e na manutenção da homeostase cerebral (CHEN; ZHONG, 2013). Neurônios e astrócitos são cercados por um fluido composto de glicose e lactato, onde a concentração de glicose é mantida pela glicose oriunda do sangue, enquanto que a troca de lactato ocorre entre os astrócitos e as células gliais. O acoplamento metabólico que ocorre entre os neurônios e os astrócitos exige um grande consumo de  $O_2$  e produção de ATP nos neurônios (BENARROCH, 2014).

Acredita-se que os astrócitos sejam as primeiras células a consumirem glicose e a metabolizarem para lactato; esse, por sua vez, é entregue aos neurônios como fonte de energia (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Existem evidências que demonstram que inicialmente, a maior parte do fluxo de glicose seja captada pelos neurônios e então, o lactato é liberado e absorvido pelos astrócitos (BENARROCH, 2014).

O hormônio pancreático, insulina, tem como função principal diminuir os níveis de glicose circulante pela ativação dos transportadores de glicose. Embora o cérebro tenha sido considerado impermeável à insulina, estudos mostram que este hormônio também atua no SNC, mantendo o equilíbrio energético, a homeostase de nutrientes, o desempenho cognitivo e a memória, levando a efeitos neuromoduladores e neuroprotetores (BLAZQUEZ *et al.*, 2014; BEGG, 2015).

Os transportadores de glicose sensíveis à insulina, como GLUT4, também desempenham papel importante na regulação do transporte de glicose ao SNC (PRASAD *et al.*, 2014). A insulina estimula a expressão de GLUT4 e o transporte de proteínas do citosol para a membrana plasmática para regular a captação e a utilização da glicose. Portanto, a estimulação de GLUT4 pela insulina é crítica para a regulação do metabolismo neuronal (DE LA MONTE, 2014).

O lactato, produto do metabolismo glicolítico da glicose, é transportado dentro e fora das células neuronais pelos transportadores de monocarboxilato (MCTs) MCT1 na BHE e astrócitos e MCT2 nos neurônios (SIMPSON *et al.*, 2008). Um estudo *in vitro* com neurônios cerebelares mostrou a importância do lactato e da glicose na manutenção da homeostase dos neurotransmissores durante a atividade sináptica; enquanto o lactato mantém a atividade basal dos neurônios, a glicose é o substrato utilizado durante essa atividade (BAK *et al.*, 2006).

O papel neuroprotetor do lactato durante a isquemia ou hipoglicemia tem sido demonstrado na literatura (WENDER *et al.*, 2000). O metabolismo cerebral durante a hipoglicemia pode ser mantido por diversos fatores. Um mecanismo explicável seria o aumento na captação de lactato, utilizado pelo cérebro como fonte alternativa de energia (SIMPSON *et al.*, 2008), capaz de sustentar a atividade dos neurônios, diminuindo a necessidade cerebral de glicose (PELLERIN *et al.*, 2005; BOUMEZBEUR *et al.*, 2010).

Além disso, o lactato tem sido evidenciado por possuir funções fisiológicas no SNC (PATET *et al.*, 2016), assumindo importância na cooperação metabólica entre os neurônios e as células da glia, especialmente durante a atividade cerebral

aumentada, ou seja, tem capacidade de manter a integridade neuronal na deficiência de glicose, além de ser facilmente metabolizado (FALKOWSKA *et al.*, 2015). Portanto, o cérebro humano saudável parece ser capaz de suportar reduções moderadas nos níveis de glicose, provavelmente graças a uma maior disponibilidade de lactato (VAN DE VEN *et al.*, 2011).

A anormalidade no transporte de glicose ou a disfunção no seu catabolismo afeta o metabolismo cerebral, o que provavelmente contribui para as anormalidades metabólicas e para o surgimento de doenças neurodegenerativas (CHEN; ZHONG, 2013).

O elevado consumo de energia pelo cérebro, principalmente aquela derivada do metabolismo da glicose, o torna vulnerável às deficiências do metabolismo energético. Tanto a hipoglicemia, como a hiperglicemia estão associadas fortemente à integridade funcional do cérebro, principalmente à função cognitiva (CHEN; ZHONG, 2013).

O glicogênio, devido ao seu lento metabolismo durante o repouso e rápida metabolização durante episódios hipoglicêmicos, tem sido considerado o principal substrato de emergência durante a ausência de glicose (MCCRIMMON; SHERWIN, 2010).

A hiperglicemia crônica pode resultar em alterações metabólicas cerebrais e danos ao SNC. A hiperglicemia, resultante da deficiência absoluta de insulina (diabetes tipo 1) ou da resistência à insulina (diabetes tipo 2) pode causar alterações cerebrais (FALKOWSKA *et al.*, 2015), como a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO), a deterioração neuronal e a diminuição da sobrevivência e diferenciação neuronal, levando à morte celular (DORSEMANS *et al.*, 2017). Sem considerar outros fatores, a hiperglicemia aumenta o risco do desenvolvimento da demência, além de aumentar a propensão ao desenvolvimento de um acidente vascular cerebral (AVC), de distúrbios metabólicos e de convulsões (BAIRD *et al.*, 2002).

### **3.2 Hiperglicemia e doenças neurodegenerativas**

Os distúrbios cerebrais são considerados o problema mais sério de saúde da sociedade moderna. Mais de 600 tipos de disfunções afetam o SNC, dentre as

quais, as doenças neurodegenerativas, como a DA, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Parkinson (DP) são as mais frequentes (SUGANTHY *et al.*, 2016).

Apesar da diferença dos sintomas associados a estas doenças, os mecanismos da neurodegeneração (Figura 3) estão cionados, como o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade do glutamato, a inflamação, a agregação de proteínas e a alteração na homeostase de íons metálicos (NIEOULLON, 2011; SUGANTHY *et al.*, 2016).

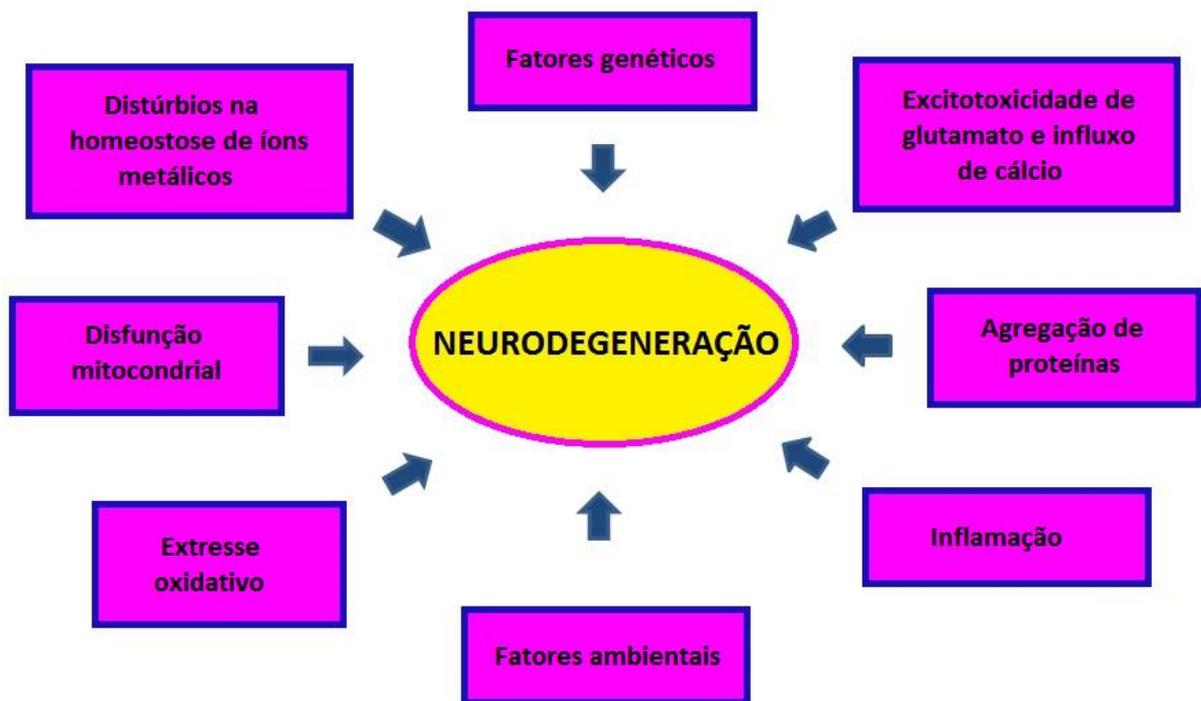


Figura 3 Etiologia dos distúrbios neurodegenerativos.  
Fonte: Adaptado de SUGANTHY *et al.*, 2016.

Estudos clínicos e experimentais demonstram que idosos apresentam déficit de desempenho em tarefas cognitivas, devido ao fornecimento insuficiente de glicose (BIESSELS *et al.*, 2006; CRAFT, 2005; EUSER *et al.*, 2010) e que a disponibilidade de glicose em áreas seletivas do cérebro pode modular positivamente o desempenho em tarefas cognitivas (SCHROEDER; PACKARD, 2003; GOLD, 2005).

Um indivíduo envelhecido apresenta maior risco de exposição à privação de glicose, especialmente durante tarefas cognitivas. Assim, os mecanismos envolvidos na anormalidade do transporte de glicose, especialmente a resistência à insulina e as perturbações do metabolismo intracelular, possivelmente contribuem para as

alterações no metabolismo das doenças neurodegenerativas (CHEN; ZHONG, 2013).

A DA é, de longe, a causa mais comum de demência, afeta cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo. É uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pelo declínio progressivo da memória de curto e de longo prazo, com déficit cognitivo que prejudica as atividades da vida diária (CARUANA; CAUCHI; VASSALLO, 2016; KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2017).

Uma das características da doença é a morte neuronal, o acúmulo de placas senis e os emaranhados neurofibrilares (NFTs) (CHEN; ZHONG, 2013). Esses emaranhados neurofibrilares estão presentes principalmente em regiões vulneráveis do cérebro, como o hipocampo e o córtex frontal e, são resultantes de inclusões intraneuronais de agregados de proteína tau, que por sua vez estão associadas aos microtúbulos, necessários para manter a estrutura do citoesqueleto (SUGANTHY *et al.*, 2016).

A extensão da fosforilação da proteína tau determina a sua capacidade de ligação aos microtúbulos. A hiper-fosforilação leva ao desprendimento da proteína dos microtúbulos, ocasionando a sua agregação e, com isso, a morte neuronal, característica dos processos neurodegenerativos (TAI *et al.*, 2012).

Os eventos etiológicos que levam ao desenvolvimento da DA ainda não estão bem esclarecidos, embora a idade e a hereditariedade parecem desempenhar um importante papel. Estudos sugerem que a predisposição à doença esteja associada a fatores ambientais, além dos genéticos (TANZI; BERTRAM, 2005; MOREIRA *et al.*, 2007).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, caracterizada por perda de células neuronais da substância negra que leva a redução da entrada dopaminérgica no estriado (LIMA *et al.*, 2014), além de degeneração de neurônios corticais, do tronco cerebral e de neurônios parassimpáticos (LI *et al.*, 2012), acompanhados de inclusões intraneuronais, chamadas de corpos de Lewy (CARUANA; CAUCHI; VASSALLO, 2016).

Diabetes mellitus (DM) é um transtorno metabólico caracterizado por hiperglicemia. No diabetes tipo 1 (DMT1), o principal defeito é a destruição auto-imune das células  $\beta$  da ilhota pancreática, levando à deficiência de insulina (MOREIRA *et al.*, 2007; DE LA MONTE; WANDS, 2008).

No diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), forma mais comum de diabetes, o principal defeito é a resistência à insulina em tecidos periféricos (CHEN; ZHONG,

2013), levando à deficiência relativa de insulina. Está associada ao envelhecimento, à história familiar da doença, à obesidade e à falta de exercício físico (MOREIRA *et al.*, 2007; DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Como a insulina estimula a captação e a utilização da glicose cerebral, o metabolismo, a cognição e a memória (DE LA MONTE; WANDS, 2005; DE LA MONTE, 2014); a deficiência ou a resistência à insulina leva à perturbações no metabolismo da glicose, interrompendo o equilíbrio energético cerebral. Isso aumenta o estresse oxidativo, a produção de ERO, que por sua vez, causam danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e geram disfunção mitocondrial (DE LA MONTE *et al.*, 2009).

A resistência à insulina é uma condição em que os tecidos que requerem glicose tem uma resposta diminuída à insulina e essa depuração diminuída de glicose do sangue gera um *feedback* negativo, isso faz com que o pâncreas aumente a produção de insulina para induzir a captação de glicose (LUCHSINGER; SMALL; BIESSELS, 2011).

Sugere-se que a DMT2 contribui para a patogênese da DA. Essa inter-relação tem sido sugerida devido: a) risco aumentado de desenvolvimento de deficiência cognitiva, demência ou DA em indivíduos com DMT2 ou distúrbios de obesidade/dislipidemia; b) resistência progressiva à insulina cerebral e deficiência de insulina na DA; c) comprometimento cognitivo em modelos experimentais com DMT2 ou dislipidemia; d) neurodegeneração e comprometimento cognitivo em modelos experimentais com resistência induzida à insulina ou deficiência de insulina; e) alterações moleculares e bioquímicas compartilhadas entre DA e DMT2 (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Isso indica que o DMT2 tem um impacto significativo na função cerebral (CHEN; ZHONG, 2013; REGALADO DOÑA *et al.*, 2009), uma vez que a insuficiência na utilização da glicose cerebral e no metabolismo energético agrava juntamente com a progressão do comprometimento cognitivo (HOYER; NITSCH; OESTERREICH, 1991; DE LA MONTE, 2014; DORSEMANS *et al.*, 2017) e embora o envelhecimento seja claramente o maior fator de risco para o comprometimento cognitivo da DA, muitas outras condições associadas ao DMT2 podem se combinar para facilitar o comprometimento cognitivo (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

A DA representa uma doença metabólica que possui características fisiopatológicas compostas do tipo 1 (deficiência da insulina) e do tipo 2 (resistência à insulina) de diabetes mellitus, ocasionando prejuízos ao balanço energético

cerebral e consolidando o conceito de que a DA seja chamada de “diabetes mellitus tipo 3” (DMT3) (DE LA MONTE, 2014; VERDILE *et al.*, 2015). Estudos epidemiológicos demonstram que a DMT2 induz à deficiência cognitiva e, que pacientes com DMT2 tem maior probabilidade de serem diagnosticados com demência. Além disso, evidências mostram existir resistência celular a insulina ou insuficiência de insulina no cérebro de pacientes com DA, incluindo aqueles sem diagnóstico de diabetes (KANG; LEE; LEE, 2017).

Assim, referir-se à DA como DMT3 é justificável, pois as anormalidades moleculares e bioquímicas se sobrepõe tanto a DMT1 quanto a DMT2 (DE LA MONTE; WANDS, 2008). Alguns dos dados mais importantes que suportam esse conceito são resultados de estudos clínicos demonstrando melhora cognitiva e/ou estabilização do comprometimento cognitivo em indivíduos com DA precoce, após tratamento com insulina intranasal (BENEDICT *et al.*, 2004; HAAN, 2006; REGER *et al.*, 2006; DE LA MONTE *et al.*, 2009).

Estudo com indivíduos com idade acima de 60 anos hiperglicêmicos ou intolerância à glicose mostraram risco aumentado em desenvolver demência (FORMIGA; REÑE; PÉREZ-MARAVÉ, 2015).

Korf *et al.* (2006) também demonstraram que o DMT2 e a glicemia de jejum prejudicada ocorrem mais frequentemente em modelos de DA do que nos controles sem a demência. No entanto, não foram observados emaranhados neurofibrilares da DA no grupo DMT2, o que sugere que o DMT2 pode aumentar a progressão, mas pode não ser suficiente para causar a doença.

### **3.3 Estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas**

O papel essencial das mitocôndrias na bioenergética celular e na sobrevivência já é bem estabelecido, além disso, a disfunção mitocondrial tem sido sugerida por desempenhar um papel essencial no desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, como a DA (BRINTON, 2008), diabetes e câncer, bem como no próprio processo de envelhecimento (DAVIS *et al.*, 2009).

O comprometimento do metabolismo cerebral da glicose é um fenômeno fisiopatológico que caracteriza e precede os sintomas clínicos e alterações patológicas das doenças neurodegenerativas. Esses fenômenos fisiopatológicos incluem a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo, os fatores inflamatórios, a

citotoxicidade, a apoptose, a ativação de algumas proteínas quinases, entre outros (CUNNANE *et al.*, 2011; CHEN; ZHONG, 2013).

A geração das ERO é mantida em níveis fisiológicos pela atividade dos componentes antioxidantes celulares. Qualquer desequilíbrio nesse processo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los, resulta no estresse oxidativo (DE ANDRADE RAMOS; WITKIN, 2016). Esse sistema enzimático de defesa do organismo é composto principalmente pelas enzimas: glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), as quais atuam sobre o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sobre o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e os radicais hidroxila (OH), mantendo o potencial redox nas células e desempenhando papel de regulação da apoptose (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; GAETANI *et al.*, 1989; DRINGEN, 2000 ).

Sabe-se que o cérebro tem baixa ou moderada atividade de SOD e CAT, enquanto que a GSH-Px é o principal sistema antioxidante cerebral. Este sistema está envolvido na eliminação de peróxidos pelas células cerebrais e na proteção contra o estresse oxidativo, tentando diminuir a geração de ERO, durante a fosforilação oxidativa (DRINGEN, 2000).

A regulação da acetilcolina também é crucial para assegurar a funcionalidade dos sistemas nervoso central e periférico, uma vez que funções vitais, tais como aprendizagem, memória e controle de movimentos são dependentes dessa regulação (MAREK *et al.*, 2016). As deficiências cognitivas associadas ao envelhecimento estão relacionadas à anormalidades na regulação do sistema colinérgico. No entanto, a compreensão desses mecanismos neuronais ainda não está bem esclarecida (SARTER; PARIKH, 2005).

O metabolismo cerebral de pacientes com DA diminui pelo menos uma década antes do diagnóstico da doença (WANG *et al.*, 2007) e disfunções no metabolismo da glicose, na bioenergética e na função mitocondrial são antecedentes consistentes ao diagnóstico (MOSCONI *et al.*, 2007; FORMIGA; REÑE; PÉREZ-MARAVÉ, 2015). O mesmo foi observado em modelo experimental da DA realizado com camundongos femininos, onde os déficits mitocondriais precederam a doença (YAO *et al.*, 2009).

As mitocôndrias foram caracterizadas como um local onde a apoptose pode ser induzida por patogêneses relacionadas com as doenças neurodegenerativas, como o estresse oxidativo, a interrupção da fosforilação oxidativa e as mutações ao DNA (COTTRELL *et al.*, 2002). Trabalhos demonstram que existe um desequilíbrio

entre a geração de radicais livres e o sistema endógeno de eliminação destes nos distúrbios cerebrais, resultando num prejuízo na geração de ATP (BOWLING *et al.*, 1993; FISKUM; MURPHY; BEAL, 1999). Nesse sentido, as mitocôndrias são alvos imediatos do dano oxidativo, indicando potencial papel causal da bioenergética mitocondrial na progressão e na patogênese da DA (MIQUEL *et al.*, 1980).

Em níveis baixos, as ERO funcionam como meio de sinalização na regulação de atividades celulares, como respostas do crescimento e da adaptação. No entanto, em concentrações mais elevadas, podem causar lesão e morte celular (BAYNES; THORPE, 1999; LINSEMAN, 2009). Isso normalmente ocorre durante o envelhecimento, quando o estresse oxidativo aumenta devido à geração acelerada de ERO e há um declínio nos mecanismos antioxidantes de defesa (WANG *et al.*, 2009; SUGANTHY *et al.*, 2016).

A alta taxa metabólica de aminoácidos excitatórios e a neurotransmissão agem como fonte de ERO, levando ao estresse oxidativo. As ERO por sua vez, induzem a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas, os danos ao DNA de neurônios e de células gliais, ocasionando a morte neuronal (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001).

Como o metabolismo cerebral requer cerca de 20% do oxigênio fornecido pelo sistema respiratório completo, o cérebro é considerado um órgão com alta produção e alto consumo de energia (ALIEV *et al.*, 2008), tornando-se mais suscetível à anomalias mitocondriais e ao estresse oxidativo do que qualquer outro órgão (WANG *et al.*, 2009).

Esse alto consumo de energia cerebral na manutenção das atividades neuronais e sinápticas requer uma adequada função mitocondrial para a geração de ATP no cérebro. Duas essenciais vias metabólicas da glicose ocorrem nas mitocôndrias: o ciclo de Krebs (CK) e a fosforilação oxidativa. O funcionamento anormal dessas duas vias causa não somente hipometabolismo da glicose, mas também múltiplas cascatas fisiopatológicas, como o estresse oxidativo e a apoptose (CHEN; ZHONG, 2013).

O CK ou ciclo do ácido cítrico é essencial para a produção de equivalentes redutores para a síntese de ATP nas mitocôndrias (PALMER, 1999; RUSSELL *et al.*, 1999). A fosforilação oxidativa, por sua vez, é o passo final da bioenergética, desempenhando papel fundamental na produção de ATP, impulsionando os neurônios a exercerem diversas funções fisiológicas, como a neurotransmissão, o equilíbrio iônico, entre outras (PALMER, 1999).

Como a fosforilação oxidativa ocorre na mitocôndria e esta é suscetível a fatores nocivos, como a sobrecarga de cálcio, o sinal de apoptose externa e o estresse oxidativo, qualquer colapso acidental do metabolismo pode afetar a função fisiológica da fosforilação (CHEN; ZHONG, 2013). O hipometabolismo da glicose então, induzido por disfunção na fosforilação oxidativa, está ligado a alterações fisiopatológicas encontradas na DA (YAO *et al.*, 2009).

A respiração mitocondrial funcional do cérebro manifesta um declínio gradual no processo de envelhecimento, tornando difícil atender constantemente o alto consumo de energia, levando à geração de ERO e ao dano oxidativo. Como as mitocôndrias são as organelas mais afetadas com a geração de ERO, o estresse oxidativo exacerba ainda mais a disfunção mitocondrial e o círculo vicioso começa, gradualmente, a envelhecer o cérebro. Esse círculo vicioso é um evento inicial do processo de demência, mesmo antes do aparecimento de placas senis e das manifestações clínicas (BISHOP; LU; YANKNER, 2010).

### **3.4 Estrógeno e o sistema nervoso central**

Os esteroides gonadais tem efeito altamente seletivo sobre a memória, fato importante quando se considera mulheres no período pós-menopausa, quando ocorre a diminuição na produção de estrógeno e de progesterona (PHILLIPS; SHERWIN, 1992), desencadeando alterações, como a diminuição da função cognitiva, as mudanças de humor e as ondas de calor, as quais tem sido relacionadas, principalmente à falta de estrógeno no cérebro (SHEPHERD, 2001; YAO *et al.*, 2010).

O estrógeno é uma molécula de sinalização que regula funções múltiplas através de genes, células e órgãos. Para que essa ação coordenada seja possível, se utiliza de receptores e de vias de sinalização para ativar os processos moleculares e as respostas necessárias para a sobrevivência do organismo, influenciando diretamente na função cerebral, através de seus receptores localizados nas diferentes áreas do SNC (AREVALO *et al.*, 2012; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014).

Estudo *in vitro* com estrógeno demonstrou efeitos neuroprotetores e neurotróficos na proteção dos neurônios do estresse oxidativo, da lesão isquêmica,

da hipoglicemia e dos danos causados pela proteína amiloide, a qual é característica da DA (MCEWEN; ALVES, 1999).

O papel desse hormônio na regulação da homeostase da glicose tem se tornando cada vez mais reconhecido. Os receptores de estrógeno são encontrados nas células  $\beta$  pancreáticas, onde a diminuição do estrógeno está associada a um aumento da resistência ou da diminuição da secreção de insulina (LIPSCOMBE *et al.*, 2012).

São reconhecidos os efeitos benéficos do estrógeno sobre todo o sistema bioenergético cerebral, induzindo as vias de sinalização que convergem para as mitocôndrias, favorecendo assim a utilização de glicose no CK e na fosforilação oxidativa, o que resultará produção de ATP (BRINTON, 2008; 2009).

Além de facilitar o transporte de glicose, o estrógeno também promove a glicólise neuronal. Em estudo com roedores, o estradiol aumentou a atividade das enzimas glicolíticas, hexoquinase e piruvatoquinase, durante a exposição ao tratamento (KOSTANYAN; NAZARYAN, 1992).

Um grande número de vias de sinalização reguladas pelo estrógeno convergem para as mitocôndrias. Nestas, a regulação positiva do transporte de glicose e a glicólise mediada pelo estrógeno são complementadas pela potencialização da bioenergética mitocondrial (MANNELLA; BRINTON, 2006; BRINTON, 2008).

Em trabalho realizado com roedores e primatas não humanos, a ovariectomia induziu uma diminuição nos transportadores de glicose (GLUT1, GLUT3 e GLUT4) e a administração de estradiol evitou o declínio desses transportadores (CHENG *et al.*, 2001).

Vina *et al.* (2006) verificaram que após a administração de estradiol, ocorre um aumento na defesa antioxidante e menor dano oxidativo ao DNA mitocondrial, proteínas e lipídeos no fígado e no cérebro. Resultado similar foi demonstrado em trabalho com ratas, onde se observou um aumento da lipoperoxidação no grupo ovariectomizado e uma diminuição destes no grupo que recebeu estradiol (IRWIN *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2012).

Ding *et al.* (2012) demonstraram que a diminuição dos hormônios com o envelhecimento reprodutivo induziu declínio significativo na utilização de glicose cerebral. Isto pode ser atribuído a uma diminuição na expressão dos transportadores neuronais, na atividade comprometida da hexoquinase, na inativação do complexo

piruvato-desidrogenase e possivelmente a uma diminuição funcionalmente significativa da bioenergética mitocondrial.

O estrógeno também promove o crescimento, a viabilidade, a reparação e a ramificação neuronais (SHEPHERD, 2001), além de influenciar o suprimento sanguíneo, aumentando a perfusão cerebral, provavelmente por mecanismos similares aos que ocorrem nas artérias coronárias (PENOTTI *et al.*, 1996). Pode, também, atuar como agente anti-inflamatório na parede dos vasos sanguíneos, protegendo-os contra danos causados por citocinas, radicais livres e contra a formação de placas senis (MCEWEN; ALVES, 1999).

Mesmo em mulheres saudáveis, o volume cerebral começa a diminuir conforme os níveis de estrógeno caem no período pós-menopausa. Essa atrofia ocorre principalmente no hipocampo e no lobo parietal, áreas associadas principalmente à memória e à cognição (MURPHY *et al.*, 1996). Tais alterações podem contribuir para as queixas frequentes de mulheres nesse período, como a diminuição da clareza mental e os problemas de memória verbal de curto prazo, a irritabilidade, os distúrbios psicológicos e do sono, além de sintomas vasomotores (FRACKIEWICZ; CUTLER, 2000).

De modo geral, os níveis de estrógeno podem afetar o curso da DA, devido à perda dos efeitos anti-inflamatórios, neurotróficos e neuroprotetores, os quais tornam o cérebro menos resistente ao processo da doença (XU *et al.*, 1998), tornando, assim, clinicamente relevante o risco aumentado de desenvolvimento da DA em mulheres na pós- menopausa (YAO *et al.*, 2010).

### **3.4.1 Terapia hormonal**

O aumento da expectativa de vida significa que a maioria das mulheres passará a segunda metade de suas vidas num estado de deficiência de estrógeno. Estado esse que predispõe ao aparecimento da síndrome metabólica, de doenças cardiovasculares e da DMT2. Portanto, o amplo impacto da deficiência de estrógeno no metabolismo feminino representa um novo desafio terapêutico (XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2017).

Embora exista alguma controvérsia sobre os efeitos benéficos das terapias de estrógeno sobre o cérebro (HERRERA *et al.*, 2011; NEWHOUSE; DUMAS, 2015) décadas de investigação científica sobre a ação do estrógeno no cérebro e

subsequentes ensaios clínicos e observacionais tem indicado o benefício de terapias à base desse hormônio. Ações cruciais na regulação da diferenciação dos neurônios, na plasticidade sináptica, na indução da sobrevivência neuronal e na neurogênese são desenvolvidas pelo estrógeno. Aliás, alguns desses efeitos parecem atrasar o início, ou mesmo melhorar, a neuropatologia da DA (BRINTON, 2005; SINGH *et al.*, 2008).

A influência da pós-menopausa é considerada na prevalência de diabetes devido ao aumento da incidência dessa doença na população que está envelhecendo. Tanto a duração mais curta da vida reprodutiva, devido à ovariectomia, quanto a menopausa precoce podem contribuir para o risco de diabetes, sendo as terapias de reposição hormonal estratégias para a prevenção da doença (STUENKEL, 2017).

As avaliações epidemiológicas observacionais em mulheres com estado neurológico saudável, que iniciaram a terapia hormonal estrogênica no momento da menopausa, apresentaram redução no risco de desenvolvimento da DA (ZANDI *et al.*, 2002; BRINTON, 2005; SHERWIN; HENRY, 2008) .

De acordo com Brinton (2005), se os neurônios são saudáveis no momento de exposição ao estrógeno, sua resposta ao hormônio é benéfica, tanto para a função neurológica, quanto para a sobrevivência neuronal. Contudo, se a saúde cerebral já está comprometida, a exposição ao estrógeno por longo período de tempo, pode exacerbar a morte neurológica.

Para Walton *et al.* (1993) em mulheres pós-menopáusicas, a produção de insulina é menor. A ovariectomia é considerada um modelo de resistência à insulina pós-menopausa, pois a perda dos hormônios ovarianos induz aumento do peso corporal e dos níveis glicêmicos e diminui a resposta dos tecidos à insulina. Esses efeitos podem ser revertidos com o uso de estrógeno após a ovariectomia, normalizando inclusive, os níveis de glicose (DING *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013).

Estudo com mulheres pós-menopáusicas testadas para a DA e para demência senil, observou que aquelas que já realizavam terapia de reposição hormonal com estrógeno tiveram 70% a menos de risco de desenvolver DA, mesmo considerando a idade e o uso de álcool e tabaco (BALDERESCHI *et al.*, 1998). Além de que, esta diminuição é significativa com o aumento da dose e com a duração da terapia hormonal (PAGANINI-HILL; HENDERSON, 1996), demonstrando que a terapia de reposição de estrógeno pode prevenir ou retardar o início da DA.

### 3.5 Tamoxifeno e metabolismo da glicose

O tamoxifeno ou trans-1-[p-β(dimetil-amino)etoxi-fenil]1,2-difenil-1-buteno é um isômero trans substituído do trifenil-etileno (Figura 4), um esteroide sintético classificado como um SERM (JORDAN, 2006), devido aos seus efeitos agonista ou antagonista ao estrógeno, em diferentes tecidos que possuam ER (O'REGAN; JORDAN, 2002). Os SERM se ligam aos ER resultando na alteração conformacional destes receptores. Esta alteração conformacional expõe diferentes aminoácidos que ativam proteínas co-reguladoras ativadoras ou repressoras de genes promotores responsivos a estrógeno, ativando ou inibindo a síntese de RNA mensageiro (RNAm) (DUTERTRE; SMITH, 2000).

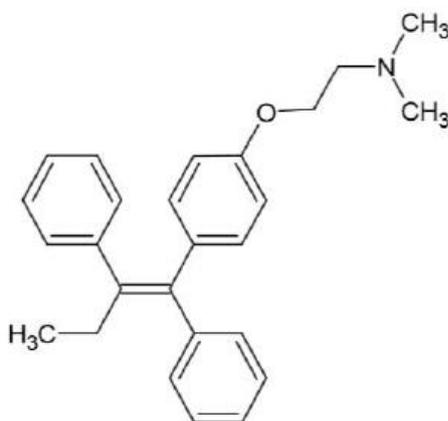


Figura 4 Estrutura química do isômero trans do tamoxifeno.  
Adaptado de JORDAN, 2006.

Após ser absorvido pelo trato gastrointestinal, o tamoxifeno se liga às proteínas plasmáticas, em especial à albumina (em torno de 99%), e devido ao seu caráter lipofílico distribui-se amplamente nos tecidos. Ao interagir com os lipídios e as proteínas das membranas dos tecidos, incorpora-se de tal forma que chega a atingir concentrações de 10 a 60 vezes mais altas que as encontradas no plasma (MAREK; ITINOSE; BRACHT, 2010).

O tamoxifeno sofre extenso metabolismo hepático, principalmente através da ação enzimática do sistema citocromo P450. O 4-hidroxitamoxifeno (4-OHTAM) e o N-desmetiltamoxifeno são os dois principais metabólitos primários produzidos, os quais, posteriormente, são biotransformados em 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno, também chamado de endoxifeno. Este, por sua vez, tem sido proposto como o mais importante metabólito ativo produzido (GOETZ; KAMAL; AMES, 2008; XIONG *et al.*, 2017).

Apesar de sua atividade antiestrogênica ter sido estudada no tratamento do câncer de mama desde a década de 1970 e os dados sugerirem a diminuição em um terço a taxa de mortalidade em mulheres tanto na pré, quanto na pós-menopausa (GOETZ; KAMAL; AMES, 2008), somente a partir de 1998 o tamoxifeno foi autorizado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) para o tratamento preventivo em mulheres com elevado risco de desenvolvimento da doença (CRAIG JORDAN *et al.*, 2014).

A ação antagonista do tamoxifeno é reconhecida no tecido mamário (XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2016) e nas células  $\beta$ -pancreáticas (KIM; CHO; KIM, 2014); agonista nos ossos (LOVE *et al.*, 1992), no endométrio (XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2017) e no tecido adiposo (YE *et al.*, 2015); e ação mista no tecido hepático (DUTERTRE; SMITH, 2000) e no cérebro (ERNST *et al.*, 2002; VANČOVÁ *et al.*, 2010) (Figura 5).

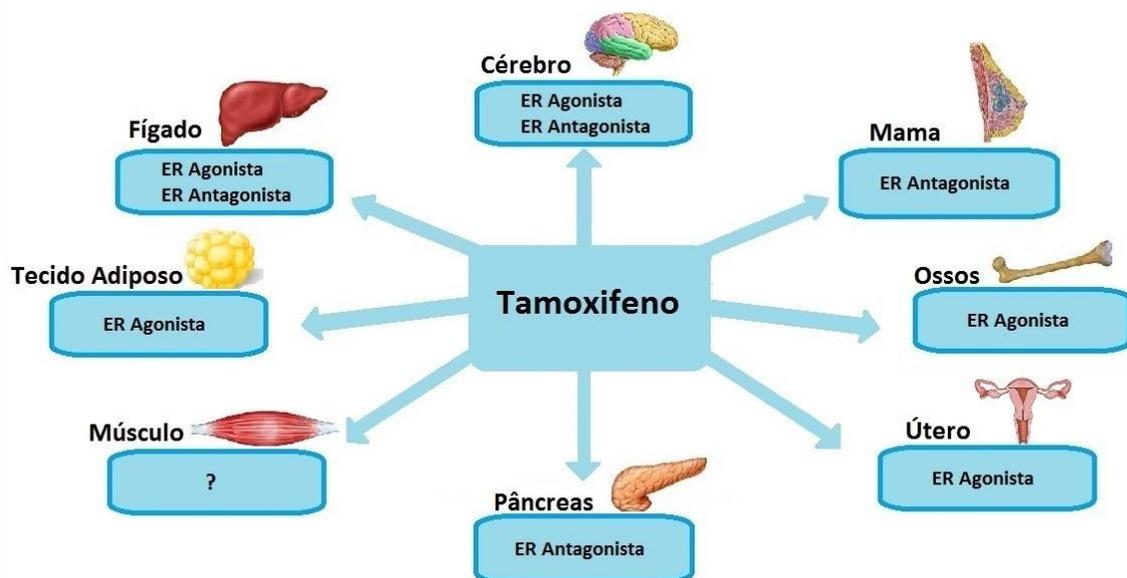


Figura 5 Resumo dos efeitos do tamoxifeno no organismo.

Fonte: Adaptado de XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2017.

Estudo com células mamárias cancerígenas e com fígado de rato mostrou que o tamoxifeno e o 4-OHTAM interagem fortemente com as mitocôndrias (PELICANO *et al.*, 2006), influenciando na bioenergética mitocondrial, ao afetar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e estimular a hidrólise do ATP (CARDOSO *et al.*, 2001; MAREK *et al.*, 2011).

Foi reconhecido que o tamoxifeno causa efeitos metabólicos secundários como diabetes, anormalidades lipídicas e esteatose hepática (XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2017). Estudos com mulheres com câncer de mama revelaram

uma relação entre o tratamento com tamoxifeno e o aumento do risco de desenvolver diabetes (LIPSCOMBE *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014).

Esse risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus (LIPSCOMBE *et al.*, 2012) tem sido considerado em decorrência das diversas ações do tamoxifeno e de seus metabólitos no metabolismo de carboidratos (JAIN; THANKI; JAIN, 2013). Trabalho com modelo de ratas ovariectomizadas não diabéticas demonstrou que o tamoxifeno induz a hiperglicemia; podendo, o estado hiperglicêmico ser, possivelmente, em razão da inibição de receptores de estrógeno ou devido a uma ação direta do tamoxifeno sobre a cadeia respiratória mitocondrial dos hepatócitos (SILVA *et al.*, 2017).

O acúmulo de glicose e de seus intermediários ativam vias metabólicas alternativas, mudando o estado redox intracelular proveniente do balanço  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ; Este desequilíbrio aumenta significativamente o quadro de estresse oxidativo, gerando a síndrome metabólica (YAN *et al.*, 2014).

No entanto, o mecanismo exato do efeito diabetogênico ainda não está totalmente esclarecido. Sugere-se que o tamoxifeno exerça efeito adverso sobre as células  $\beta$  pancreáticas, desencadeando resistência à insulina, além de induzir hipertrigliceridemia e o desenvolvimento da síndrome metabólica (XU; LOVRE; MAUVAIS-JARVIS, 2017).

Em estudo com camundongos fêmeas, o tamoxifeno inverteu o efeito protetor do estradiol na prevenção de diabetes deficiente de insulina induzida pela administração de estreptozotocina (STZ), sugerindo que o tamoxifeno atue como antagonista ER nas células  $\beta$ , prejudicando a sobrevivência das ilhotas pancreáticas (LE MAY *et al.*, 2006).

A associação entre a terapia com o tamoxifeno e o risco do desenvolvimento de DM encontra-se cada vez mais evidente. Um estudo demonstrou que 10% das mulheres, com idade média de 74,5 anos, que tiveram câncer de mama, desenvolveram DM ao longo do tratamento com tamoxifeno (LIPSCOMBE *et al.*, 2012). Embora o risco de desenvolver diabetes aumente gradativamente com a idade, o uso de tamoxifeno aumenta este risco independente da faixa etária (SUN *et al.*, 2014).

Pesquisa com ratas ovariectomizadas sugere que tanto o estrógeno como o tamoxifeno desempenham papel neuroprotetor ou de reparo, pois ambos aumentam a densidade sináptica (ERNST *et al.*, 2002). Estudo retrospectivo, comparando mulheres acima de 65 anos que tomavam tamoxifeno com aquelas que nunca

tomaram, mostrou que aquelas que faziam a terapia com tamoxifeno foram menos propensas ao diagnóstico de DA e se mostraram significativamente mais independentes no desempenho de atividades diárias (BREUER; ANDERSON, 2000).

O possível efeito neuroprotetor dos SERMs, e até mesmo uma redução do dano neuronal foi avaliado em situações de inflamação cerebral, de deficiência cognitiva, de distúrbios neurodegenerativos e de distúrbios do humor (PINKERTON; THOMAS, 2014). É possível que outros SERMs como o raloxifeno e o bazedoxifeno, assim como o tamoxifeno, possam neutralizar a inflamação cerebral em doenças neurodegenerativas, por uma possível ação agonista ao estrógeno em moléculas pró-inflamatórias produzidas por astrócitos. Isto foi observado através de um estudo *in vitro* com astrócitos em que estes três SERMs reduziram os níveis de RNAm de moléculas pró-inflamatórias (ZHAO; O'NEILL; DIAZ BRINTON, 2005; AREVALO *et al.*, 2012).

Apesar destes estudos indicarem um papel neuroprotetor, outros mostram que o tamoxifeno pode induzir mecanismos adversos na cognição, sugerindo um efeito negativo particularmente sobre a memória (JENKINS *et al.*, 2004; BENDER *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2008), apontando que uma única dose de 75mg/Kg peso corporal de tamoxifeno em ratos seria capaz de induzir estresse celular, tanto no SNC, quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (DENK *et al.*, 2015).

Considerando que no tecido cerebral o metabolismo depende quase que exclusivamente do suprimento de glicose, a glicemia persistentemente elevada, favorece o aparecimento de alterações cognitivas (KODL; SEAQUIST, 2008), resultantes do desequilíbrio no estado redox da célula pelo aumento da formação de ERO ou pela diminuição na capacidade dos sistemas de defesas antioxidantes. O tamoxifeno, por sua vez, está associado à perda de memória, por afetar negativamente o metabolismo cerebral (VANČOVÁ *et al.*, 2010).

Considerando o longo período que envolve o tratamento com tamoxifeno, entre 3 a 5 anos, associado com o aumento da expectativa de vida e a probabilidade do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, há a necessidade da associação de terapias preventivas (DAJAS *et al.*, 2015), que minimizem os efeitos causados pela lipoperoxidação do tamoxifeno (JAIN; THANKI; JAIN, 2013). Em particular substâncias com atividade antioxidante (GREENLEE *et al.*, 2009), como as vitaminas A, C e E que minimizam os efeitos tóxicos produzidos pelos antineoplásicos tem sido estudadas (DOS SANTOS; CRUZ, 2001).

### 3.6 Quercetina: Mecanismo de neuroproteção

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) (Figura 6) é um membro da família dos flavonóides que tem despertado crescente atenção, devido a sua ação antioxidante. A presença de grupos hidroxilas aromáticos conferem a estes compostos acentuadas atividades antioxidantes (KAWAI *et al.*, 2009). O número e a posição dos grupos hidroxilas livres possibilitam doar hidrogênio para estabilizar os radicais livres (GUARDIA *et al.*, 2001). São amplamente distribuídos na forma de metabólitos secundários nas plantas (ABDELMOATY *et al.*, 2010) e considerados componentes vitais da dieta humana, devido a sua bioatividade diversificada (XIAO *et al.*, 2016).

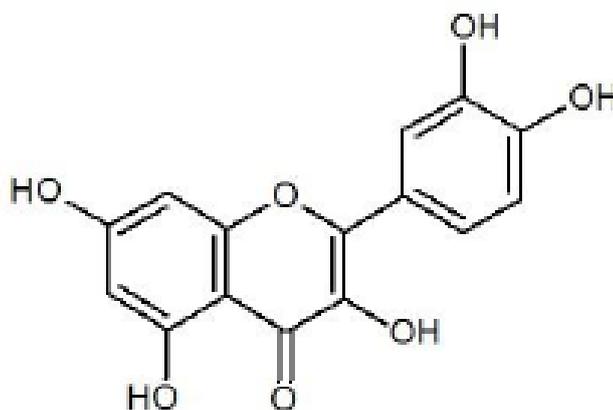


Figura 6 Estrutura química da 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona (quercetina).  
Fonte: Adaptado de CASAS-GRAJALES; MURIEL, 2015.

A quercetina está presente em diversas frutas e vegetais, como na maçã, no morango, no brócolis, na couve, na cebola, no chá e também no vinho tinto (HERTOG *et al.*, 1993; DONG *et al.*, 2014). Com potentes ações quelante e *scavenger* de radicais livres, tem amplo potencial terapêutico na prevenção e no tratamento de doenças decorrentes do estresse oxidativo, como artrite, inflamações, doenças cardiovasculares e DA, além de terapia nas infecções bacterianas e virais (MAALIK *et al.*, 2014) e terapia antialérgica (LAMSON; BRIGNALL, 2000).

O metabolismo da quercetina é complexo, assim fatores que regulam a absorção, o metabolismo e a sua eliminação são importantes mediadores da sua biodisponibilidade. O local e a maneira pela qual a quercetina é absorvida depende da sua estrutura química. A quercetina em sua forma aglicona pode ser absorvida

pelo estômago e pelo intestino por difusão passiva, já a sua forma glicosilada não é absorvida pelo estômago, necessitando sofrer hidrólise no intestino pela lactase florizina hidrolase (LPH) sendo absorvida pelo epitélio intestinal (GUO; BRUNO, 2015).

Após ser absorvida, a quercetina sofre conjugação através da ação das enzimas uridina 5'-glucuroniltransferase (UGT), sulfotransferase (SULT) e catecol-Ometiltransferase (COMT), formando seus metabólitos metilados, sulfonilados e glucuronados no intestino e no fígado. Os principais metabólitos encontrados na circulação sanguínea são quercetina-3-glucuronídeo e quercetina-3-sulfatada (VAN DER WOUDE *et al.*, 2004; YEH *et al.*, 2016).

A quercetina está presente principalmente na forma conjugada, amplamente ligada à albumina, já a sua forma livre está presente em concentrações baixas (DAJAS *et al.*, 2015). A maior parte dos metabólitos derivados da quercetina é excretada pela via biliar, porém uma parte da quercetina que é absorvida no intestino sofre efluxo para o lúmen intestinal, devido a sua baixa solubilidade em água, que dificulta a difusão passiva, enquanto os demais metabólitos são excretados pela via renal, após sofrer metabolismo hepático (GUO; BRUNO, 2015).

A quercetina tem capacidade de reduzir a hiperglicemia induzida pelo tamoxifeno, os níveis de colesterol no sangue, assim como aumentar o glicogênio no fígado, levando ao efeito normoglicemiante (ABDELMOATY *et al.*, 2010).

Em estudo para avaliar os possíveis efeitos da quercetina sobre a glicose no sangue e o potencial das enzimas antioxidantes na diabetes induzida por STZ em ratos, Abdelmoaty *et al.* (2010) observaram que mesmo em baixas doses (15mg/Kg peso corporal), a quercetina, mostrou-se capaz de prevenir a glicemia induzida e normalizar o nível glicêmico, provavelmente devido à inibição da peroxidação lipídica. A mesma dose, em trabalho anterior, mostrou efeitos protetores, preservando a integridade das células pancreáticas e diminuindo o estresse oxidativo (COSKUN *et al.*, 2005). Em outro estudo, Silva *et al.* (2017), observaram que a quercetina quando associada ao tamoxifeno foi capaz de diminuir os níveis glicêmicos induzidos pelo tamoxifeno em ratas ovariectomizadas.

Nas doenças cerebrais, o estresse oxidativo já foi identificado como um dos principais mecanismos envolvidos no processo patológico da morte neuronal. A produção excessiva de ERO é reconhecida no início, na progressão e na manutenção das doenças neurodegenerativas. Nesse cenário, estudos vem sendo

desenvolvidos tentando mostrar a ação protetora dos flavonóides e os benefícios de uma dieta rica desses compostos (DAJAS *et al.*, 2015).

Além da função antioxidante, a quercetina também se revelou uma substância neuroprotetora. Seu efeito antioxidante potente aumenta a sobrevivência de cultura de neurônios contra uma variedade de injúrias oxidativas. No entanto, a antioxidação parece não ser condição suficiente para neuroproteção, sendo necessárias ações de sinalização intracelular e fatores de transcrição para a proteção de neurônios em cultura (DAJAS *et al.*, 2015).

Evidências apoiam a ideia que uma dieta rica em polifenóis proporciona efeitos benéficos para a saúde (COSTA *et al.*, 2016). Existem trabalhos específicos sobre os efeitos neuroprotetores da quercetina. Por exemplo, a quercetina oral (50mg/Kg peso) mostrou proteger os ratos do estresse oxidativo e da neurotoxicidade induzida por injúrias neurotóxicas (ISHISAKA *et al.*, 2011).

Em trabalho que avaliou o efeito neuroprotetivo da quercetina em modelo de DA transgênico, os dados mostraram que a quercetina induziu melhor desempenho no aprendizado e nas tarefas de memória espacial, além de diminuir a beta amiloidose extracelular, tauopatia, astrogliose e microgliose no hipocampo. Juntos, esses achados sugerem que a quercetina inverte as características histológicas da DA e protege a função cognitiva em ratos (SABOGAL-GUAQUETA *et al.*, 2015).

Em estudo com ratos machos ao avaliar o efeito da alimentação com quercetina em marcadores da biogênese mitocondrial, observou-se que essa alimentação a curto prazo com doses relativamente baixas do flavonóide melhora a biogênese no músculo e no cérebro dos animais (DAVIS *et al.*, 2009).

Os mecanismos que resultam em morte neuronal, como a falha na energia celular, a acidose, a liberação de glutamato, a peroxidação lipídica, a neuroinflamação, entre outros, já são conhecidos há algum tempo; entretanto pesquisas destinadas a desenvolver tratamentos neuroprotetores ainda não provaram ser bem sucedidas (ZEMEK *et al.*, 2014). O grande potencial da quercetina como molécula neuroprotetora *in vitro* não garante os mesmos resultados *in vivo*, já que após a ingestão oral, existem limitações ocasionadas pela absorção e o complexo metabolismo da molécula, dificultando uma tradução direta dos efeitos da neuroproteção da quercetina e a sua aplicabilidade clínica (DAJAS *et al.*, 2015)

A quercetina pode atuar como um agente terapêutico efetivo contra desordens neurodegenerativas através da supressão do estresse oxidativo e da

inflamação induzidas por peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de ácido linoleico e outras moléculas neurotóxicas (COSTA *et al.*, 2016).

De acordo com Suganthy *et al.* 2016, a capacidade anti-inflamatória da quercetina atenua as lesões neuronais ocasionadas por ERO através de uma regulação descendente da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como a ciclooxigenase (COX). Além de melhorar a neurogenese através da elevação do nível de fatores neurotróficos essencialmente impedir a neurodegeneração pela capacidade de antiagregação de proteínas anormais, como o peptídeo beta-amilóide.

Evidentemente os mecanismos de ação da quercetina variam de acordo com a sua concentração e com o nível de estresse oxidativo na célula. Em animais tratados com STZ foi verificado que a passagem e o acúmulo da quercetina no cérebro levam a um importante papel neuroprotetor deste flavonóide (ISHISAKA *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2014), inclusive na prevenção de perda da memória e na disfunção colinérgica (TOTA *et al.*, 2010).

Em estudo sobre os efeitos protetores da quercetina contra a degeneração mitocondrial em resposta à toxicidade induzida por estressantes endógenos e exógenos, foi observado que os mecanismos de proteção podem ser independentes dos seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Sua ação pode estar relacionada a um efeito direto sobre a modulação da função mitocondrial, na qual alteraria o potencial de membrana, a respiração oxidativa, a produção de ATP e o estado redox intramitocondrial e isto afetaria provavelmente todas as células e tecidos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Em trabalho que avaliou a interferência da quercetina sobre a ação do tamoxifeno na atividade da acetilcolinesterase em diferentes regiões do cérebro de rato, os resultados mostraram que o tamoxifeno modula o sistema colinérgico e a quercetina interfere nessa modulação de forma diferente em cada região estudada, enfatizando o potencial terapêutico da quercetina nas doenças neurodegenerativas (MAREK *et al.*, 2016).

#### 4. CAPÍTULO: ARTIGO ORIGINAL

### **Alteração no metabolismo da glicose no cérebro associada ao tratamento com tamoxifeno: estudo em modelo animal pós-menopáusico**

Suélyn Koerich<sup>a</sup>, Fernanda Coleraus Silva<sup>a</sup>, Ana Maria Itinose<sup>b</sup>, Fabiano Sandrini<sup>c</sup>, Sara Cristina Sagae Schneider<sup>d</sup> Carla Brugin Marek<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Assistência em Toxicologia, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Brasil.

<sup>c</sup> Clínica de Endocrinologia, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

\*Endereço ao autor: Carla Brugin Marek: [carla.marek@unioeste.br](mailto:carla.marek@unioeste.br), Laboratório de Toxicologia Celular, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 1619, Cascavel – Paraná, Brasil.

## Resumo

**Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo avaliar se há associação entre os níveis de glicose no cerebelo, córtex e hipocampo com os níveis hiperglicêmicos induzidos na quimioprevenção com tamoxifeno, conhecer o perfil metabólico nestas regiões e verificar a influência da quercetina coadministrada com tamoxifeno no teor da glicose cerebral.

**Metodologia:** Um modelo animal simulando a mulher pós-menopáusia foi gerado em 80 ratas adultas, Wistar, através de ovariectomia bilateral. Após a estabilização hormonal os animais foram divididos em 4 grupos (n = 20): TAM – 5 mg.Kg<sup>-1</sup> de tamoxifeno; QUER – 22,5 mg.Kg<sup>-1</sup> de quercetina; TAMQ – 5 mg.Kg<sup>-1</sup> de tamoxifeno + 22,5 mg.kg<sup>-1</sup> de quercetina e CONT – 1,0 mL.Kg<sup>-1</sup> de óleo de canola. Todos os animais receberam o tratamento durante 14 dias por via oral. Após este período foi medido o nível de glicose no sangue, líquido cefalorraquidiano e no cerebelo, córtex e hipocampo dos animais. O piruvato e lactato também foram analisados nas três regiões cerebrais. Utilizou-se o cobre como indicador de metabolismo cerebral satisfatório.

**Resultados:** A hiperglicemia induzida pelo tratamento com tamoxifeno aumentou significativamente os níveis de glicose no líquido cefalorraquidiano, córtex e hipocampo; e aumentou a produção de lactato no hipocampo. A coadministração de quercetina com tamoxifeno mostrou capacidade de diminuir os níveis de glicose no sangue e em todas as regiões do cérebro, diminuindo também a produção de piruvato no córtex. O teor de cobre esteve fortemente diminuído apenas no hipocampo dos animais que receberam tamoxifeno mais quercetina, indicando possível alteração do estado redox nesta região.

**Conclusão:** As descobertas do presente estudo mostram que o tamoxifeno em um período relativamente curto de tratamento, 14 dias, afeta fortemente o metabolismo da glicose cerebral, sendo um fator de risco para a saúde cerebral de mulheres pós-menopáusicas em quimioprevenção. A utilização de quercetina com tamoxifeno é uma possibilidade viável na regulação metabólica da glicose nessas mulheres para um envelhecimento mais saudável, principalmente sobre a saúde cerebral.

**Palavras-chave:** Hiperglicemia, mulheres pós-menopáusicas e neurodegeneração.

## 1. Introdução

O envelhecimento, obesidade, falta de exercício físico e histórico familiar contribuem para a patogênese do diabetes tipo 2 [1,2], que causa impacto significativo na função cerebral, particularmente na utilização da glicose e no metabolismo energético cerebral [3,4]. O cérebro é sensível aos níveis de glicose plasmática. Em idosos não diabéticos com níveis elevados de glicose mesmo com intervalo considerado normal ( $< 6,1$  mmol/L) estão associadas atrofia do hipocampo [5], ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal [6] e diminuição de volumes regionais de substância cinza e branca; todos relacionados ao aumento do risco de declínio cognitivo ou demência [7,8]. Outro mecanismo ligado a neurodegeneração é a glicação de macromoléculas. O aumento dos níveis de glicose livre no cérebro associado a deficiência de cobre cerebral aumenta o estresse oxidativo tecidual causado pelas moléculas glicadas. O cobre é indispensável para o bom funcionamento das enzimas citocromo c oxidase da cadeia respiratória e para a defesa antioxidante [9].

O tamoxifeno, utilizado na quimioterapia e quimioprevenção de câncer de mama, é um indutor hiperglicêmico. Há evidências do risco de desenvolvimento de diabetes em mulheres sob tratamento quimioterápico com tamoxifeno [10]. Essa indução é explicada por efeito compensatório da inibição da energia mitocondrial e pela supressão da secreção de insulina nas células  $\beta$ -pancreáticas [11, 12]. A ingestão adequada de frutas e grãos contendo polifenóis e compostos flavônicos têm apresentado aspecto positivo tanto para a prevenção quanto coadjuvando no tratamento da hiperglicemia [13].

Mostramos recentemente, em modelos experimentais animais que simulam a mulher na menopausa, que a quercetina, um flavonoide encontrado na maçã, morango, brócolis, couve, cebola, chá, uva e vinho tinto [13], quando coadministrada com tamoxifeno reduz eficazmente a hiperglicemia induzida por este quimioterápico, trazendo, inclusive, os níveis de glicose para intervalos normais [14].

O que não se sabe é se os níveis elevados de glicemia induzidos pela quimioprevenção com tamoxifeno em mulheres pós-menopáusicas influenciam nos teores e no metabolismo da glicose em diferentes regiões do cérebro, e se a coadministração de quercetina interfere nesse mecanismo. O entendimento da relação entre os níveis de glicose no sangue com o metabolismo da glicose em diferentes regiões cerebrais é importante para um melhor gerenciamento dos níveis

glicêmicos em mulheres pós-menopáusicas em terapia com tamoxifeno, contribuindo para uma melhor saúde cerebral nessas mulheres. O objetivo deste estudo foi, portanto, através de ratas ovariectomizadas tratadas com tamoxifeno, verificar se os teores de glicose no cerebelo, córtex e hipocampo estão associados aos níveis glicêmicos, conhecer o perfil metabólico nestas regiões e avaliar a influência da quercetina coadministrada com tamoxifeno no teor da glicose cerebral. O cobre foi utilizado como indicador de metabolismo cerebral satisfatório.

## 2. Materiais e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Toxicologia Celular da UNIOESTE em 80 ratos, Wistar, heterogênicos, fêmeas, adultos, pesando aproximadamente 250g fornecidos 30 dias antes da cirurgia de ovariectomia.

Condições de alojamento: Os animais foram alojados, 4 no máximo, em caixas de polipropileno a  $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em ciclo claro-escuro de 12 horas (09:00 – 19:00 horas), com sistema de exaustão contínuo e umidade  $55 \pm 5\%$ , alimentadas *ad libitum* com dieta padrão para roedores Nuvilab<sup>®</sup> (Nuvital Ltda, PR, Brasil) e água potável.

### 2.1. Indução do período pós-menopáusico por cirurgia de ovariectomia

As ratas, antes da cirurgia ficaram em jejum de 12 horas. No momento da cirurgia foram anestesiadas com  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  por peso animal de cloridrato de quetamina (Cristália, Brasil) e  $15 \text{ mg.Kg}^{-1}$  por peso animal de cloridrato de xilazina (Vetbrands, Brasil) por via intraperitoneal. Em condições assépticas foi feita uma incisão abdominal, a pele do abdome foi cortada e o peritônio aberto. Em seguida os vasos sanguíneos de ambos os ovários foram pinçados e amarrados para a retirada dos mesmos. Na sequência os ovários foram retirados e o músculo e a pele suturados. Após a cirurgia, as ratas receberam uma gota de dipirona ( $50 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) como analgésico por via oral. As ratas foram mantidas, conforme as condições de alojamento já descritas, durante 30 dias em observação e para a estabilização dos níveis hormonais [15].

### 2.2. Protocolo de tratamento

Após os 30 dias da ovariectomia, as ratas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos contendo 20 animais, e tratadas diariamente, por via oral, durante 14 dias, conforme:

- Grupo CONT (Controle): recebeu  $1,0 \text{ mL.Kg}^{-1}$  de óleo de canola;
- Grupo TAM (Tamoxifeno): recebeu  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de tamoxifeno;
- Grupo QUER (Quercetina): recebeu  $22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de quercetina;

Grupo TAM+Q (Tamoxifeno + Quercetina): recebeu  $5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de tamoxifeno e  $22,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de quercetina.

Devido à lipossolubilidade do tamoxifeno e da quercetina, estes foram solubilizados em óleo de canola. As doses selecionadas foram baseadas em estudos anteriores simulando doses terapêuticas de tamoxifeno e mais efetiva da quercetina [14]. Durante todo o período de tratamento os animais foram observados diariamente e mantidos conforme as condições de alojamento já descritas anteriormente.

### **2.3. Coleta de sangue, líquido cefalorraquidiano e isolamento do cérebro**

Após os 14 dias de tratamento, os animais foram deixados em jejum de 12 horas e anestesiados com  $100 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de cloridrato de quetamina e  $15 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de cloridrato de xilazina. Uma gota de sangue foi retirada da veia caudal com o auxílio de uma agulha para a dosagem de glicose. Em seguida, coletou-se o líquido cefalorraquidiano (LCR) conforme metodologia adaptada de Consiglio e Lucion, 2000 [16]. A técnica consistiu em fixar o animal em um esterotáxico com a cabeça situada no plano de fixação dos incisivos superiores com o occipital posicionado quase no plano horizontal, deixando o tórax disposto verticalmente. Nessa posição, visualizou-se uma pequena depressão entre a protuberância occipital e o processo espinhoso do Atlas. Com um “scalp” conectado a uma seringa de 1 mL, o LCR foi aspirado e transferido para um tubo Eppendorf para a dosagem de glicose.

Na sequência o abdome e o tórax foram abertos longitudinalmente, expondo o coração para a coleta intracardíaca de sangue. O sangue foi, então, centrifugado a 700 g por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubo Eppendorf e armazenado sob refrigeração. Ainda com o animal posicionado no estereotáxico, com um bisturi fez-se uma incisão na linha mediana da cabeça e a pele foi afastada para a exposição do crânio. Aprofundou-se a incisão e, delicadamente foi introduzida a haste de um funil de plástico dentro desse corte. Em seguida banhou-se o cérebro durante 3 minutos com nitrogênio líquido para o completo congelamento do órgão [17]. O animal foi decapitado e o cérebro retirado para o isolamento do cerebelo, córtex e hipocampo. Depois de cuidadosamente separadas, cada região foi pesada separadamente e o seu homogenato preparado.

Todos os procedimentos foram realizados em banho de gelo e ambiente climatizado em  $18^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ .

#### **2.4. Preparo dos homogenatos de cerebelo, córtex e hipocampo**

Cada região foi preparada separadamente. Os tecidos foram picotados em um bequer contendo tampão Ringer-fosfato 100 mM (pH 7,4), transferidos para um homogeneizador de Dounce e homogeneizados completamente. Em seguida centrifugou-se a 716 g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 10.332 g por 10 minutos. Neste sobrenadante foram dosados glicose, lactato e piruvato. O precipitado foi utilizado para medir o cobre mitocondrial. Em todos os homogenatos foi realizada a dosagem de proteínas [18].

#### **2.5. Dosagem de glicose**

Foi dosada a glicose no sangue, no LCR e nos homogenatos do cerebelo, córtex e hipocampo. No sangue, a dosagem foi realizada por meio do glicosímetro FreeStyle<sup>®</sup> (OptiumH, Abbott) no momento da punção da veia caudal. Para as dosagens no LCR e nos homogenatos utilizou-se método colorimétrico do Kit da Bioliquid<sup>®</sup> (Pinhais, PR, Brasil). Os resultados foram expressos em mmol/L para sangue e LCR, e em  $\mu\text{mol}$  de glicose g tecido<sup>-1</sup> para os homogenatos de cerebelo, córtex e hipocampo.

#### **2.6. Dosagem de lactato e piruvato no cerebelo, córtex e hipocampo**

Os homogenatos foram primeiramente desproteinizados conforme metodologia adaptada de Detka et. al. (2015) [19] com ácido perclórico 4 mol/L em banho de gelo. Após centrifugação a 13.000 g por 2 minutos o sobrenadante foi retirado, neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L e utilizado para as dosagens.

O lactato foi oxidado a piruvato pelo NAD em reação catalisada pela lactato desidrogenase. A redução de NAD é proporcional ao substrato convertido sendo lido espectrofotometricamente a 340 nm [20]. Da mesma forma, o piruvato é reduzido a lactato pelo NADH na reação enzimática catalisada pela lactato desidrogenase. A oxidação do NADH é proporcional ao substrato convertido, o qual

é medido em 340 nm [21]. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de lactato (ou piruvato).g tecido<sup>-1</sup>.

### **2.7. Dosagem de cobre**

Os teores de cobre no sangue e no cerebelo, córtex e hipocampo foram realizados em um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite VARIAN (Mulgrave, Austrália), modelo AA240Z, com corretor de fundo por efeito Zeeman, com amostrador automático e forno de grafite GTA 120. Foi utilizada uma lâmpada de catodo oco monoelementar de cobre com corrente de 4,5 mA como fonte de radiação, comprimento de onda de 3214,8 nm, largura da fenda de 0,5 nm e gás argônio (99,999% de pureza). As leituras foram efetuadas em absorbância no modo integrado. As soluções de cobre foram preparadas a partir de solução estoque de 1.000 mg/L (Tritisol<sup>®</sup>, Merck, São Paulo) com água ultrapura com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm [22]. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de cobre.L.

### **2.8. Dosagem de ceruloplasmina**

A ceruloplasmina no sangue foi dosada conforme Schosinsky et al., 1974 [23] por espectrofotometria a 540 nm, através de o-dianisidina em pH ácido. Os resultados foram expressos em Unidades de ceruloplasmina/L.

### **2.9. Análise estatística**

O software utilizado para as análises estatísticas foi o GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 6.0 (USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados usando two-way ANOVA, e em caso de significância estatística ( $P < 0,05$ ) foi aplicado o teste de acompanhamento de LSD-Fisher.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Glicose no sangue e no LCR**

A Tabela 1 mostra que as ratas tratadas com tamoxifeno tiveram aumento significativo nos níveis de glicose tanto no sangue (15,7%) quanto no LCR (17,0%) em comparação com as ratas controle, sendo, no entanto, mantida a razão glicose LCR/sangue. No grupo em que se coadministrou a quercetina com o tamoxifeno, os níveis de glicose mantiveram-se próximos aos valores encontrados no grupo controle, porém a razão glicose LCR/sangue foi significativamente maior que nos outros grupos. A quercetina isoladamente, apesar de não se mostrar estatisticamente significativa, aumentou ligeiramente o nível de glicose no sangue, mas não influenciou no teor do LCR; não interferindo também na razão glicose LCR/sangue.

#### **3.2. Glicose no cerebelo, córtex e hipocampo**

A distribuição da glicose nas três regiões do cérebro de todos os grupos mostrou ser maior no hipocampo, seguida pelo cerebelo e por fim, no córtex. O tratamento com tamoxifeno não alterou o nível de glicose no cerebelo, mas causou aumento de 80% e 30,2% no córtex e no hipocampo, respectivamente, quando comparado com as ratas controle. Comparando-se com os grupos controle e apenas tamoxifeno, a coadministração de quercetina com tamoxifeno reduziu significativamente os níveis de glicose em todas as estruturas. O grupo tratado apenas com quercetina diminuiu significativamente a glicose no cerebelo em comparação com as ratas controle, conforme visto na Tabela 2.

#### **3.3. Metabolismo da glicose no cerebelo, córtex e hipocampo**

Na Tabela 3 observa-se que tanto o tamoxifeno quanto a coadministração de quercetina com tamoxifeno não alteraram o perfil metabólico da glicose no cerebelo, enquanto que a quercetina aumentou significativamente a produção de piruvato comparadas com as ratas controle. Já no córtex, a coadministração de tamoxifeno mais quercetina diminuiu significativamente a produção de piruvato quando comparado com os demais grupos (Tabela 4). A Tabela 5 mostra que a produção de lactato foi aumentada no hipocampo de ratas

tratadas apenas com tamoxifeno, comparadas com o grupo controle. A quercetina isoladamente ou em associação com o tamoxifeno manteve os níveis de lactato próximos aos das ratas controle.

### **3.4. Cobre mitocondrial do cerebelo, córtex e hipocampo**

Comparando-se com o grupo controle, a Tabela 6 mostra que o tratamento com tamoxifeno aumentou expressivamente em 152,6% os níveis de cobre mitocondrial no córtex; a coadministração de quercetina com tamoxifeno diminuiu significativamente o cobre tanto no cerebelo quanto no hipocampo, enquanto que aumentou em 65,6% no córtex; e a quercetina isoladamente aumentou o cobre no cerebelo e em 187,2% no córtex.

### **3.5. Cobre plasmático e ceruloplasmina**

O cobre plasmático do grupo tamoxifeno aumentou significativamente em relação ao controle, enquanto que a coadministração de quercetina com tamoxifeno não se mostrou alterada. Em relação à ceruloplasmina, a associação de tamoxifeno com quercetina promoveu um aumento em 80,9%, assim como o grupo tratado apenas com quercetina aumentou em 69,2% em comparação com o grupo controle. As ratas tratadas com tamoxifeno não mostraram alteração na ceruloplasmina, visto na Tabela 7.

#### 4. Discussão

A associação da quercetina com tamoxifeno em ratas ovariectomizadas, que simulam a mulher pós-menopáusia, tem demonstrado benefício na redução dos níveis glicêmicos, trazendo-os, inclusive, para a normalidade como no presente estudo [14]. O aumento da glicemia mediada pelo tamoxifeno, em um período relativamente curto, 14 dias, é uma forte evidência da sua interferência sobre o metabolismo da glicose. Segundo o *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* [24], valores definidos como normais estariam abaixo de 100 mg/dL (5,55 mmol/L). Isso, inclusive, coloca uma dúvida sobre a não influência da quercetina sobre o metabolismo da glicose em indivíduos normoglicêmicos [25], já que, embora não estatisticamente significativa, a glicemia aumentou sensivelmente nas ratas tratadas isoladamente com este flavonoide.

Há um número de mecanismos pelos quais o tamoxifeno pode levar ao quadro hiperglicêmico. Existem evidências na literatura demonstrando alteração na cadeia respiratória pela inibição da energia mitocondrial e pelo estímulo da hidrólise de ATP. O prejuízo à geração e manutenção do potencial eletroquímico da membrana mitocondrial [10] e o insuficiente suprimento de cobre para a citocromo c oxidase I e II [26] levam ao aumento da glicemia por estímulo tanto da glicólise quanto da gliconeogênese para compensar a diminuição da produção energética.

Esta hiperglicemia leva naturalmente ao aumento de glicose no LCR, deixando para a barreira hematoencefálica a regulação do transporte para o cérebro. Na situação normoglicêmica, a passagem controlada da glicose pela barreira hematoencefálica manteve uma razão LCR/Sangue próximo de 0,426. O cérebro por não armazenar energia, requer um fornecimento contínuo de glicose para atender as suas necessidades energéticas, as quais variam nas diferentes regiões cerebrais conforme as suas atividades neuronais [27]. De fato, observamos que, independente do tipo de tratamento, a demanda de glicose é maior no hipocampo, seguida pelo cerebelo e por fim no córtex. Assim como no sangue, o tamoxifeno aumentou os níveis de glicose no cérebro ( $\sim 3,2 \mu\text{mol de glicose.g tecido}^{-1}$ ), o que pode ter contribuído para a razão LCR/Sangue ter se mantido próximo da normalidade. Já o grupo que recebeu quercetina e tamoxifeno, a razão LCR/Sangue foi significativamente maior (0,530), sugerindo que a administração simultânea dessas

duas substâncias contribuí para a diminuição da passagem da glicose para o cérebro, já que o teor total de glicose foi relativamente menor ( $\sim 1,92 \mu\text{mol}$  de glicose.g tecido<sup>-1</sup>) em relação ao controle ( $\sim 2,72 \mu\text{mol}$  de glicose.g tecido<sup>-1</sup>).

O metabolismo da glicose não é um sistema isolado, está fortemente integrado com a fisiologia e com a função cerebral. Todas as regiões do cérebro estão em todos os momentos metabolicamente ativas [28]. O cerebelo, região envolvida na aprendizagem espacial e atividade motora [29], não foi afetado pelo tamoxifeno; enquanto que o tamoxifeno mais quercetina e somente a quercetina diminuíram sensivelmente o nível de glicose, sugerindo que esta diminuição esteja ligada a ação da quercetina. Esta, isoladamente, teve capacidade em deslocar o perfil metabólico para piruvato. Como a energia cerebral é quase que totalmente proveniente da glicose e do piruvato, pode haver conversão do lactato em piruvato para atender a rápida necessidade energética. O piruvato, produto final da glicólise, é uma forte fonte energética que conduz a produção de ATP por fosforilação oxidativa e por múltiplas vias biossintéticas que se cruzam no ciclo do ácido cítrico [30].

Ao contrário do cerebelo, o córtex e o hipocampo demonstraram sensibilidade ao tamoxifeno, com aumento da glicose nessas duas regiões. A expressiva atenuação nos níveis de glicose com a coadministração de tamoxifeno e quercetina foi mais evidente sobre o córtex, inclusive com diminuição significativa na produção de piruvato. A sensível diminuição do lactato, embora não significativa, demonstra o comprometimento energético nessa região. Mesmo que córtex e hipocampo tenham papéis distintos, estas duas regiões, em particular o córtex pré-frontal, interagem fortemente no processo prolongado de consolidação de memórias. É um processo complexo, representado pela organização estrutural de cada região e pela forma de comunicação que ocorre entre elas [31]. O hipocampo, região responsável pela aprendizagem, memória e regulação da ansiedade e do estresse [32] também foi claramente sensível à ação do tamoxifeno, com aumento nos níveis de lactato. Em condições de hipóxia ou dependendo do perfil metabólico celular, em condições aeróbias, o lactato pode ser produzido para servir de ligação entre o metabolismo glicolítico e oxidativo quando os neurônios estão disparando em alta frequência [30, 33]. Lembrando, a maior parte do consumo de energia do cérebro é utilizada para o transporte ativo de íons para sustentar e restaurar os potenciais de membrana descarregados durante o processo de excitação e condução neuronal.

Apesar da integração existente entre as regiões do cérebro, não há surpresa nas diferenças nos perfis metabólicos, dada a heterogeneidade estrutural e funcional de cada região. Mesmo porque o metabolismo energético é dependente, também, de inúmeros processos que envolvem o estado redox da célula, transportadores, cofatores, metais e outros substratos. A literatura relata que um metabolismo mitocondrial defeituoso por deficiência de cobre prejudicaria a utilização de glicose naquela região, podendo levar a danos teciduais. O suprimento insuficiente de cobre para a citocromo c oxidase I e II, enzimas dependentes de cobre, levaria a redução na atividade mitocondrial com consequente alteração no metabolismo da glicose [9]. O cobre também está associado a defesa antioxidante por ativar as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, contribuindo na redução de danos teciduais causados por um desequilíbrio no estado redox da célula ou pela ação de moléculas oxidantes. O hipocampo, em homeostase fisiológica, é a região que contém concentrações mais elevadas de cobre [34], como observado nas ratas controle. A redução significativa de cobre nesta região foi verificada com a coadministração de tamoxifeno e quercetina, porém o perfil metabólico manteve-se inalterado. Tanto o tamoxifeno quanto a quercetina administrados isoladamente conduziram expressivamente ao aumento de cobre no córtex e não influenciaram no cerebelo.

A quantificação de cobre livre e ligado a ceruloplasmina, que tem de 65 a 90% de cobre plasmático ligado, demonstrou que nenhum dos tratamentos conduziu a deficiência de cobre, ao contrário, os tratamentos aumentaram o teor de cobre. Há indícios que o tratamento quimioterápico com tamoxifeno aumenta os níveis de cobre plasmático [35], o mesmo foi observado no grupo de ratas que recebeu apenas tamoxifeno. Curiosamente, os grupos em que foi administrada quercetina, com reconhecida ação quelante do cobre [36] mantiveram o teor de cobre plasmático próximo dos valores do grupo controle, enquanto que a ceruloplasmina aumentou significativamente. A literatura não traz nenhuma informação adicional sobre isso.

Fato interessante evidenciado por este estudo foi que a ação hiperglicêmica do tamoxifeno não se restringe apenas a efeitos metabólicos hepáticos, ultrapassando para regiões nobres do cérebro, como o hipocampo; sugerindo que a barreira hematoencefálica permite um fluxo maior de glicose para o cérebro nos estados hiperglicêmicos. No processo de neurodegeneração o cerebelo, o córtex e o hipocampo são regiões propensas a sofrer relativamente pouco,

moderado e graves danos neuronais, respectivamente. Assim, a mudança no perfil metabólico em algumas regiões, como o hipocampo, é preocupante considerando que isto pode levar a danos teciduais, que por sua vez podem ser precursores de um processo neurodegenerativo. A quercetina, quando associada ao tamoxifeno, pode minimizar os efeitos causados por esse medicamento, entretanto o mesmo não é verdadeiro quando se tem este flavonoide isoladamente, isto mostra que ainda há necessidade de aprofundar os estudos sobre a sua capacidade neuroprotetora.

Embora o estudo seja com animais, a possibilidade de utilização destes modelos simulando a mulher saudável no período pós-menopáusicos em tratamento quimiopreventivo com tamoxifeno traz a vantagem de ser um estudo praticamente controlado, minimizando interferentes psíquicos e ambientais. A alimentação regular e balanceada, o alojamento em ambiente climatizado, sem extremos de estresse são condições favoráveis que ajudam a manter em equilíbrio o metabolismo energético cerebral. Isto é relevante, pois, nos admite observar, com o mínimo de interferência, alterações metabólicas que os tratamentos utilizados causaram, além da possibilidade de avaliar diretamente o tecido cerebral. Outro ponto que se deve considerar é a semelhança metabólica entre o rato e o homem, que nos permite com segurança extrapolar os dados aqui encontrados para a mulher.

## **Conclusão**

As descobertas do presente estudo enfatizam a necessidade de acompanhar os níveis glicêmicos em mulheres pós-menopáusicas sob tratamento com tamoxifeno, considerando-se que mesmo teores de glicemia ligeiramente elevados são fatores de risco para a saúde cerebral, em especial do hipocampo; e que se deve ter cautela em utilizar a quercetina juntamente com o tamoxifeno, pois esta associação diminuiu expressivamente a glicose no cérebro. O gerenciamento adequado dos níveis de glicose contribuirá diretamente para um envelhecimento mais saudável, principalmente sobre a saúde cerebral.

Tabela 1 Níveis de glicose no sangue e no líquido cefalorraquidiano nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Sangue		LCR		Razão Líquor/Sangue
	(mM)	(mg/dL)	(mM)	(mg/dL)	
CONT	5,47 ± 0,250	98,6 ± 4,40	2,30 ± 0,0887	41,4 ± 1,60	0,426 ± 0,0157
TAM	6,33 ± 0,346*	114,1 ± 6,23*	2,69 ± 0,123**	48,7 ± 2,22**	0,412 ± 0,0194
TAMQ	5,37 ± 0,280 <sup>†</sup>	96,8 ± 5,05 <sup>†</sup>	2,68 ± 0,150	48,3 ± 2,70	0,530 ± 0,0313** <sup>††</sup> <sup>°°</sup>
QUER	6,01 ± 0,336	108,3 ± 6,05	2,36 ± 0,0909 <sup>†</sup>	42,5 ± 1,64 <sup>†</sup>	0,403 ± 0,0244

\*P < 0,05; \*\*P < 0,005 comparado com o grupo controle

<sup>†</sup>P < 0,05; <sup>††</sup>P < 0,005 comparado com o grupo tamoxifeno

<sup>°°</sup>P < 0,005 comparado com o grupo quercetina

Tabela 2 Teor de glicose no cerebelo, córtex e hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Cerebelo	Córtex	Hipocampo
	(μmol.g tecido <sup>-1</sup> )		
CONT	1,18 ± 0,0696	0,250 ± 0,0379	1,29 ± 0,133
TAM	1,07 ± 0,0371	0,450 ± 0,0153****	1,68 ± 0,163*
TAMQ	0,640 ± 0,0675***††	0,133 ± 0,0149****†††† <sup>e</sup>	1,15 ± 0,0911††
QUER	0,738 ± 0,0548***††	0,198 ± 0,00750††††	1,13 ± 0,102††

\*P < 0,05; \*\*P < 0,005; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001 comparado com o grupo controle

††P < 0,005; †††P < 0,001; ††††P < 0,0001 comparado com o grupo tamoxifeno

<sup>e</sup>P < 0,05 comparado com o grupo quercetina

Tabela 3 Níveis de piruvato e lactato no cerebelo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Glicose	Piruvato	Lactato
	(μmol.g tecido <sup>-1</sup> )		
CONT	1,18 ± 0,0696	1,61 ± 0,0860	1,19 ± 0,351
TAM	1,07 ± 0,0371	1,67 ± 0,109	0,938 ± 0,090
TAMQ	0,640 ± 0,0675***††	1,73 ± 0,041	1,12 ± 0,101
QUER	0,738 ± 0,0548***††	1,86 ± 0,144*†	0,945 ± 0,100

\*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001 comparado com o grupo controle

†P < 0,05; ††P < 0,005; †††P < 0,001 comparado com o grupo tamoxifeno

Tabela 4 Níveis de piruvato e lactato no córtex nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Glicose	Piruvato	Lactato
	(μmol.g tecido <sup>-1</sup> )		
CONT	0,250 ± 0,0379	1,79 ± 0,171	1,02 ± 0,251
TAM	0,450 ± 0,0153****	1,90 ± 0,249	1,06 ± 0,159
TAMQ	0,133 ± 0,0149**†††† <sup>o</sup>	1,46 ± 0,070*†† <sup>eo</sup>	0,768 ± 0,150
QUER	0,198 ± 0,0075††††	1,98 ± 0,091	1,10 ± 0,98

\*P < 0,05; \*\*P < 0,005; \*\*\*\*P < 0,0001 comparado com o grupo controle

††P < 0,005; ††††P < 0,0001 comparado com o grupo tamoxifeno

<sup>o</sup>P < 0,05; <sup>eo</sup>P < 0,005 comparado com o grupo quercetina

Tabela 5 Níveis de piruvato e lactato no hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Glicose	Piruvato	Lactato
	(μmol.g tecido <sup>-1</sup> )		
CONT	1,29 ± 0,133	11,8 ± 1,008	4,64 ± 0,213
TAM	1,68 ± 0,163*	14,3 ± 0,939	5,46 ± 0,132*
TAMQ	1,15 ± 0,0911 <sup>††</sup>	13,4 ± 1,097	4,66 ± 0,160 <sup>†</sup>
QUER	1,13 ± 0,102 <sup>††</sup>	12,0 ± 0,796	4,53 ± 0,330 <sup>††</sup>

\*P < 0,05 comparado com o grupo controle

<sup>†</sup>P < 0,05; <sup>††</sup>P < 0,005 comparado com o grupo tamoxifeno

Tabela 6 Teor de cobre mitocondrial no cerebello, córtex e hipocampo nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Cerebello	Córtex	Hipocampo
	(µg/L)		
CONT	93,4 ± 2,03	57,8 ± 3,79	116,0 ± 7,09
TAM	71,6 ± 8,66	146,0 ± 6,99**	102,0 ± 7,13
TAMQ	62,2 ± 13,8 <sup>oo</sup>	95,7 ± 9,81 <sup>o</sup>	56,6 ± 7,82****††† <sup>ooo</sup>
QUER	122,2 ± 11,5 <sup>†</sup>	166,0 ± 20,4***	105,0 ± 9,98

\*\*P < 0,005; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001 comparado com o grupo controle

†P < 0,05; ††P < 0,001 comparado com o grupo tamoxifeno

<sup>o</sup>P < 0,05; <sup>oo</sup>P < 0,005; <sup>ooo</sup>P < 0,001 comparado com o grupo quercetina

Tabela 7 Níveis de ceruloplasmina e cobre no plasma nos diferentes grupos de ratas ovariectomizadas

Grupo	Cobre ( $\mu\text{g/L}$ )	Ceruloplasmina (U/L)
CONT	605,0 $\pm$ 36,6	43,5 $\pm$ 2,38
TAM	878,0 $\pm$ 55,0 <sup>***</sup>	44,7 $\pm$ 3,13
TAMQ	627,0 $\pm$ 55,8 <sup>††</sup>	77,5 $\pm$ 2,70 <sup>****†††</sup>
QUER	615,0 $\pm$ 55,3 <sup>†††</sup>	73,6 $\pm$ 3,42 <sup>****†††</sup>

\*\*\*P < 0,005; \*\*\*\*P < 0,0001 comparado com o grupo controle

††P < 0,005; †††P < 0,001; ††††P < 0,001 comparado com o grupo tamoxifeno

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta investigação nos permite concluir que:

- O transporte de glicose do líquido cefalorraquidiano para o cérebro é menor nos animais em que foi coadministrada quercetina mais tamoxifeno,
- O teor de glicose diminui significativamente no cerebelo e no córtex, enquanto que no hipocampo é inalterado na coadministração de quercetina com tamoxifeno.
- O perfil metabólico no córtex é alterado, com diminuição na produção de piruvato nos animais tratados com quercetina mais tamoxifeno.
- O teor de cobre apresenta-se significativamente menor no hipocampo dos animais que receberam quercetina mais tamoxifeno.
- A quercetina isoladamente diminui a glicose no cerebelo e aumenta a produção de lactato.
- Os níveis de glicose são significativamente maiores no sangue, no líquido cefalorraquidiano, no córtex e no hipocampo dos animais tratados apenas com tamoxifeno.
- O tamoxifeno isoladamente altera o perfil metabólico no hipocampo com aumento da produção de lactato.
- Independente do tratamento, os maiores níveis de glicose são no hipocampo, cerebelo e por fim córtex.
- O tratamento quimiopreventivo em mulheres pós-menopáusicas com tamoxifeno é um risco para a saúde cerebral, em especial do hipocampo; e a associação de quercetina ao tratamento com tamoxifeno, embora normalize os níveis glicêmicos, não é uma alternativa viável para a saúde cerebral.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 6.1 Referências da revisão bibliográfica

ABDELMOATY, M. A.; IBRAHIM, M. A.; AHMED, N. S.; ABDELAZIZ, M. A. Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 188-192, 2010.

ALIEV, G.; OBRENOVICH, M. E.; REDDY, V. P.; SHENK, J. C.; MOREIRA, P. I.; NUNOMURA, A.; ZHU, X.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 13, p. 1395-406, Nov 2008.

AREVALO, M. A.; RUIZ-PALMERO, I.; SCERBO, M. J.; ACAZ-FONSECA, E.; CAMBIASSO, M. J.; GARCIA-SEGURA, L. M. Molecular mechanisms involved in the regulation of neuritogenesis by estradiol: Recent advances. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 131, n. 1-2, p. 52-6, Aug 2012.

ATTWELL, D.; BUCHAN, A.; CHARPAK, S.; LAURITZEN, M.; A MACVICAR, B.; A NEWMAN, E. Glial and neuronal control of brain blood flow. **Nature**, p. 232-43, 2010.

BAIRD, T. A.; PARSONS, M. W.; BARBER, P. A.; BUTCHER, K. S.; DESMOND, P. M.; TRESS, B. M.; COLMAN, P. G.; JERUMS, G.; CHAMBERS, B. R.; DAVIS, S. M. The influence of diabetes mellitus and hyperglycaemia on stroke incidence and outcome. **J Clin Neurosci**, v. 9, n. 6, p. 618-26, Nov 2002.

BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, H. S. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 10, p. 1285-97, Oct 2006.

BALDERESCHI, M.; DI CARLO, A.; LEPORE, V.; BRACCO, L.; MAGGI, S.; GRIGOLETTO, F.; SCARLATO, G.; AMADUCCI, L. Estrogen-replacement therapy and Alzheimer's disease in the Italian Longitudinal Study on Aging. **Neurology**, v. 50, n. 4, p. 996-1002, Apr 1998.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 1999.

BEGG, D. P. Insulin transport into the brain and cerebrospinal fluid. **Vitam Horm**, v. 98, p. 229-48, 2015.

BENARROCH, E. E. Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. **Neurology**, v. 82, n. 15, p. 1374-9, Apr 15 2014.

BENDER, C. M.; SEREIKA, S. M.; BERGA, S. L.; VOGEL, V. G.; BRUFISKY, A. M.; PARASKA, K. K.; RYAN, C. M. Cognitive impairment associated with adjuvant therapy in breast cancer. **Psychooncology**, v. 15, n. 5, p. 422-30, May 2006.

BENEDICT, C.; HALLSCHMID, M.; HATKE, A.; SCHULTES, B.; FEHM, H. L.; BORN, J.; KERN, W. Intranasal insulin improves memory in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 10, p. 1326-34, Nov 2004.

BIESSELS, G. J.; STAEKENBORG, S.; BRUNNER, E.; BRAYNE, C.; SCHELTENS, P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 1, p. 64-74, Jan 2006.

BISHOP, N. A.; LU, T.; YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 529-35, Mar 25 2010.

BLAZQUEZ, E.; VELAZQUEZ, E.; HURTADO-CARNEIRO, V.; RUIZ-ALBUSAC, J. M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 161, 2014.

BOUMEZBEUR, F.; PETERSEN, K. F.; CLINE, G. W.; MASON, G. F.; BEHAR, K. L.; SHULMAN, G. I.; ROTHMAN, D. L. The contribution of blood lactate to brain energy metabolism in humans measured by dynamic <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J Neurosci**, v. 30, n. 42, p. 13983-91, Oct 20 2010.

BOWLING, A. C.; MUTISYA, E. M.; WALKER, L. C.; PRICE, D. L.; CORK, L. C.; BEAL, M. F. Age-dependent impairment of mitochondrial function in primate brain. **J Neurochem**, v. 60, n. 5, p. 1964-7, May 1993.

BREUER, B.; ANDERSON, R. The relationship of tamoxifen with dementia, depression, and dependence in activities of daily living in elderly nursing home residents. **Women Health**, v. 31, n. 1, p. 71-85, 2000.

BRINTON, R. D. Investigative models for determining hormone therapy-induced outcomes in brain: evidence in support of a healthy cell bias of estrogen action. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1052, p. 57-74, Jun 2005.

BRINTON, R. D. The healthy cell bias of estrogen action: mitochondrial bioenergetics and neurological implications. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 10, p. 529-37, Oct 2008.

BRINTON, R. D. Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 4, p. 212-22, Apr 2009.

CARDOSO, C. M.; CUSTODIO, J. B.; ALMEIDA, L. M.; MORENO, A. J. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 176, n. 3, p. 145-52, Nov 01 2001.

CARUANA, M.; CAUCHI, R.; VASSALLO, N. Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Front Nutr**, v. 3, p. 31, 2016.

CASAS-GRAJALES, S.; MURIEL, P. Antioxidants in liver health. **World J Gastrointest Pharmacol Ther**, v. 6, n. 3, p. 59-72, Aug 06 2015.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. **Prog Neurobiol**, v. 108, p. 21-43, Sep 2013.

CHENG, C. M.; COHEN, M.; WANG, J.; BONDY, C. A. Estrogen augments glucose transporter and IGF1 expression in primate cerebral cortex. **FASEB J**, v. 15, n. 6, p. 907-15, Apr 2001.

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacol Res**, v. 51, n. 2, p. 117-23, Feb 2005.

COSTA, L. G.; GARRICK, J. M.; ROQUE, P. J.; PELLACANI, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 2986796, 2016.

COTTRELL, D. A.; BORTHWICK, G. M.; JOHNSON, M. A.; INCE, P. G.; TURNBULL, D. M. The role of cytochrome c oxidase deficient hippocampal neurones in Alzheimer's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 28, n. 5, p. 390-6, Oct 2002.

CRAFT, S. Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 65-9, Dec 2005.

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

CUNNANE, S.; NUGENT, S.; ROY, M.; COURCHESNE-LOYER, A.; CROTEAU, E.; TREMBLAY, S.; CASTELLANO, A.; PIFFERI, F.; BOCTI, C.; PAQUET, N.; BEGDOURI, H.; BENTOURKIA, M.; TURCOTTE, E.; ALLARD, M.; BARBERGER-GATEAU, P.; FULOP, T.; RAPOPORT, S. I. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. **Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 3-20, Jan 2011.

DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MARTINEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochem Int**, v. 89, p. 140-8, Oct 2015.

DANEMAN, R. The blood-brain barrier in health and disease. **Ann Neurol**, v. 72, n. 5, p. 648-72, Nov 2012.

DAVIS, J. M.; MURPHY, E. A.; CARMICHAEL, M. D.; DAVIS, B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 4, p. R1071-7, Apr 2009.

DE ANDRADE RAMOS, B. R.; WITKIN, S. S. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome. **Cell Stress Chaperones**, v. 21, n. 5, p. 755-62, Sep 2016.

DE LA MONTE, S. M. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimers disease: mini-review. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 12, p. 1954-60, Dec 2014.

DE LA MONTE, S. M.; LONGATO, L.; TONG, M.; WANDS, J. R. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 10, n. 10, p. 1049-60, Oct 2009.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 7, n. 1, p. 45-61, Feb 2005.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, Nov 2008.

DE OLIVEIRA, M. R.; NABAVI, S. M.; BRAIDY, N.; SETZER, W. N.; AHMED, T.; NABAVI, S. F. Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view. **Biotechnol Adv**, v. 34, n. 5, p. 532-49, Sep-Oct 2016.

DENK, F.; RAMER, L. M.; ERSKINE, E. L.; 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 Neuropathol Commun**, v. 3, p. 74, Nov 26 2015.

DING, F.; LUO, J.; YAO, J.; MAO, Z.; CHEN, S.; CHEN, K.; REIMAN, E.; BRINTON, R. Ovarian hormone loss induced decline in glucose availability and shift to alternative substrates in brain. **Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association**, v. 8, n. 4, p. P153, 2012.

DING, F.; YAO, J.; RETTBERG, J. R.; CHEN, S.; BRINTON, R. D. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for bioenergetic intervention. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79977, 2013.

DONG, Y. S.; WANG, J. L.; FENG, D. Y.; QIN, H. Z.; WEN, H.; YIN, Z. M.; GAO, G. D.; 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. 282-90, 2014.

DORSEMANS, A. C.; COURET, D.; HOARAU, A.; MEILHAC, O.; LEFEBVRE D'HELLEN COURT, C.; DIOTEL, N. Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and zebrafish models. **Neurogenesis (Austin)**, v. 4, n. 1, p. e1281862, 2017.

DOS SANTOS, H. S.; CRUZ, W. M. D. S. A Terapia Nutricional com Vitaminas Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico Oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, 2001.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 649-71, Dec 2000.

DUTERTRE, M.; SMITH, C. L. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, n. 2, p. 431-7, Nov 2000.

ERNST, T.; CHANG, L.; COORAY, D.; SALVADOR, C.; JOVICICH, J.; WALOT, I.; BOONE, K.; CHLEBOWSKI, R. The effects of tamoxifen and estrogen on brain metabolism in elderly women. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 8, p. 592-7, Apr 17 2002.

EUSER, S. M.; SATTAR, N.; WITTEMAN, J. C.; BOLLEN, E. L.; SIJBRANDS, E. J.; HOFMAN, A.; PERRY, I. J.; BRETELER, M. M.; WESTENDORP, R. G. A prospective analysis of elevated fasting glucose levels and cognitive function in older people: results from PROSPER and the Rotterdam Study. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1601-7, Jul 2010.

FALKOWSKA, A.; GUTOWSKA, I.; GOSCHORSKA, M.; NOWACKI, P.; CHLUBEK, D.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 11, p. 25959-81, Oct 29 2015.

FISKUM, G.; MURPHY, A. N.; BEAL, M. F. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, n. 4, p. 351-69, Apr 1999.

FORMIGA, F.; REÑE, R.; PÉREZ-MARAVER, M. Dementia and diabetes: Casual or causal relationship? **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 144, n. 4, p. 176-180, 2015.

FRACKIEWICZ, E. J.; CUTLER, N. R. Women's health care during the perimenopause. **J Am Pharm Assoc (Wash)**, v. 40, n. 6, p. 800-11, Nov-Dec 2000.

GAETANI, G. F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A. M.; KIRKMAN, H. N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 334-9, Jan 1989.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-75, Jun 2001.

GOETZ, M. P.; KAMAL, A.; AMES, M. M. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. **Clin Pharmacol Ther**, v. 83, n. 1, p. 160-6, Jan 2008.

GOLD, P. E. Glucose and age-related changes in memory. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 60-4, Dec 2005.

GONZALEZ-REYES, R. E.; ALIEV, G.; AVILA-RODRIGUES, M.; BARRETO, G. E. Alterations in Glucose Metabolism on Cognition: A Possible Link Between Diabetes and Dementia. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 7, p. 812-8, 2016.

GREENLEE, H.; GAMMON, M. D.; ABRAHAMSON, P. E.; GAUDET, M. M.; TERRY, M. B.; HERSHMAN, D. L.; DESAI, M.; TEITELBAUM, S. L.; NEUGUT, A. I.; JACOBSON, J. S. Prevalence and predictors of antioxidant supplement use during breast cancer treatment: the Long Island Breast Cancer Study Project. **Cancer**, v. 115, n. 14, p. 3271-82, Jul 15 2009.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmac**, v. 56, n. 9, p. 683-7, Sep 2001.

GUO, Y.; BRUNO, R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 3, p. 201-10, Mar 2015.

HAAN, M. N. Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 3, p. 159-66, Mar 2006.

HERRERA, J. L.; FERNANDEZ, C.; DIAZ, M.; CURY, D.; MARIN, R. Estradiol and tamoxifen differentially regulate a plasmalemmal voltage-dependent anion channel involved in amyloid-beta induced neurotoxicity. **Steroids**, v. 76, n. 9, p. 840-4, Aug 2011.

HERTOG, M. G.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutr Cancer**, v. 20, n. 1, p. 21-9, 1993.

HLADKY, S. B.; BARRAND, M. A. Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. **Fluids Barriers CNS**, v. 13, n. 1, p. 19, Oct 31 2016.

HOYER, S.; NITSCH, R.; OESTERREICH, K. Predominant abnormality in cerebral glucose utilization in late-onset dementia of the Alzheimer type: a cross-sectional comparison against advanced late-onset and incipient early-onset cases. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 1991.

IDO, Y.; CHANG, K.; WOOLSEY, T. A.; WILLIAMSON, J. R. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. **FASEB J**, v. 15, n. 8, p. 1419-21, Jun 2001.

IRWIN, R. W.; YAO, J.; HAMILTON, R. T.; CADENAS, E.; BRINTON, R. D.; NILSEN, J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 3167-75, Jun 2008.

ISHISAKA, A.; ICHIKAWA, S.; SAKAKIBARA, H.; PISKULA, M. K.; NAKAMURA, T.; KATO, Y.; ITO, M.; MIYAMOTO, K.; TSUJI, A.; KAWAI, Y.; TERAOKA, J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 7, p. 1329-36, Oct 01 2011.

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. **Mol Pharm**, v. 10, n. 9, p. 3459-74, Sep 03 2013.

JENKINS, V.; SHILLING, V.; FALLOWFIELD, L.; HOWELL, A.; HUTTON, S. Does hormone therapy for the treatment of breast cancer have a detrimental effect on memory and cognition? A pilot study. **Psychooncology**, v. 13, n. 1, p. 61-6, Jan 2004.

JORDAN, V. C. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S269-76, Jan 2006.

KANDIMALLA, R.; THIRUMALA, V.; REDDY, P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 5, p. 1078-1089, May 2017.

KANG, S.; LEE, Y. H.; LEE, J. E. Metabolism-Centric Overview of the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Yonsei Med J**, v. 58, n. 3, p. 479-488, May 2017.

KAWAI, Y.; SAITO, S.; NISHIKAWA, T.; ISHISAKA, A.; MUROTA, K.; TERAOKA, J. Different profiles of quercetin metabolites in rat plasma: comparison of two administration methods. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 3, p. 517-23, Mar 23 2009.

KIM, J. H.; CHO, H. T.; KIM, Y. J. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. **Endocr J**, v. 61, n. 11, p. 1055-67, 2014.

KODL, C. T.; SEAQUIST, E. R. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. **Endocr Rev**, v. 29, n. 4, p. 494-511, Jun 2008.

KORF, E. S.; WHITE, L. R.; SCHELTENS, P.; LAUNER, L. J. Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia Aging Study. **Diabetes Care**, v. 29, n. 10, p. 2268-74, Oct 2006.

KOSTANYAN, A.; NAZARYAN, K. Rat brain glycolysis regulation by estradiol-17 beta. **Biochim Biophys Acta**, v. 1133, n. 3, p. 301-6, Feb 03 1992.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Altern Med Rev**, v. 5, n. 3, p. 196-208, Jun 2000.

LE MAY, C.; CHU, K.; HU, M.; ORTEGA, C. S.; SIMPSON, E. R.; KORACH, K. S.; TSAI, M. J.; MAUVAIS-JARVIS, F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 24, p. 9232-7, Jun 13 2006.

LI, J.; LIU, D.; SUN, L.; LU, Y.; ZHANG, Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. **J Neurol Sci**, v. 317, n. 1-2, p. 1-5, Jun 15 2012.

LIMA, M. M.; TARGA, A. D.; NOSEDA, A. C.; RODRIGUES, L. S.; DELATTRE, A. M.; DOS SANTOS, F. V.; FORTES, M. H.; MATURANA, M. J.; FERRAZ, A. C. Does Parkinson's disease and type-2 diabetes mellitus present common pathophysiological mechanisms and treatments? **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 3, p. 418-28, Apr 2014.

LINSEMAN, D. A. Targeting oxidative stress for neuroprotection. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 421-4, Mar 2009.

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. 2615-22, May 15 2012.

LOVE , R. R.; MAZESS , R. B.; BARDEN , H. S.; EPSTEIN , S.; NEWCOMB , P. A.; JORDAN , V. C.; CARBONE , P. P.; DEMETS , D. L. Effects of Tamoxifen on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 13, p. 852-856, 1992.

LUCHSINGER, J. A.; SMALL, S.; BIESSELS, G. J. Should we target insulin resistance to prevent dementia due to Alzheimer disease? **Arch Neurol**, v. 68, n. 1, p. 17-8, Jan 2011.

MAALIK, A.; KHAN, A. 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. 9, 2014.

MANNELLA, P.; BRINTON, R. D. Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. **J Neurosci**, v. 26, n. 37, p. 9439-47, Sep 13 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.; ITINOSE, A. M.; TAKEMOTO, Q. H.; TOLEDO, A. G.; SILVA, F. C. Quercetin Interferes in the Acetylcholinesterase Activity-Modulated by Tamoxifen in Brain of the Ovariectomized Rats. **J Complement Med Alt Healthcare**, v. 1, n. 1, p. 4, 2016.

MAREK, C. B.; PERALTA, R. M.; ITINOSE, A. M.; BRACHT, A. Influence of tamoxifen on gluconeogenesis and glycolysis in the perfused rat liver. **Chem Biol Interact**, v. 193, n. 1, p. 22-33, Aug 15 2011.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 25 1969.

MCCRIMMON, R. J.; SHERWIN, R. S. Hypoglycemia in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2333-2339, 2010.

MCEWEN, B. S.; ALVES, S. E. Estrogen actions in the central nervous system. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 279-307, Jun 1999.

MCEWEN, B. S.; REAGAN, L. P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 13-24, Apr 19 2004.

MIQUEL, J.; ECONOMOS, A. C.; FLEMING, J.; JOHNSON, J. E., JR. Mitochondrial role in cell aging. **Exp Gerontol**, v. 15, n. 6, p. 575-91, 1980.

MOREIRA, P. I.; SANTOS, M. S.; SEICA, R.; OLIVEIRA, C. R. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. **J Neurol Sci**, v. 257, n. 1-2, p. 206-14, Jun 15 2007.

MOSCONI, L.; BRYNS, M.; SWITALSKI, R.; MISTUR, R.; GLODZIK, L.; PIRRAGLIA, E.; TSUI, W.; DE SANTI, S.; DE LEON, M. J. Maternal family history of Alzheimer's disease predisposes to reduced brain glucose metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 48, p. 19067-72, Nov 27 2007.

MURPHY, D. G.; DECARLI, C.; MCINTOSH, A. R.; DALY, E.; MENTIS, M. J.; PIETRINI, P.; SZCZEPANIK, J.; SCHAPIRO, M. B.; GRADY, C. L.; HORWITZ, B.; RAPOPORT, S. I. Sex differences in human brain morphometry and metabolism: an in vivo quantitative magnetic resonance imaging and positron emission tomography study on the effect of aging. **Arch Gen Psychiatry**, v. 53, n. 7, p. 585-94, Jul 1996.

NEWHOUSE, P.; DUMAS, J. Estrogen-cholinergic interactions: Implications for cognitive aging. **Horm Behav**, v. 74, p. 173-85, Aug 2015.

NIEOULLON, A. Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 9, n. 4, p. 173-183, 2011/01/01/2011.

O'REGAN, R. M.; JORDAN, V. C. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 4, p. 207-214, 2002.

PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, V. W. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease. **Arch Intern Med**, v. 156, n. 19, p. 2213-7, Oct 28 1996.

PALMER, A. M. The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 106, n. 3-4, p. 317-28, 1999.

PATET, C.; SUYS, T.; CARTERON, L.; ODDO, M. Cerebral Lactate Metabolism After Traumatic Brain Injury. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 16, n. 4, p. 31, Apr 2016.

PELICANO, H.; XU, R. H.; DU, M.; FENG, L.; SASAKI, R.; CAREW, J. S.; HU, Y.; RAMDAS, L.; HU, L.; KEATING, M. J.; ZHANG, W.; PLUNKETT, W.; HUANG, P. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. **J Cell Biol**, v. 175, n. 6, p. 913-23, Dec 18 2006.

PELLERIN, L.; BERGERSEN, L. H.; HALESTRAP, A. P.; PIERRE, K. Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 55-64, Jan 1-15 2005.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10625-10629, 1994.

PENOTTI, M.; FARINA, M.; SIRONI, L.; BARLETTA, L.; GABRIELLI, L.; VIGNALI, M. Cerebral artery blood flow in relation to age and menopausal status. **Obstet Gynecol**, v. 88, n. 1, p. 106-9, Jul 1996.

PHILLIPS, S. M.; SHERWIN, B. B. Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 17, n. 5, p. 485-495, 1992.

PINKERTON, J. V.; THOMAS, S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 142, p. 142-54, Jul 2014.

PORRAS, O. H.; RUMINOT, I.; LOAIZA, A.; BARROS, L. F. Na(+)-Ca(2+) cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. **Glia**, v. 56, n. 1, p. 59-68, Jan 01 2008.

PRASAD, S.; SAJJA, R. K.; NAIK, P.; CUCULLO, L. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. **J Pharmacovigil**, v. 2, n. 2, p. 125, Jun 2014.

REGALADO DOÑA, P. J.; AZPIAZU ARTIGAS, P.; SÁNCHEZ GUERRA, M. L.; ALMENAR MONFORT, C. Factores de riesgo vascular y enfermedad de Alzheimer. **Revista Española de Geriatria y Gerontología**, v. 44, n. 2, p. 98-105, 2009.

REGER, M. A.; WATSON, G. S.; FREY, W. H., 2ND; BAKER, L. D.; CHOLERTON, B.; KEELING, M. L.; BELONGIA, D. A.; FISHEL, M. A.; PLYMATE, S. R.; SCHELLENBERG, G. D.; CHERRIER, M. M.; CRAFT, S. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 3, p. 451-8, Mar 2006.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Front Neuroendocrinol**, v. 35, n. 1, p. 8-30, Jan 2014.

RODER, P. V.; WU, B.; LIU, Y.; HAN, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Exp Mol Med**, v. 48, p. e219, Mar 11 2016.

RUSSELL, R. L.; SIEDLAK, S. L.; RAINA, A. K.; BAUTISTA, J. M.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulfhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. **Arch Biochem Biophys**, v. 370, n. 2, p. 236-9, Oct 15 1999.

SABOGAL-GUAQUETA, A. M.; MUNOZ-MANCO, J. I.; RAMIREZ-PINEDA, J. R.; LAMPREA-RODRIGUEZ, M.; OSORIO, E.; CARDONA-GOMEZ, 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. 134-45, Jun 2015.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 1, p. 48-56, Jan 2005.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, n. 5, p. 364-71, Sep-Oct 2004.

SCHROEDER, J. P.; PACKARD, M. G. Systemic or intra-amygdala injections of glucose facilitate memory consolidation for extinction of drug-induced conditioned reward. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1482-8, Apr 2003.

SHEPHERD, J. E. Effects of estrogen on cognition mood, and degenerative brain diseases. **J Am Pharm Assoc (Wash)**, v. 41, n. 2, p. 221-8, Mar-Apr 2001.

SHERWIN, B. B.; HENRY, J. F. Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, n. 1, p. 88-113, Jan 2008.

SILVA, F. C.; BRAMATTI, I. C.; TOLEDO, A. G.; SALLES, F. M.; ITINOSE, A. M.; MAREK, C. B. Antihyperglycemic Effect of Quercetin in Ovariectomized Rats Treated with Tamoxifen. **J Med Food**, v. 20, n. 3, p. 235-242, Mar 2017.

SIMPSON, I. A.; DWYER, D.; MALIDE, D.; MOLEY, K. H.; TRAVIS, A.; VANNUCCI, S. J. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 2, p. E242-53, Aug 2008.

SINGH, M.; SUMIEN, N.; KYSER, C.; SIMPKINS, J. W. Estrogens and progesterone as neuroprotectants: what animal models teach us. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 1083-1089, 2008.

STUENKEL, C. A. Menopause, hormone therapy and diabetes. **Climacteric**, v. 20, n. 1, p. 11-21, Feb 2017.

SUGANTHY, N.; DEVI, K. P.; NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. M. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 892-908, Dec 2016.

SUN, L. M.; CHEN, H. J.; LIANG, J. A.; LI, T. C.; KAO, C. H. Association of tamoxifen use and increased diabetes among Asian women diagnosed with breast cancer. **Br J Cancer**, v. 111, n. 9, p. 1836-42, Oct 28 2014.

TAI, H. C.; SERRANO-POZO, A.; HASHIMOTO, T.; FROSCH, M. P.; SPIRES-JONES, T. L.; HYMAN, B. T. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. **Am J Pathol**, v. 181, n. 4, p. 1426-35, Oct 2012.

TANZI, R. E.; BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 545-55, Feb 25 2005.

TOTA, S.; AWASTHI, H.; KAMAT, P. K.; NATH, C.; HANIF, K. Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. **Behav Brain Res**, v. 209, n. 1, p. 73-9, May 01 2010.

VAN DE VEN, K. C.; DE GALAN, B. E.; VAN DER GRAAF, M.; SHESTOV, A. A.; HENRY, P. G.; TACK, C. J.; HEERSCHAP, A. Effect of acute hypoglycemia on human cerebral glucose metabolism measured by (1)(3)C magnetic resonance spectroscopy. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1467-73, May 2011.

VAN DER WOUDE, H.; BOERSMA, M. G.; VERVOORT, J.; RIETJENS, I. M. Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. **Chem Res Toxicol**, v. 17, n. 11, p. 1520-30, Nov 2004.

VANČOVÁ, O. G.; BAČIAK, L.; KAŠPAROVÁ, S.; KUCHARSKÁ, J.; PALACIOS, H. H.; HORECKÝ, J.; ALIEV, G. In vivo and in vitro assessment of brain bioenergetics in aging rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 11, p. 2667-2674, 2010.

VERDILE, G.; KEANE, K. N.; CRUZAT, V. F.; MEDIC, S.; SABALE, M.; ROWLES, J.; WIJESEKARA, N.; MARTINS, R. N.; FRASER, P. E.; NEWSHOLME, P. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 105828, 2015.

VINA, J.; SASTRE, J.; PALLARDO, F. V.; GAMBINI, J.; BORRAS, C. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. **Free Radic Res**, v. 40, n. 12, p. 1359-65, Dec 2006.

WALTON, C.; GODSLAND, I. F.; PROUDLER, A. J.; WYNN, V.; STEVENSON, J. C. The effects of the menopause on insulin sensitivity, secretion and elimination in non-obese, healthy women. **Eur J Clin Invest**, v. 23, n. 8, p. 466-73, Aug 1993.

WANG, X.; SU, B.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. Insights into amyloid- $\beta$ -induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 12, p. 1569-1573, 2007.

WANG, X.; SU, B.; ZHENG, L.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; ZHU, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, v. 109 Suppl 1, p. 153-9, May 2009.

WENDER, R.; BROWN, A. M.; FERN, R.; SWANSON, R. A.; FARRELL, K.; RANSOM, B. R. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. **J Neurosci**, v. 20, n. 18, p. 6804-10, Sep 15 2000.

XIAO, J.; CAPANOGLU, E.; JASSBI, A. R.; MIRON, A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 56 Suppl 1, p. S29-45, Jul 29 2016.

XIONG, W.; ZHAO, J.; WANG, L.; JIANG, X. UPLC-MS/MS method for the determination of tobacco-specific biomarker NNAL, tamoxifen and its main metabolites in rat plasma. **Biomed Chromatogr**, v. 31, n. 6, Jun 2017.

XU, B.; LOVRE, D.; MAUVAIS-JARVIS, F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. **Biochimie**, v. 124, p. 92-7, May 2016.

XU, B.; LOVRE, D.; MAUVAIS-JARVIS, F. The effect of selective estrogen receptor modulators on type 2 diabetes onset in women: Basic and clinical insights. **J Diabetes Complications**, v. 31, n. 4, p. 773-779, Apr 2017.

XU, H.; GOURAS, G. K.; GREENFIELD, J. P.; VINCENT, B.; NASLUND, J.; MAZZARELLI, L.; FRIED, G.; JOVANOVIĆ, J. N.; SEEGER, M.; RELKIN, N. R.; LIAO, F.; CHECLER, F.; BUXBAUM, J. D.; CHAIT, B. T.; THINAKARAN, G.; SISODIA, S. S.; WANG, R.; GREENGARD, P.; GANDY, S. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer [beta]-amyloid peptides. **Nat Med**, v. 4, n. 4, p. 447-451, 1998.

YAN, Y. E.; ZHANG, J.; WANG, K.; XU, Y.; REN, K.; ZHANG, B. Y.; SHI, M.; CHEN, C.; SHI, Q.; TIAN, C.; ZHAO, G.; DONG, X. P. Significant reduction of the GLUT3 level, but not GLUT1 level, was observed in the brain tissues of several scrapie experimental animals and scrapie-infected cell lines. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 2, p. 991-1004, Apr 2014.

YAO, J.; HAMILTON, R. T.; CADENAS, E.; BRINTON, R. D. Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 10, p. 1121-6, Oct 2010.

YAO, J.; IRWIN, R.; CHEN, S.; HAMILTON, R.; CADENAS, E.; BRINTON, R. D. Ovarian hormone loss induces bioenergetic deficits and mitochondrial  $\beta$ -amyloid. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 8, p. 1507-1521, 2012.

YAO, J.; IRWIN, R. W.; ZHAO, L.; NILSEN, J.; HAMILTON, R. T.; BRINTON, R. D. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 34, p. 14670-5, Aug 25 2009.

YE, R.; WANG, Q. A.; TAO, C.; VISHVANATH, L.; SHAO, M.; MCDONALD, J. G.; GUPTA, R. K.; SCHERER, P. E. Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: Inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. **Mol Metab**, v. 4, n. 11, p. 771-8, Nov 2015.

YEH, S. L.; LIN, Y. C.; LIN, Y. L.; LI, C. C.; CHUANG, C. H. Comparing the metabolism of quercetin in rats, mice and gerbils. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 1, p. 413-22, Feb 2016.

ZANDI, P. P.; CARLSON, M. C.; PLASSMAN, B. L.; WELSH-BOHMER, K. A.; MAYER, L. S.; STEFFENS, D. C.; BREITNER, J. C. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. **JAMA**, v. 288, n. 17, p. 2123-9, Nov 06 2002.

ZEMEK, F.; DRTINOVA, L.; NEPOVIMOVA, E.; SEPSOVA, V.; KORABECNY, J.; KLIMES, J.; KUČA, K. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. **Expert Opin Drug Saf**, v. 13, n. 6, p. 759-74, Jun 2014.

ZHAO, L.; O'NEILL, K.; DIAZ BRINTON, R. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 49, n. 3, p. 472-93, Nov 2005.

ZHU, L.; BROWN, W. C.; CAI, Q.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; MCGUINNESS, O. P.; STAFFORD, J. M. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver

and may improve pathway-selective insulin resistance. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 424-34, Feb 2013.

## 6.2 Referências do artigo original

- [1] P.I. Moreira, M.S. Santos, R. Seica, C.R. Oliveira, Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes, *Journal of the neurological sciences* 257(1-2) (2007) 206-14.
- [2] S.M. de la Monte, J.R. Wands, Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 7(1) (2005) 45-61.
- [3] S.M. de la Monte, Type 3 diabetes is sporadic Alzheimers disease: mini-review, *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24(12) (2014) 1954-60.
- [4] A.C. Dorsemans, D. Couret, A. Hoarau, O. Meilhac, C. Lefebvre d'Hellencourt, N. Diotel, Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and zebrafish models, *Neurogenesis (Austin, Tex.)* 4(1) (2017) e1281862.
- [5] N. Cherbuin, P. Sachdev, K.J. Anstey, Higher normal fasting plasma glucose is associated with hippocampal atrophy: The PATH Study, *Neurology* 79(10) (2012) 1019-26.
- [6] F.F. Johansen, N.H. Diemer, Influence of the plasma glucose level on brain damage after systemic kainic acid injection in the rat, *Acta neuropathologica* 71(1-2) (1986) 46-54.
- [7] N.T. Vagelatos, G.D. Eslick, Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship, *Epidemiologic reviews* 35 (2013) 152-60.
- [8] P.K. Crane, R. Walker, R.A. Hubbard, G. Li, D.M. Nathan, H. Zheng, S. Haneuse, S. Craft, T.J. Montine, S.E. Kahn, W. McCormick, S.M. McCurry, J.D. Bowen, E.B. Larson, Glucose Levels and Risk of Dementia, *New England Journal of Medicine* 369(6) (2013) 540-548.
- [9] J. Xu, P. Begley, S.J. Church, S. Patassini, S. McHarg, N. Kureishy, K.A. Hollywood, H.J. Waldvogel, H. Liu, S. Zhang, W. Lin, K. Herholz, C. Turner, B.J. Synek, M.A. Curtis, J. Rivers-Auty, C.B. Lawrence, K.A.B. Kellett, N.M. Hooper, E.R.L.C. Vardy, D. Wu, R.D. Unwin, R.L.M. Faull, A.W. Dowsey, G.J.S. Cooper, Elevation of brain glucose and polyol-pathway intermediates with accompanying brain-copper deficiency in patients with Alzheimer's disease: metabolic basis for dementia, *Scientific Reports* 6 (2016) 27524.
- [10] L.L. Lipscombe, H.D. Fischer, L. Yun, A. Gruneir, P. Austin, L. Paszat, G.M. Anderson, P.A. Rochon, Association between tamoxifen treatment and diabetes: a population-based study, *Cancer* 118(10) (2012) 2615-22.
- [11] C.B. Marek, R.M. Peralta, A.M. Itinose, A. Bracht, Influence of tamoxifen on gluconeogenesis and glycolysis in the perfused rat liver, *Chemico-biological interactions* 193(1) (2011) 22-33.

- [12] C. Le May, K. Chu, M. Hu, C.S. Ortega, E.R. Simpson, K.S. Korach, M.J. Tsai, F. Mauvais-Jarvis, Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24) (2006) 9232-7.
- [13] R.M. van Dam, E.B. Rimm, W.C. Willett, M.J. Stampfer, F.B. Hu, Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men, *Annals of internal medicine* 136(3) (2002) 201-9.
- [14] F.C. Silva, I.C. Bramatti, A.G. Toledo, F.M. Salles, A.M. Itinose, C.B. Marek, Antihyperglycemic Effect of Quercetin in Ovariectomized Rats Treated with Tamoxifen, *Journal of medicinal food* 20(3) (2017) 235-242.
- [15] T. Li, Y. Ma, H. Zhang, P. Yan, L. Huo, Y. Hu, X. Chen, T. Li, M. Zhang, Z. Liu, Estrogen Replacement Regulates Vaginal Innervations in Ovariectomized Adult Virgin Rats: A Histological Study, *BioMed Research International* 2017 (2017) 6.
- [16] A.R. Consiglio, A.B. Lucion, Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats, *Brain research. Brain research protocols* 5(1) (2000) 109-14.
- [17] U. Ponten, R.A. Ratcheson, L.G. Salford, B.K. Siesjo, Optimal freezing conditions for cerebral metabolites in rats, *Journal of neurochemistry* 21(5) (1973) 1127-38.
- [18] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry* 193(1) (1951) 265-75.
- [19] J. Detka, A. Kurek, M. Kucharczyk, K. Glombik, A. Basta-Kaim, M. Kubera, W. Lason, B. Budziszewska, Brain glucose metabolism in an animal model of depression, *Neuroscience* 295 (2015) 198-208.
- [20] Gutmann I, Wahlefeld W, L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. in: Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1974, pp.1464-1472
- [21] Czok R, Lamprecht W, Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate, in: Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1974, pp.1446-1448.
- [22] S. Bakirdere, N. Kizilkan, M. Yaman, Determination of zinc, copper, iron, and manganese in different regions of lamb brain, *Biological trace element research* 142(3) (2011) 492-9.
- [23] K.H. Schosinsky, H.P. Lehmann, M.F. Beeler, Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride, *Clinical chemistry* 20(12) (1974) 1556-63.
- [24] Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care* 26 Suppl 1 (2003) S5-20.

- [25] M. Vessal, M. Hemmati, M. Vasei, Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats, *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP 135C(3) (2003) 357-64.
- [26] M. Razandi, A. Pedram, V.C. Jordan, S. Fuqua, E.R. Levin, Tamoxifen regulates cell fate through mitochondrial estrogen receptor beta in breast cancer, *Oncogene* 32(27) (2013) 3274-85.
- [27] F. Boumezbeur, L. Besret, J. Valette, F. Vaufrey, P.G. Henry, V. Slavov, E. Giacomini, P. Hantraye, G. Bloch, V. Lebon, NMR measurement of brain oxidative metabolism in monkeys using <sup>13</sup>C-labeled glucose without a <sup>13</sup>C radiofrequency channel, *Magnetic resonance in medicine* 52(1) (2004) 33-40.
- [28] P. Mergenthaler, U. Lindauer, G.A. Dienel, A. Meisel, Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function, *Trends in neurosciences* 36(10) (2013) 587-597.
- [29] M.G. Leggio, M. Molinari, P. Neri, A. Graziano, L. Mandolesi, L. Petrosini, Representation of actions in rats: The role of cerebellum in learning spatial performances by observation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(5) (2000) 2320-2325.
- [30] L.R. Gray, S.C. Tompkins, E.B. Taylor, Regulation of pyruvate metabolism and human disease, *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 71(14) (2014) 2577-604.
- [31] A.R. Preston, H. Eichenbaum, Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory, *Current biology* : CB 23(17) (2013) R764-R773.
- [32] B. Leuner, E. Gould, Structural plasticity and hippocampal function, *Annual review of psychology* 61 (2010) 111-40, C1-3.
- [33] L. Riske, R.K. Thomas, G.B. Baker, S.M. Dursun, Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder, *Therapeutic advances in psychopharmacology* 7(2) (2017) 85-89.
- [34] M. Manto, Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and Roles in Neurodegeneration, *Toxics* 2(2) (2014) 327.
- [35] H.M. Antila, M.S. Salo, V. Nanto, V. Nikkanen, O. Kirvela, The effect of postoperative radiotherapy on leukocyte zinc, serum trace elements and nutritional status of breast cancer patients, *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 31(5) (1992) 569-72.
- [36] S.M. Kuo, C.T. Huang, P. Blum, C. Chang, Quercetin cumulatively enhances copper induction of metallothionein in intestinal cells, *Biological trace element research* 84(1-3) (2001) 1-10.

## 7 ANEXOS

### 7.1 Anexo I Protocolos aprovados pelo comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE)



### PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Treinamento para coleta de líquido cefalorraquidiano e congelamento de tecido cerebral", 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, 01/12/2016

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

**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

## PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Avaliação do efeito da quercetina sobre o metabolismo cerebral de ratas ovariectomizadas submetidas ao tratamento com tamoxifeno", 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, 19/10/2016

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