

BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
10260

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES ATIVAS DE
OXIGÊNIO NA ESQUIZOFRENIA E PSICOSE
MANÍACO-DEPRESSIVA

DULCINEIA SAES PARRA ABDALLA
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. ETELVINO J. H. BECHARA

SÃO PAULO
1988

Aos meus pais, pelo apoio
e carinho constantes e cujo
exemplo de dedicação e
perseverança foram a base
para minhas realizações.

Ao José Roberto, que com seu amor e
compreensão sempre esteve presente
nos momentos difíceis, me dando apoio
para prosseguir.

Ao "Rafa", por aceitar meus
longos períodos de ausência e
me dar alegria e razão para
viver.

À Dona Nayda, pelo apoio
estratégico que me permite
desenvolver com tranquilidade
minhas atividades profissionais.

Ao Etelvino, pela orientação criteriosa deste trabalho
e pelo constante estímulo no desenvolvimento de nossa
carreira científica.

AGRADECIMENTOS

- aos colegas e amigos da Disciplina de Bioquímica Clínica, Prof. Gunter, Durval, Bruno, Alexandre, Raul, Mário, Rosário, Leda e Carlos que têm incentivado nossa carreira científica. Ao Ricardo, Feitosa, Margô, Marieta, Lucy, Gina, Maurício, Roberto "Batatinha", Paulo e Carmen pela constante colaboração.
- a todos os colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCFUSP pelo estímulo e consideração recebidos durante todos estes anos.
- ao "pessoal" do Bloco 10, Ana Campa, Fernanda, Guilherme, Karin, Vani, Ana Lúcia, Miguel, Lídia Guillo, Carmem, Marcelo, Benê, Pio, Like, Marisa, Willi, Cornélia, Maju, Teresa, Lydia Butturini, Humberto e Alberto, pelo companheirismo e amizade. À dona Jacyra, pelo calor humano. Ao amigo Hugo, pelos trabalhos anteriores realizados em associação. Ao Prof. Cilento, Klaus, Nelson, Roberto e Dinha pelo apoio constante.
- aos Drs. José Ary Carletti e Ricardo Moreno, pela seleção criteriosa dos pacientes psiquiátricos.
- ao Prof. Dr. Moacyr Azenstein, em especial, e ao Prof. Dr. Roberto de Luccia, aos colegas Cris, Cleo, Ivo e Fabiana e a Cidinha, do grupo de Psicofarmacologia do ICBUSP, cuja colaboração foi imprescindível para a realização deste trabalho.
- a Junko, pela orientação na análise estatística.
- às Profas. Dras. Virginia B. Junqueira, Kioko Simizu e Silvia Berlanga assim como ao Léo e Alberto, pela colaboração neste trabalho.

- ao Laboratório Fleury, na pessoa do Dr. Adaguimar Andriolo, por ter permitido a utilização do cromatógrafo (HPLC) e a farmacêutica bioquímica Luiza Aparecida Nunes da Silva pelas orientações técnicas.
- à Profa. Dra. Ohara Augusto e à Maria Cristina Fortunato pelo auxílio durante a utilização do espectômetro de RPE. Ao amigo Wilson Roberto Toselli, pela obtenção da lecitina de ovo; à Maria Lucid Bianconi, pelas "dicas" na preparação de lipossomos e à colega Francesca Cardillo Theobaldo (HPLC).
- aos colegas Raul, Ana Campa e Fernanda pela leitura feita deste trabalho.
- à dona Helena, por seu exemplo de luta, fé e resignação e à cuja paciência e capacidade devemos a datilografia deste trabalho.
- à bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, pela organização das referências bibliográficas.
- aos recursos financeiros da FINEP, CNPq, FAPESP, Fundação Volkswagen, GTZ e CAPES .
- e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

BIBLIOTECA
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

I.1	Aspectos clínicos e moleculares da esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva	1
I.1.1	Esquizofrenia	1
I.1.1.1	Prevalência	2
I.1.1.2	Aspectos Diagnósticos	4
I.1.1.3	Aspectos Genéticos	6
I.1.1.4	Alterações Estruturais	7
I.1.1.5	Bioquímica	9
I.1.1.5.1	Transmetilação	9
I.1.1.5.2	Adrenocromo (Aminocromos)	11
I.1.1.5.3	Norepinefrina, Serotonina, Acetilcolina e feniletilamina	14
I.1.1.5.4	Monoamina oxidase (MAO)	16
I.1.1.5.5	Neuropeptídeos	16
I.1.1.5.6	Aminoácidos	17
I.1.1.5.7	Prostaglandinas	19
I.1.1.5.8	Dopamina	19
I.1.2	Psicose Maníaco-Depressiva	24
I.1.2.1	Prevalência	24
I.1.2.2	Aspectos Diagnósticos	25
I.1.2.3	Aspectos Genéticos	26
I.1.2.4	Bioquímica	27
I.1.2.4.1	Catecolaminas	27
I.1.2.4.2	Indolaminas, Serotonina e MAO	29
I.1.2.4.3	Acetilcolina	30
I.1.2.4.4	Transporte ativo de Na ⁺	31
I.2	Farmacoterapia da esquizofrenia e PMD: Neurolepticos e Li ₂ CO ₃ ..	32
I.3	Espécies ativas de oxigênio, "stress" oxidativo e sistemas antioxidantes	36
I.3.1	Espécies ativas de oxigênio	36
I.3.1.1	Radical Superóxido	38
I.3.1.2	Peróxido de Hidrogênio	39
I.3.1.3	Radical Hidroxila	40
I.3.1.4	Oxigênio Singlete	41
I.3.2	"Stress" oxidativo	42
I.3.3	Sistemas antioxidantes	43
I.3.4	"Stress" oxidativo e defesas antioxidantes cerebrais ...	46

II. Objetivos	50
III Materiais e Métodos	53
III.1 Abreviaturas	53
III.2 Reagentes	54
III.3 Equipamentos	56
III.4 Delineamento Experimental	57
III.4.1 Estudos com pacientes	57
III.4.2 Estudos com animais	57
III.4.2.1 Efeito do tratamento agudo com clorpromazina e Li_2CO_3 nos níveis de atividade de SOD e GSH-Px e na peroxidação espontânea em fígado, cérebro e eritrócitos	58
III.4.2.2 Efeito do tratamento crônico com clorpromazina nos níveis de atividade de SOD e GSH-Px em cérebro e eritrócitos de ratos	58
III.4.2.3 Efeito do "stress" oxidativo cerebral, induzido pela 6-OHDA, nos níveis de atividade de SOD cerebral e eritrocitária	59
III.4.2.4 Geração intracerebral de produtos hidroxilados da dopamina	59
III.4.3 Estudos "in vitro"	
III.4.3.1 Detecção de espécies ativas de oxigênio geradas durante a autoxidação de 6-OHDA	60
III.4.3.2 Indução de peroxidação lipídica por 6-OHDA	60
III.5 Casuística	
III.5.1 Esquizofrenia	61
III.5.2 Psicose maníaco-depressiva	61
III.5.3 Grupo controle	61
III.6 Metodologia	
III.6.1 Obtenção e preparação e amostras	67
III.6.1.1 Hemolisados do sangue obtido dos pacientes	67
III.6.1.1.1 Preparação da amostra para análise de SOD ..	67
III.6.1.1.2 Preparação da amostra para análise de GSH-Px	68

III.6.1.2	Hemolisados do sangue obtido de ratos	68
III.6.1.2.1	Preparação da amostra para análise de SOD	69
III.6.1.3	Homogenatos de tecidos de ratos	69
III.6.1.4	Isolamento do corpo estriado de cérebro de ratos	70
III.6.1.5	Separação dos metabólitos de dopamina em colunas de Sephadex G-10	70
III.6.2	Administração intraventricular de 6-OHDA	71
III.6.3	Determinação de hemoglobina	71
III.6.4	Determinação da atividade de SOD	71
III.6.5	Determinação da atividade de GSH-Px	72
III.6.6	Dosagem de proteínas totais	73
III.6.7	Preparação de lipossomos multilamelares	73
III.6.8	Medida de produtos de peroxidação lipídica em lipossomos, homogenatos de tecido e eritrócitos de rato pelo teste do ácido tiobarbitúrico	74
III.6.9	Medidas de consumo de oxigênio na autoxidação de 6-OHDA	75
III.6.10	Deteção de superóxido, durante a autoxidação de 6-OHDA	75
III.6.11	Obtenção dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica dos adutos de spin do radical hidroxila formado na autoxidação de 6-OHDA	76
III.6.12	Separação de produtos hidroxilados da dopamina por cromatografia líquida de alta pressão	76
III.6.13	Determinação fluorimétrica de HVA e DOPAC	77
III.6.14	Análise Estatística	78
IV	Resultados	80
IV.1	Atividades eritrocitárias de SOD e GSH-Px nos pacientes com esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva	80
IV.2	Efeito do tratamento com CPZ e Li_2CO_3 nas atividades de SOD, GSH-Px e na peroxidação espontânea em fígado, cérebro e eritrócitos de ratos	83
IV.2.1	Tratamento agudo com CPZ e Li_2CO_3	84
IV.2.2	Tratamento crônico com CPZ	84
IV.3	Efeito da administração intraventricular de 6-OHDA nos níveis de atividade da SOD	90

IV.4	Geração de espécies ativas de oxigênio na autoxidação de 6-OHDA	96
IV.4.1	Consumo de oxigênio na autoxidação de 6-OHDA. Efeito da CPZ	96
IV.4.2	Deteccção de O_2^- pela redução de ferricitocromo C. Efeito da CPZ	102
IV.4.3	Deteccção de O_2^- pela oxidação de adrenalina	103
IV.4.4	Deteccção de radical $\cdot OH$ por ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	103
IV.5	Peroxidação lipídica induzida por radicais gerados na autoxidação de 6-OHDA	106
IV.6	Investigação de produtos hidroxilados da dopamina no corpo estriado de cérebro de ratos por HPLC	114
V	Discussão	119
V.1	Enzimas antioxidantes em pacientes psiquiátricos	119
V.2	Modelos químicos para a geração de espécies ativas de oxigênio	128
V.3	Estudos com animais de experimentação	138
V.3.1	Tratamento com neurolepticos	138
V.3.2	Indução de SOD durante "stress" oxidativo cerebral induzido por 6-OHDA	142
VI	Conclusões	152
VII	Resumo	154
VIII	Abstract	157
IX	Referências bibliográficas	160

I. INTRODUÇÃO

I.1 - ASPECTOS CLÍNICOS E MOLECULARES DA ESQUIZOFRENIA E PSICOSE MANÍACO-DEPRESSIVA

I.1.1 - Esquizofrenia

A esquizofrenia é um distúrbio mental, conhecido em todas as culturas e países, afetando aproximadamente 1% da população mundial (Eaton, 1985). Os mecanismos moleculares envolvidos nesta patologia ainda não estão elucidados. A complexidade desta doença é ressaltada em várias revisões da literatura, focalizando sua etiologia, mecanismos de transmissão, alterações bioquímicas, critérios de diagnóstico e tratamento (Hartman, 1976; Baldessarani, 1977; Smithies, 1979; Crow, 1980; Moal, 1980; Berger, 1981; Wyatt e col., 1981; Rodnight, 1983; Weinberger e col., 1983; Horrobin, 1985; Schmauss & Emrich, 1985; Kovelman & Scheibel, 1986; Prilipko, 1986; Meltzer, 1987; Pardes e col., 1987).

Alguns autores sugerem que a esquizofrenia seja uma síndrome que inclui várias desordens e tem um caráter multifactorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (Meltzer, 1979); Mirsky e col., 1984). Esta doença mani-

feita-se, geralmente, no início da idade adulta e evolui para uma forma crônica que acompanha o indivíduo por toda a sua vida. Caracteriza-se por uma completa desintegração da personalidade em um indivíduo fisicamente sadio. Crow (1982) postula duas síndromes da esquizofrenia: tipo I e tipo II. A esquizofrenia tipo I identifica-se por sintomas positivos, tais como alucinações visuais e auditivas, pensamento desordenado e ilusões, sendo que os pacientes respondem ao tratamento com neurrolépticos. No tipo II predominam os sintomas negativos, como falta de afeto, dificuldades na conversação, isolamento social e resistência à farmacoterapia. Esta dicotomia delinea, grosseiramente, a esquizofrenia aguda e crônica. Muitos pacientes do tipo II apresentam, no início, sintomas agudos (isto é, do tipo I) e podem reapresentá-los de forma intermitente durante sua doença crônica, na forma de surtos psicóticos; por outro lado, os sintomas negativos podem ocorrer nos pacientes do tipo I. Entretanto, diferentemente destes pacientes, que ocasionalmente recuperam-se da doença, aqueles do tipo II apresentam uma evolução clínica onde ocorre deterioração gradual, sugerindo que um processo encefalítico crônico possa ser responsável pela atrofia cerebral em alguns casos de esquizofrenia crônica.

I.1.1.1 - Prevalência

Os estudos epidemiológicos realizados há algum tempo atrás, mostravam uma maior ocorrência de esquizofrenia nos Estados Unidos que na Europa. Os europeus utilizavam o conceito de esquizofrenia, cautelosamente, para referir-se a um

grupo restrito de pacientes com alucinações e ilusões não explicáveis em termos de distúrbios afetivos durante o primeiro episódio e, freqüentemente, seguido por deficiências de longa duração tais como lentidão, hipo-reatividade e isolamento social. Nos Estados Unidos, o conceito de esquizofrenia incluía qualquer indivíduo com alucinações e ilusões, ou mostrando um comportamento estranho, não explicável de outra forma. A partir de 1980 houve uma reformulação da metodologia de diagnóstico pela Associação Psiquiátrica Americana, resultando em critérios mais rigorosos. Os dados a seguir mostram a prevalência da esquizofrenia em diversos estudos realizados nos últimos dez anos:

LOCAL	AUTOR	PREVALÊNCIA/ 1000
Baltimore (E.E.U.U.)	Von Korff e col. (1983)	6,0
Comunidade Amish (E.E.U.U.)	Egeland & Hostetler (1983)	0,3
Ghana	Sikamartey & Eaton (1984)	0,6
Índia	Nandi e col. (1979)	5,6
Índia	Nandi e col. (1980)	2,2
Sri Lanka	Wijesinghe e col. (1978)	3,7
U.R.S.S.	Rotstein (1977; citado em Jablensky, 1986)	3,8
Irlanda	Walsh (1980)	5,6
Suécia (área de alta prevalência)	Book e col. (1978)	17,0

A esquizofrenia manifesta-se mais cedo em homens que

em mulheres. A idade de máxima incidência está entre 15-24 anos para o sexo masculino e entre 25-30 anos para o sexo feminino (Eaton, 1985). A taxa de incidência é semelhante em ambos os sexos (Eaton, 1985).

Existem diferenças de prevalência da esquizofrenia, tanto em relação a diferentes países como em regiões distintas de um mesmo país. Diferenças intrapopulacionais foram constatadas na Suécia (Book e col., 1978), Yugoslávia (Kulcar e col., 1971) e Índia (Nandi e col., 1980). Em contraste com os dados nos EEUU e Europa, que relacionam a esquizofrenia a grupos sócio-econômicos mais baixos, na Índia a maior prevalência da doença ocorre nas castas superiores (Nandi e col., 1979; 1980).

Nas regiões tropicais a prevalência tem sido menor que na Irlanda e norte da Escandinávia, sugerindo um possível gradiente norte-sul na distribuição da doença. A incidência de esquizofrenia tem aumentado nos últimos anos na Suécia (Book e col., 1978) e Estados Unidos (Myers e col., 1984). Não é certo, porém, até que ponto estas diferenças são reais ou devidas a critérios diagnósticos diferentes.

I.1.1.2 - Aspectos Diagnósticos

A nosologia psiquiátrica sistemática começou a se desenvolver no século XIX. Devido à falta de conhecimentos sobre a etiologia e patogênese das doenças psiquiátricas, as classificações foram realizadas de acordo com as características clínicas, não se levando em consideração as causas (hipotéticas) da insanidade. Pinel (1806) e Haslan (1809) introdu-

ziram a esquizofrenia na literatura psiquiátrica moderna. Posteriormente, Kraepelin (1919) combinou a "démence précoce" de Morel, a "katatonia" de Kahlbaum e a hebefrenia de Hecker em uma entidade distinta denominada de "dementia praecox" e diferenciou-a da insanidade maníaco-depressiva, baseando-se na evolução clínica destas doenças. Bleuler (1950) redefiniu a "dementia praecox" de Kraepelin, como sendo um grupo de doenças, considerando a sintomatologia como fator preponderante para o diagnóstico. Classificou a esquizofrenia nos subtipos: paranóide, catatônica, simples e hebefrênica.

As abordagens mais recentes para o diagnóstico da esquizofrenia, tais como o DSMII (Manual Diagnóstico e Estatístico para as Doenças Mentais da Associação Psiquiátrica Americana; Spitzer e col., 1975), ICD-9 (International Classification of Diseases, 1980) e DSMIII (Spitzer, 1980) também usam características clínicas para classificar os pacientes. Este último sugere que os distúrbios de personalidade podem ser divididos em três grupos: (i) excêntrico (paranóide, esquizóide e esquizotípico); (ii) dramático, emotivo ou inconstante (histriônico, narcisista, anti-social e "borderline") e (iii) ansioso ou temeroso (arredio, dependente, compulsivo e passivo-agressivo). O DSM-III caracteriza-se por definir os distúrbios psiquiátricos de acordo com características clínicas descritivas, com inferência mínima e por não considerar teorias sobre a etiologia e fisiopatologia do processo, constituindo, assim, uma doutrina metodológica de empirismo estrito (Faust & Miner, 1986).

A classificação da esquizofrenia unicamente com base nos sintomas e evolução clínica é insatisfatória por várias razões (Jeste e col., 1982): (i) considerável sobreposi-

ção de sintomas entre diferentes grupos; (ii) flutuações na sintomatologia em função do tempo, no mesmo paciente; (iii) ausência de uma relação consistente entre diagnóstico e resposta a um tratamento específico e (iv) falta de evidências para uma base etiopatológica específica para o diagnóstico.

Como a classificação é o primeiro passo na ciência, o diagnóstico é um dos problemas fundamentais na psiquiatria. Estudos a nível molecular são extremamente importantes para elucidar a fisiopatologia, bem como fornecer subsídios para o diagnóstico dos distúrbios psiquiátricos.

I.1.1.3 - Aspectos Genéticos

Evidências de que fatores genéticos contribuem para a etiologia da esquizofrenia são dadas por estudos com famílias, gêmeos e de adoção (Koverlman & Scheibel, 1986; Mc Guffin & Sturt, 1986). Porém, questões de importância fundamental permanecem não elucidadas: (i) a distribuição dos membros afetados em uma família não obedece ao padrão de segregação Mendeliana simples; (ii) o modo como o(s) gene(s) se expressa(m) permanece obscuro; (iii) não há como predizer se os descendentes de um indivíduo afetado desenvolverão a doença e (iv) não está definido se a esquizofrenia é uma entidade única ou um conjunto de distúrbios biológica e geneticamente diferentes. Há, no entanto, um consenso de que a heterogeneidade da doença ao nível clínico é mais quantitativa que qualitativa e a maioria dos autores, quando propõem um modelo genético, considera a esquizofrenia como uma condição unitária (Mc Guffin e col., 1987).

Duas possibilidades devem ser consideradas na transmissão da esquizofrenia: (i) herança monogenética e (ii) poligênica multifatorial (Mc Guffin & Sturt, 1986). O modelo de um único locus principal no qual apenas um gene é responsável pela predisposição familiar à doença é inadequado para explicar a discordância de 50% na manifestação da esquizofrenia em gêmeos monozigóticos (O'Rourke e col., 1982). No outro modelo vários genes em diferentes loci atuam de maneira aditiva. Como resultado, a predisposição em uma população tende a seguir uma distribuição normal. Apenas os indivíduos, cuja suscetibilidade estivesse além de um certo limiar, manifestariam a doença. Assim, fatores ambientais poderiam aumentar a expressão da doença em indivíduos geneticamente vulneráveis (Kovelman & Scheibel, 1986).

Vários marcadores genéticos têm sido investigados na tentativa de detectar e definir os genes relacionados à esquizofrenia. A associação da esquizofrenia aos antígenos HLA A9, B5 e BW35 já foi observada (Mc Guffin & Sturt, 1986). Estudos futuros deverão ser dirigidos no sentido de tentar identificar genes, hipoteticamente, de importância patológica na etiologia da esquizofrenia como, por exemplo, os genes envolvidos na neurotransmissão (Gurling e col., 1984).

I,1.1.4 - Alterações estruturais

Embora a esquizofrenia seja considerada uma doença funcional, estudos de tomografia computadorizada (De Lisi e col., 1985; Kemali e col., 1987; Kanba e col., 1987) e com imagens obtidas por ressonância magnética eletrônica (Bes-

son e col., 1987) revelam alterações estruturais no cérebro de esquizofrênicos. Aumento do terceiro ventrículo e ventrículos laterais, assimetrias e atrofia cortical foram relatados, principalmente em pacientes com sintomas negativos e baixo índice de resposta aos neurolepticos. O aumento dos ventrículos laterais pode sugerir lesão celular nas regiões adjacentes do corpo estriado e córtex frontal, as quais têm sido associadas com hipóteses específicas relacionadas à patologia da esquizofrenia (De Lisi e col., 1985). No entanto, não está definido se esse aumento ventricular é geneticamente determinado, ou resulta de condições adquiridas como complicações no nascimento, infecções virais, reações imunes e toxinas (Reveley e col., 1984).

Outras alterações como decréscimos no peso cerebral, no volume dos gânglios basais, lobo temporal, região límbica, assim como desorganização de camadas celulares piramidais do hipocampo e atrofia de determinadas camadas corticais têm sido relatadas (Kovelman & Scheibel, 1986; Meltzer, 1987).

Miyakama e col. (1972), analisando biópsias do córtex frontal de esquizofrênicos por microscopia eletrônica, observaram sinapses avesiculares, material elétron-denso (granular ou vesicular) nas interfaces axônio-oligodendroglia e alterações das membranas neuronais. Stevens e col. (1984) observaram a presença de gliose em 75% dos cérebros de esquizofrênicos analisados, particularmente nas regiões periventriculares.

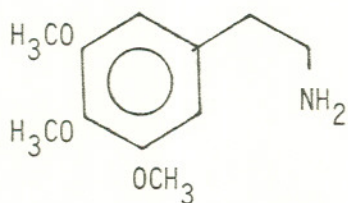
Como um grupo, estes dados sugerem uma maior frequência de anomalias nas estruturas límbicas e nas zonas periventriculares de alguns pacientes esquizofrênicos.

I.1.1.5 - Bioquímica

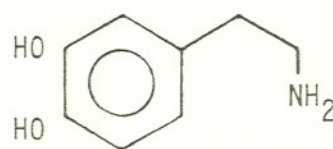
Os mecanismos bioquímicos envolvidos na esquizofrenia não foram ainda elucidados. Nas últimas décadas surgiram várias hipóteses sobre as possíveis vias e processos bioquímicos envolvidos nesta patologia.

I.1.1.5.1 - Transmetilação

Osmond & Smythies, em 1952, formularam a hipótese da transmetilação, baseada na semelhança estrutural entre a dopamina e a droga psicomimética, mescalina:



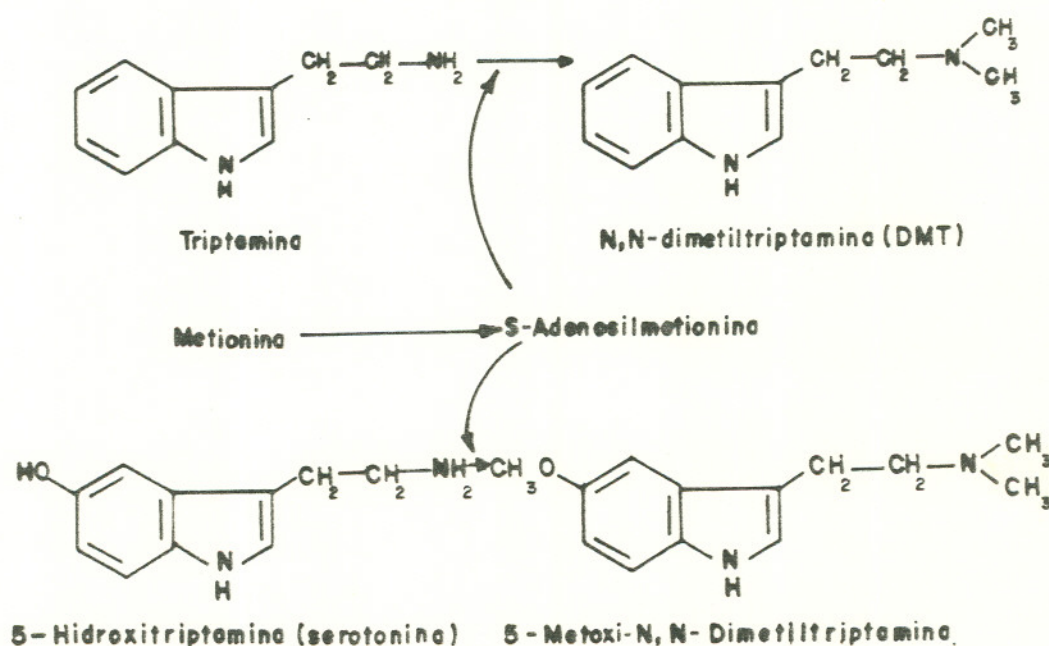
mescalina



dopamina

A mescalina induz, em algumas pessoas, uma reação psicótica semelhante àquela vista na esquizofrenia aguda. Os autores sugeriram que alguns casos de esquizofrenia poderiam ser causados por um erro inato do metabolismo de catecolaminas no qual substâncias semelhantes à mescalina poderiam ser produzidas endogenamente. Alguns estudos sugerem a presença de feniletilaminas e indolaminas metiladas (esquema I) na urina ou sangue de pacientes psicóticos (Baldessarani, 1975; Gillin e col., 1976). A formação destas "esquizotoxinas" (3,4-di

metoxi-feniletilamina, 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina e N,N-dimetiltriptamina (DMT) seria dependente do doador de grupo metil, S-adenosilmetionina (Baldessarani, 1975).



Esquema I - Rotas propostas para a síntese de DMT e 5-metoxi-DMT (Guillin e col., 1976)

A metionina, associada a inibidores da MAO, causou exacerbação reversível de sintomas psicóticos em esquizofrênicos crônicos (Pollin e col., 1961; Cohen e col., 1974). Andreoli & Maffei (1975) relataram níveis sanguíneos baixos de S-adenosilmetionina em pacientes com esquizofrenia aguda, sugerindo sua ex-

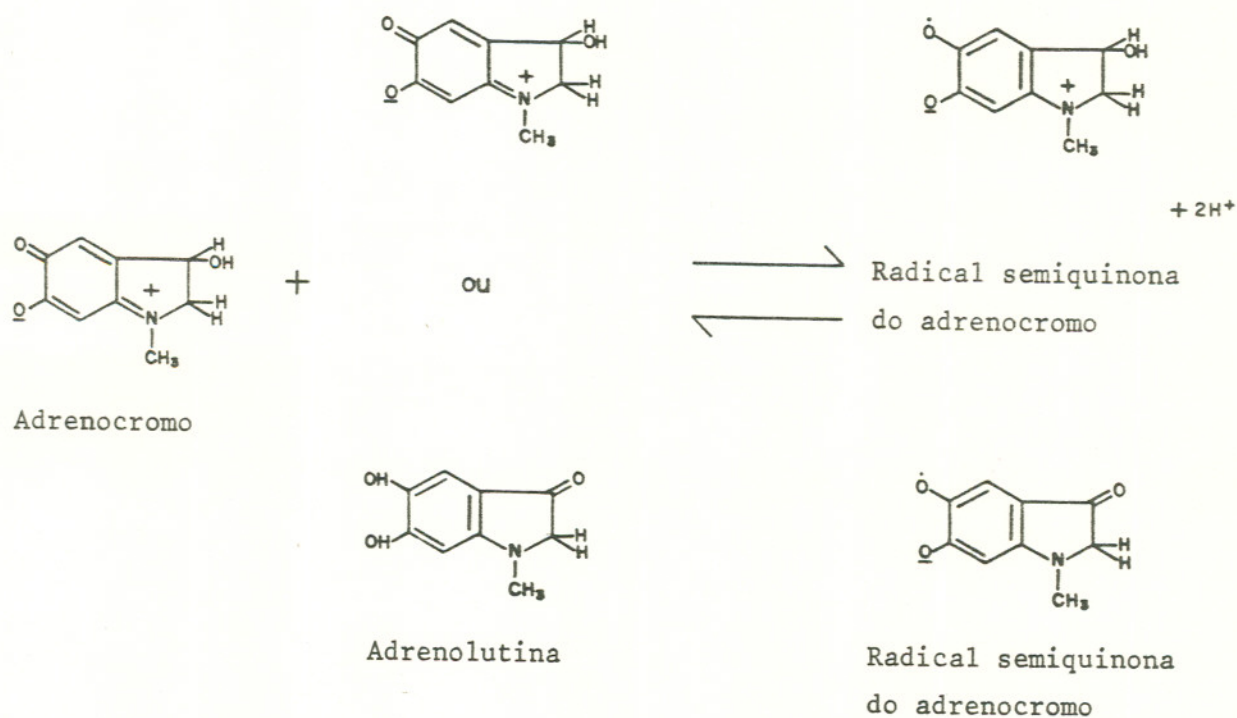
cessiva utilização ou produção deficiente. Posteriormente, Bal-dessarani e col. (1979) não constataram efeitos comportamentais da L-metionina em indivíduos normais. A metionina e S-adenosilmetionina em altas doses não aumentaram a metilação de L-DOPA "in vivo". Em pulmão de coelhos, a S-adenosilmetionina diminuiu a concentração de dimetiltriptamina. Os autores concluíram que as evidências experimentais não oferecem suporte para a hipótese da metilação na esquizofrenia.

I.1.1.5.2 - Adrenocromo (Aminocromos)

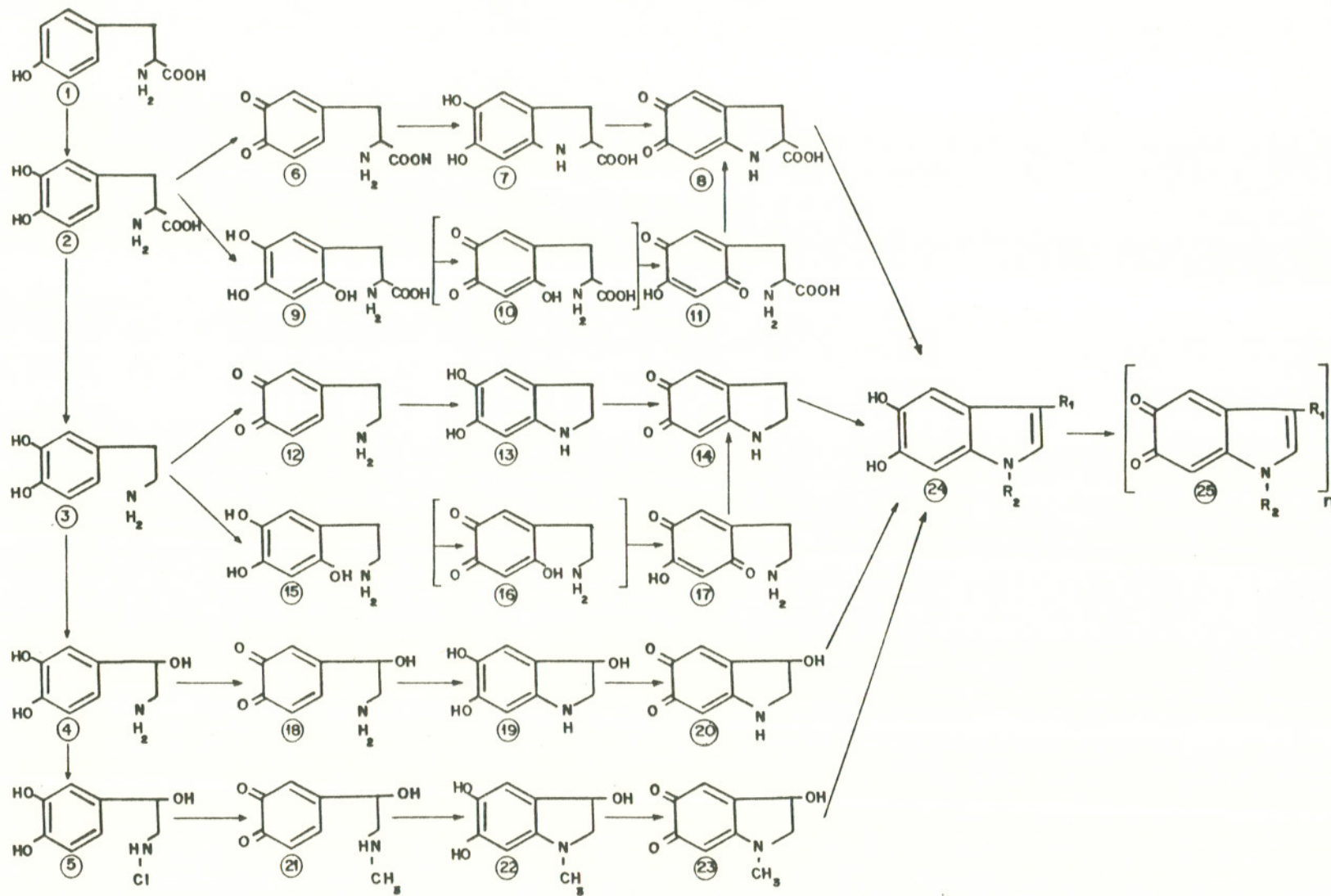
Hoffer e col. (1954) postulavam que o aumento de produtos de oxidação da epinefrina (adrenocromo) e outras catecolaminas, os aminocromos, estava implicado na esquizofrenia. Em trabalho posterior, Hoffer (1964) sugeriu que nos pacientes esquizofrênicos o adrenocromo seria convertido em adrenolutina, enquanto que em indivíduos normais a maior parte do adrenocromo seria metabolizado a diidroxil-N-metil indol. Esta alteração no metabolismo do adrenocromo seria devido a deficiências de enzimas que converteriam o adrenocromo em derivados não tóxicos. Alterações comportamentais em ratos, coelhos, gatos, cães e macacos também foram observadas pela administração do adrenocromo (Hoffer, 1964). Em humanos, Hoffer (1964) observou reações psicóticas, alterações na percepção, raciocínio e humor. Ensaios "in vitro" mostram que o adrenocromo inibe a ATPase (Inchiosa & Freedberg, 1961), a hexoquinase (Vernon, 1959) e a respiração celular (Meyerhof & Randall, 1948; Vernon, 1959).

O adrenocromo é o produto estável de oxidação por quatro elétrons da epinefrina; a dopamina e a norepinefrina também formam os respectivos aminocromos (esquema II, Graham, 1978).

A citotoxicidade do adrenocromo foi demonstrada nos tecidos tumoral (Svingen & Powis, 1981) e cardíaco (Singal e col., 1981). A toxicidade do adrenocromo pode ser associada à geração de radicais livres por sua oxidação ou redução uni-eletrônica (Prabhananda e col., 1985). Embora a abordagem de Hoffer não tenha sido exatamente esta, atualmente, poder-se-ia supor que o aumento destes compostos no cérebro resulte em lesões celulares por estes radicais (esquema III).



Esquema III — Geração de radicais livres a partir do adrenocromo (Prabhananda e col., 1985)



Esquema II - Vias oxidativas propostas para DOPA e catecolaminas (Graham, 1978)

1:tirosina; 2:DOPA; 3:dopamina; 4:norepinefrina; 5:epinefrina; 6:dopaquinona; 7:leucoadrenocromo; 8:dopacromo; 9:TOPA; 10:o-quinona; 11:p-quinona; 12:dopamina-o-quinona; 13: leucoaminocromo; 14:aminocromo; 15:6-hidroxidopamina; 16:o-quinona da 6-hidroxidopamina; 17:p-quinona da 6-hidroxidopamina; 18:norepinefrina o-quinona; 19: leucoadrenocromo; 20:noradrenocromo; 21:epinefrina o-quinona; 22:leucoadrenocromo; 23:adrenocromo; 24:dihidroxiindol (e derivados); 25:indolquinonas e derivados.

1.1.1.5.3 - Norepinefrina, Serotonina, Acetilcolina, Feniletilamina

Dados da literatura (Berger, 1981; Prilipko, 1986; Meltzer, 1987) sugerem o envolvimento destas aminas na esquizofrenia, mas não há evidências conclusivas a este respeito.

A hiperatividade do sistema noradrenérgico na esquizofrenia foi sugerida por alguns estudos. Aumentos na concentração de norepinefrina (NE) foram relatados em: regiões límbica e do putâmen em cérebro ("post-mortem") de esquizofrênicos (Farley e col., 1978) e no líquido e plasma de pacientes em fase aguda (Kemali e col., 1982, 1985).

Segundo Dajas e col. (1983) a NE plasmática correlacionou-se com a psicopatologia global, sintomas positivos e sintomatologia paranóide. Estes resultados, porém, podem indicar "stress" e hiperexcitação não específica. Nenhuma eficácia na esquizofrenia foi obtida com bloqueadores ou agonistas de receptores α_2 -adrenérgicos, enquanto que efeitos benéficos foram constatados com bloqueadores β -adrenérgicos (Eccleston, 1985). Dados mais consistentes devem ser obtidos para evidenciar o papel da NE na fisiopatologia da esquizofrenia.

As razões para se relacionar a serotonina (5-HT) à esquizofrenia são as seguintes: (i) as relações, extremamente complexas entre serotonina e dopamina (Korsgaard e col., 1985), (ii) drogas indólicas alucinógenas têm sido sugeridas como modelo na esquizofrenia (Fishman, 1983) e (iii) neurolépticos atípicos como a clozapina e melperona são inibidoras de receptores 5-HT₂ (Meltzer, 1987).

Os níveis de serotonina, seu precursor triptofano,

seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e quinure_nina (metabólito do triptofano) são normais (Joseph e col., 1979), ou diminuídos (Bucht e col., 1979) no cérebro e lí_quor (Potkin, 1983) de esquizofrênicos. Alguns estudos mos_tram aumento de serotonina em plaquetas de pacientes não medi_cados (Jackman e col., 1983; Stahl e col., 1983).

Tentativas de aumentar a atividade serotoninérgica não tiveram êxito no tratamento da esquizofrenia (Guillin e col. 1976; Bigelow e col., 1979). As evidências até aqui não escl_arecem o quanto a serotonina é importante na esquizofrenia.

O possível envolvimento da acetilcolina na esquizo_frenia é indicado pelo fato de que substâncias colinomiméti_cas ou inibidoras de acetilcolinesterase (fisostigmina) prom_ovem uma breve remissão em esquizofrênicos (Pfeiffer & Jenny, 1957; Collard e col., 1965; Rosenthal & Bigelow, 1973). As aç_ões benéficas da fisostigmina parecem envolver a acetilcoli_na e a dopamina, uma vez que a ação do metilfenidato (agonis_ta da dopamina) de exacerbar os sintomas da esquizofrenia é revertida pela fisostigmina. Tentativas de aumentar os ní_veis de acetilcolina cerebral não resultaram efeitos significantes nos sintomas da esquizofrenia (Berger, 1981).

As semelhanças estruturais e farmacológicas da fe_niletilamina, formada endogenamente pela descarboxilação da fenilalanina, com a anfetamina levaram alguns pesquisadores (Sandler & Reynolds, 1976; Wyatt e col. 1977, 1979) a propor que a feniletilamina pudesse estar envolvida na esquizofrenia. Até o momento, porém, não existem evidências conclusivas des_te fato.

I.1.1.5.4 - Monoamina Oxidase (MAO)

A monoamina oxidase (E.C.1.4.3.4) é uma enzima mitocondrial responsável pela desaminação oxidativa das aminas neurotransmissoras endógenas, atuando também em aminas exógenas (Fowler e col., 1981). Existem duas formas desta enzima: MAO A e MAO B, que são identificadas por sua sensibilidade a inibidores e seletividade de substratos. A MAO A atua sobre catecolaminas, enquanto que os substratos da MAO B são benzilaminas e as aminas biogênicas etilamina e N-metilhistamina (Fowler e col., 1981).

A MAO plaquetária (tipo B) é considerada um marcador genético para os mecanismos serotoninérgicos cerebrais (Orland e col., 1984) e sua atividade, em geral, está diminuída em esquizofrênicos (Prilipko, 1986; Meltzer, 1987). Entretanto, não se observou correlação direta entre a MAO plaquetária e a MAO B cerebral (Young e col., 1986).

I.1.1.5.5 - Neuropeptídeos

Com a demonstração de que certos peptídeos atuam como neurotransmissores, ou cotransmissores e neuromoduladores, considerou-se a possibilidade da alteração destes neuropeptídeos como base para a esquizofrenia.

Tentativas iniciais de esclarecer possíveis anormalidades peptidérgicas concentraram-se em estudos da eficácia do tratamento com β -endorfina, análogos da encefalina, encefalina- γ -endorfina, hormônio liberador da tireotrofina e colecistocinina (Gerner e col., 1980; Meltzer, 1986; Tamminaga e

col., 1986). Os dados obtidos, entretanto, não foram reprodutíveis.

O tratamento com naloxone, antagonista de receptores opióides, diminuiu as manifestações alucinatórias em esquizofrênicos (Pickar e col., 1982). Os efeitos antipsicóticos de agonistas e antagonistas opióides, assim como de peptídeos, tais como a colecistocinina, parecem estar relacionados à sua capacidade de modular a atividade dopaminérgica (Schmauss & Emrich, 1985; Nair e col., 1985).

Níveis séricos de peptídeos opióides em esquizofrênicos têm sido relatados como normais (Ross e col., 1979), altos (Brambilla e col., 1984) ou baixos (Bianco e col., 1981). No líquor têm-se mostrado: (i) níveis normais de β -endorfina e análogos (van Kammen e col., 1981) (ii) diminuição de dinorfina (Zhang e col., 1985); (iii) níveis baixos de neurotensina (antagonista endógeno da dopamina, Nemeroff e col., 1983) em subgrupos de esquizofrênicos (Widerlöv e col., 1982); (iv) aumento de oxitocina (Beckman e col., 1985) e (v) decréscimo de colecistocinina (Verbanck e col., 1983).

Os dados acima indicam que não está claro que o mecanismo neuropeptidérgico esteja envolvido na esquizofrenia.

I.1.1.5.6 - Aminoácidos

Os aminoácidos podem atuar no sistema nervoso central como neurotransmissores ou moduladores nas sinapses excitatórias (glutamato, aspartato) ou inibitórias (ácido gama-aminobutírico-GABA, glicina, taurina) (Fagg & Foster, 1983; Fonnum, 1984) e têm sido relacionados a sintomas neurológicos e doenças psiquiátricas (Perry, 1982; Meldrum, 1984).

Kim e col. (1980) propuseram que a alteração neuroquímica primária na esquizofrenia seria uma disfunção dos neurônios glutamatérgicos e que esta disfunção seria refletida pelas baixas concentrações de glutamato no líquido de esquizofrênicos. Porém, resultados obtidos por Korpi e col. (1987) não mostram alterações de glutamato em líquido de pacientes tratados ou não, com neurolepticos.

Níveis líquidos aumentados de alanina, glicina, leucina e fenilalanina foram observados por Reveley e col. (1987) em esquizofrênicos. A alanina correlacionou-se ao aumento dos ventrículos no cérebro destes pacientes. Estes autores sugerem que em esquizofrênicos com degenerações do sistema nervoso central (aumento ventricular), poderia haver alterações em estruturas de membrana ou nos sistemas de transporte de membrana, que seriam refletidos pelo aumento de aminoácidos no líquido.

Roberts (1977) sugeriu que o defeito bioquímico na esquizofrenia está localizado em um sistema neuronal GABAérgico, que controla a atividade da dopamina. Na esquizofrenia a influência inibitória destes neurônios GABAérgicos nas vias dopaminérgicas estaria diminuída, resultando uma hiperatividade das mesmas e um comportamento anormal do indivíduo. Perry e col. (1979) relataram concentrações mais baixas de GABA em duas regiões cerebrais de esquizofrênicos autopsiados e recomendaram mais estudos sobre o papel do GABA na esquizofrenia.

I.1.1.5.7 - Prostaglandinas

As prostaglandinas (PG) podem ser produzidas em grandes quantidades no cérebro e estão presentes no líquido (Galli e col., 1977; Galli, 1978; Hassan e col., 1979).

As PGs podem modular a condução nervosa (Horrobin e col., 1977), a liberação de neurotransmissores (Shimizu e col., 1979; Reimann e col., 1981) e ações pós-sinápticas de neurotransmissores (Blosser e col., 1978; Golub e col., 1982).

Dois hipóteses são colocadas em relação ao envolvimento das PGs na esquizofrenia: (i) excesso da síntese de PG (Feldberger, 1976) e (ii) déficit generalizado na síntese de PG (Horrobin, 1977). As evidências para a primeira hipótese são o aumento de PGE no líquido e aumento de ácido araquidônico em plaquetas (que poderia ser utilizado para a síntese de PG). Para a segunda hipótese a evidência principal é a diminuição de PGE₁ nas plaquetas de pacientes esquizofrênicos.

O assunto foi recentemente revisado por Horrobin (1985).

I.1.1.5.8 - Dopamina

O papel da dopamina (DA) na fisiopatologia da esquizofrenia tem sido o foco predominante na pesquisa da bioquímica da esquizofrenia nas últimas duas décadas. O principal ponto da hipótese da DA é o conceito de uma hiperatividade dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, mesocorticais ou nigroestriatais (Figura A) em esquizofrênicos (Randrup & Munkvard, 1972).

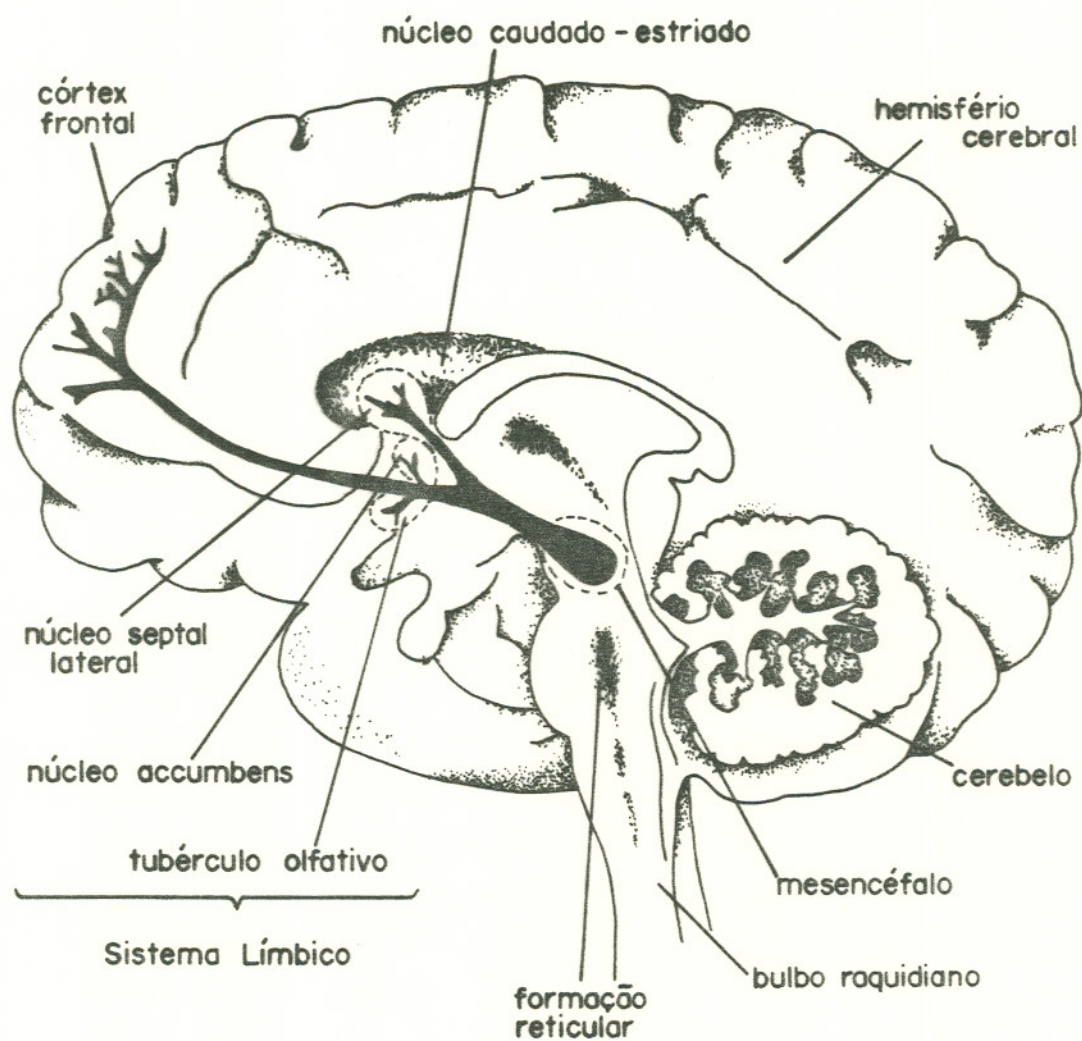


Figura A – Sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbicos (Le Moal, 1980)
 O sistema límbico é formado por um conjunto de neurônios, cujos corpos celulares situam-se no mesencéfalo projetando-se para diversos grupos de neurônios (núcleos) e para o córtex frontal, o qual conecta-se ao corpo estriado.

A hipótese de hiperatividade dopaminérgica na esquizofrenia está fundamentada em dois tipos de evidências: (i) agentes antipsicóticos efetivos (neurolépticos) bloqueiam receptores dopaminérgicos (Snyder e col., 1974) e (ii) agentes que aumentam a atividade central da DA, tais como anfetamina, fenciclidina, metilfenidato, apomorfina e L-DOPA produzem ou exacerbam sintomas análogos aos da esquizofrenia paranóide aguda (Meltzer & Stahl, 1976; Meltzer, 1979).

Estudos "post-mortem", em cérebro de esquizofrênicos, mostraram aumento de dopamina no núcleo caudado e núcleo accumbens (Bird e col., 1980; Mackay e col., 1982).

Determinações dos níveis de metabólitos da DA mostram aumento de ácido homovanílico (HVA) no líquido de pacientes esquizofrênicos (Sedvall & Wode-Helgodt, 1980; Leckman e col., 1981). Níveis líquidos baixos de HVA foram correlacionados a sintomas negativos da esquizofrenia (Lindstrom, 1985), à atrofia cerebral e a proporções ventrículo-cérebro aumentadas (Van Kammen e col., 1983). Estes resultados sugerem que a atrofia cerebral resulta em decréscimo da transmissão dopaminérgica. Por outro lado, é possível que apenas neurônios dopaminérgicos, de regiões cerebrais que não contribuem expressivamente para a concentração de DA no líquido, sejam hiperativas na esquizofrenia.

Análise de receptores de DA em esquizofrênicos, "post-mortem", revelou uma correlação positiva destes receptores aos sintomas positivos da doença (MacKay e col., 1982) e aumento na densidade de receptores DA₂ (pós-sináptico, não acoplado à adenilato ciclase) no corpo estriado do cérebro de pacientes isentos de medicação (Cross e col., 1981, Seeman e col., 1984). Estudos "in vivo", utilizando tomografia com e-

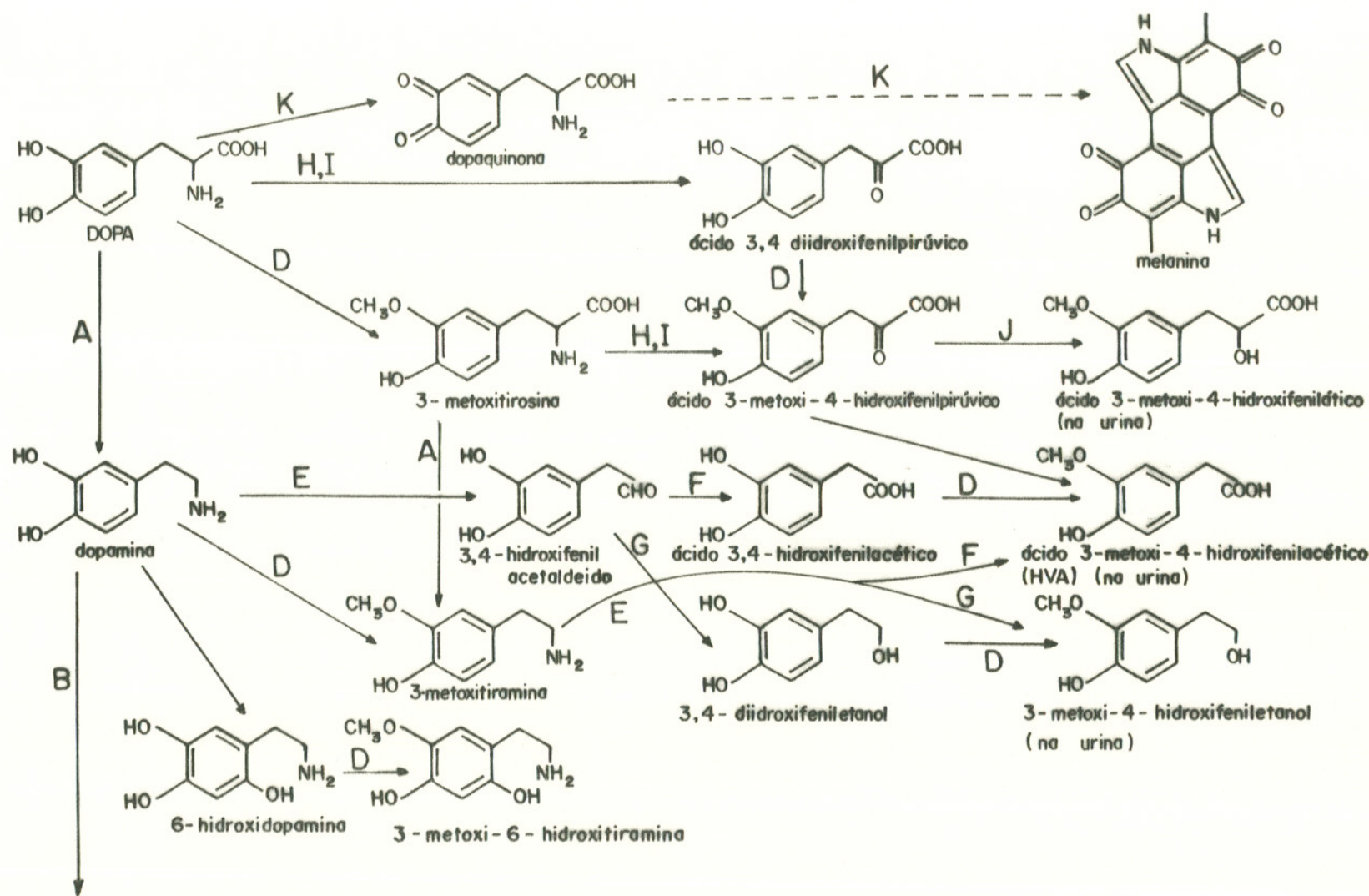
missão de fôtons e de põesitrons, utilizando ^{77}Br -espiperona e ^{11}C -raclopride detectaram aumento na ligação de receptores DA_2 no gânglio basal (Crawley e col., 1985) e no putamen (Sedvall e col., 1986) do cérebro de esquizofrênicos não tratados.

Stein & Wise (1971), baseados em alterações comportamentais induzidas em ratos por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), sugeriram que esta neurotoxina poderia ser formada endogenamente (de acordo com esquema IV) e que estaria relacionada à etiopatologia da esquizofrenia.

A administração intracerebral de 6-OHDA degenera neurônios catecolaminérgicos (Tranzer & Thoenen, 1968; Butcher e col., 1974; Butcher, 1975), depleta DA e NE (Laverty e col., 1965; Breese & Taylor, 1971) e diminui a excreção urinária de seus metabólitos (Edwards e col., 1985). O nível tóxico intracelular de 6-OHDA foi estimado por Sachs & Jonsson (1975) estar ao redor de 25 mM.

A autooxidação da 6-OHDA em pH fisiológico é rápida e gera as espécies ativas de oxigênio: ânion-radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^\bullet) bem como, o radical livre semiquinona (SQ^\bullet) e a quinona correspondente (Cohen & Heikkila, 1974; Borg e col. 1978).

Assim, o aumento de O_2^- , H_2O_2 e a conseqüente geração de HO^\bullet , no cérebro, resultaria em lesão à macromoléculas e peroxidação de lipídeos das membranas celulares. Aumento de peróxidos lipídicos foram constatados no soro de portadores de esquizofrenia (Gulidova, 1981; Prilipko & Lideman, 1982). Peroxidação lipídica induzida em cérebro de ratos por hiperoxia, alterou a ligação de serotonina e diazepam aos respectivos receptores (Prilipko & Lideman, 1982). Na presença de antioxidantes este efeito foi eliminado. Os autores sugeriram que a peroxidação de lipídeos das membranas neuronais em esquizofrênicos poderia alterar a transmissão neural.



Esquema IV - Metabolismo da dopamina em animais superiores (Nagatsu, 1973).

A: DOPA descarboxilase (EC 4.1.1.26); B: dopamina- β -hidroxilase (EC 1.14.2.1); D: catecol-Cmetiltransferase (COMT; EC 2.1.1.6); E: monoaminaoxidase (MAO; EC 1.4.3.4); F: aldeído oxidase; G: álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1); H: L-aminoácido oxidase (EC 1.4.3.2); I: tirosina aminotransferase (EC 2.6.1.5); J: α -cetoácido redutase; K: o-difenol oxidase (EC 1.10.3.1.).

I.1.2 - Psicose Maníaco-Depressiva

Os distúrbios afetivos constituem um grupo de doenças que se manifestam por alterações do humor e das funções fisiológicas, cognitivas e endócrinas (Whybrow e col., 1984). As formas primárias destes distúrbios são a depressão unipolar e a doença bipolar, ou psicose maníaco-depressiva (PMD). A PMD é uma severa doença mental cíclica (Paykel, 1982), que se distingue da depressão unipolar por apresentar episódios de mania intercalados às fases depressivas, com uma periodicidade variável de dias ou meses. Os episódios de mania são caracterizados por humor exaltado, expansivo ou irritável, sendo que os sintomas incluem inquietação física, conversação prolongada e desconexa, pensamentos rápidos, auto-estima exagerada estendendo-se a ilusões de superioridade, diminuição do sono e agitação. As fases depressivas caracterizam-se pela presença dos sentimentos de desesperança e desamparo associados à perda de apetite, distúrbios do sono, dificuldade de concentração, decréscimo de energia, perda de interesse e sensações de inutilidade ou culpa, estendendo-se a pensamentos de morte ou suicídio.

I.1.2.1 - Prevalência

A prevalência da PMD na América do Norte e Europa Ocidental é ao redor de 1% (Robins e col., 1984). Entretanto Holden (1986) sugere que este índice seja bem mais elevado, pois até a década passada os casos de mania eram, com frequência, diagnosticados erroneamente porque muitos sintomas são semelhantes aos da esquizofrenia.

A incidência anual da doença bipolar varia de 0,009% a 0,015% em homens e de 0,07% a 0,03% em mulheres (Boyd & Weissman, 1981). A prevalência, estabelecida em vários países, oscila de 1% a 23% para mulheres e de 1% a 14% em homens (Boyd & Weissman, 1981).

I.1.2.2 - Aspectos Diagnósticos

As primeiras descrições de pacientes com períodos alternados de depressão e exaltação foram feitas por Falret, em 1851, que denominou este distúrbio de "folie circulaire" e por Baillarger, em 1859, que o descreveu como "folie à double forme" (citados em Cronholm, 1984). No início deste século Kraepelin separou a "dementia praecox", como uma doença iniciando-se com alterações cognitivas e emocionais, que levam à deterioração mental e à demência da psicose maníaco-depressiva, caracterizada por sintomas afetivos de depressão e elação, periódicos, sem deterioração mental.

A dicotomia entre depressão unipolar/bipolar foi descrita por Leonhard (1968; citado em Cronholm, 1984) e analisada posteriormente por Perris (1966) e Kendell (1976). A doença bipolar pode ser subdividida nos tipos I e II; no tipo I os episódios depressivos associam-se à mania e no tipo II, à hipomania.

Esta classificação diagnóstica também não considera critérios etiológicos ou patogênicos.

I.1.2.3 - Aspectos Genéticos

A base biológica dos estados maníacos e depressivos é evidenciada por alterações cíclicas do humor, não relacionadas a fatores ambientais e à resposta dos pacientes à medicação, a qual indica que sistemas neuronais afetados pelos diversos fármacos são importantes nestes distúrbios.

Evidências indiretas da hereditariedade da PMD são: (i) a concordância de 80% na manifestação da doença em gêmeos monozigóticos e (ii) no fato de que em estudos de adoção, apenas 2% dos pais adotivos têm a doença, enquanto 30% dos pais biológicos a apresentam.

Baron e col. (1987) evidenciaram uma relação entre PMD e dois marcadores genéticos do cromossomo X: deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (locus q28) e daltonismo (locus q27-qter). A hipótese de ligação do cromossomo X à PMD também está relacionada à maior incidência desta patologia em mulheres.

A estratégia para encontrar-se um marcador genético relacionado a determinada patologia é traçar a hereditariedade da mesma em grandes famílias e procurar por um segmento do DNA que é herdado juntamente com a predisposição para o desenvolvimento da doença.

Egeland e col. (1987) realizaram estes estudos na comunidade "Amish", nos EEUU, empregando análises de segregação de polimorfismos de fragmentos de restrição. Os autores localizaram um gene dominante, conferindo uma forte predisposição à PMD, no cromossomo 11 (na região dos loci INS e HRAS1). A possível correlação deste dado com a fisiopatologia da doença é que o gene estrutural que codifica a tirosina hidroxila-

se está localizado no mesmo segmento do gene da insulina INS e do oncogene HRAS1 no cromossomo 11 (Craig e col., 1986). Esta enzima participa da biossíntese da dopamina, a qual pode estar envolvida no mecanismo bioquímico das depressões (Willner, 1983). Detera-Wadleigh e col. (1987), entretanto, não observaram associação entre um locus para a PMD e os genes INS e HRAS1 do cromossomo 11 em pacientes bipolares que não pertenciam à comunidade Amish.

Heterogeneidade genética relacionada à PMD é sugerida por Hodgkinson e col. (1987), os quais sugerem que mutações em diferentes loci são responsáveis pelos fenótipos para a PMD em populações distintas. Desta forma, há evidências para duas formas de transmissão da PMD: autossômica dominante, relacionada ao cromossomo 11, e ligada ao cromossomo X.

I.1.2.4 - Bioquímica

I.1.2.4.1 - Catecolaminas

Estudos na década de 50 (citados em Godwin e col., 1972) relataram que alguns pacientes hipertensos tratados com reserpina (depletor de catecolaminas) apresentaram depressão. Isto levou pesquisadores a investigar o papel das catecolaminas nas depressões. A hipótese das catecolaminas para as doenças afetivas enfoca predominantemente a NE (Schildkraut, 1965) e a DA (Randrup e col., 1975). Em resumo, estas duas catecolaminas estariam diminuídas na depressão e aumentadas na mania.

A estratégia para avaliar esta hipótese engloba investigações de: (i) modo de ação de agentes farmacológicos ati

vos na mania ou depressão; (ii) substâncias que alteram o metabolismo das catecolaminas; (iii) análise de NE, DA e seus metabólitos em fluidos biológicos ou tecido cerebral "post-mortem" e (iv) sistemas metabólicos controlados por NE ou DA, tais como a liberação dos hormônios hipofisários (hormônio de crescimento, prolactina e LH-hormônio luteinizante).

O envolvimento da NE e DA na mania é sugerido pelos dados a seguir: (i) o precursor da NE e DA, L-DOPA, quando administrado em altas doses em pacientes bipolares, provoca episódios hipomaníacos (Murphy e col., 1971); e (ii) a administração de antidepressivos tricíclicos resulta em surtos de mania nestes pacientes (Bunney e col., 1970). Em contraste, agentes neurolepticos, que bloqueiam receptores dopaminérgicos, apresentam efeito anti-depressivo em alguns pacientes, supostamente por bloqueio seletivo de auto-receptores de DA (Willner, 1983).

Há outras evidências de hiperatividade adrenérgica e dopaminérgica na PMD. MacLeod & Lehmyer (1974) constataram decréscimo da liberação de prolactina, o que indicaria hiperatividade de DA, uma vez que esta exerce controle inibitório sobre a prolactina. Whalley e col. (1985, 1987) mostraram aumento de LH plasmático basal assim como de sua resposta ao LHRH (fator liberador de LH), em pacientes bipolares. Os autores atribuíram o fato ao aumento da atividade α -noradrenérgica central, embora uma atividade opióide reduzida também pudesse contribuir para isto (Kalra & Kalra, 1983).

As evidências de diminuição de NE e DA na depressão são as seguintes: (i) diminuição da excreção urinária de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, metabólito derivado em grande parte da NE cerebral (Schildkraut, 1973) e (ii) diminuição de

ácido homovanílico no líquor (Bowers, 1972).

A alta incidência de depressão na doença de Parkinson (Asnis, 1977) é uma indicação de que a DA está relacionada à depressão, uma vez que nesta doença ocorre um déficit acentuado de DA (Hornykiewicz, 1966).

Apesar das alterações acima descritas, o envolvimento das catecolaminas na PMD ainda não está esclarecido em bases moleculares.

I.1.2.4.2 - Indolaminas, Serotonina e MAO

Há evidências de um metabolismo anormal das indolaminas na depressão e na mania (Coppen, 1976). Na depressão ocorre diminuição da excreção urinária de triptamina e da concentração de ácido-5-hidroxiindolacético (5-HIAA - metabólito da serotonina) no líquor. Na mania os níveis de 5-HIAA também são baixos. Após a recuperação clínica dos pacientes, os níveis de 5-HIAA no líquor não mudam em relação àqueles encontrados durante as fases da mania ou depressão.

As plaquetas têm sido utilizadas como modelo de neurônios em relação à captação de serotonina, atividade da MAO e receptores de superfície (Lingjaerde, 1984). A captação de serotonina (5-HT) em pacientes com depressão bipolar foi relatada como deprimida (Scott e col., 1979; Meltzer e col., 1980; Meltzer e col., 1981). A extrapolação destes dados para a fisiopatologia da PMD é que uma captação reduzida de 5-HT nas sinapses serotoninérgicas significaria uma atividade sináptica aumentada, o que estaria em contraposição à hipótese de um decréscimo da atividade serotoninérgica na depressão. Entretanto,

menor captação de 5-HT poderia ser vista como um fenômeno compensatório para se contrapor a uma hiperatividade primária do sistema serotoninérgico (Lingjaerde, 1984).

A determinação da atividade da MAO plaquetária não oferece subsídios importantes para a PMD, uma vez que os dados são controversos (Nies e col., 1974; Gershon e col., 1979; White e col., 1980).

I 1.2.4.3 - Acetilcolina (Ach)

Janowsky e col. (1972) propuseram que o desequilíbrio entre os sistemas colinérgico e noradrenérgico está relacionado a PMD. A depressão estaria associada a um aumento de atividade colinérgica e a mania, com a hiperatividade noradrenérgica. Os pontos que favorecem o aspecto desta hipótese, relacionado a Ach, são: (i) a fisostigmina, que aumenta os níveis de Ach pela inibição da acetilcolinesterase, induz depressão (Modestin e col., 1973); (ii) trabalhadores expostos a inseticidas que inibem a acetilcolinesterase apresentam episódios depressivos (Gershon & Shaw, 1961); (iii) a fisostigmina e a lecitina (precursores da Ach) revertem vários sintomas de mania (Janowsky e col., 1973); Cohen e col., 1982); e (iv) drogas anticolinérgicas que atuam centralmente podem causar um estado semelhante a mania (Gisselman e col., 1975); (v) alguns antidepressivos tricíclicos, em concentrações terapêuticas, bloqueiam receptores muscarínicos colinérgicos (Snyder & Yamamura, 1977); e (vi) fibroblastos de pacientes bipolares apresentam maior densidade de receptores colinérgicos, em relação a indivíduos normais (Nadi e col., 1984).

Um outro aspecto sobre o envolvimento da Ach surge de estudos sobre o efeito do lítio (utilizado no tratamento da PMD) no metabolismo do inositol. Em cérebro de ratos tratados com lítio ocorre decréscimo de inositol e aumento dos níveis de monofosfato de inositol (Allison & Stewart, 1971; Allison e col., 1976), decorrente da inibição da enzima inositol-1-monofosfatase pelo lítio (Hallcher & Sherman, 1980). Estas alterações são dependentes da ação muscarínica tônica no sistema nervoso central, uma vez que não são observadas pelo bloqueio de receptores muscarínicos e são marcadamente acentuadas por inibidores da acetilcolinesterase (Allison e col., 1976). As relações complexas destas ações colinérgicas com o mecanismo da PMD ainda não estão completamente explicados.

I.1.2.4.4 - Transporte ativo de Na⁺

Alguns estudos têm indicado que na PMD ocorrem alterações no transporte ativo de Na⁺. O transporte de Na⁺ do sangue para o líquido está reduzido na depressão, retornando ao normal com a recuperação do paciente (Coppen, 1960). O sódio intracelular parece estar aumentado na mania e na depressão (Coppen & Shaw, 1963; Coppen e col., 1966). Na recuperação de pacientes depressivos, ou maníacos, a concentração intraeritrocitária de Na⁺ decresce (Naylor e col., 1971), estando este fato relacionado ao transporte ativo de Na⁺ e ao aumento da atividade da Na⁺-K+ATPase da membrana eritrocitária (Naylor e col., 1980). O tratamento com lítio também aumenta a atividade da Na⁺-K+ATPase (Naylor e col., 1977). Além disto, Naylor & Smith (1981) mostraram que linfócitos de pacientes

bipolares têm capacidade reduzida de produzir sítios novos de bomba de Na^+ , em resposta ao aumento da concentração intracelular de Na^+ .

Naylor & Smith (1981a) sugeriram que a atividade reduzida do transporte ativo de Na^+ na mania e na depressão poderia ser produzida pela ação do vanadato (V^{5+}), o qual é um forte inibidor da $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ (Cantley e col., 1977). Os autores observaram que pacientes tratados com altas doses de ácido ascórbico (3g/dia) tiveram melhora clínica significativa. Isto foi atribuído ao fato de o ácido ascórbico reduzir o íon vanadato (V^{5+}) ao vanadil (V^{4+}), que é um fraco inibidor da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (Cantley & Aisen, 1979). Entretanto, este dado também poderia sugerir que o ácido ascórbico estaria atuando como antioxidante ao nível de processos oxidativos, que teriam algum papel na fisiopatologia da PMD.

I.2 - FARMACOTERAPIA DA ESQUIZOFRENIA E PMD: NEUROLÉPTICOS E Li_2CO_3

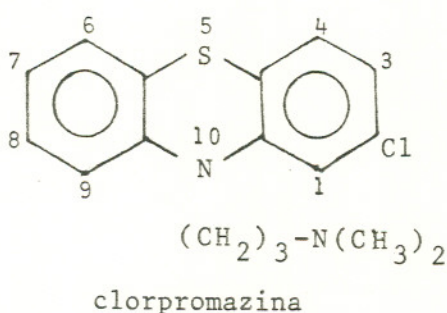
No tratamento dos distúrbios psiquiátricos utilizam-se drogas neurolépticas ou antipsicóticas (fenotiazínicos, tioxantenos, butirofenonas, indolonas e alcalóides da rauwolfia), estabilizadoras do humor (sais de lítio) e antidepressivos (inibidores da MAO e antidepressivos tricíclicos).

Os neurolépticos são utilizados na esquizofrenia e na fase maníaca da PMD. Estes agentes promovem um estado de indiferença afetiva, depressão da vigilância e da atividade motora e melhoria da excitação e agitação em pacientes agudos

ou crônicos (Carlsson, 1978a). A ação antipsicótica destes agentes está associada ao bloqueio de receptores dopaminérgicos (Carlsson & Lindqvist, 1963). Os efeitos funcionais da dopamina são antagonizados por neurolepticos de maneira dose-dependente (Andén e col., 1970; Jackson e col., 1975). Além disto, há uma correlação positiva entre este antagonismo e a potência antipsicótica destes agentes (Carlsson, 1978).

Esquemáticamente, pode-se distinguir três principais vias neuronais dopaminérgicas no cérebro: a nigro-estriada, mesolímbica e tuberoinfundibular (Ungerstedt, 1971). A ação de neurolepticos ao nível do corpo estriado resulta em efeitos colaterais parkinsonianos (ação extrapiramidal), sendo que os efeitos antipsicóticos estão relacionados às estruturas límbicas (Andén, 1972; Bartholini, 1976).

A clorpromazina (CPZ), droga fototóxica, é o protótipo das drogas fenotiazínicas foi introduzida na clínica psiquiátrica por Lehmann & Hanrahan (1954):



A CPZ pode ser oxidada a seu cátion radical (CPZ⁺) por interação com magnésio (Borg & Cotzias, 1962), vanadato (Sakurai e col., 1984), melanina (Bolt & Forrest, 1967; Larsson & Tjälve, 1979), pela ação de peroxidase (Pietto e col., 1964) e no metabolismo microssomal (Forrest e col., 1958). Alguns efeitos bioquímicos da CPZ são me-

diados pelo seu cation radical (CPZ^{\dagger}). Assim, a inibição da Na^+-K^+ ATPase e da captação de cálcio por sinaptossomos ocorre pela ação de CPZ^{\dagger} , enquanto que a proteção contra o choque osmótico nas membranas sinaptossomais e a inibição da captação de NE e DA são devidos à ação da CPZ (Lee e col., 1976). A CPZ e outros fenotiazínicos apresentam baixo potencial redox (Karreman e col., 1959). Embora não exista uma relação direta entre a atividade neuroleptica de fenotiazínicos e sua capacidade de doar elétrons (Domelsmith e col., 1977) estas drogas têm mostrado atividade antioxidante em tecido cerebral (Samrajski & Roslten, 1976; Smith e col., 1980; Szabó e col., 1983; Roy e col., 1984).

O tratamento com neurolepticos reduz a frequência de recidivas em pacientes esquizofrênicos. Davis (1975) observou que 55% dos pacientes que receberam placebo tiveram recidivas, comparados a 17% daqueles tratados com neurolepticos. As doses diárias para obtenção de efeitos antipsicóticos variam de 300 a 400 mg de CPZ, ou quantidade equivalente de outra droga, enquanto que doses mais baixas (50-200 mg) são utilizadas nos tratamentos de manutenção (Davis & Garver, 1978).

O lítio (Li_2CO_3) é o principal agente terapêutico na doença bipolar, exercendo ação profilática e terapêutica na mania e em algumas formas de depressão (Klein e col., 1980). O mecanismo de ação do lítio ainda não está completamente esclarecido. Em relação às catecolaminas, o lítio inibe a liberação de DA e NE, dependente de cálcio, nas terminações nervosas e pode alterar a recaptação e o armazenamento pré-sináptico de catecolaminas (Gallager e col., 1978). O lítio inibe a produção de AMP cíclico devido à estimulação hormonal (Forn

negativos de esquizofrênicos crônicos (Brambilla e col., 1986).

& Valdecasas, 1971) e a atividade da adenilato ciclase estimulada por Ca^{2+} /calmodulina (Mork & Geisler, 1987).

Allison & Stuart (1971) mostraram que o tratamento com lítio reduziu os níveis de inositol em cérebro de ratos, o que foi acompanhado por um aumento do inositol-1-fosfato (Allison e col., 1976). Isto se deve à inibição da inositol-1-fosfatase (Hallcher & Sherman, 1980) que desfosforila D-inositol-1-fosfato derivado do metabolismo do inositol pela via biossintética a partir da glicose. Em decorrência disto, os níveis de trifosfato de inositol e diacilglicerídeos, que atuam como segundo mensageiros na ativação celular, diminuiriam. Berridge e col. (1982) propuseram que as ações anti-maniacas do lítio seriam decorrentes da depleção de fosfatidilinositídeos, o que reduziria a resposta dos neurônios a estímulos colinérgicos muscarínicos, α -adrenérgicos e outros. Desta forma o tratamento com lítio poderia modular seletivamente a função de neurônios hiperativos que contribuem para o estado maníaco.

As doses prescritas para o Li_2CO_3 são de 900-1500 mg/dia em pacientes não internados e 1200-2400 mg/dia em pacientes maníacos hospitalizados; estas doses correspondem a concentrações plasmáticas de 0,8-1,25 mEq/L e 1,0-1,50 mEq/L, respectivamente (Cooper & Simpson, 1978).

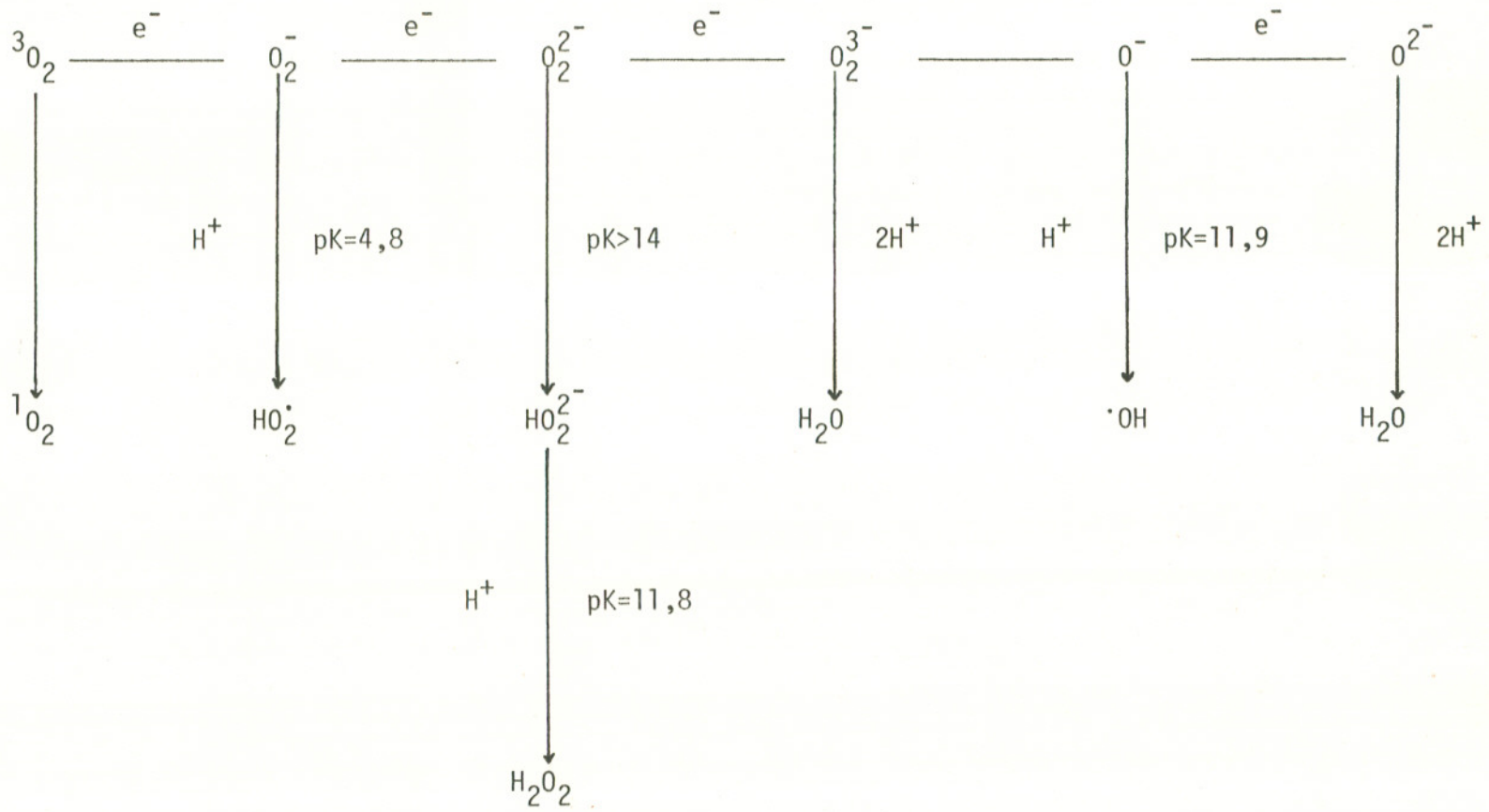
Recentemente, o tratamento da esquizofrenia com neuropeptídeos tem sido utilizado. A ceruleína, decapeptídeo homólogo da colecistocinina, não foi eficaz (Ito e col., 1986), enquanto que a vasopressina e o TRH (hormônio liberador de tireotrofina) tiveram efeitos significantes sobre os sintomas negativos de esquizofrênicos crônicos (Brambilla e col., 1986).

I.3 - ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO, "STRESS" OXIDATIVO E SISTEMAS ANTIOXIDANTE

I.3.1 - Espécies ativas de oxigênio X

A toxicidade do oxigênio decorre da geração "in vivo" de seus derivados reativos parcialmente reduzidos ou da formação de seus estados eletrônicos excitados (oxigênio singlete, 1O_2). As espécies ativas de oxigênio (EAO) derivadas de sua redução unieletrônica (esquema V) são: ânion-radical superóxido (O_2^-/HO_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\cdot$).

A molécula de oxigênio, no estado fundamental triplete (3O_2), é um birradical com dois elétrons não pareados em diferentes orbitais π^* (antiligante). Esses dois elétrons têm o mesmo número quântico de spin e para o oxigênio oxidar outro átomo ou molécula, aceitando um par de elétrons, estes também devem ter spins paralelos para ocupar os espaços orbitais π^* do oxigênio. Como a maior parte das biomoléculas é diamagnética (possuem elétrons com spins antiparalelos no orbital molecular), a restrição de spin impõe que nas oxidações pelo oxigênio este sofra reduções unieletrônicas. Esta restrição de spin pode ser superada também por metais presentes no sítio ativo de oxidases e oxigenases que têm a capacidade de doar ou receber um elétron (Hill, 1981).



Esquema IV - Redução unieletrônica do oxigênio (Green & Hill, 1984).

I.1.3.1.1 - Radical superóxido X

O produto de redução do O_2 por um elétron, o radical superóxido O_2^- , pode ser formado por reações de autooxidação e oxidações enzimáticas em organelas subcelulares. Dentre as substâncias de interesse biológico que se autooxidam gerando O_2^- incluem-se: hemoglobina (Misra & Fridovich, 1972a), mioglobina (Gotoh & Shikama, 1976), leucoflavinas (Ballou e col., 1969), tetraidropteridinas (Nishikimi, 1975), catecolaminas (Misra & Fridovich, 1972; Cohen & Heikkila, 1974), tióis (Misra, 1974), e quinonas (Misra & Fridovich, 1972b). Estas autooxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o O_2^- pode atuar como iniciador e propagador das cadeias. Várias enzimas tais como xantina oxidase, aldeído oxidase (McCord & Fridovich, 1969), NAD(P)H oxidase (Babior & Peters, 1981) e uma série de flavino desidrogenases geram O_2^- . A formação de O_2^- em organelas celulares ocorre pela autooxidação de componentes reduzidos das cadeias de transporte de elétrons ou por reações enzimáticas. Assim, detectou-se O_2^- em mitocôndrias (Loschen e col., 1974; Boveris, 1977; Turrens & Boveris, 1980; Babior & Peters, 1981), cloroplastos (Asada & Kiso, 1973) e núcleos isolados (Patton e col., 1980). Nos microsossomos, o sistema NADPH-citocromo P-450 redutase/citocromo P-450 gera O_2^- durante o metabolismo de alguns xenobióticos (Goodman & Hochstein, 1977). Outro processo que gera O_2^- em quantidade significativa é a fagocitose, devido à ativação da NAD(P)H oxidase associada à membrana de neutrófilos e outras células fagocitárias (Babior, 1979).

O radical O_2^- é bastante reativo em meio hidrofóbico (Roberts e col., 1983), mas tem baixa reatividade em meio aquo

so. Seu ácido conjugado, radical perhidroxil- HO_2^\cdot , é mais reativo que o O_2^- (Bielski e col., 1983) e por ser menos polar poderia atravessar membranas biológicas, o que não ocorre com o O_2^- (a menos que haja um canal iônico). Em pH fisiológico (7,4) apenas 0,25% do O_2^- está sob a forma de HO_2^\cdot ; no entanto, nas proximidades das membranas biológicas ocorre um decréscimo do pH que poderia favorecer o equilíbrio do par $\text{O}_2^-/\text{HO}_2^\cdot$ ($\text{pK}_a = 4,8$) para a forma protonada. O HO_2^\cdot pode, potencialmente, peroxidar lipídeos de membrana, como ocorre "in vitro" com ácidos graxos (Bielski e col., 1983).

I.3.1.2 - Peróxido de Hidrogênio \times

O processo de dismutação do O_2^- origina H_2O_2 :



Assim, o H_2O_2 é formado nos processos que geram O_2^- e também pela atividade de oxidases e desidrogenases em mitocôndrias (succinato desidrogenase e ácido graxo desidrogenase; Boveris & Cadenas, 1975), nos peroxissomas (lactato-oxidase, urato oxidase e D-aminoácido oxidase; Flashner & Massey, 1974) e no citoplasma (xantina oxidase; McCord & Fridovich, 1969). O H_2O_2 é uma substância não radicalar e sua reatividade em meio aquoso é limitada; porém, pode atravessar membranas biológicas.

I.3.1.3 - Radical Hidroxila X

A formação de radical HO·, "in vivo", ocorre provavelmente pela reação de Haber-Weiss catalizada por metais de transição:



Os metais Cu^{1+} , Ti^{3+} , Fe^{2+} e Co^{2+} podem reduzir o H_2O_2 (Walling, 1982). Agentes complexantes de baixo peso molecular biologicamente importantes, tais como ATP, ADP e citrato, quando quelados ao ferro podem catalizar a formação de HO· (Floyd, 1983; Flitter, 1983). O ferro ligado à transferrina e lactoferrina, em pH fisiológico, não participa da geração de HO· (Halliwell & Gutteridge, 1984; Baldwin e col., 1984; Winterbourn, 1984; Sibille e col., 1987; Aruoma & Halliwell, 1987). No entanto, o ferro localizado na ferritina pode ser mobilizado por O_2^- ou ascorbato e catalizar a formação de HO· (Bannister e col., 1984; Biemond e col., 1984; Thomas & Aust, 1986; Bolann & Ulvik, 1987). O ferro ligado a macromoléculas e membranas pode, "potencialmente", catalizar a formação de HO·.

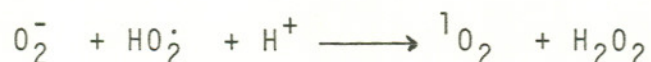
O radical HO· é extremamente reativo. Suas constantes de velocidade de segunda ordem são bastante elevadas (entre 10^9 e $10^{12} M^{-1} s^{-1}$) para aminoácidos (Singh & Singh, 1982), tióis (Lin & Armstrong, 1977) e proteínas (Thornalley & Vasák, 1985). Esta alta reatividade do HO· implica que esta espécie, quando gerada "in vivo", reagirá "in situ". Por outro lado,

a reação de HO· com uma biomolécula pode gerar um radical mais estável, o qual pode difundir-se a partir do seu local de formação e atacar outras moléculas alvo. Na maioria dos sistemas envolvendo espécies ativas de oxigênio o radical HO· parece ser o agente oxidante final (Halliwell & Gutteridge, 1985, 1986).

I.3.1.4 - Oxigênio Singlete X

A excitação do 3O_2 aos seus estados singletes $^1\Sigma_g^+$ (instável) e $^1\Delta_gO_2$ requer energia térmica ou fotoquímica e pode ocorrer quando vários pigmentos são iluminados na presença de 3O_2 . O pigmento ao absorver luz passa para um estado eletrônico de mais alta energia, podendo transferir energia para o 3O_2 e formar oxigênio singlete (1O_2).

A formação de 1O_2 ocorre em sistemas pigmentados expostos à luz, tais como a córnea (Zigler & Goosey, 1981) e cloroplastos (Halliwell, 1984). Outras fontes geradoras de 1O_2 são: (i) sistemas enzimáticos como o da lactoperoxidase, cloroperoxidase e mieloperoxidase |H₂O₂|haletos, (ii) o processo de peroxidação lipídica e (iii) transições redox de quinonas (Durán & Cadenas, 1987). A geração de 1O_2 na dismutação espontânea de O_2^- em meio aquoso foi evidenciada por Kahn (1970, 1981):



O 1O_2 participa em reações de fotossensibilização envolvidas no tratamento da psoríase pelo psoraleno (Pathak &

Joshi , 1984), na destruição de células tumorais por derivados de hematoporfirina (Evesen e col., 1984; Cortese & Kinsey, 1984) e nas fotodermatites causadas pelo benoxaprofeno (Sik e col. 1983).

Atualmente, o conceito de EAO tende a ampliar-se englobando outras substâncias radicalares (alcoxila $RO\cdot$, peroxila $ROO\cdot$, semiquinonas $SQ\cdot$) e moléculas eletronicamente excitadas como cetonas e aldeídos no estado triplete (Cilento, 1984).

I.3.2 — "Stress" Oxidativo

A expressão "stress" oxidativo é utilizada para definir uma situação na qual organismos aeróbicos apresentam um desequilíbrio entre sistemas antioxidantes e prooxidantes (espécies ativas de oxigênio) com a predominância destes últimos (Sies, 1985). Portanto, "stress" oxidativo é a lesão causada por espécies ativas de oxigênio (Sies, 1986).

A produção exacerbada de EAO parece estar envolvida em fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos, havendo um número crescente de evidências que indicam a participação destas espécies em diversos processos tais como a carcinogênese, inflamação, envelhecimento e na toxicidade de xenobióticos.

As EAO promovem lesões em: (i) ácidos nucleicos (Lesko e col., 1980; Inouye, 1984; Mello & Meneghini, 1984); (ii) resíduos de alguns aminoácidos em proteínas, tais como metionina (Brot & Weissbach, 1983) e histidina (Levine, 1983; Fucci e col., 1983); (iii) carboidratos, como é evidenciado pela degradação de desoxirribose (Halliwell & Gutteridge, 1981) e despolimerização de ácido hialurônico (McCord, 1974) e (iv)

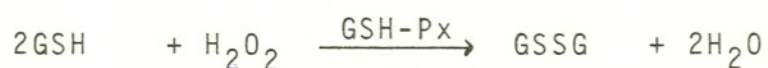
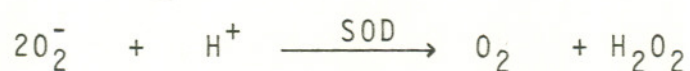
lipídeos, induzindo peroxidação (Thomas e col., 1982; Thomas e col., 1984; Thomas e col., 1985; Davis & Goldberg, 1987; Shan & Jayatilleke, 1987).

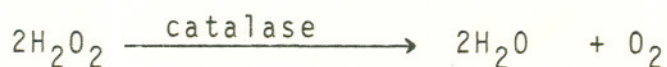
A possibilidade de as EAO atuarem sobre diversos tipos de moléculas em diferentes compartimentos celulares reforça a hipótese de estas espécies estarem relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças.

Através da determinação de enzimas antioxidantes ou produtos de lipoperoxidação em fluidos biológicos e células, o envolvimento de EAO é proposto nas seguintes patologias: lipofuscinose neuronal ceróide ou doença de Batten (Westermarck & Santavuori, 1984), distrofia muscular (Murphy & Kehrer, 1986), diabetes melito (Yagi, 1982); artrite reumatóide (Lunec e col. 1981; Rowley e col., 1984), mongolismo (Sinet e col., 1975; Baret e col., 1981), favismo (Mavelli e col., 1984) e porfiria aguda intermitente (Medeiros e col., 1982) dentre outras (revisões do assunto encontram-se em Halliwell & Gutteridge, 1985 e Halliwell & Grootveld, 1987).

I.3.3 - Sistemas Antioxidantes X

As EAO produzidas no metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares ($O_2^- \sim 10^{-11}$ M e $H_2O_2 \sim 10^{-8}$ M) pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase:





A função da superóxido dismutase (EC 1.15.1.1.) foi descoberta por McCord & Fridovich (1969). Estas enzimas estão presentes em todos os organismos aeróbicos e catalizam a dismutação de superóxido. Existem três classes de SOD: Fe-SOD, Mn-SOD e CuZn-SOD. A Mn-SOD e CuZn-SOD encontram-se em eucariotos, sendo que a Fe-SOD ocorre apenas em procariotos. A CuZn-SOD é uma enzima citoplasmática com peso molecular ao redor de 32.000 dältons, composta por duas subunidades idênticas, cada qual contendo um átomo de Cu^{2+} e um de Zn^{2+} e é inibida por cianeto. A Mn-SOD encontra-se na mitocôndria, sendo constituída por um tetrâmero de peso molecular 80.000 dältons, contendo dois átomos de Mn^{2+} (Weisiger & Fridovich, 1973).

Marklund e col. (1982) descreveram uma CuZn-SOD extracelular (EC-SOD) presente no plasma de vários mamíferos. A EC-SOD é tetramérica com peso molecular de cerca de 135.000 dältons, possuindo quatro átomos de Cu^{2+} e quatro átomos de Zn^{2+} por molécula (Marklund, 1984).

As atividades de SOD em diversos órgãos distribuem-se na seguinte ordem: fígado > rins > coração > intestino > baço > cérebro = pulmão > estômago (Westerman & Marklund, 1981; Takada e col., 1982). Os eritrócitos apresentam alta concentração de CuZn-SOD em comparação às plaquetas e ao plasma (Abella e col., 1987).

A glutathiona peroxidase (EC 1.11.1.9.) cataliza a reação de hidroperóxidos com glutathiona reduzida (GSH) para formar glutathiona oxidada (GSSG) e hidroperóxido reduzido. Esta enzima é específica quanto ao doador de hidrogênio (GSH),

mas pode reduzir vários hidroperóxidos orgânicos (Tan e col., 1986), inclusive peróxidos lipídicos. Ursini e col. (1985) descreveram uma GSH-Px com capacidade de reduzir hidroperóxidos de fosfolipídeos, localizada em células cardíacas.

A molécula de GSH-Px é um tetrâmero com peso molecular de 95.000 dältons, contendo um átomo de selênio por subunidade (Awasthi e col., 1975). Nas células, cerca de 2/3 de sua atividade está no citosol e 1/3 nas mitocôndrias. A GSH-Px apresenta alta atividade no fígado e em eritrócitos e baixa atividade nos músculos (Chow & Tappel, 1972).

A catalase (EC 1.11.1.6.) está localizada nos peroxissomas de fígado e rim e em microperoxissomas de várias outras células. É uma hemoproteína com quatro grupos prostéticos Fe^{3+} -protoporfirina IX. Tem especificidade para H_2O_2 , não atuando em hidroperóxidos orgânicos. Constitui uma segunda linha de defesa em relação à eliminação de H_2O_2 nas células, pelo fato de estar compartimentalizada e apresentar baixa afinidade pelo H_2O_2 (Corin & Cox, 1979). Uma outra evidência disto é que indivíduos homozigotos para a acatalasemia (deficiência de catalase) são assintomáticos (Aebi & Wiss, 1983).

Enzimas auxiliares como a NADPH-quinona oxirredutase (DT-diaforase), que reduz quinonas via dois elétrons sem formação de semiquinona e de O_2^- (Iyanagi & Yamazaki, 1970), glutationa redutase (GSSG redutase) e enzimas que fornecem NADPH (glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogliconato desidrogenase e isocitrato desidrogenase) contribuem para o sistema de defesa antioxidante do organismo (Sies, 1985).

Outros compostos que também participam deste sistema são antioxidantes como α -tocoferol (vitamina E; lipossolúvel; protege membranas celulares), ascorbato, β -caroteno (supressor de 1O_2), urato (supressor de 1O_2 e sequestrador

de radicais), proteínas plasmáticas como a ceruplasmina e albumina e, possivelmente, bilirubina (Sies, 1985; Liebler e col., 1986; Grootveld & Halliwell, 1987, Stocker e col., 1987; Wayner e col., 1987; Wasil e col., 1987).

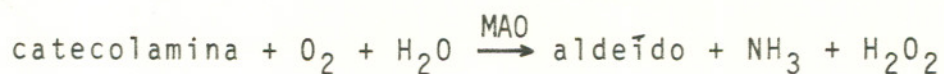
I.3.4 - "Stress" oxidativo e defesas antioxidantes cerebrais X

Hã pelo menos três fatos que poderiam contribuir para a suscetibilidade do tecido cerebral a lesões oxidativas (Demopoulos e col., 1982):

1. Maior solubilidade do oxigênio e maior reatividade de algumas de suas espécies reduzidas (O_2^-) em compartimentos hidrofóbicos, tais como as bicamadas lipídicas das membranas biológicas.
2. Os sistemas de membranas neuronais, especialmente as bainhas de mielina, são especialmente ricas em ácidos graxos insaturados e, portanto, particularmente mais suscetivas à peroxidação.
3. Os neurônios, devido ao seu alto conteúdo mitocondrial, tem uma taxa elevada de fosforilação oxidativa e são ricos em ubiquinona Q, um componente lipossolúvel da cadeia de transporte de elétrons que se autoxida, gerando O_2^- .

A maior parte das fontes geradoras de EAO que ocorrem em outros órgãos também está presente no cérebro. Uma fonte importante de H_2O_2 a nível cerebral é a monoamino oxidase (Sinet e col., 1980), que cataliza a desaminação oxidativa de

catecolaminas:



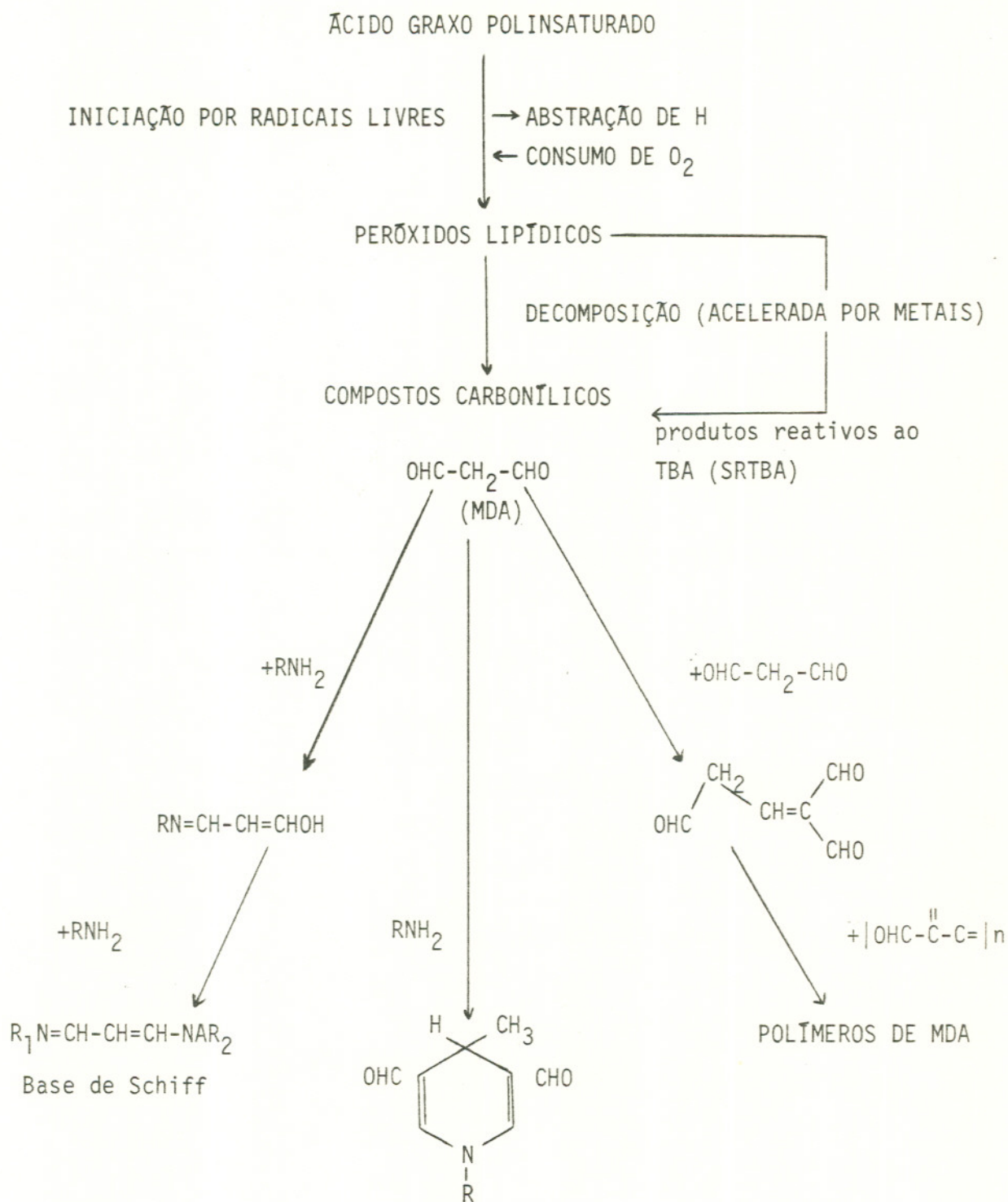
Esta enzima apresenta atividade aumentada quando os neurônios são ativados, em decorrência do mecanismo de captura de catecolaminas associado à membrana axonal.

Cohen (1982) propôs que a produção de H_2O_2 pela MAO (e possivelmente de EAO derivados) causa um "stress" oxidativo nos neurônios do trato nigroestriado, podendo ter relevância na destruição de neurônios dopaminérgicos, que ocorre na doença de Parkinson.

Uma das conseqüências das interações de radicais livres com estruturas celulares é a peroxidação de lipídeos polinsaturados, que pode ser detectada pelos produtos formados durante as diversas etapas deste processo, incluindo malonaldeído (MDA) e outros compostos reativos com o ácido tiobarbitúrico (SRTBA). O esquema VI mostra as diversas etapas deste processo (Halliwell & Gutteridge, 1985).

A reação de compostos carbonílicos formados na lipoperoxidação com aminoácidos das cadeias laterais de proteínas, aminoácidos livres ou bases de ácidos nucléicos resulta em bases de Schiff fluorescentes. Estes produtos, segundo Chio & Tappel (1969) e Chio e col. (1969), originam a lipofucsina que são grânulos densos associados a estruturas lisossomais. O acúmulo de lipofucsina no cérebro é diretamente proporcional à atividade das enzimas oxidativas presentes nos neurônios (Friede, 1962). O aumento de lipofucsina cerebral tem sido relacionado ao envelhecimento (Fletcher e col., 1973; Tappel, 1973) e parece ocorrer em pacientes com doença de Alzheimer (doença

degenerativa do sistema nervoso central) e mongolismo (Cohen, 1985).



Esquema VI - Formação de produtos na lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1985)

As implicações da interação de EAO com estruturas do sistema nervoso central são várias. Alguns ensaios "in vitro" demonstram que a peroxidação de lipídeos em tecido cerebral, induzida por EAO, inibe a ligação de antagonistas da dopamina (Heikkila e col., 1982) e do aminoácido GABA (Brayghler, 1985; Debler, 1986) aos seus receptores neuronais. Chia e col. (1983) demonstraram que o O_2^- induz lipoperoxidação e altera a estrutura da mielina.

O cérebro apresenta baixos níveis de atividade de catalase (Sinet e col., 1980), que está associada aos microperoxissomas (McKenna e col., 1976) e de GSH-Px (De Marchena e col. 1974), que está localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial (Vitorica, 1984). As atividades mais altas de GSH-Px estão associadas às regiões do caudado-putamen e substância "nigra", correspondendo à arborização terminal e aos corpos celulares de um dos principais grupos de neurônios dopaminérgicos no cérebro (Brannan e col., 1980). Savolainem (1978) demonstrou que as atividades da GSH-Px, DT-diaforase e SOD são mais elevadas nas células da glia, comparadas aos neurônios.

As duas formas de SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD estão presentes no cérebro (Westman & Marklund, 1981). Sua distribuição é relativamente homogênea no cérebro de ratos, havendo apenas pequenas diferenças entre as diversas regiões cerebrais. Considerando-se estas diferenças temos o seguinte perfil de atividade: medula oblongata > hipotálamo > cerebelo > hipocampo > corpo estriado > córtex (Thomas e col., 1976).

A inibição de SOD e GSH-Px em cérebro de ratos aumenta a susceptibilidade dos animais à hiperoxia, indicando a importância destas enzimas no mecanismo de defesa antioxidante cerebral (Puglia & Loeb, 1984; Powell & Puglia, 1987).

II. OBJETIVOS

As evidências sobre a geração de espécies ativas de oxigênio "in vivo", bem como sua importância em diversos processos metabólicos vêm se acumulando em um grande número de estudos (Halliwell & Gutteridge, 1985). Estas espécies, produzidas endogenamente seja a partir de substratos autooxidáveis ou por via enzimática, têm sido relacionadas à fisiopatologia de diversas doenças, incluindo algumas com manifestações neuro-psiquiátricas (Halliwell & Grootveld, 1987):

Apesar de existirem numerosos estudos sobre os aspectos biológicos da esquizofrenia e da PMD está muito distante a compreensão de seus mecanismos moleculares. Dentre as diversas hipóteses sobre as alterações bioquímicas relacionadas com a esquizofrenia, pelo menos duas delas envolvem espécies ativas de oxigênio: a teoria da oxidação das catecolaminas, resultando na formação de aminocromos (Hoffer, 1954) e a da geração endógena de produtos hidroxilados da dopamina (Stein & Wise, 1972).

A possível relação entre toxicidade do oxigênio e diversas doenças mentais foi sugerida por Michelson e col. (1977). No entanto, neste trabalho, a casuística mal definida no tocante ao diagnóstico e à medicação utilizada não permite concluir definitivamente que haja envolvimento das espécies

ativas de oxigênio nessas patologias.

Tendo em vista o exposto acima, com o objetivo mais amplo de evidenciar o "stress" oxidativo em pacientes portadores de esquizofrenia ou PMD e desenvolver um modelo experimental "in vivo" de indução de "stress" oxidativo no cérebro, nos propusemos a:

— Medir a atividade eritrocitária das enzimas SOD e GSH-Px em indivíduos normais, em pacientes com esquizofrenia e PMD para se estabelecer de maneira inequívoca a ocorrência de "stress" oxidativo nestas doenças. Com este objetivo, a casuística será maior e os critérios diagnósticos e o tratamento farmacoterápico serão melhor definidos.

— No grupo de pacientes portadores de esquizofrenia, comparar as atividades enzimáticas daqueles em uso de neurolepticos com os isentos tanto desta medicação quanto de outros psicotrpicos.

— Avaliar a influência da CPZ e do lítio nas atividades cerebrais e eritrocitárias de SOD e GSH-Px em grupos experimentais de ratos.

— Verificar, em ratos, se a geração de espécies ativas de oxigênio no cérebro, decorrente do processo de auto-oxidação da 6-OHDA injetada por via intraventricular tem como consequência o aumento da atividade eritrocitária de SOD.

— Medir a lipoperoxidação induzida pela 6-OHDA em

homogenatos de cérebro de rato e lipossomos de lecitina, considerando que este processo pode contribuir para a gênese de lesões em estruturas cerebrais.

- Investigar, no corpo estriado de cérebro de ratos, a formação de produtos hidroxilados da dopamina.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - ABREVIATURAS

- BHT - Hidroxi-tolueno butilado
Cit.C³⁺ - Ferricitocromo C
COMT - Catecol O-metil transferase
CPZ - Clorpromazina
CuZn-SOD - Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DBH - Dopamina β-hidroxilase
DDC - Dietilditiocarbamato de sódio
DMPO - 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DOPAC - Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
GSH - Glutationa reduzida
GSSG - Glutationa oxidada
GSH-Px - Glutationa peroxidase
Hb - Hemoglobina
HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão
HVA - Ácido homovanílico
IMAO - Inibidor da MAO

- ICOMT — Inibidor da COMT
MAO — Monoamino oxidase
MDA — Malonaldeído
Mn-SOD — Superóxido dismutase dependente de manganês
NBT — Azul de nitro-tetrazólio
NADPH — β -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
6-OHDA — 6-hidroxidopamina
OSS — Octil sulfato de sódio
RPE — Ressonância paramagnética eletrônica
SRTBA — Substâncias reativas ao TBA
TBA — Ácido 2-tiobarbitúrico
TCA — Ácido tricloroacético
TEMPOL — 2,2,6,6-tetrametil-1-oxipiperidinil

III.2 — REAGENTES

Os reagentes utilizados, de grau analítico, foram obtidos das seguintes procedências:

Sigma Chemical Company

Ácido tiobarbitúrico, albumina sérica bovina (fração V), D-anfetamina, catalase de fígado bovino, citocromo C-tipo III, cisteína, digitonina, L-DOPA, dopamina, epinefrina, ferricianeto de potássio, GSH, glutatona redutase de levedura-tipo III, hidroperóxido de tércio-butila, L-metionina,

NADPH, norepinefrina, cloridrato de 6-hidroxi-dopamina, octil sulfato de sódio, riboflavina, CuZn-SOD de eritrócito bovino, tirosinase e tropolona.

E. Merck Darmstadt

Acetato de sódio, ácido acético, ácido L-ascórbico, ácido cítrico, ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido ortofosfórico, ácido perclórico, bromo, carbonato de lítio, cianeto de potássio, cloreto de sódio, DTPA, EDTA, etanol absoluto, fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio, hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, molibdato de sódio, sulfato de cobre, sulfato de lítio, tartarato de sódio e potássio e tungstato de sódio.

Aldrich Chemical Company

DMPO e TEMPOL

Fluka Chemical Company

DOPAC e HVA

Eastman Organic Chemicals

Etilenodiamina e DDC

Abbot

Pargilina

Pharmacia Fine Chemicals

Sephadex G 10

Rhodia Química S/A

Cloridrato de clorpromazina

Labtest

Metahemoglobina humana

III.3 - EQUIPAMENTOS

Os aparelhos utilizados para as determinações espectrofotométricas foram: Zeiss DMR-10, Zeiss DMR-21 e Beckman, modelo 25. As medidas de fluorescência foram feitas em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-3 e os espectros de ressonância paramagnética eletrônica foram obtidos no espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica Varian E-4.

As medidas de consumo de oxigênio foram realizadas no oxígrafo YSI (Yellow Springs Instruments), modelo 53.

As análises cromatográficas foram feitas em um cromatógrafo líquido Waters 6000A com injetor universal U6K (Waters Association) e "loop" com capacidade máxima de 2 ml, acoplado a um detector amperométrico LC-4B da BAS (Bioanalytical Systems Inc.).

Outros equipamentos utilizados: centrífuga Sorvall RC-2B, disruptor de células Virsonic da Virtis Co. e aparelho estereotáxico para pequenos animais da marca David Kopf.

III.4 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

III.4.1 - Estudo com pacientes

No caso de humanos, utilizou-se uma casuística bem definida em relação ao diagnóstico e à medicação utilizada. Os níveis eritrocitários de SOD e GSH-Px foram determinados em portadores de esquizofrenia e psicose maníaco-depressiva, que estavam sob supervisão de psiquiatras, seja em regime de internação (esquizofrenia) ou ambulatorial (maníaco-depressivos).

III.4.2 - Estudos com animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, com peso entre 200-280 g criados no biotério do IQUSP (experimentos com CPZ e Li_2CO_3) e do ICBUSP (experimentos com 6-OHDA). Os animais do ICBUSP foram mantidos em sala com temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação controlada através de um ciclo de luz 12 horas claro/12 horas escuro. Todos os animais receberam fornecimento de água e ração "ad libitum", sendo que 24 horas antes de sacrificá-los a ração foi retirada.

III.4.2.1 - Efeito do tratamento agudo com clorpromazina e Li_2CO_3 nos níveis de atividade de SOD e GSH-Px e na peroxidação espontânea em fígado, cérebro e eritrócitos de ratos

Neste experimento utilizou-se 40 ratos, divididos em 4 grupos de 10. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e a cada um dos grupos administrou-se, respectivamente, clorpromazina (10 mg/kg), Li_2CO_3 (2mEq Li/kg), clorpromazina (10 mg/kg) e Li_2CO_3 (2mEq Li/kg) ou solução de NaCl 0,9% (controle) por via intraperitoneal, durante 1 semana. As soluções de clorpromazina e Li_2CO_3 foram preparadas no mesmo dia de sua utilização em NaCl 0,9%, estéril, e injetadas em um volume ao redor de 0,2 ml, por via intraperitoneal. Ao final de 1 semana de tratamento, os ratos foram sacrificados e mediu-se as atividades enzimáticas e as SRTBA (MDA) nos eritrócitos e homogenatos de fígado e cérebro.

III.4.2.2 - Efeito do tratamento crônico com clorpromazina nos níveis de atividade de SOD e GSH-Px em cérebro e eritrócitos de ratos

O experimento foi realizado com um total de 20 animais, divididos em 2 grupos de 10 animais (controle e experimental). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e a cada um dos grupos administrou-se, por via intraperitoneal, CPZ (10 mg/kg) ou NaCl 0,9% (controle), em dias alternados, du

rante 1 mês. Ao final deste período, os ratos foram sacrificados, medindo-se as atividades enzimáticas nos eritrócitos, hemisférios cerebrais e cerebelo.

III.4.2.3 - Efeito do "stress oxidativo" cerebral, induzido pela 6-OHDA, nos níveis de atividade da SOD cerebral e eritrocitária

Nesta fase experimental, os ratos foram divididos em grupos e injetados com 6-OHDA por via intraventricular, nas doses de 50 µg, 100 µg e 200 µg/5µl. Sacrificou-se os animais 24 ou 72 horas após a injeção intraventricular e mediu-se os níveis da SOD eritrocitária e cerebral.

A avaliação do efeito da CPZ sobre o "stress oxidativo", causado pela 6-OHDA, foi verificado fazendo-se um tratamento prévio com CPZ (descrito em III.4.2.1) e ao final deste, injetando-se 200 µg/ µl de 6-OHDA por via intraventricular. Após 72 horas, os ratos foram sacrificados para a execução das medidas de atividade da SOD.

III.4.2.4 - Geração intracerebral de produtos hidroxilados da dopamina

A metabolização das catecolaminas pela MAO e COMT foi inibida pela administração intraperitoneal de pargilina 50 mg/kg (IMAO) e tropolona 50 mg/kg (ICOMT), trinta minutos antes da injeção de D-anfetamina (20 mg/kg). Decorrida 1 hora

após a administração dos inibidores, isolou-se o corpo estriado do cérebro dos ratos e o tecido foi preparado para a investigação dos produtos hidroxilados da dopamina pela técnica de HPLC. Alguns animais foram injetados com DDC, inibidor não específico da dopamina beta-hidroxilase, na dose de 500 mg/kg por duas vezes, ou seja, 7 e 4 horas antes da administração de ICOMT e IMAO, seguindo-se o mesmo tratamento acima descrito.

III.4.3 - Estudos "in vitro"

III.4.3.1 - Detecção de espécies ativas de oxigênio geradas durante a autoxidação de 6-OHDA

A formação de espécies ativas de oxigênio pela autoxidação de 6-OHDA, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, contendo DTPA 0,1 mM ou 1 mM, foi investigada pelas técnicas de redução de ferricitocromo C, oxidação de epinefrina e ressonância paramagnética eletrônica.

III.4.3.2 - Indução de peroxidação lipídica por 6-OHDA

Utilizou-se como modelo, lipossomos multilamelares, preparados com lecitina de ovo, para investigar a indução

OBS.: Todos os reativos foram preparados com H₂O deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore).

de peroxidação lipídica pelas espécies ativas de oxigênio, geradas durante a autoxidação de 6-OHDA. A formação de SRTBA (MDA) foi utilizada como parâmetro indicador de lipoperoxidação.

III.5 - CASUÍSTICA

III.5.1 - Esquizofrenia

Os pacientes portadores de esquizofrenia crônica foram diagnosticados pelo Dr. José Ary Carletti do Hospital Psiquiátrico do Juqueri, segundo critérios estabelecidos pela 9ª Revisão da "International Classification of Diseases" (ICD-9, 1980).

III.5.2 - Psicose Maníaco-depressiva

Os portadores de psicose maníaco-depressiva foram diagnosticados pelo Grupo de Doenças Afetivas (GRUDA) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP, coordenado pelo Dr. Ricardo Moreno.

III.5.3 - Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 58 voluntários (40 homens e 18 mulheres), aparentemente sadios, na faixa etária de 18 a 55 anos, da raça branca, residentes na ci-

dade de São Paulo, alunos da Escola de Preparação de Soldados da Polícia Militar, estudantes da Escola de Educação Física da USP e funcionários do IQUSP e FCFUSP. Nenhum destes indivíduos apresentava antecedentes de doença psiquiátrica.

QUADRO I

Identificação e diagnóstico dos pacientes diagnosticados como portadores de esquizofrenia

CASO	NOME	IDADE (anos)	SEXO	COR	DIAGNÓSTICO	MEDICAÇÃO
1.	E.S.T.	58	M	L	291.1	Sem medicação há 5 meses
2.	E.P.O.	28	M	P	295.3 e 303	Sem medicação há 2 meses
3.	G.O.S.	48	M	ML	295.3	Sem medicação há 3 meses
4.	L.G.	54	M	L	300	Sem medicação há 6 meses
5.	D.P.M.	35	M	L	295.3	Sem medicação há 3 meses
6.	J.R.N.	45	M	L	298.9	Sem medicação há 6 meses
7.	B.D.S.L.	30	M	P	345.1	Sem medicação há 6 meses
8.	J.A.	44	M	P	317	Sem medicação há 6 meses
9.	W.R.	31	M	L	318 e 303	Sem medicação há 6 meses
10.	P.R.O.	28	M	ML	318	Sem medicação há 3 meses
11.	P.S.S.	25	M	L	295.3	Sem medicação há 4 meses
12.	B.A.S.	50	M	L	295.6	Sem medicação há 1 mês
13.	J.R.N.	45	M	L	298.9	Sem medicação há 6 meses
14.	P.P.D.	55	M	P	291.4	Sem medicação há 1 mês
15.	J.F.S.	37	M	L	295.3	Sem medicação há 1 mês
16.	D.P.D.	30	M	L	295.3	Sem medicação há 1 mês
17.	A.S.	37	M	L	295.3	Prometazina (75 mg), haloperidol (10 mg)
18.	G.J.S.	53	M	ML	295.3	Prometazina (25 mg), clorpromazina (125 mg), haloperidol (10 mg)
19.	E.L.C.	29	M	L	295.3	Sem medicação há 1 mês
20.	A.G.O.	38	M	L	317 e 295.3	Sem medicação há 2 meses
21.	C.V.S.	28	M	L	295.9 e 317	Prometazina (50 mg), fenobarbital(100 mg), haloperidol (10 mg)
22.	C.S.A.	34	M	L	295.3	Haloperidol (5 mg)
23.	C.M.A.S.	38	M	L	295.6	Sem medicação há 1 mês

CASO	NOME	IDADE (anos)	SEXO	COR	DIAGNÓSTICO	MEDICAÇÃO
24.	H.M.	53	M	X	298.9 e 318	Sem medicação há 3 meses
25.	A.A.F.	33	M	P	295.3	Sem medicação há 2 meses
26.	I.	53	F	L	318	Sem medicação há 11 meses
27.	H.H.	82	F	X	295	Sem medicação há anos
28.	H.Z.K.	71	F	X	295	Sem medicação há anos
29.	A.B.S.	55	F	P	295.6	Sem medicação há 11 meses
30.	M.I.	54	F	X	295.1	Fenobarbital (200 mg), haloperidol (10 mg)
31.	M.R.	74	F	ML	295.4	Diazepan (20 mg)
32.	M.C.S.	58	F	L	293 e	Sem medicação há anos
33.	M.T.	40	F	P	299.3	Fenitoina (100 mg), Fenobarbital (200 mg)
34.	L.C.	76	F	X	295.4	Sem medicação há anos
35.	R.N.O.	55	F	P	295.2	FeSO ₄ (200 mg), Metildopa (500 mg)
36.	L.L.	57	F	L	297.3	Sem medicação há 1 ano
37.	P.F.S.	35	F	P	295.3	Haloperidol (5 mg), clorpromazina (50 mg), fenobarbital (100 mg)
38.	A.S.J.	70	F	L	295.1	Clortalidona (50 mg)
39.	M.A.S.	26	F	L	315	Sem medicação há 4 meses
40.	C.A.S.	28	F	L	318 e 295.4	Prometazina (50 mg), haloperidol (10 mg)
41.	J.R.	53	F	L	298.9	Sem medicação há 11 meses
42.	A.A.A.	73	F	L	298.9	Sem medicação há 1 mês
43.	L.S.	46	F	L	345 e 295.6	Primidona (250 mg), fenobarbital (20 mg), carbamazepina (200 mg)
44.	J.P.	32	F	P	294.8 e 318	Sem medicação há anos
45.	L.L.	34	F	ML	298.9	Clorpromazina (100 mg), haloperidol (15 mg), fenobarbital (100 mg), prometazina (100 mg)

CASO	NOME	IDADE (anos)	SEXO	COR	DIAGNÓSTICO	MEDICAÇÃO
46.	I.R.O.	31	F	L	317	Flufenasina (70 mg), prometazina (75 mg)
47.	J.P.J.S.	66	F	L	290	FeSO ₄ (200 mg)
48.	D.F.	72	F	L	295.2	Metildopa (250 mg), digoxina (0,25 mg)
49.	M.L.D.					
50.	A.L.	64	F	L	295.3	Sem medicação há anos

OBS.: M, masculino; F, feminino; L, leucodérmico; ML, melanodérmico;
X, xantodérmico; P, pardo.

As doses de medicamentos referem-se a mg/dia.

QUADRO 2

Identificação dos pacientes diagnosticados como maníaco-depressivos

CASO	NOME	IDADE (anos)	SEXO	COR	MEDICAÇÃO
1.	E.C.R.	33	F	L	Imipramina (200 mg), Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
2.	H.M.F.	62	F	L	Imipramina (175 mg), Li ₂ CO ₃ (600 mg)
3.	M.H.A.	48	F	L	Levomepromazina (12,5 mg), Li ₂ CO ₃ (1000 mg)
4.	S.S.R.	55	F	L	Li ₂ CO ₃ (900 mg), Metil-Dopa (250 mg)
5.	N.C.F.	30	F	L	Levomepromazina (12,5 mg), Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
6.	M.A.S.	40	F	L	Imipramina (175 mg), Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
7.	E.F.C.	64	F	P	Imipramina (100 mg)
8.	E.V.C.	40	F	L	Li ₂ CO ₃ (600 mg)
9.	E.T.L.S.	49	F	L	Li ₂ CO ₃ (600 mg)
10.	M.R.G.	39	F	L	Li ₂ CO ₃ (900 mg)
11.	S.M.O.	32	F	X	Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
12.	A.F.N.	74	F	L	Clorimipramina (75 mg), Li ₂ CO ₃ (600 mg)
13.	D.G.C.	41	F	L	Levomepromamina (100 mg), Li ₂ CO ₃ (600 mg)
14.	J.G.L.F.	57	M	L	Clorpromazina (100 mg), Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
15.	V.L.S.F.	33	F	L	Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
16.	M.T.B.R.	40	F	L	Li ₂ CO ₃ (900 mg)
17.	J.D.S.	36	M	L	Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
18.	M.A.A.J.N.T.	46	F	L	Li ₂ CO ₃ (1200 mg)
19.	A.C.N.	50	F	L	Li ₂ CO ₃ (1000 mg)
20.	M.L.P.M.	50	F	L	Clorimipramina (250 mg) Li ₂ CO ₃ (750 mg)

OBS.: L, leucodérmico; X, xantodérmico, P, pardo.

As doses de medicamentos referem-se a mg/dia.

III.6 - METODOLOGIA

III.6.1 - Obtenção e preparação das amostras

III.6.1.1 - Hemolisados do sangue obtido dos pacientes

O sangue obtido por punção venosa dos pacientes, em jejum, foi coletado através do sistema Vacuntainer ou seringas descartáveis (Becton-Dickson), utilizando-se EDTA como anticoagulante. O sangue foi mantido em gelo e o hemolisado foi preparado até 6 horas após a coleta, de acordo com a metodologia descrita por Maral e colaboradores (1977).

III.6.1.1.1 - Preparação da amostra para análise de SOD

Tomou-se 2 ml de sangue total e centrifugou-se a 1000 g por 10 minutos, a 4°C. Removeu-se o plasma por aspiração e lavou-se os eritrócitos 3 vezes com NaCl 0,9%. Adicionou-se 1 ml de água destilada aos eritrócitos lavados, submetendo-os à lise por agitação a 4°C, durante 2 horas. Retirou-se 1 ml do hemolisado, adicionou-se 0,42 ml de uma mistura de clorofórmio-etanol (3:5 v/v) e 0,15 ml de água destilada, agitou-se vigorosamente com um bastão de vidro para precipitação da hemoglobina e centrifugou-se a 3000 g por 20 minutos.

Separou-se o sobrenadante que foi utilizado, posteriormente, para a determinação da atividade da SOD.

III.6.1.1.2 — Preparação da amostra para análise de GSH-Px

Centrifugou-se 1 ml de sangue total a 1000 g por 10 minutos, a 4°C. Retirou-se o plasma e lavou-se os eritrócitos 3 vezes com solução de NaCl a 0,9%. Adicionou-se 1 ml de água destilada aos eritrócitos e procedeu-se à lise através de congelamento e rápido descongelamento (3 vezes). Determinou-se a concentração de hemoglobina do hemolisado e diluiu-se para uma concentração final de 5 g/100 ml. Este lisado foi misturado com igual volume de reagente de Drabkin (100 partes de NaHCO_3 , 20 partes de $\text{K}_3|\text{Fe}(\text{CN})_6|$ e 5 partes de KCN, em 100 partes de água deionizada).

III.6.1.2 — Hemolisados do sangue obtido de ratos

Após incisão no abdomen dos animais, o sangue foi colhido da artéria aorta abdominal, utilizando-se seringas heparinizadas. O material foi mantido em gelo e os hemolisados foram preparados em seguida. Para as determinações da atividade da GSH-Px o hemolisado foi preparado como no item 6.1.1.2.

III.6.1.2.1 - Preparação da amostra para análise de SOD

Tomou-se 1 ml de sangue total que foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos, a 4°C. Retirou-se o plasma e lavou-se os eritrócitos 3 vezes com NaCl 0,9%. Foram adicionados 0,1 ml de digitonina 0,02% (Löhr & Waller, 1974) aos eritrócitos lavados e deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos a 4°C. Nós retiramos 0,5 ml do hemolisado, adicionamos 0,5 ml de clorofórmio-etanol (3:5 v/v), agitando a mistura vigorosamente com um bastão de vidro para a precipitação da hemoglobina. Após a centrifugação a 3000 g por 30 minutos, separou-se o sobrenadante a ser utilizado para determinação da atividade de SOD.

III.6.1.3 - Homogenatos de tecidos de ratos

Após o sacrifício dos ratos por exsanguinação, retirou-se o cérebro e, nos casos em que foi utilizado o fígado, este foi perfundido com 20 ml de solução de NaCl 0,9%. Os órgãos foram pesados, picados com tesoura cirúrgica e lavados com NaCl 0,9%, em gelo. Os homogenatos foram preparados pela adição de 3 volumes de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo KCl 0,1 M, utilizando-se um homogeneizador tipo Potter-E_vehjem. Em seguida, centrifugou-se a suspensão a 1000 g por 20 minutos, a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para determinação de MDA e o restante foi sonicado por 1 minuto, em gelo e centrifugado a 13.000 g por 1 hora, a 4°C (Westman & Marklund, 1981). O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas e proteínas totais.

III.6.1.4 - Isolamento do corpo estriado de cérebro de ratos

Em seguida à decapitação, retirou-se o cérebro do rato e dissecou-se o corpo estriado, o qual foi dividido ao meio (lados esquerdo e direito), imediatamente congelado em gelo seco e pesado. Uma parte do tecido foi armazenada a -80°C e a outra foi processada no mesmo dia.

A homogeneização do tecido foi feita em HClO_4 0,1 M, contendo ácido ascórbico 1 mM e EDTA 10 μM (Rollema e col., 1986) e o homogenato foi centrifugado a 4800 g por 20 minutos, a 4°C . Utilizou-se o sobrenadante para a determinação de catecolaminas e o "pellet", dissolvido em 1 ml de NaOH 1N, para a dosagem de proteínas totais.

III.6.1.5 - Separação dos metabólitos de dopamina em colunas de Sephadex G-10

O isolamento das catecolaminas foi realizado segundo a metodologia de Westerink (1983) e Rollema e col. (1986). As colunas preparadas em pipetas Pasteur (5 x 70 mm) foram preenchidas com Sephadex G-10 e lavadas com 3,0 ml de hidróxido de amônio 0,01 N e 3,0 ml de ácido fórmico 0,01 N. Os sobrenadantes obtidos dos homogenatos do corpo estriado foram transferidos para as colunas e eluiu-se a dopamina e 6-OHDA com 3,0 ml de ácido fórmico 0,02 M, contendo ácido ascórbico 1 mM e EDTA 10 μM . Os metabólitos HVA e DOPAC foram eluídos, em seguida, com 2,0 ml de amônia 0,02 M. Os eluatos foram imediatamente congelados em gelo seco e armazenados a -80°C .