

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

**Estresse oxidativo, conteúdo de S100B e ensaio Cometa no
sangue de pacientes com Transtorno do Humor Bipolar**

Ana Cristina Andrezza

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.*

2006

*... À minha família Armando, Marlês e Tatiane
pela dedicação, amor e compreensão.*

“Não há nenhum mar inavegável, nenhuma terra inabitável.”
Robert Thorne, Mercador e Geógrafo, (1527)

Agradecimentos

Ao Prof. Carlos Alberto Gonçalves pela oportunidade, orientação e dedicação ao trabalho. Muito obrigada!

Ao Prof. Flávio Kapczinski pela confiança, oportunidade, orientação e presença em todos os momentos.

Á Profa. Mirian Salvador pela compreensão, apoio, inspiração e oportunidade.

Á Profa. Carmen Gotfield pelo conhecimento passado e disposição constante a ajudar.

Aos meus pais, Armando e Marles, pelo amor, carinho e apoio em todas as etapas desse processo e da vida.

Á minha irmã, Tatiane, pelo companherismo e amor.

Aos meus avós por todo amor e orações que sempre dedicaram a mim.

Ao meu namorado, Daniel, que acompanhou o desenvolvimento desta dissertação e esteve presente em todos os momentos me apoiando e compreendendo a ausência e as longas horas em frente ao computador.

A todos os colegas do Laboratório 33 pelo carinho com que me acolheram e pelos ensinamentos que me passaram, em especial a Pati por sua amizade e companherismo em todos os momentos.

A todos os colegas do Laboratório de Psiquiatria Experimental pela amizade e ajuda em todas as etapas desse trabalho, em especial a Keila e a Adri pela constante amizade e ao Benício pela perseverança no trabalho e apoio.

A todos os colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes pela amizade de oito anos e por toda a paciência e carinho comigo, em especial a Carina e a Fernanda fundamentais para a realização dos experimentos desta dissertação.

A todos os Professores do Departamento de Bioquímica, pela oportunidade de passaram seus conhecimentos nas aulas.

Ao Departamento de Bioquímica e a UFRGS pela oportunidade de realizarmos este trabalho.

Aos órgãos financiadores: CAPES e CNPq pelas bolsas cedidas ao longo da iniciação científica e mestrado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
PARTE I	
Resumo.....	1
Abstract	2
Lista de Abreviatruras.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 TRANSTORNO DO HUMOR BIPOLAR.....	4
1.2 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS.....	6
1.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES	10
1.3.1 <i>Superóxido dismutase (Sod)</i>	11
1.3.2 <i>Catalase (Cat)</i>	12
1.3.3 <i>Sistema Glutathiona</i>	12
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E VULNERABILIDADE DO SNC.....	13
1.5 DANO AO DNA E ENSAIO COMETA.....	16
1.6. A PROTEÍNA S100B	18
1.7 OBJETIVO GERAL	21
1.7.1 <i>Objetivos Específicos</i>	21
PARTE II	
2. RESULTADOS	22
CAPITULO I	23
CAPITULO II.....	49
PARTE III	
3. DISCUSSÃO	71
3.1 <i>Conclusões</i>	85

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1. Geração de ERO a partir da redução do oxigênio (Halliwell 2001). 9

Figura 2. Estresse oxidativo e dano celular. (ERO) espécies reativas do oxigênio; (ONOO*) peroxinitrito; (NOS) óxido nítrico sintase (adaptada de Halliwell & Gutteridge, 2000).....14

Figura 3. Possíveis vias de oxidação das catecolaminas. (OH*) radical hidroxila; (O₂*) radical superóxido; (MAO) monoamino oxidase; (H₂O₂) peróxido de hidrogênio; (GSH) glutathiona reduzida; (GSSG) glutathiona oxidada (adaptada de Obata, 2002 e Baez *et al* 1997).....17

PARTE II

CAPITULO I

Figure 1. Serum S100B concentraion in BD and controls. BD patients wereseperated in euthymic, maniac and depressive groups. S100B was measured by ELISA. Demographic data are in Table 1. Values are expressed in mean ± standard error. * Statistically different from control (p<0.01 for depressed group and p<0.0 for maniac group).....43

Figure 2. Serum TBARS in BD patients and controls. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Demographic data are in Table 1. Values are expressed in mean ± standard error. * Statistically different from control (p < 0.01 for manic and euthymic groups and p < 0.05 for depressive group).....44

Figure 3. Serum superoxide dismutase (Sod) activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean ± standard error. a Statistically different from controls (p < 0.01); b Statistically different euthymic group (p < 0.05).....45

Figure 4. Serum glutathione peroxidase (GPx) activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean ± standard error. * Statistically different from control and other groups (p < 0.01).....46

Figure 5. Serum catalase activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean ± standard error. * Statistically different from controls and depressed group (p < 0.01).....47

Figure 6. Sod/(GPx + catalase) ration in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean ± standard error. a Statistically different from control (p < 0.01 for depressive group and p < 0.05 from manic group). b Statistically different from euthymic group (p < 0.05).....48

CAPITULO II

Figure 1. DNA damage assessed using the single cell gel electrophoresis (comet assay).....69

Figure 2. DNA damage index assessed im drugs used by patients.....70

PARTE III

- Figura 4.** Efeito extracelular dependente da concentração de S100B. Adaptada de Van Eldik & Wainwright, 2003..... 74
- Figura 5.** Diagramação dos resultados avaliados nos pacientes bipolares. Sod (superóxido dismutase); TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico); GPx (Glutathione peroxidase).778
- Figura 6.** Caracterização do tipo de dano ao DNA verificado no ensaio Cometa. Dano 0 = célula sem dano – Dano 4 = dano máximo ao DNA. 81

LISTA DE TABELAS

PARTE I

- Tabela 1:** Principais espécies reativas do oxigênio, nitrogênio e outras. (Tabela baseada no livro Radicais Livres de Halliwell & Gutteridge, 2000).....7

PARTE II

Capítulo I

- Table 1:** Demographics and clinical characteristics of BD patients and control group.....42

Capítulo II

- Table 1:** Demographic factors of patients and controls.....68

PARTE I

Resumo

O transtorno do humor bipolar (THB) é uma doença de curso recorrente, crônica e altamente incapacitante e está associado com o aumento da morbidade e da mortalidade por condições médicas gerais, como câncer e diabetes, as quais podem estar associadas com o aumento do dano ao DNA. Marcadores periféricos vêm sendo utilizados para verificarmos alterações bioquímicas que possam estar associadas com o THB e/ou possivelmente associadas à patofisiologia do THB. Diversos grupos têm proposto o envolvimento da S100B nos transtornos psiquiátricos. Outros marcadores bioquímicos, particularmente os associados como o dano oxidativo, também estão sendo estudados nesses transtornos. No presente estudo, nós avaliamos marcadores de dano neuronal, estresse oxidativo e dano ao DNA em pacientes com THB. As alterações astrocíticas foram verificadas através dos níveis séricos de S100B; espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes foram medidas para verificar os níveis séricos de estresse oxidativo nos paciente com THB nas diferentes fases da doença. O dano ao DNA foi avaliado utilizando-se o ensaio Cometa em trinta e dois pacientes bipolares tipo-I. Nós encontramos um aumento significativo dos níveis de S100B, atividade da Superóxido dismutase (Sod) e da razão entre Sod/(glutathione peroxidase + catalase) nos pacientes maníacos e deprimidos. Os pacientes bipolares tipo-I apresentaram elevação da frequência de dano ao DNA em comparação ao grupo controle. Estes resultados sugerem um potencial dano oxidativo nos pacientes bipolares. A variação oxidativa periférica pode estar indicando que estas ocorram durante as fases ativas da doença (depressão e mania) e estejam relacionadas ao aumento do dano ao DNA dos pacientes. Além disso, alterações astrocíticas também foram relatadas pelas alterações dos níveis de S100B.

Abstract

Bipolar disorder (BD) is a chronic, severe, and highly disabling psychiatric disorder that is associated with increased morbidity and mortality due to general medical conditions. There is an emerging body of evidence correlating chronic medical conditions to DNA damage. Peripheral markers have been used to assess biochemical alterations associated with BD and/or possibly involved in its pathophysiology. Many groups have proposed the involvement of S100B in psychiatric disorders. Other biochemical markers, particularly associated with oxidative stress have been studied in this disorder. In the present study we evaluated markers of brain injury, oxidative stress and DNA damage in patients with BD. Brain injury was assessed using serum S100B content; oxidative stress was assessed using serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and activities of antioxidant enzymes in BD patients in different episodes of disease. The DNA damage was assessed using Comet assay in thirty-two bipolar-I outpatients. We found a significant increment of serum S100B during episodes of mania and depression but not in euthymic patients. Superoxide dismutase (Sod) activity, as well the Sod/glutathione peroxidase plus catalase ratio, was also increased in manic and depressed patients. On the other hand, TBARS levels were increased in BD patients regardless of the phase of the disorder. Bipolar-I outpatients present an increase frequency of DNA damage as compared to controls. These findings suggest a potential oxidative damage in BD patients. This peripheral oxidative imbalance indicates that systemic changes are taking place during the active phases (depressive and mania) of the illness, and this may be increases DNA damage in BD patients. Such changes seem to relate to astrocyte function, as assessed using serum S100B.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA = ácido desoxiribonucleico
EO = Estresse Oxidativo
ERO= Espécies Reativas do Oxigênio
GPx = Glutathione peroxidase
GR = glutathione reductase
GSH = glutathione
GSSG = glutathione oxidada
GST = glutathione S-transferase
H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio
HNE = 4-hidroxil-2-nonenal
MDA = malondialdeído
NO[•] = óxido nítrico
NOS = óxido nítrico sintases
O₂^{•-} = radical superóxido
O₂¹ = oxigênio singlet
OH[•] = radical hidroxil
ONOO⁻ = peroxinitrito
RL = Radicais livres
RO[•] = radical peroxil
Sod = Superoxido dismutase
TBA = ácido tio-barbitúrico
TBARS = Espécies reativas do ácido tio-barbitúrico
THB = Transtorno do humor bipolar

1. Introdução

1.1 Transtorno do Humor Bipolar

O transtorno bipolar do humor (THB) é uma doença de curso recorrente, episódico, crônica e incapacitante (Belmaker 2004), caracterizado por episódios recorrentes de mania, hipomania, depressão e estados mistos. (Sajatovic 2005). Alguns estudos estimam que a prevalência do THB está entre 1% e 2% (Kessler et al 1994; Belmaker 2004). Um estudo multicêntrico realizado no Brasil em 1992 estima que 1,1% da população de Porto Alegre, RS, é portadora de Transtorno do Humor Bipolar (THB) (Almeida 1992); entretanto, quando são também consideradas formas mais leves desse transtorno (espectro bipolar), estudos indicam uma prevalência de até 6% na população em geral (Judd and Akiskal, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde o THB é a sexta causa de incapacidade entre condições médicas e psiquiátricas entre pessoas com 15 a 44 anos (Murray & Lopez 1997). Estudos têm demonstrado que o gasto anual para a sociedade, com pacientes Bipolares, varia entre 1,8 a 45 bilhões de dólares; indiretamente causado devido a esses pacientes pararem de trabalhar (Wyatt and Henter 1995; Das Gupta and Guest 2002; Hakkaart-van Roijen et al 2004). Além disso, Morselli et al (2004) publicaram recentemente uma nova versão do *GAMIAN-Europe/BEAM survey*, e demonstraram que menos da metade da população estudada (n=968) possui um trabalho ativo (Morselli 2004). Além disso,

comorbidades clínicas e psiquiátricas são comuns nos pacientes com THB (Sajatovic 2005).

Alterações neuroquímicas induzidas pela mania estão associadas ao surgimento de efeitos lesionais em células neurais (Post et al 1982; Friedman et al 1993; Johnston-Wilson et al 2000). Tem sido sugerida, nos últimos anos, em estudos variados, a ocorrência de redução das células gliais em transtornos do humor. Assim sendo, conceitualmente tem sido proposto que o THB é uma patologia complexa, multifatorial e relacionada a alterações na plasticidade estrutural cerebral em neurônio e glia (Ongur et al 1998; Johnston-Wilson et al 2000; Rajkowska et al 2001). Além disso, o THB está associado com o aumento da morbidade e da mortalidade por condições médicas gerais, como doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes mellitus (Kupfer 2005).

As bases biológicas do THB incluem estudos relacionados à genética, às vias neuro-hormonais, neurotransmissão, vias de transcrição de sinal, regulação da expressão gênica, estresse oxidativo, entre outros. Estudos genéticos têm sugerido, fortemente, que a patofisiologia pode ser explicada, pelo menos em parte, por fatores genéticos (Lenox et al 2002). Existem diversas evidências mostrando o envolvimento das espécies reativas do oxigênio (ERO) em diversas patologias, especialmente nos transtornos neurológicos e psiquiátricos devido a vulnerabilidade do sistema nervoso central ao estresse oxidativo (Takuma et al 2004). Estudos recentes têm mostrado alterações nas enzimas antioxidantes nos eritrócitos de pacientes com THB (Ozcan et al 2004; Rajenkar et al 2003; Kuloglu et al 2002). Além disso, em um estudo piloto encontrou-se um aumento dos níveis da proteína S100B durante episódios maníacos (Machado-Viera et al 2002).

1.2 Radicais livres e espécies reativas

O oxigênio constitui tanto um benefício quanto uma ameaça aos organismos vivos e aqueles que se capacitaram a usufruir seus benefícios tiveram, por necessidade, de desenvolver uma série de defesas contra os seus perigos (Fridovich 1978).

De maneira simples, o termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell and Gutteridge 1990; Halliwell 2001). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Gutteridge & Halliwell 2000). Os principais radicais livres e suas principais funções estão relacionados na Tabela 1.

Nos mamíferos são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas os que ganham mais destaque devido a reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio. O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) inclui não somente radicais livres, mas também, espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio, capaz de levar a formação do radical hidroxila, quando em presença de metais (Halliwell 2000, Halliwell 2001, Shao et al 2002).

As ERO e outros RL podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Na célula, as ERO são produzidas como consequência do metabolismo celular normal (Halliwell 2001). As principais fontes endógenas são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo

enzimático citocromo P-450, o processo de fagocitose e a oxidação de pequenas moléculas como hidroquinonas, ferredoxinas reduzidas e catecolaminas, entre outras (Salvador et al 2004; Andrezza et al 2004).

Tabela 1: Principais espécies reativas do oxigênio, nitrogênio e outras. (Tabela baseada no livro Radicais Livres de Halliwell & Gutteridge 2000).

Principais Espécies Reativas^a		
<i>Espécies reativas do Oxigênio^b</i>		
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Radical mais abundante nas células, gerado por reações de autooxidação, como a cadeia de transporte de elétrons, algumas enzimas como a xantina oxidase ou pode ser formado por ação das células fagocitárias.
Peróxido de hidrogênio (não-radicalar)	H_2O_2	Gerado principalmente na matriz mitocôndrial durante o processo de redução do O_2 a H_2O . Atua como segundo mensageiro intra e intercelular ativando o fator de transcrição NF- κ B em algumas células.
Radical hidroxila	OH^{\cdot}	É extremamente reativo, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. Possui uma meia vida de 7×10^{-4} s. A capacidade desse radical em lesar as células aumenta visto que o organismo não possui uma defesa específica para esse radical
Oxigênio Singlet (não-radicalar)	O_2^1	Esse pode ser gerado por indução luminosa, reações catalisadas por peroxidases ou por células fagocíticas. Pode lesar o DNA diretamente.

Espécies Reativas do Nitrogênio

Oxido Nítrico (radical)	NO^\bullet	Possui um importante papel no cérebro na vasoregulação e na neurotransmissão. Não possui alta reatividade, porém quando em excesso pode reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e formar o radical ONOO^\bullet .
Peroxinitrito (não-radicalar)	ONOO^\bullet	Esse radical pode causar a oxidação e a nitratação de lipídios, DNA e resíduos de aminoácidos de proteínas.

Outras espécies ou radicais livres

Radicais do Enxofre	S^\bullet	Os radicais do enxofre são formados quando um grupo tiol (-SH) reage com vários radicais do oxigênio ou com metais de transição (Fe^{3+}). A homocisteína, por sua vez, é capaz de gerar radicais tióis.
Radicais Lipídicos	$\text{RO}^{\bullet c}$, ROO^\bullet	O radical alcóxil (RO^\bullet) e peróxil (ROO^\bullet) possuem reatividade intermediária. O ROO^\bullet pode dar início a reações em cadeias de RL, sendo particularmente importante quando ocorrem em lipídios.

^aAs espécies reativas envolve os radicais livre e os não-radicais.

^bAs ERO são formadas principalmente na cadeia de transporte de elétrons, com exceção do oxigênio singlet.

^cUtiliza-se o símbolo R para representar de modo geral qualquer grupo alquila.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Figura 1). A formação mais freqüente das ERO ocorre no metabolismo incompleto da redução do O_2 a H_2O . O oxigênio recebe um elétron formando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ o qual recebe mais elétron formando o H_2O_2 esse por sua vez se reduz a OH^- que recebendo mais um elétron passa a H_2O (Halliwell 2000; Andersen 2004).

As espécies reativas possuem um papel fisiológico importante como por exemplo, o H_2O_2 é um segundo mensageiro para a ativação do fator NF- κB em alguns tipos celulares (Halliwell 2001; Bowie & O'Neill 2000), o NO atua como um neurotransmissor e neuromodulador (Andersen 2004; Esplugues 2002; Hobbs 1999). Algumas espécies reativas possuem baixa reatividade química, por exemplo, o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é gerado por reações de autooxidação, como a cadeia de transporte de elétrons ou por enzimas como a xantina oxidase (Fridovich 1997; Bolmann & Ulvik 1990).

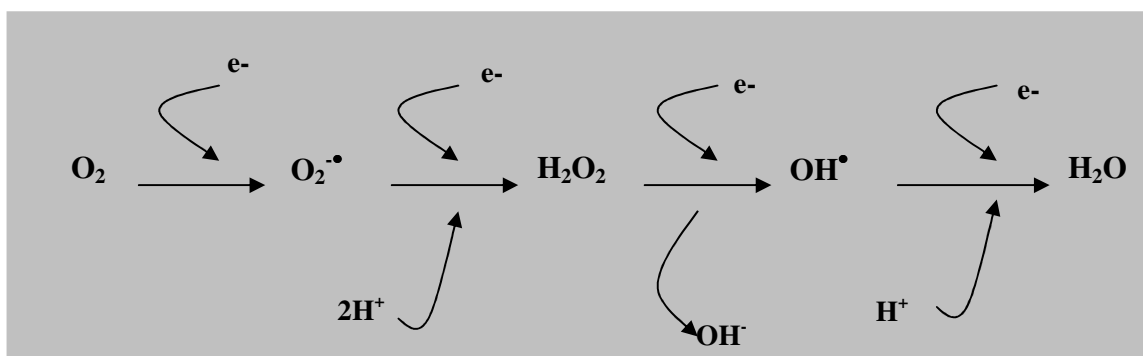
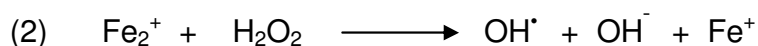
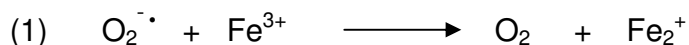


Figura 1. Geração de ERO a partir da redução do oxigênio (Halliwell 2001).

O radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ participa na reação de Haber-Weiss (1) gerando oxigênio e ferro reduzido, o qual catalisa a reação de Fenton (2) formando o radical hidroxila (Halliwell & Gutteridge 1984).



O radical hidroxila possui alta reatividade podendo atacar e lesar todas as biomoléculas: carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (Vonn Sonntag 1897). As

bases purínicas e pirimidínicas e resíduos de desoxirribose do DNA ao serem atacadas pelo radical OH^\bullet geram diversos produtos, a maioria deles mutagênicos (Halliwell, 2001). Estes produtos incluem citosina glicol, 8-hidroxiadenina e 8-hydroxiguanina (Droge 2002; Fujikawa et al 1998).

Os lipídios oxidados pelos RL iniciam uma cadeia de reações conhecida como peroxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge 2000). Na presença de ERO os lipídios reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários (Droge 2002). Os radicais alcóxil e peróxil podem causar danos as membranas protéicas das células levando a modificação da estrutura e diminuição da fluidez da membrana celular resultando na alteração das suas propriedades fisiológicas. A destruição da membrana celular causa a perda da função das organelas podendo levar à morte celular (Andersen 2004; Droge 2002; Niki et al 1993). A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE) (Halliwell 2001; Esterbauer et al 1991).

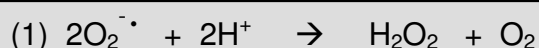
1.3 Defesas Antioxidantes

O nosso organismo dispõe de um sistema celular de defesa contra as ERO produzidas no organismo (Bonney et al 2002). São as chamadas defesas antioxidantes primárias, que incluem as enzimas superóxido dismutase (Sod),

glutathione peroxidase (GPx), catalase (Cat), glutathione S-transferase (GST)¹ e outras que não participam diretamente do processo, mas fornecem suporte à GPx, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a glutathione redutase (GR) (Halliwell & Gutteridge, 2000; Droge, 2002). Além das defesas enzimáticas existem ainda antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides e outras moléculas como β -caroteno, N-acetilcisteína e glutathione (Borella & Varela 2004). Esses antioxidantes agem principalmente bloqueando a cadeia de peroxidação lipídica, eliminando oxigênio ou quelando íons metálicos (Sies 1993).

1.3.1 Superóxido dismutase (Sod)

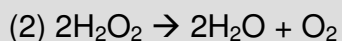
Descoberta em 1969 por McCord e Fridovich, as Sod são metaloenzimas abundantes nas células aeróbias, responsáveis pela dismutação do radical superóxido a H_2O_2 e O_2 (Reação 1) (Jhonson and Giulivi 2005). Em mamíferos, foram identificadas três diferentes tipos de enzimas Sod: Sod1 ou SodCuZn, um homodímero de cobre e zinco encontrada no citoplasma; Sod2 ou SodMn, um tetrâmero contendo manganês em seu sítio ativo e encontrada exclusivamente na mitocôndria e Sod3 ou SodEC, a mais recente Sod caracterizada, um tetrâmero de cobre e zinco que apresenta um peptídeo sinalizador que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular (Fridovich 1998; Zelco et al 2002).



¹ A GST pode não ser considerada uma defesa antioxidante por depletar os níveis de glutathione necessária para a formação de GPx (Hayes et al 2005). O mecanismo da GST de conjugar-se com o-quinonas (composto que pode levar a formação de semi-quinonas, neurodegenerativas, explicado na secção 1.4.) é um dos mecanismos pelo qual a GST é considerada uma defesa antioxidante (Baez et al, 1997).

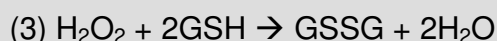
1.3.2 Catalase (Cat)

A enzima catalase é uma ferrihemoenzima formada por quatro unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético de heme no centro catalítico, para a ativação dos tetrâmeros é requerido NADPH (Borella & Varela 2004; Halliwell & Whitman 2004; Halliwell 2001). A principal fonte de NADPH é reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a primeira reação da via das pentoses (Ursini *et al.*, 1997). A catalase converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, (ver reação 2) (Fridovich 1998). Em células eucarióticas, existem catalases citosólicas e perioxossomais, codificadas pelos genes CTT1 e CTA1, respectivamente (Speavak *et al.* 1986), estando presente principalmente nos peroxissomas (Halliwell 2001).

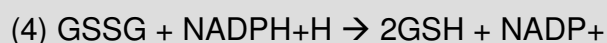


1.3.3 Sistema Glutaciona

O H_2O_2 também pode ser detoxificado por uma seleno-enzima a glutaciona peroxidase (GPx). A sua ação está baseada na oxidação de glutaciona (GSH) ao seu dissulfeto correspondente GSSG (reação 3) (Chance *et al.* 1979; Baez *et al.* 1997):



A razão entre GSH e GSSG em células normais é alta, pois existe um mecanismo de redução da GSSG que é catalisado pela enzima glutathiona redutase (GR) (Chance et al 1979):



A glutathiona desempenha também um importante papel na detoxificação de xenobióticos e vários compostos endógenos, como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos, através de reações mediadas pela glutathiona transferase (Halliwell 2001).

1.4 Estresse oxidativo e vulnerabilidade do SNC

Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Entretanto em situações patológicas, esta produção pode aumentar substancialmente. O estresse oxidativo (EO) pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de ERO, ou uma combinação de ambas condições (Figura 2) (Pawlak et al 1998; Beckman & Ames 1998; Halliwell 2001).

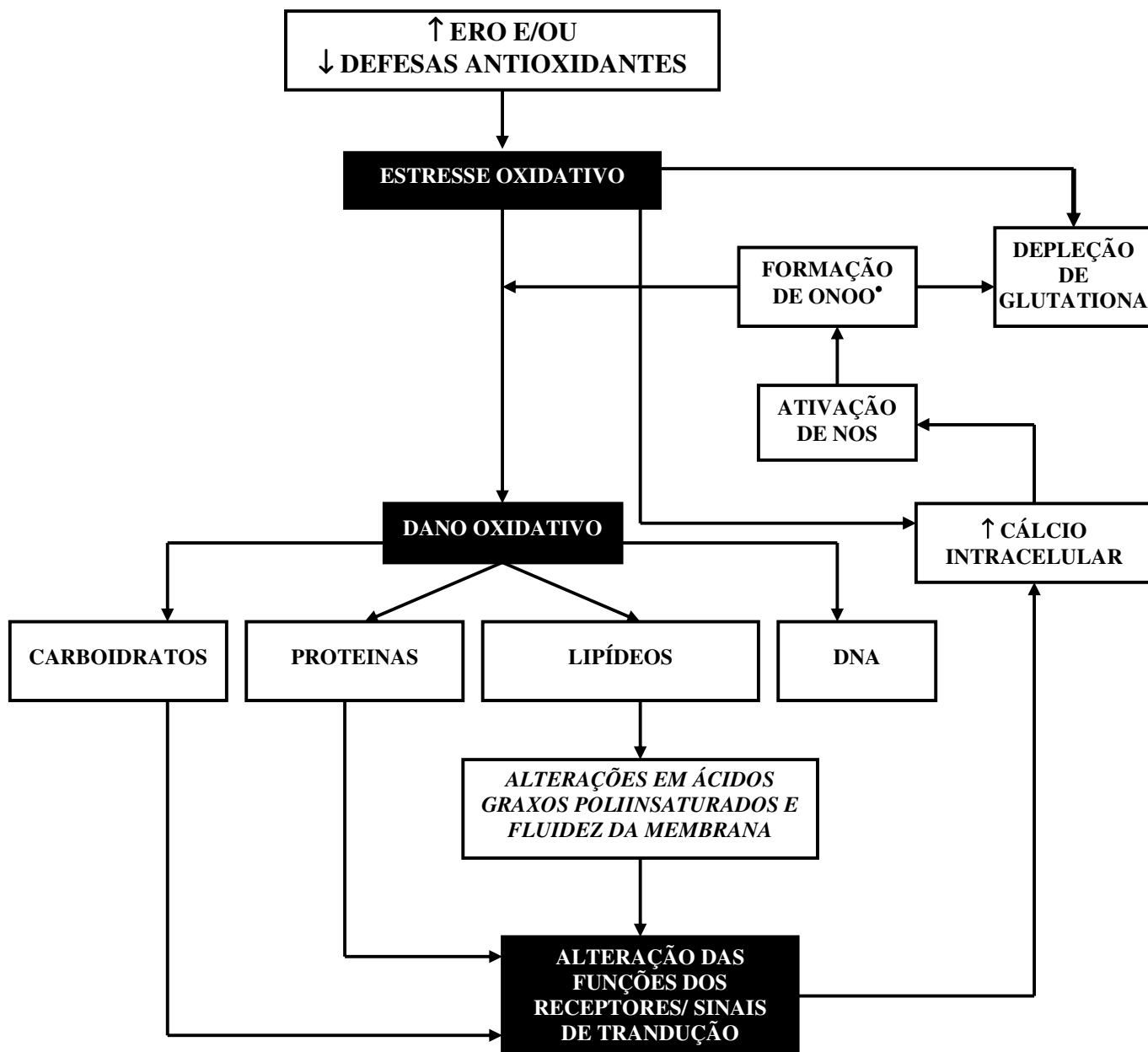


Figura 2. Estresse oxidativo e dano celular. (ERO) espécies reativas do oxigênio; (ONOO*) peroxinitrito; (NOS) óxido nítrico sintase (adaptada de Halliwell & Gutteridge 2000).

Todos os tecidos são vulneráveis ao EO, porém o SNC é particularmente sensível (Mahadik et al 2001). Esta situação pode ser desenvolvida por alguns fatores: (1) alta taxa de consumo de oxigênio (Halliwell 2001); (2) elevados níveis de lipídios poliinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica (Mahadik et al 2001). (3) uso extensivo do glutamato como neurotransmissor, o glutamato ao se ligar no seu receptor (NMDA) libera Ca^{2+} que estimula a atividade da óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), levando a produção de NO^{\cdot} (Schulz et al 1997; Schulz et al 1996); (4) auto-oxidação de alguns neurotransmissores podem levar a formação de ERO (Obata 2002, Qureshi et al 2004).

Todas as regiões do SNC possuem CuZnSOD, MnSOD, GSH (em quantidade milimolares) e GPx. Além dessas enzimas o cérebro possui a glutationa S-transferase que promove a eliminação das o-quinonas formadas pela oxidação das catecolaminas (Halliwell & Gutteridge 2000).

As catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) podem ser oxidadas através de uma via não-enzimática (auto-oxidação) e enzimática, no caso da dopamina (Figura 3) (Obata 2002; Halliwell 2001; Sagin et al 2004). A auto-oxidação das catecolaminas ocorre em presença de íons Fe^{2+} livres, originando as respectivas o-quinonas, que podem reduzir-se a radical o-semiquinona, numa reação mediada pela citocromo P-450 redutase com NADPH como cofator (Baez 1997). A glutationa S-transferase, utilizando a GSH, forma um complexo estável com a o-quinona, com o objetivo de diminuir a formação de o-semiquinona, um radical neurotóxico (Obata 2002; Baez 1997).

A dopamina pode ser oxidada na presença da enzima monoamino oxidase (MAO), resultando na formação do ácido 3,4 diidroxifenilacético e H_2O_2 , capaz de

gerar OH[•]. Essa via ocorre especialmente nos gânglios da base (putamen, núcleo caudal e substantia nigra) onde existem altas concentrações de dopamina, oxigênio e ferro (Qureshi et al 2004; Obata 2002).

O THB é marcado por episódios recorrente de mania e depressão os quais estão acompanhados por alterações nos níveis das catecolaminas e indolaminas (Schatzberg et al 1987; Machado-Vieira et al 2004), evidenciando uma provável alteração nos níveis de estresse oxidativo.

1.5 Dano ao DNA e Ensaio Cometa

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Estima-se que aproximadamente 2×10^4 lesões oxidativas ao DNA ocorram no genoma humano por dia (Ames & Shigenoga 1992). Acredita-se que desta maneira o reparo destas lesões possua um papel central na prevenção do aumento de mutações nos organismos vivos (Maluf, 2004). Muitas evidências sugerem que danos cumulativos ao DNA causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) contribuam para diversas condições clínicas como câncer (Palyvoda et al 2003; Rajeswari et al 2000), esquizofrenia (Psimadas et al 2004), Alzheimer (Migliore et al 2005). Porém, devemos levar em consideração que o dano ao DNA pode ser induzido por hábitos alimentares e estilo de vida (McCord & Edeas 2005). Alguns estudos têm mostrado que o cigarro pode aumentar o dano ao DNA tanto em jovens como em adultos (Piperakis et al 2004). Singh et al (1991) mostrou que o dano ao DNA aumenta com o envelhecimento, além disso, está bem relatado que a frequência de mutações também aumenta com o envelhecimento causado pelo acúmulo de

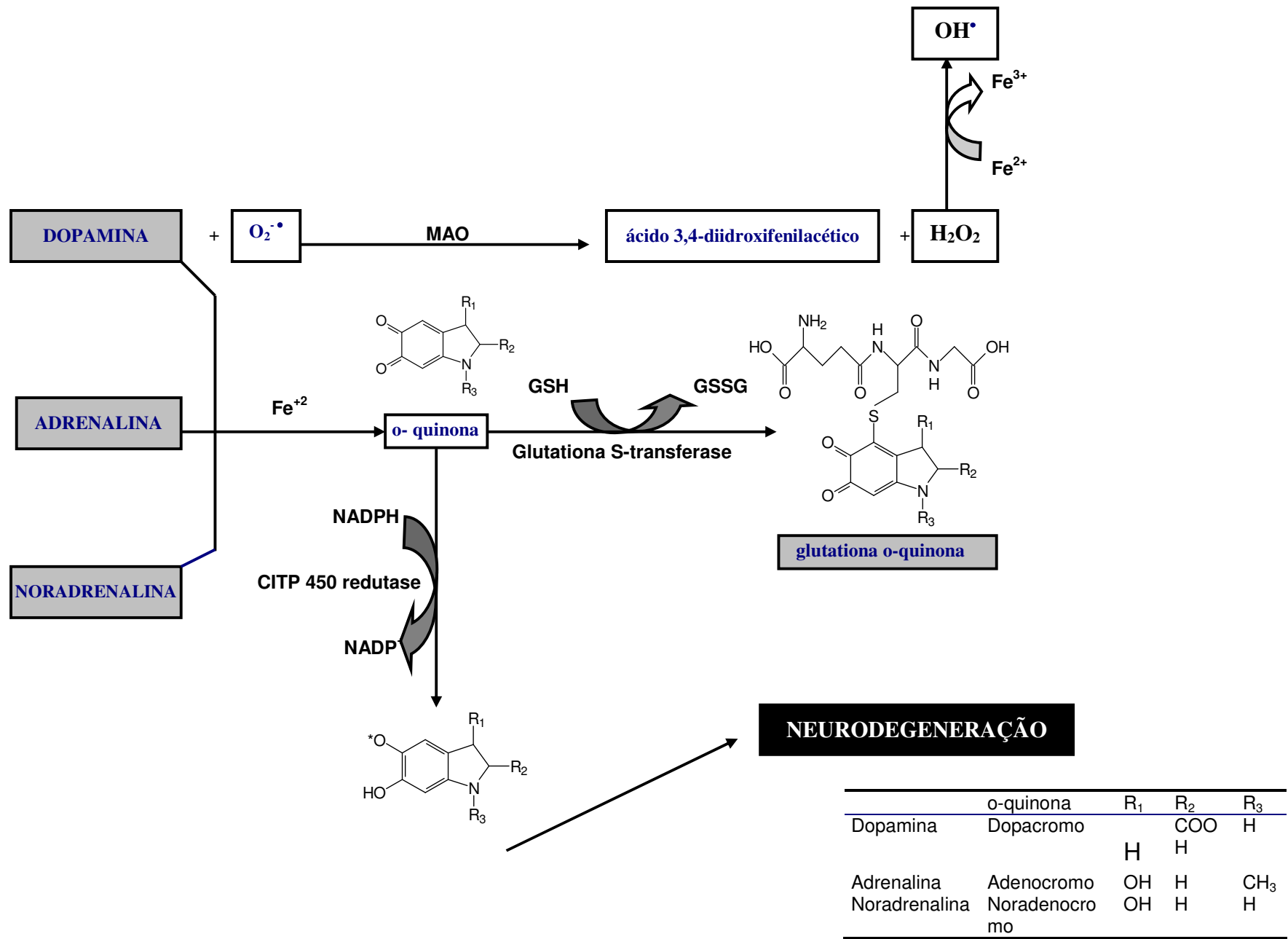


Figura 3. Possíveis vias de oxidação das catecolaminas. (OH•) radical hidroxila; (O₂^{•-}) radical superóxido; (MAO) monoamino oxidase; (H₂O₂) peróxido de hidrogênio; (GSH) glutathione reduzida; (GSSG) glutathione oxidada (adaptada de Obata, 2002 e Baez *et al* 1997).

danos e/ou pela diminuição capacidade de reparo ao DNA (Betti et al 1994; McCord & Edeas 2005). Maluf (2004) relata influencia do exercício físico na indução de dano ao DNA, porém até o momento nenhum trabalho demonstrou alterações cromossomais em indivíduos praticantes de exercício físico intenso.

O ensaio Cometa é uma técnica simples e rápida para verificarmos de modo quantitativo quebras simples e dupla ao DNA (Maluf & Erdtmann 2000; Faust et al 2004). Östling e Johanson (1984) detectaram o dano ao DNA induzido por radiação ionizante após eletroforese sob condições de pH neutro, verificando apenas quebras duplas ao DNA. Singh et al (1988) propuseram proceder à técnica sob condições alcalinas, assim podendo detectar quebras simples e duplas ao DNA. Atualmente esta técnica sofreu pequenas modificações (Tice et al 2000) e vem sendo amplamente utilizada para detecção de dano ao DNA.

1.6. A Proteína S100B

A Glia possui um papel ativo e vital no SNC, incluindo a regulação do desenvolvimento neural, manutenção da homeostase celular e resposta reparativa a danos neurológicos agudos e crônicos (Van Eldik & Wainwright 2003). No entanto, em condições patológicas, a função glial pode ser desregulada levando a um aumento da neuroinflamação e futuro dano neurológico (Laming et al 2000).

Em 1965, Moore isolou uma fração subcelular de um cérebro bovino, que considerava conter proteínas específicas do SNC. Esta fração foi chamada de S100, devido ao fato de seus constituintes serem 100% solúveis em uma solução saturada de sulfato de amônia. Posteriormente verificou-se que este extrato cerebral não continha somente uma, mas duas diferentes proteínas a S100A1 e a

S100B (Isobe & Okuyama 1981). As proteínas S100 apresentam estrutura do tipo *EF-hand*, contendo dois sítios de ligação para Ca^{+2} (Rothermundt et al 2003).

A S100B é uma proteína de cerca de 21kDa encontrada principalmente na forma homodimérica, expressada abundantemente em astrócitos, podendo ser considerada, juntamente com a GFAP, como uma marcadora destas células no SNC (Van Eldik & Wainright 2003). Fora do SNC, a S100B foi identificada também em adipócitos e melanomas (Donato 2001) e embora possa desempenhar funções semelhantes às que realiza em astrócitos, seu papel nestas células não é conhecido.

A S100B é produzida e secretada pelos astrócitos exercendo efeito parácrinos e autócrinos sob neurônios e na própria glia de forma dependente da concentração (Adami et al 2001; Rothermundt et al 2003). Em concentrações na ordem de nM a S100B estimula a sobrevivência neuronal, o crescimento de neuritos (Selinfreund et al 1990) e ativação da ERK (Gonçalves et al 2002). Em concentrações μM a S100B está relacionada a efeitos tóxicos, podendo induzir apoptose em astrócitos e neurônios (Van Eldik & Wrainwright 2003; Rothermundt et al 2003), além disso nessas concentrações a S100B pode estimular a secreção de óxido nítrico pelos astrócitos através da ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Níveis extracelulares elevados de S100B estão associados ao dano neuronal e parecem estar envolvidos na patogênese de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (Griffin et al 1998) e mal de Parkinson (Schaf et al 2005), transtornos psiquiátricos como esquizofrenia

(Schmitt et al 2005) e THB (Machado-Vieira et al 2002; Schroeter et al 2003) também apresentaram níveis elevado de S100B.

1.7 Objetivo Geral

O objetivo geral desta dissertação consiste na avaliação dos níveis séricos de S100B, enzimas antioxidantes, peroxidação lipídica e dano ao DNA em pacientes com Transtorno do Humor Bipolar durante as fases de eutímia, mania e depressão em comparação com controles voluntários não portadores de THB.

1.7.1 Objetivos Específicos

1) Avaliar os níveis séricos de S100B nos pacientes bipolares durante os episódios de mania e depressão e fase eutímica e comparar a controles saudáveis;

2) Verificar a atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase no soro dos pacientes e controles;

3) Avaliar os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) dos pacientes e controles.

4) Caracterizar o dano ao DNA, através do ensaio Cometa, de pacientes bipolares Tipo 1, não fumantes e que não possuam comorbidades clínicas em comparação a controles não fumantes e que não utilizem medicações.

PARTE II

2. Resultados

Os objetivos desta dissertação estão distribuídos em dois capítulos:

2.1 Capítulo 1

Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. Ana Cristina Andreazza, Carina Cassini, Adriane Ribeiro Rosa, Marina Leite, Lucia MV Almeida, Patrícia Nardin, Keila Maria Ceresér, Angelo Cunha, Aida Santin, Carmem Gottfried, Mirian Salvador, Flavio Kapczinski, Carlos Alberto Gonçalves.

Artigo submetido à Biological Psychiatry

(Objetivos 1, 2, e 3)

2.2 Capítulo 2

DNA damage in Bipolar disorder. Ana Cristina Andreazza, Benicio Frey, Fernanda Rombaldi, Bernardo Erdtaman, Mirian Salvador, Carlos Alberto Gonçalves, Flavio Kapczinski.

Artigo Submetidos à Psychiatry Research

(Objetivo 4)

CAPITULO I

Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients

Ana Cristina Andreazza, Carina Cassini, Adriane Ribeiro Rosa, Marina Leite, Lucia MV Almeida, Patrícia Nardin, Keila Maria Ceresér, Angelo Cunha, Aida Santin, Carmem Gottfried, Mirian Salvador, Flavio Kapczinski, Carlos Alberto Gonçalves

ARTIGO SUBMETIDO AO

Biological Psychiatry

Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients

Ana Cristina Andreazza ^{a,b}, Carina Cassini ^c, Adriane Ribeiro Rosa ^b, Marina Leite ^a, Lucia MV Almeida ^a, Patrícia Nardin^a, Keila Maria Ceresér^b, Aida Santin^b, Carmem Gottfried ^a, Mirian Salvador ^c, Flavio Kapczinski ^{a,b}, Carlos Alberto Gonçalves ^a

^a Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600- Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil;

^b Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; ^c Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. Zip code: 95070-560. Caxias do Sul, Brazil

Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Depto Bioquímica, ICBS, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-anexo

90035-003 Porto Alegre, RS Brazil

E-mail: casg@ufrgs.br

Fax: 55-51-3316 5535

Abstract: 255 words; Text: 2,456; Number of figures: 06; Table: 01

Abstract

Bipolar disorder (BD) is a chronic, severe, and highly disabling psychiatric disorder; peripheral markers have been used to assess biochemical alterations associated with BD and/or possibly involved in its pathophysiology. Many groups have proposed the involvement of S100B in psychiatric disorders. Other biochemical markers, particularly associated with oxidative stress have been studied in this disorder. In the present study we evaluated markers of brain injury and oxidative stress in patients with BD. Brain injury was assessed using serum S100B content; oxidative stress was assessed using serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and activities of antioxidant enzymes in BD patients in different episodes of disease. We found a significant increment of serum S100B during episodes of mania and depression but not in euthymic patients. Superoxide dismutase (Sod) activity, as well the Sod/glutathione peroxidase plus catalase ratio, was also increased in manic and depressed patients. On the other hand, TBARS levels were increased in BD patients regardless of the phase of the disorder. These findings suggest a potential oxidative damage in BD patients. This peripheral oxidative imbalance indicates that systemic changes are taking place during the active phases of the illness. Such changes seem to relate to astrocyte function, as assessed using serum S100B.

Key Words: bipolar disorder; catalase; glutathione peroxidase; oxidative stress; superoxide dismutase; S100B.

Introduction

Bipolar disorder (BD) is a chronic, severe, and highly disabling psychiatric disorder which is estimated to affect 1% of the world population (Belmaker 2004). According to the World Health Organization, BD is considered the sixth leading cause of disability amongst all medical and psychiatric conditions (Murray and Lopez 1997). Moreover, BD is associated with increased morbidity and mortality due to other general medical conditions, such as cardiovascular disease, obesity and diabetes mellitus (Kupfer 2005). Peripheral markers have been used to assess biochemical alterations associated with BD and/or possibly involved in its pathophysiology.

S100B is a calcium-binding protein produced and secreted by astrocytes that exert paracrine and autocrine effects on neurons and glia (Donato 2001). Extracellular S100B levels may play trophic and/or toxic roles depending on its concentration. Increased extracellular levels of this protein are associated to brain damage and its persistent elevation appears to be involved in neurodegenerative disorders (Rothermundt et al 2003). Previous studies have reported alterations of glial cells and particularly astrocytes in mood disorders (Ongur et al 1998; Johnston-Wilson et al 2000; Schroeter et al 2002). A pilot study showed that BD patients exhibit elevated levels of serum S100B during manic episodes (Machado-Viera et al 2002). Moreover, it has been put forward the involvement of S100B in the pathophysiology of schizophrenia (Wiesmann et al 1999; Lara et al 2001; Rothermundt 2001), reinforcing the importance of this astrocyte marker in psychiatric disorders.

There is evidence that reactive oxygen species (ROS) play an important role in the pathogenesis of many diseases, particularly in neurological and psychiatric diseases due to the central nervous system vulnerability to oxidative stress (Takuma et al 2004). Recent studies have reported alterations of antioxidant enzymes in red blood cells from BD patients (Ozcan et al 2004; Rajenkar et al 2003; Kuloglu et al 2002). The content of plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and erythrocyte superoxide dismutase (Sod) activity have been reported to be increased in BD patients (Kuloglu et al 2002). On the other hand, no changes in TBARS or SOD activity were observed in another study with patients with BD (Ranjekar et al 2003). Independently, another group described a decrease in catalase activity in BD patients; this decrease was accompanied, by an increase of plasma TBARS and a decrease of glutathione peroxidase (GPx) activity (Ozcan et al 2004). More recently, Machado-Vieira (2005) observed elevated levels of TBARS and Sod activity during manic episodes in BD patients. Regardless methodological differences in these works, the available evidence suggests that oxidative stress may play a role in the pathophysiology of Bipolar Disorder. We have hypothesized, a priori, that some of the inconsistencies found in these studies are due to state changes induced by differential phases of the illness.

The present study was designed to evaluate brain injury, using the serum S100B content, and oxidative stress, using serum TBARS and activities of antioxidant enzymes (Sod, GPx and catalase) in BD patients during the differential phases of the illness.

Material and Methods

Subjects

This was a case-control study of 84 patients with BD (21 depressed 32 manic and 31 euthymic) matched to 32 healthy volunteers. Patients were 18 years or older, consecutively assessed from December 2003 to May 2005. All patients were recruited from the Bipolar Disorders Program - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Patients were non-smokers, did not present active medical conditions and were not on medication, apart from those prescribed for their psychiatric disorder. BD diagnose was carried out using the Structured Clinical Interview for DSM-IV – Axis I (SCID-I) (First et al 1998). Manic and depressive symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young et al 1978) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (Hamilton 1960), respectively. The normal subjects consisted of healthy volunteers (n=32), who manifested interesting in participated of the study. In addition, controls did not have history of major psychiatric disorders, dementia, mental retardation, cancer or tumor in their first-degree relatives. Control subjects were no smokers and were not on medication. Healthy subjects were matched for age and gender. This study was approved in the local ethical committee, and all subjects signed the informed consent before entering in the study.

Procedure

Collection and processing of blood samples

Each subject had 5 ml blood samples collected by venipuncture without anticoagulants and serum was obtained by centrifugation at 3,000 xg for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months until the biochemical assay.

Superoxide Dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically in serum samples by measuring the inhibition of the ratio of autocatalytic adrenochrome formation at 480nm in a reaction medium containing 1 mmol/l adrenaline (pH 2) and 50 mmol/l glycine (pH 10.2). This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C during 3 minutes. Enzyme activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the ratio of adrenochrome formation to 50% (Mirsa et al 1972).

Catalase activity

Catalase activity was assayed by the method of Chance and Machley (1954). Briefly, first 2 ml quartz cuvette contained in 1,980ml phosphate buffer (pH=7.0, 50 mM) and 20 µL of serum were added and the spectrophotometer was adjusted to auto zero. After, was added 2 µL of H₂O₂ (3 mM freshly diluted). One unit of catalase decomposing 1 µmol of hydrogen peroxide per mg of protein per minute at pH 7.4.

Glutathione peroxidase activity

The reaction was carried out at 25°C in 600 µL of solution containing 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.4 mM sodium azide, 2 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.62 U GSH reductase. The activity of selenium-dependent GPx was measured taking tert-butyl-hydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg protein (Wendel 1981).

Analysis of serum TBARS (Tiobarbituric acid reactive substances)

The levels of oxidative stress were measured using the thiobarbituric acid (TBARS) method described by Wills (1966). In this method, when the free radicals react with a lipid production MDA, which in combination with TBARS forms a pink chromogen, i.e., compound, whose absorbance at 530 nm was measured. MDA results were expressed as nmol/ml.

S100B protein measurement

Serum S100B was measured by ELISA, as described previously (Tramontina et al 2000) with some modifications. The standard S100B curve ranged from 0.025 to 2.5 ng/mL. Briefly, 50 µL of serum plus 50 µL of barbital buffer were incubated for 3 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1, from Sigma). The plate was then incubated with rabbit polyclonal anti-S100 (from DAKO) and peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin for 1 h. Color reaction with o-phenylenediamine was measured at

492 nm. Samples were measured in triplicate and those with a coefficient of variation > 5 % were repeated; the interassay coefficient of variation in our sample was < 6 %.

Statistical Analysis

Statistical Product and Service Solutions 12.0 Version (SPSS) performed analysis. The Kolmogorov-Smirnov Test was used for compares an observed cumulative distribution function to a theoretical cumulative distribution. Patients were divided according clinical scale (depressive and manic episode or euthymic) this were compared to control group. The outcome measures of the three groups were compared using the ANOVA test and Tukey post test. In order to adequately adjust for confounders, a linear regression model was used, having each biochemical procedure as the outcomes. The confounders analyzed were sex, age, years of schooling and number of medication. Other variables, such as number of suicides attempts, number of hospitalizations and rapid cycling, were not associated with biochemical procedure, and therefore, were not included in the regression model.

Results

Demographic characteristics of BD patients and controls are included in table 1. The mean age and gender of controls (N=32) matched to depressed (N=21), manic (N=32) and euthymic patients and did not present significantly difference. Because serum S100B content is dependent on age we separated BD patients and controls in two age groups. No difference between in serum S100B

between BD patients and controls could be due to age between them. All patients were medicated and more than 2/3 of them were using lithium, alone or together with other medication.

Fig 1 shows a significant increment of serum S100B in depressive ($p=0.004$) and manic ($p=0.011$) episodes. No changes were observed in euthymic patients ($p=0.263$). Differently, TBARS levels were increased in BD patients (Fig 2), independently of psychiatric phase of the disease: euthymic ($p=0.001$), depressed ($p=0.022$) or manic ($p=0.001$).

Serum Sod activity (Fig 3) was strongly increased in manic and depressed BD patients (about 3 times) ($p=0.001$), but not in euthymic patients ($p=0.550$). This Sod activity increment in manic and depressive episodes also was significant when compared to euthymic patients. On the contrary, serum GPx activity (Fig 4) was significantly increased in euthymic patients ($p=0.001$), but not in depressed ($p=0.997$) or manic patients ($p=0.448$). Interestingly, serum catalase activity (Fig 5) was reduced in manic ($p=0.010$) and euthymic ($p=0.001$) patients, but not in depressive patients ($p=0.898$).

Another interesting view was obtained analyzing the Sod/(GPx + catalase) ratio (Fig 6). An elevated ratio was observed in manic ($p=0.001$) and depressive ($p=0.023$) BD patients, when they were compared to controls. Like serum SOD activity, this ratio was elevated in manic and depressive patients also when they compared to euthymic patients.

Discussion

Many evidence have suggested that neurodegeneration might be a pathogenetic factor in the development of psychiatric disorders, mainly schizophrenia and major depression, in which elevated serum S100B is a common finding (Rothermundt et al 2003). Bipolar disorder is not recognized as neurodegenerative disease, but there is evidence that lithium, the quintessential mood stabilizer, has a protective role in neurodegeneratives disorders (Chuang et al 2004). Here we found a significant increment of serum S100B in depressive and manic episodes. This increment in manic episode is in accordance with our previous pilot study (Machado-Vieira et al 2002).

Two-third of BD patients were using lithium alone or combined with valproate or carrbamazepine. This suggest that the changes observed in serum S100B and oxidative stress are not related to a possible effect of lithium. Interestingly, cerebrospinal fluid S100B is increased in rats chronically treated with lithium (E. Rocha, unpublished data). However, the effect of lithium and other medications *per se* need more investigation.

It is important to mention that adipocytes also contribute to the serum content of S100B (Netto et al 2005), but we did not find any body weight difference among BD patients (data not shown) that could explain, at least in part, a specific increase in depressive and manic episodes. In fact, the serum increment in S100B content represents an alteration in astrocyte activity. This alteration and other reported alterations of glial cells in mood disorders (Ongur et al 1998; Johnston-Wilson et al 2000; Schroeter et al 2002) reinforce the involvement of astrocytes in the pathogenesis of BD.

Astrocytes play a central role in the antioxidant defense in central nervous system (Takuma et al 2004), which is especially vulnerable to ROS because it is a highly oxygenated organ that use 20% of the total oxygen required by the body. Based on this it is possible to conceive that the imbalance between production of reactive species and antioxidant defense observed in periphery (e.g. red blood cells) is still more serious in brain tissue. Persistent elevated levels of ROS are putatively involved in several neurodegeneratives disorders (Floyd 1999).

We found significant changes in serum TBARS and activity of antioxidant enzymes in BD patients. The peripheral imbalance (i.e. oxidative stress) observed in BD patients is possibly due to disease itself, but is strongly affected by medications, co-morbidities, diet and lifestyle and together are responsible by the heterogeneity and discrepancy observed in the literature concerning to the activity of antioxidant enzymes (Kuloglu et al 2002; Ranjekar et al 2003; Ozcan et al 2004).

In previous studies involving BD patients was not taking in care the phase of disease, even because the number of patients was small and they were predominantly in manic episode (Ranjekar et al 2003; Ozcan et al 2004). In according to Kuloglu et al (2002) and Oscan et al (2004) we found an increment in serum TBARS.

In addition, we found elevated serum Sod activity in depressive and manic episodes, as observed by Kuloglu et al (2002) in erythrocyte from BD patients. No significant changes in SO activity were observed in euthymic patients. Ranjekar et al (2003) and Ozcan et al (2004) did no found any changes in erythrocyte SOD activity, in BD patients (predominately in manic episodes). SOD is a member of a family of metalloenzymes, widely distributed in mammalian tissue, which plays a

major role in protecting the cells against toxic oxygen derivatives, converting superoxide anion into H_2O_2 (Johnson and Giulivi 2005). Three types of Sod are known in humans, with the most abundant being the cytosolic Sod-1, characterized by its dependence on Cu/Zn. Serum Sod activity, like erythrocyte Sod activity, is predominately SOD-1 and its upregulation observed in BD patients (manic and depressive episodes) strongly suggests an oxidative stress condition. However, the eventual oxidative damage will depend also on other associated antioxidant systems (including GPx and catalase activities). In the same vein, we found a normal serum GPx activity and reduced activity of serum catalase in manic episode suggesting a higher possibility of oxidative damage. In depressive episode no changes were observed in GPx and catalase. Although it is possible to assume a compensatory balance between GPx and catalase, it is unclear at present the mechanism involved in the elevation of GPx and decrease of catalase in euthymic BD patients. Based on Sod/(GPx + catalase) ratio it is conceivable that a stress oxidative and eventually oxidative damage is ongoing in manic and depressive episodes of BD patients.

It is important to mention that some evidence suggest an antioxidant effect by mood stabilizers on cultured neural cells in excitotoxic conditions, particularly lithium and valproate (Shao et al 2005). On the other hand lithium was not able to protected oxidative stress induced by beta-amyloid peptide in rabbit hippocampus (Ghribi et al 2003). Our data indicate that the potential oxidative damage in manic and depressive episodes of BD patients was not prevented (maybe attenuated) by mood stabilizers.

In summary, our data indicate a possible oxidative damage in BD patients, particularly more accentuated during manic episodes. This damage could be due to the disorder itself, but we cannot rule out the effect and consequences of medications, co-morbidities, diet and lifestyle. This peripheral oxidative imbalance indicates that brain is possibly affected (and maybe in a more serious manner). Confirming the glial involvement, we have found an increment of serum S100B, in depressive and manic episodes, possibly due to the astrocyte activation.

References

Belmaker RH (2004): Medical progress: bipolar disorder. *N Eng J Med* 351:476-486.

Chance B, Machley AL (1954): Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzimol* 2:764-775.

Chuang DM (2004): Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol* 16:83-90.

Donato R (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668.

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JB (1998): *Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I)*. New York: Biomedics Research Department.

Floyd RA (1999): Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236-245.

Ghribi O, Herman MM, Savory J (2003): Lithium inhibits Abeta-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. *J Neurosci Res* 71:853-862.

Hamilton M (1960): A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psych* 23: 56–62.

Johnson F, Giulivi C (2005): Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26:340-352.

Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH (2000): Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 5:142-149.

Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan E, Cinkilinc N (2002): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and

bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 20: 171-175.

Kupfer DJ (2005): The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA* 293: 2528-2530.

Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO (2001): Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 35:11-14.

Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Goncalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO (2002): Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:269-272.

Machado-Vieira R. (2005): Avaliação neuroquímica de alterações tróficas e/ou dano neurônio – glial durante episódios maníacos. *PhD Thesis*. University of São Paulo.

Mirsa HP, Fridovich I (1972): The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 217:3170-3175.

Murray CJ, Lopez AD (1997): The utility of DALYs for public health policy and research: a reply. *Bull World Health Organ* 75:377-381.

Netto CB, Portela LV, Ferreira CT, Kieling C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R (2005): Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem* 38:433-435.

Ongur D, Drevets WC, Price JL (1998): Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13290-295.

Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O (2004): Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 19:89-95

Ranjekar, PK, Hinge, A, Hegde, MV, Ghate, M, Kale, A, Sitasawad, S, Wagh, UV, Debsikdar, VB, Mahadik, SP (2003): Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research* 121:109-122.

Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, Kirchner H (2001): S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord* 66:89-93.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003): S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614-632.

Shao L, Young LT, Wang JF (2005): Chronic Treatment with Mood Stabilizers

Lithium and Valproate Prevents Excitotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortical Cells. *Biol Psychiatry* [In Press]

Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Diefenbacher A, Blasig IE (2002): S100B is increased in mood disorders and may be reduced by antidepressive treatment. *Neuroreport* 13:1675-8.

Takuma K, Baba A, Matsuda T (2004): Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 72:111-127.

Tramontina F, Conte S, Goncalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Goncalves CA (2002): Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* 22:373-378.

Wendel A (1981): Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.

Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt Kirchner H (1999): Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 45:1508-1511.

Wills ED (1966): Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99:667-676.

Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA (1978): A rating scale for mania: reliability, validity, and sensitivity. *Br J Psychiatry* 133: 429–435.

Table 1: Demographics and clinical characteristics of BD patients and control group.

	Bipolar Patients			Control Group (n=32)	P value
	<i>Depresse d (n=21)</i>	<i>Manic (n=32)</i>	<i>Euthymics (n=32)</i>		
Gender					
Female	5	18	12	11	0.260*
Male	16	14	20	21	
Age (Years)	43.42	40.13	40.28	40.69	0.771**
20-40	9	15	17	20	0.755*
40-60	12	17	15	12	
Year of schooling	8.68	9.94	7.69	7.81	0.128**
Age of onset	21.32	27.19	23.13	-	0.276**#
Years of illness	22.11	12.78	17.34	-	0.075**#
HAM-D	19.69	5.16	4.28	-	0.001**#
YMRS	5.16	34.47	3.16	-	0.001**#
Medications					
Lithium	7	22	14	-	-
Valproate	6	4	5	-	-
Lithium+Valproate	1	0	9	-	-
Carbamazepine	1	6	2	-	-
Lithium+Carbamazepine	5	0	1	-	-
	1	0	1	-	-
Valproate+Carbamazepine					

All values are means (S.D.); * Chi Square Test , ** ANOVA test for heterogeneity,
Analyzed between , depressive, manic and euthymic group

Figure and legends

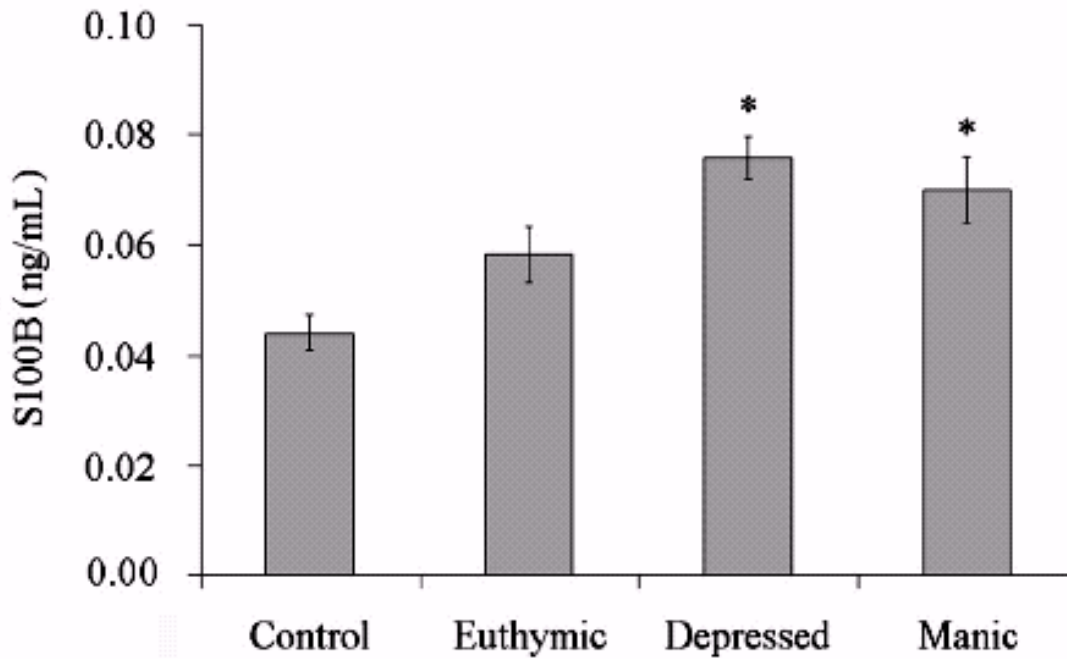


Figure 1. Serum S100B concentration in BD patients and controls. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. S100B was measured by ELISA. Demographic data are in Table 1. Values are expressed in mean \pm standard error. * Statistically different from control ($p < 0.01$ for depressed group and $p < 0.05$ for manic group).

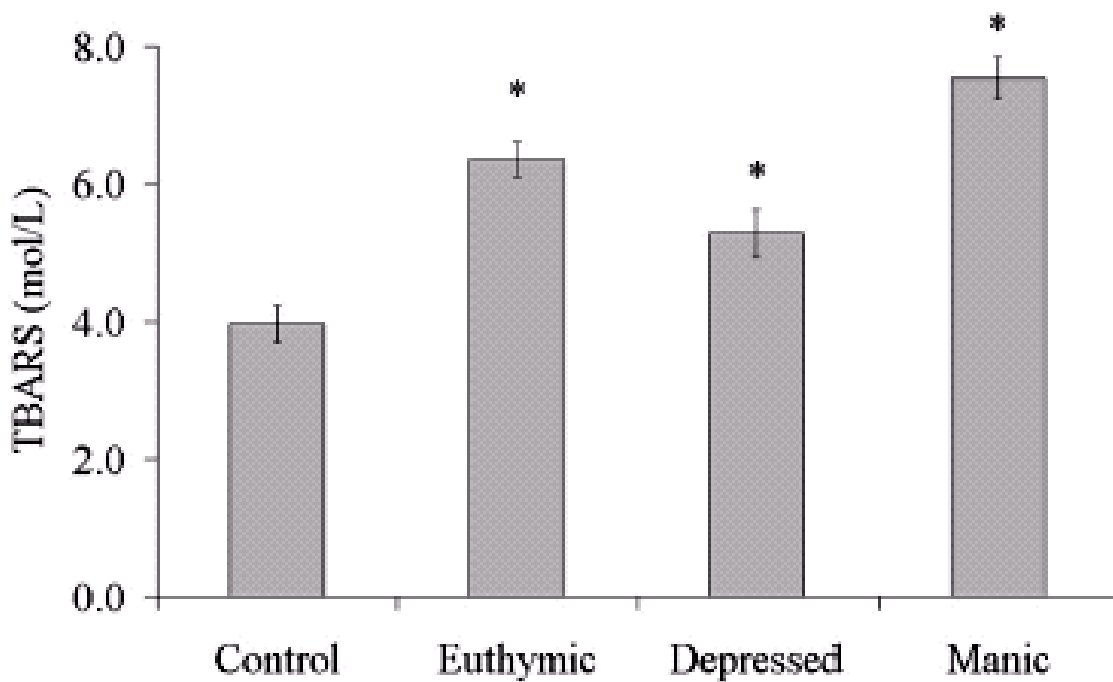


Figure 2. Serum TBARS in BD patients and controls. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Demographic data are in Table 1. Values are expressed in mean \pm standard error. * Statistically different from control ($p < 0.01$ for manic and euthymic groups and $p < 0.05$ for depressive group).

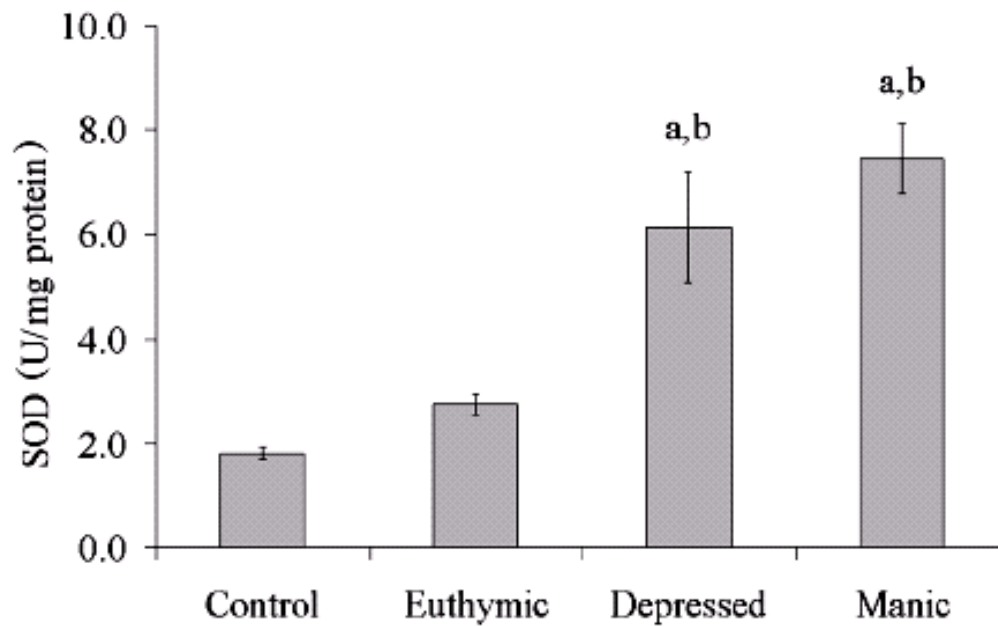


Figure 3. Serum superoxide dismutase (Sod) activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean \pm standard error. ^a Statistically different from controls ($p < 0.01$); ^b Statistically different euthymic group ($p < 0.05$).

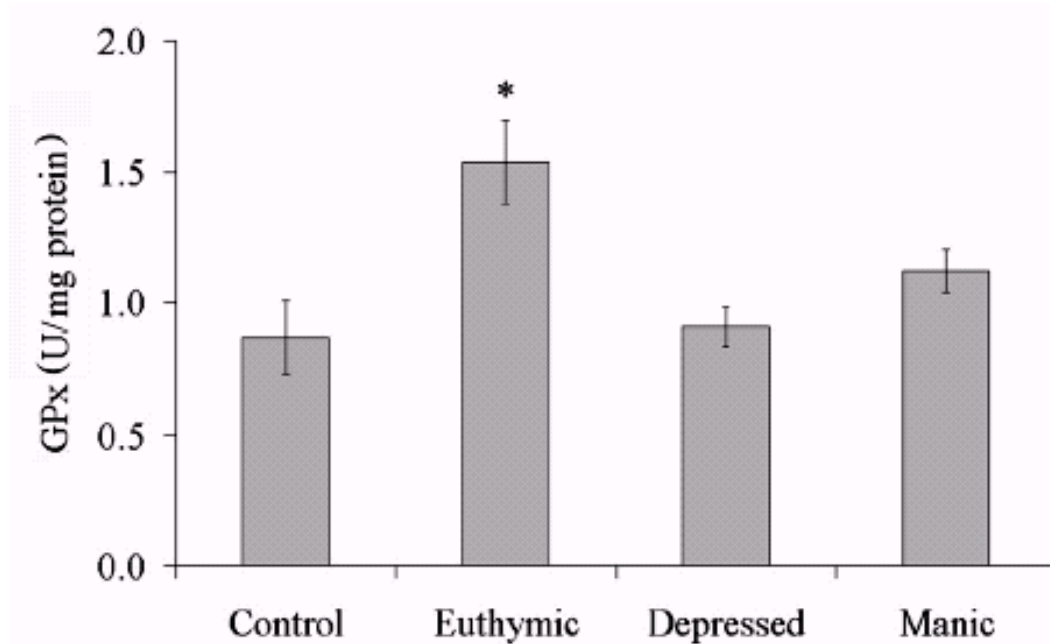


Figure 4. Serum glutathione peroxidase (GPx) activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean \pm standard error. * Statistically different from control and other groups ($p < 0.01$).

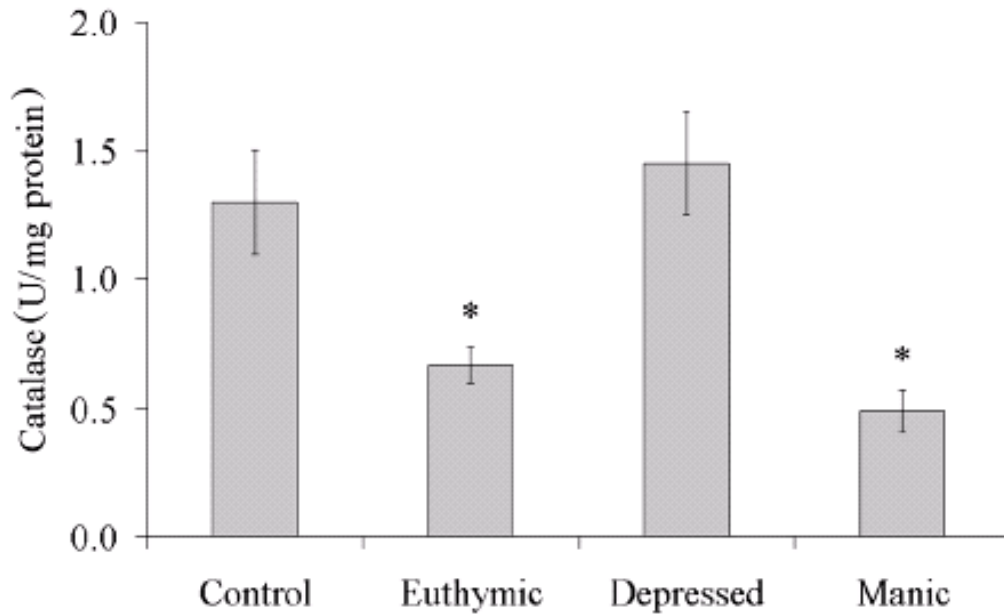


Figure 5. Serum catalase activity in BD patients. BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean \pm standard error. * Statistically different from controls and depressed group ($p < 0.01$).

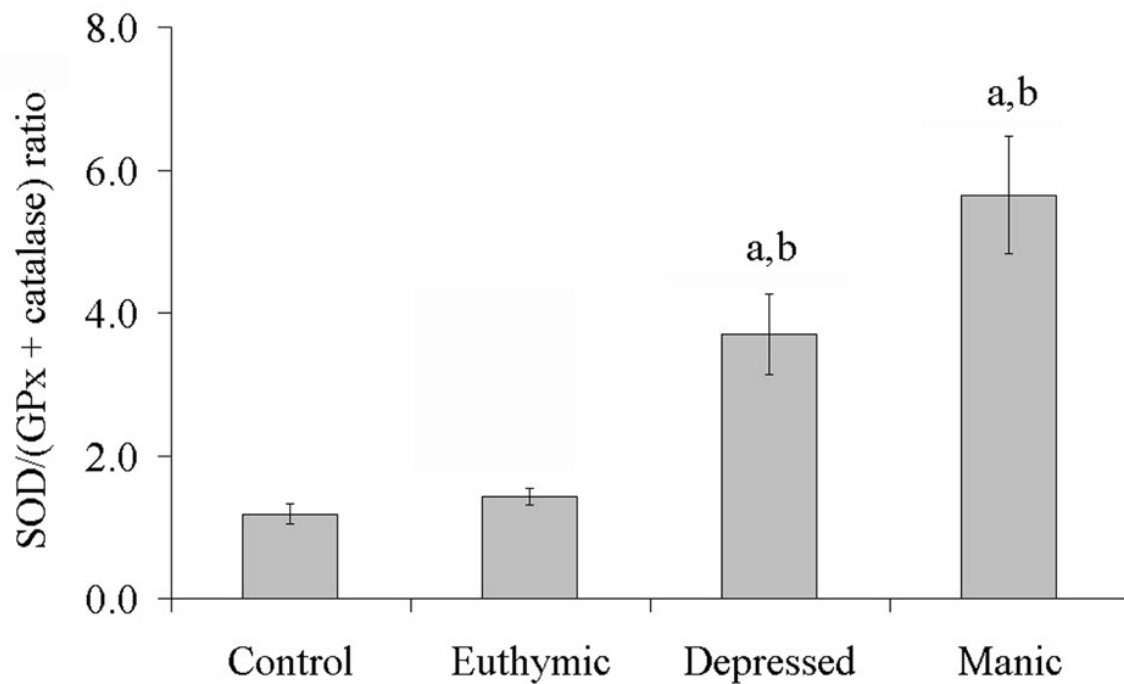


Figure 6. *Sod/(GPx + catalase) ration in BD patients.* BD patients were separated in euthymic, manic and depressive groups. Values are expressed in mean \pm standard error. ^a Statistically different from control ($p < 0.01$ for depressive group and $p < 0.05$ from manic group). ^b Statistically different from euthymic group ($p < 0.05$).

CAPITULO II

DNA Damage in Bipolar Disorder

Ana Cristina Andreazza, Benicio Frey, Fernanda Rombaldi, Bernardo Erdtaman,
Mirian Salvador, Carlos Alberto Gonçalves, Flavio Kapczinski

ARTIGO SUBMETIDO À

Psychiatry Research

DNA damage in bipolar disorder

Ana Cristina Andreazza ^{a,b}

Benicio Noronha Frey ^{a,b}

Bernardo Erdtmann ^c

Mirian Salvador ^c

Fernanda Rombaldi ^c

Aida Santin ^b

Carlos Alberto Gonçalves ^a

Flavio Kapczinski, ^{b*}

^aDepartment of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600 /Anexo. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, Brazil

^bBipolar Disorders Program, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, Brazil

^cInstitute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. Zip code: 95070-560. Caxias do Sul, Brazil

* Corresponding author. Flávio Kapczinski, Bipolar Disorders Program, Centro de Pesquisa, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Zip code: 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: + 55 51 32227309. Fax: + 55 51 21018846. E-mail: kapcz@terra.com.br

Abstract

Bipolar disorder (BD) is a prevalent, chronic, severe, and highly disabling psychiatric disorder that is associated with increased morbidity and mortality due to general medical conditions. There is an emerging body of evidence correlating chronic medical conditions to DNA damage. The present study was designed to assess DNA damage in BD patients using the comet assay (CA). Thirty-two bipolar-I outpatients diagnosed using the Structured Clinical Interview for DSM-IV were matched to 32 healthy volunteers. Manic and depressive symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS), respectively. Peripheral blood samples were collected and a standard protocol for CA preparation and analysis was performed. The present study showed that BD outpatients present an increased frequency of DNA damage as compared to controls. The frequency of DNA damage correlated with the severity of symptoms of depression and mania.

Key Words: bipolar disorder, comet assay, DNA damage, oxidative stress, mania, depression

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a prevalent, chronic, severe, and highly disabling psychiatric disorder (Belmaker, 2004). BD is considered one of the leading causes of disability amongst all medical and psychiatric conditions (Murray and Lopez, 1997), and studies have demonstrated that the annual costs of BD range between 1.8-45 billion US dollars, mainly due to indirect costs because of work loss (Das Gupta and Guest, 2002; Hakkaart-van Roijen et al 2004). Moreover, BD is associated with increased morbidity and mortality due to general medical conditions, such as cardiovascular disease, obesity and diabetes mellitus (Kupfer, 2005).

There is an emerging body of evidence correlating chronic medical conditions to DNA damage (Faust et al 2004). The single cell gel electrophoresis technique, also called the Comet assay (CA), is a rapid method for assessing DNA damage quantitatively in single cells (Maluf and Erdtmann, 2000). Under alkaline conditions, the CA detects DNA double- and single-strand breaks and alkali-labile sites (Tice et al 2000). The CA technique has been increasingly used for human biomonitoring studies (Kassie et al 2000). As a biomarker of genotoxicity, the CA may identify groups of individuals at higher risk to develop degenerative diseases (Migliore et al 2005).

Free radicals (especially HO^{\bullet}) may initiate DNA damage (Cooke et al 2005; Culmsee and Mattson, 2005), which under certain circumstances may lead to DNA mutation. Multiple systems exist to prevent lesion formation, and should damage occur, ensure rapid lesion removal (Cooke et al 2005). DNA damage may initiate

signaling pathways been identified by several kinases and through p53 phosphorylation at serine or threonine residues, leading to cell apoptosis (Evan and Littlewood, 1998; Culmsee and Mattson, 2005). In the only study to date that directly evaluated DNA fragmentation in BD subjects, no changes in single-stranded DNA breaks were found in the anterior cingulate cortex in a postmortem study (Benes et al 2003). Benes et al. (2003) suggested that changes in the intracellular signaling pathways within the mitochondria may be associated with apoptotic cells death in response to oxidative stress.

The present study was designed to assess DNA damage in BD patients using the Comet assay (CA), as compared to healthy volunteers.

2. Material and Methods

2.1 Bipolar Patients

This was a case-control study of 32 patients with BD, 18 years or older (43.28 ± 12.72), consecutively assessed from December 2003 to May 2005. All patients were recruited from the Bipolar Disorders Program - Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Patients were non-smokers, did not present active medical conditions and were not on medication, apart from those prescribed for their psychiatric disorder. BD diagnose was carried out using the Structured Clinical Interview for DSM-IV – Axis I (SCID-I) (Spitzer et al 1992). Manic and depressive symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young et al 1978) and the Hamilton Depression Rating Scale

(HDRS) (Hamilton, 1960), respectively. This study was approved in the local ethical committee, and all subjects signed the informed consent before entering in the study.

2.2 Control Group

The control group was composed of healthy subjects (n=32) who manifested an interest in participating of the study. In addition, controls did not have history of major psychiatric disorders, dementia, mental retardation or cancer in their first-degree relatives. Control subjects were non-smokers and were not on medication. All subjects were advised about the procedure and signed the informed consent before entering in the study.

2.3 Comet Assay

A standard protocol for CA preparation and analysis was adopted (Singh et al 1988 and Tice et al 2001). The slides were prepared by mixing 5µl whole blood with 90 µl low melting point agarose (0.75%). The mixture (cells/agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 µl of normal melting agarose (1%). After solidification, the cover slip was gently removed and the slides were placed in lyses solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0 – 10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide [DMSO]) for a minimum of 1hr and a maximum of 7 days. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, pH 12.6) for 30min. The DNA was electrophoresed 30min at 25 V (0.90 V/cm) and

300mA, the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5). Finally, the DNA was stained with nitrate of silver. The slides were coded for blind analysis.

Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay in order to ensure the reliability of the procedure. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from of two replicated slides) were analyzed from each patient. Cells were also scored visually according to tails size into five classes, from no tails (0), to maximally (4), resulting in a single DNA damage score for each subject, and consequently for each study group. Therefore, a group damage index could range from 0 (all cells no tail, 100 cells x 0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells x 4) (Collins et al. 1996; Collins et al. 1997) (Figure 1). The damage index was calculated based on the number of cells with tails vs those without.

2.4 In Vitro Assay

An in vitro analyzes was carried out in order to assess whether the drugs used by the patients could induce DNA damage. Drugs were incubated with peripheral blood (provided by a healthy volunteer) for 30min, 37°C. Drugs were diluted in water (lithium, valproate, amytriptiline, lamotrigine, sertraline, sulpiride, levomepromazine) or alcohol 99% (carbamazepine, fluoxetine, haloperidol, diazepam, clonazepam). The assay was carried out using the described therapeutical levels (British Pharmacopeia, 1999). Peripheral boold was used as negative control. DNA damage was evaluated using a Comet Assay as described previously. The samples were analyzed in duplicate.

2.3 Statistical Analysis

The analysis was carried out using the Statistical Product and Service Solutions 12.0 Version (SPSS). The Kolmogorov-Smirnov Test was used to compare the observed cumulative distribution function to a theoretical cumulative distribution. Statistical differences between controls and treated samples were determined by the nonparametric Mann-Whitney *U*-test based on the score each subject received in the Comet assay. Relationships between variables were assessed using Spearman's product-moment correlation coefficient. Data were presented as means \pm S.D.

3. Results

BD patients and the control group did not differ in terms of demographic data (Table 1). Bipolar patients were current using of medication, mainly lithium and/or valproate. DNA damage was markedly increased in BD patients. The frequency of DNA damage type-I, II, III and IV was higher in patients than controls and the control group presented a higher frequency of undamaged DNA (Figure 1). Gender did not influence the amount of DNA damage within the patients group (*Mann-Whitney U-test Test*= 102.50, *Z*= -0.042, *P*(2-tailed)=0.967). Depressive ($r=0.45$, $P=0,010$) and manic ($r=0.62$, $P=0.001$) symptoms correlated with the index of DNA damage in BD patients. A post hoc analysis showed that the index of DNA damage in BD patients did not correlate with the number of medications, number of hospitalizations, number of suicide attempts, length of illness and number of years undiagnosed. The patients used an average of 2.65(1.15) medications. Drugs used included: lithium, valproate, carbamazepine, fluoxetine, amytriptiline, sertraline,

lamotrigine, haloperidol, levomepromazine, sulpiride, diazepam and clonazepam. These drugs did not induce DNA damage (ANOVA test; $F=0.789$; $p=0.425$) (Figure 2).

4. Discussion

The present study showed that BD outpatients differ from controls in terms of the frequency of DNA damage in peripheral cells. As far as we are aware, this is the first study to report these findings. These results add to the notion that BD patients are exposed to deleterious systemic changes (Kupfer, 2005).

Chronic illnesses such as obesity, diabetes mellitus and cancer have been shown to be associated with increased DNA damage (Faust et al 2004). BD is known to be a combination of manic and depressive episodes, which can alternate or even occur simultaneously. In outpatient samples, alongside with euthymic subjects, an array of depressive and manic symptoms is likely to occur in a significant proportion of cases of BD (Belmaker, 2004). In the present study, the severity of manic and depressive symptoms was found to be associated to increased DNA damage. All patients studied were on medication, which may hamper the comparisons between patients and controls. However, the correlation between the depressive and manic symptoms and severity of DNA damage is unlikely to be solely explained by the use of medication. Moreover, the drugs used by patients did not induce DNA damage in the *in vitro* assay carried out to assess this issue. These findings were consistent with the literature (Frötschl et al 2005;

Singh et al 2005; Gaziorowski and Brokos, 2001; Spanova et al 1997; Saxena and Ahuja, 1988). In two studies using the CA method, chlorpromazine had no effects on DNA damage (Frötschl et al 2005), whereas fluphenazine was found to enhance DNA repair after hydrogen peroxide damage (Gaziorowski and Brokos, 2001). Amytriptiline has been described as non genotoxic using chromosome aberrations (Saxena and Ahuja, 1988) and TUNEL test for verify apoptotic DNA breaks (Spanova et al 1997). Valproate, has been found to exert an antiproliferative effect on certain cancer cell lines both in vitro and in vivo (Singh et al 2005). Therefore, the findings of the present study are more likely to be related to the severity of symptoms rather than a by-product of the exposure to medication.

Actually, mood stabilizers seem to act in the opposite way. A recent study has demonstrated that lithium and valproate decreased glutamate-induced lipid peroxidation and protein carbonyl oxidation (markers of oxidative stress) and inhibited glutamate-induced DNA fragmentation in cerebral cortical neurons (Shao et al 2005). Moreover, both mood stabilizers increased glutathione S-transferase expression in cultured neurons (Wang et al 2004). Interestingly, King and Jope (2005) demonstrated that lithium decreased caspase-3 activity induced by rotenone and H₂O₂ and may promote upregulation in Bcl-2, which may relate to its neuroprotective actions (Mora et al 1999; Mora et al 2002; Chuang et al 2004). The use of valproate or lithium (chronic administration) can stimulate bcl-2 expression as well as inhibit GSK-3 β activity, which renders a cell less susceptible to apoptosis. Thus, mood stabilizers may act to restore the balance among aberrant signaling pathways in specific areas of the brain and prevent

degeneration (Brunello, 2004). Moreover, the neuroprotective role of mood stabilizers has been reported to be related to the inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors and activation of PI3 Kinase/ AKT signaling pathways (Chuang, 2005). Using a CA protocol, Psimadas et al. (2004) showed that schizophrenics and matched controls were not different regarding DNA damage and repair capacity. They have also demonstrated that high levels of antipsychotics did not increased DNA damage in peripheral cells (Psimadas et al 2004).

The role of DNA damage in BD may be related to the fact that these patients present increased morbidity and mortality due to general medical conditions. Chronic medical disorders such as cardiovascular disease (Demirbag et al 2005), obesity (Gao et al 2004) and diabetes mellitus (Blasiak et al 2004) are associated with increased rates of DNA damage. Such disorders are more prevalent in BD patients than in the general population (Kupfer 2005). It has been suggested that DNA fragmentation detected using the CA is caused by increased oxidative stress (Migliore et al 2005, Faust et al 2004). In a recent study, lower levels of two antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) and raised lipid peroxidation (TBARS) were demonstrated in patients with BD, indicating an increased oxidative stress status (Rajenkar et al 2003).

Some limitations of the present study should be taken into consideration, such as the fact that CA provides information about recent DNA fragmentation, but does not tell about mechanisms of DNA repair. Studies assessing the DNA repair capacity in patients with BD are warranted to further investigate the impact of BD on DNA strand breaks. The comet assay has been put forward as a biomarker in

populations exposed to hazardous conditions (e.g. radiation and pollutants) (Faust et al 2004). However, results of CA can be influenced by non specific factors such diet, use of medication and lifestyle. At the present stage, it is not possible to determine whether DNA damage in BD patients is a correlate of *state* or *trait*. An interesting development of the present findings may be the use of augmentation strategies tailored to prevent DNA damage in BD patients.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Grupo de Pesquisa e Pos- Graduação from Hospital da Clinicas de Porto Alegre, Departament of Biochemistry of the Federal University of the Rio Grande do Sul (UFRGS) and Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants of the University of Caxias do Sul (UCS).

References

Belmaker, R.H., 2004. Medical progress: bipolar disorder. *New England Journal of Medicine* 351, 476-486.

Benes, F.M., Walsh, J., Bhattacharyya, S., Sheth, A., Berretta, S., 2003. DNA fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry* 60, 359-64.

Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M., Drzewoski, J., 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research*. 554, 297-304.

Brunello, N., 2004. Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. *Journal of Affective Disorders*. 79, 15-20.

British Pharmacopoeia, 1999. London . Her Majesty's Stationery Office.

Chuang, D.M., 2004. Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Critical Reviews in Neurobiology*. 16, 83-90.

Chuang, D.M., 2005. The Antiapoptotic Actions of Mood Stabilizers: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potentials. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1053, 195-204.

Cooke, M.S., Olinski, R., Evans, M.D., 2005. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry*, *in press*.

Collins, A., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslova, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in

human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental Molecular Mutagenic* 30, 139-146.

Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R., 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104, 465-469.

Culmsee, C., Mattson M.P., 2005. p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331,761-777.

Das Gupta, R., Guest, J.F., 2002. A model to estimate the cost benefit of an occupational vaccination programme for influenza in the UK. *Pharmacoeconomics* 20, 475-484.

Demirbag, R., Yilmaz, R., Kocyigit, A., 2005. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutation Research* 570,197-203.

Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I., 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 43, 200-27.

Emerit, J., Edeas, M., Bricaire, F., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58, 39-46.

Evan, G., Littlewood, T., 1998. A matter of life and cell death. *Science*. 281, 1317-1322.

Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research* 566, 209-229.

Frotschl, R., Weickardt, S., Staszewski, S., Kaufmann, G., Kasper, P., 2005. Effects of chlorpromazine with and without UV irradiation on gene expression of HepG2 cells. *Mutation Research* 575, 47-60.

Gao, D., Wei, C., Chen, L., Huang, J., Yang, S., Diehl, A.M., 2004. Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 5, 1070-1077.

Gasiorowski, K., Brokos, B., 2001. DNA repair of hydrogen peroxide-induced damage in human lymphocytes in the presence of four antimutagens. A study with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). 6, 897-911.

Hakkaart-van Roijen, L., Hoeijenbos, M.B., Regeer, E.J., Tem-have, M., Nolen, W.A., Veraart, C.P., Rutten, F.F., 2004. The societal costs and quality of life of patients suffering from bipolar disorder in the Netherlands. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 110, 383-392.

Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18, 685-716.

Hamilton, M., 1960. A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 23, 56–62.

Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 463, 13-31.

King, T.D., Jope, R.S., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16, 597-601.

Kupfer, D.J., 2005. The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA: The Journal of American Medical Association* 293, 2528-2530.

Maluf, S.W., Erdtmann, B., 2000. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 471, 21-27.

Mora, A., Rosa, A., Fuentes, J.M., Soler, G., Centeno, F., 1999. Different mechanisms of protection against by valproate and of lithium. *European Journal of Biochemistry* 266, 886–891.

Mora, A., Sabio, G., Soler, G., Centeno, F., 2002. Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disorder* 4, 195–200.

Migliore, L., Fontana, I., Colognato, R., Coppede, F., Siciliano, G., Murri, L., 2005. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 26, 587-595.

Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. The utility of DALYs for public health policy and research: a reply. *Bulletin World Health Organization* 75(4), 377-381.

Psimadas, D., Messini-Nikolaki, N., Zafiropoulou, M., Fortos, A., Tsilimigaki, S., Piperakis, S.M., 2004. DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Letters* 204(1), 33-40.

Ranjekar, P.K., Hinge, A., Hegde, M.V., Ghate, M., Kale, A., Sitasawad, S., Wagh, U.V., Debsikdar, V.B., Mahadik, S.P., 2003. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research* 121, 109-122.

Saxena R., Ahuja Y.R., 1988. Genotoxicity evaluation of the tricyclic antidepressants amitriptyline and imipramine using human lymphocyte cultures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 12, 421-430.

Spanova A., Kovaru H., Lisa V., Lukasova E., Rittich B., 1997 Estimation of apoptosis in C6 glioma cells treated with antidepressants. *Physiological Research* 46, 161-164.

Singh G., Driever P.H., Sander J.W., 2005. Cancer risk in people with epilepsy: the role of antiepileptic drugs. *Brain* 128, 7-17.

Shao, L., Young, L.T., Wang, J.F., 2005. Chronic Treatment with Mood Stabilizers Lithium and Valproate Prevents Excitotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortical Cells. *Biological Psychiatry* [in press].

Spitzer, R.L., Williams, J.B., Gibbon, M., First, M.B., 1992. The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Archives of General Psychiatry* 49, 624-629.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Wang, J.F., Shao, L., Sun, X., Young, L.T., 2004. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *Journal of Neurochemistry* 88, 1477-1484.

Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., Meyer, D.A., 1978. A rating scale for mania: reliability, validity, and sensitivity. *British Journal of Psychiatry* 133, 429–435.

Table 1. Demographic factors of patients and controls.

VARIABLE	Bipolar Patients (n=32)	Controls (n=32)	P
Sex			
Men	28.1 %	40.6 %	0.292*
Women	71.9 %	59.4 %	
Age (years)			
Mean (SD)	43.28 (12.72)	43.47 (14.24)	0.956**
<40	41.6 %	42.0 %	0.523*
40-59	52.8 %	51.5 %	
≥60	5.6 %	6.5 %	
Family income (US\$)			
Median	610	538	0.994***
1 st tercile	16.2 %	13.2 %	0.854*
2 nd tercile	53.0 %	50.0 %	
3 rd tercile	30.8 %	36.8 %	
Year of Schooling			
Mean (SD)	9.15 (4.86)	9.16 (3.30)	0.992**
Hamilton Depression Scale			
Mean (SD)	6.31(7.38)	-	
Young Mania Rating Scale			
Mean (SD)	3.62 (3.01)	-	

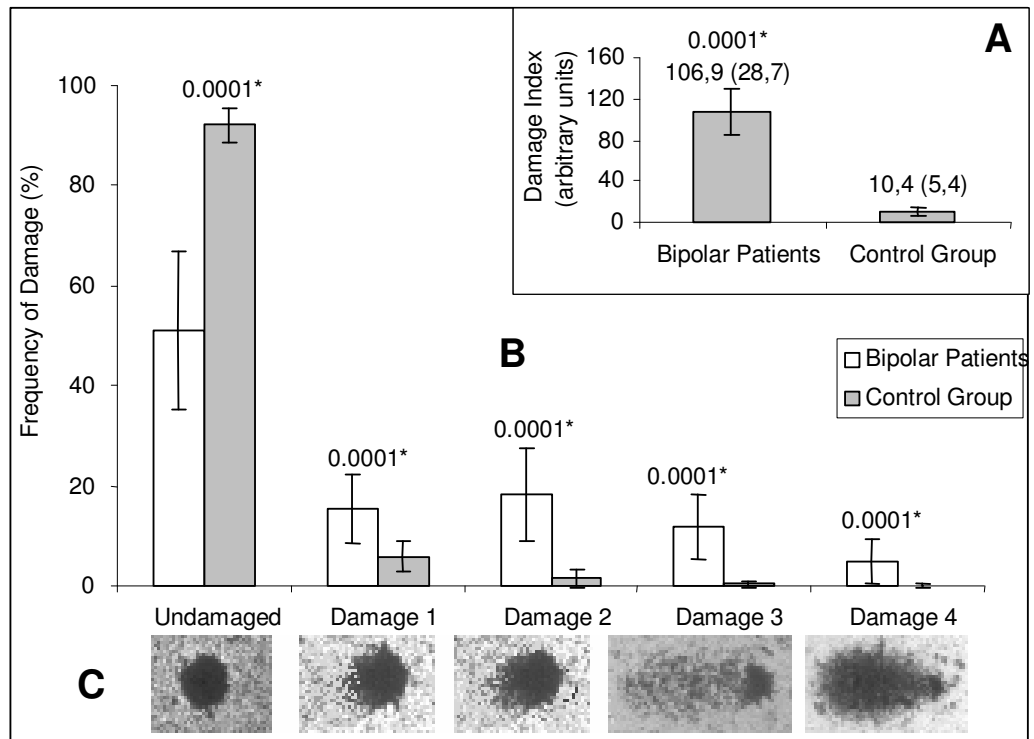


Figure 1. DNA damage assessed using the single cell gel electrophoresis comet assay

Legend to Figure 1

* Mann-Whitney *U*-test, for compare Bipolar Patients and Control group , $P < 0.001$

A: Index of DNA damage in patients and controls.

B: Frequency of type of DNA damage in patients and controls.

C: Evaluation of DNA damage using silver nitrate (200X). The cells are assessed visually and received scores from 0 (undamaged) to 4 (maximally damaged), according to the size and shape of the tail. Scores were obtained using the mean score of two independent, blind evaluators.

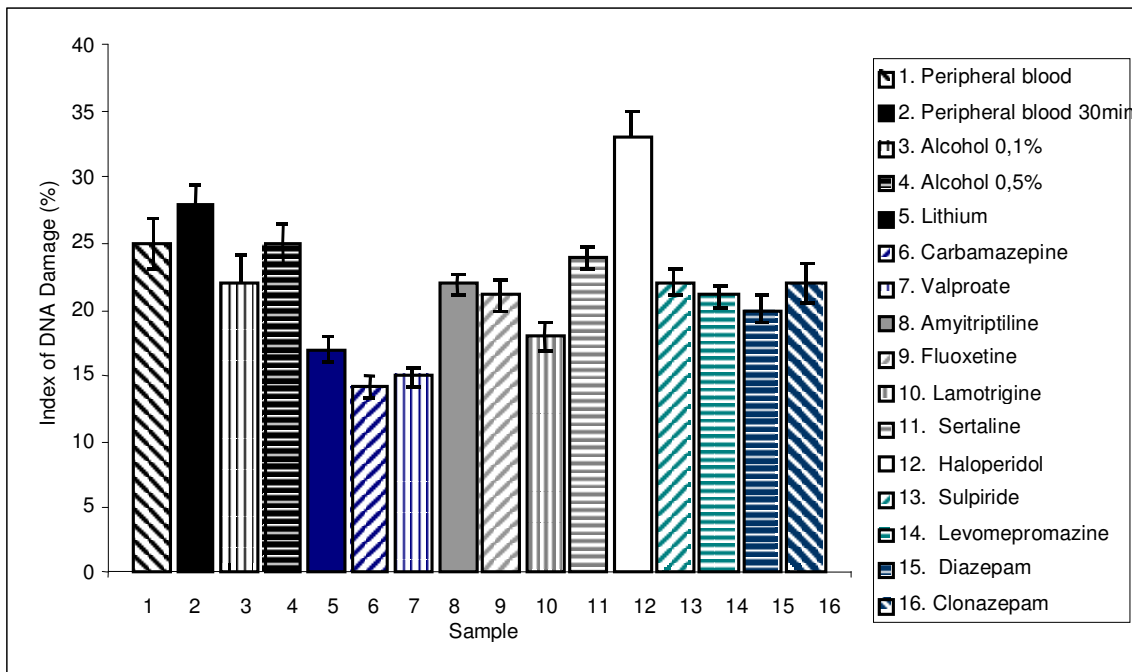


Figure 2. DNA damage index assessed in drugs used by patients.

Legend to Figure 2

The peripheral blood was incubated with diferents drugs in therapeutical levels or alcohol, used as duluted. Pheripheral blood was used as negative control.

PARTE III

3. Discussão

Sumário dos Resultados

1. Os pacientes bipolares apresentaram uma elevação na concentração sérica de S100B durante a mania ($p=0.05$) e a depressão ($p=0.01$) quando comparados ao grupo controle.
2. Os pacientes Bipolares em episódio depressivo e maníaco e durante a fase de eutímia apresentaram níveis elevados de TBARS ($p < 0.05$).
3. As enzimas antioxidantes demonstraram perfis diferenciados: (1) A Sod mostrou-se aumentada nos depressivos ($p < 0.01$) e nos maníacos ($p < 0.05$) diferenciando do controle e dos eutímicos. (2) A GPx apresentou atividade aumentada somente nos pacientes eutímicos ($p = 0.01$), os pacientes deprimidos e maníacos apresentaram níveis iguais ao controle. (3) A Cat apresentou atividade diminuída nos eutímicos ($p < 0.01$) e nos maníacos ($p < 0.01$) quando comparados ao controle.
4. A razão entre Sod/ (GPx + Cat) mostrou-se aumentada nos pacientes maníacos ($p < 0.01$) e deprimidos ($p < 0.05$), os pacientes eutímicos não diferiram do grupo controle.
5. Os pacientes bipolares tipo 1 apresentaram dano ao DNA 10 vezes aumentado em relação ao grupo controle. Sendo que este dano correlaciona-se positivamente ($r = 0.62$) com a escala YMRS que quantifica os sintomas maníacos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde o THB é a sexta causa de incapacidade entre as condições médicas e psiquiátricas. Além disso, o THB está associado com o aumento da morbidade e mortalidade por diversas condições médicas gerais, como doenças cardiovasculares, obesidade e *diabetes mellitus*. O THB não é reconhecido como um transtorno neurodegenerativo, porém estudos demonstram alterações nas células gliais, principalmente nos astrócitos, de pacientes com transtornos do humor (Ongur et al 1998; Johnston-Wilson et al 2000; Schoroeter et al 2002). Outros estudos também têm ressaltado alterações estruturais de substância branca em área pré-frontal (Drevets et al 1998; Jhonson-Wilson et al 2000), diminuição do número total de células gliais (Drevets et al 1998) e alterações nos níveis de GFAP de pacientes bipolares (Jhonson-Wilson et al 2000).

A neurodegeneração pode ser um fator patogénico no desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos, principalmente da esquizofrenia e depressão maior, nas quais níveis elevados de S100B são um resultado recorrente (Rothermundt et al 2003). No nosso estudo encontramos um aumento nos níveis de S100B nos pacientes deprimidos e maníacos. Os resultados encontrados nos pacientes maníacos estão de acordo com os resultados mostrados por Machado-Vieria (2002) com pacientes em primeiro episódio maníaco e Schroeter et al (2002) com pacientes maníacos. Não foram encontrados trabalhos na literatura que relatassem os níveis de S100B na depressão bipolar e na fase de eutímia desses pacientes.

A S100B tem ampla distribuição dentro do astrócito. Podendo ser encontrada no citoplasma, em associação com membranas ou proteínas do citoesqueleto (Bianchi et al 1996; Garbuglia et al 1996; Bianchi et al 2003), assim como no núcleo da célula, participando de eventos de apoptose e regulação do ciclo celular (Baudier et al 1992; Rustandi et al, 1998). Além disso, a S100B está envolvida na regulação do metabolismo energético nas células neuronais podendo modular a proliferação e diferenciação dos neurônios e células gliais (Rothermundt et al 2003). Algumas proteínas já foram descritas como alvos da S100B entre elas podemos citar: (1) a inibição da fosforilação da MARCKS e da p53, que protege da desnaturação agregação térmica, estimula a apoptose e inibe o ciclo celular (Donato 2001); (2) o estímulo da frutose-1,6-bifosfato aldolase e da fosfoglicomutase regulando o metabolismo energético (Zimer and Van Eldik 1986); (3) estimulação da guanilato ciclase ligada a membrana responsável por regular a adaptação de fotoreceptores ao escuro (Donato 2001); (4) inibe a fosforilação da GAP 43.

Além de sua ação intracelular a S100B possui ação extracelular dependente da concentração (Figura 4). Como já mencionado anteriormente, em concentrações nM a S100B estimula a sobrevivência neuronal e o crescimento de neuritos, já em concentrações uM a S100B pode ter efeitos tóxicos.

A S100B, em concentrações micromolar, induz apoptose em células PC12, células de neuroblastoma B104 e cultura embrionária de neurônios (Mariggio et al 1994; Arcuri et al 2005) sendo relacionada a um aumento na condutância de canais de Ca^{+2} tipo L (Mariggio et al 1994) e um regulação positiva de genes implicado na apoptose (c-fos, c-jun, bax, p-15 e p-21) (Fulle et al 2000).

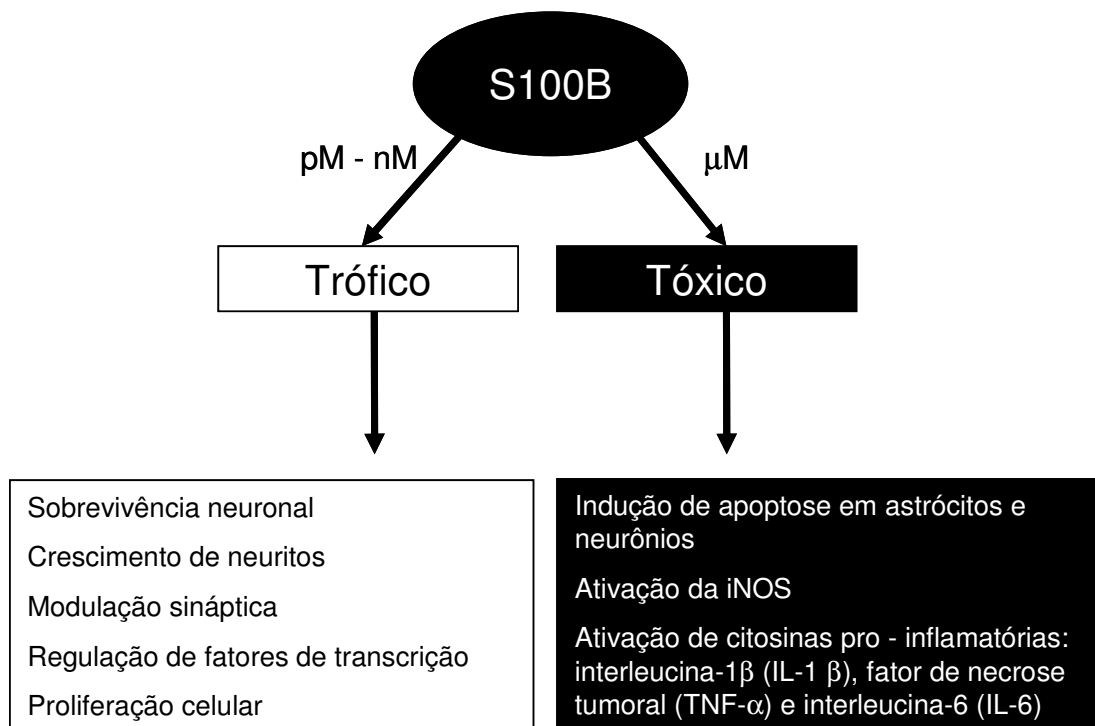


Figura 4. Efeito extracelular dependente da concentração de S100B. Adaptada de Van Eldik & Wainwright, 2003.

A ativação da glia estimula também a expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo como a iNOS (óxido nítrico sintase induzível) a qual gera óxido nítrico (NO) (Van Eldik & Wainwright 2003; Adami et al 2004). Quando o NO está presente em altas concentrações pode reagir com o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formando o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) que reage rapidamente com diversas biomoléculas levando a modificações importantes (Van Eldik & Wainwright 2003), contribuindo para o dano neuronal (Smith et al 1997). No THB tem sido relatado o

aumento dos níveis séricos de NO (Ozcan et al 2004; Yanik et al 2004) e de Sod, sugerindo o aumento na produção do radical superóxido (Kuluoglu et al 2002; Rajenkar et al 2003; Ozcan et al 2004). Ainda não existem estudos mostrando o aumento de ONOO⁻ no THB, porém este pode ser esperado pelos relatos de aumento nos níveis de NO e O₂^{-•}. Existem evidências neuropatológicas que o peroxinitrito pode mediar o dano neuronal (Smith et al 1997), fato importante no THB, como dito anteriormente, o número de células totais gliais está diminuído indicando um possível dano neuronal (Drevets et al 1998).

Os astrócitos desempenham um papel importante na defesa antioxidante no SNC (Takuma et al 2004), o qual é especialmente vulnerável às ERO. O cérebro consome 20% do oxigênio total consumido pelo organismo e é responsável por 25% do consumo de glicose assimilada pelo organismo (Floyd 1999).

Níveis elevados de ERO estão envolvidos em diversos transtornos neurodegenerativos (Floyd 1999). Nós encontramos significantes alterações nos níveis séricos de TBARS e das enzimas antioxidantes nos pacientes com THB. Devemos levar em consideração que estas alterações encontradas nos pacientes podem ser devido a própria doença, mas com certeza sofrem grande influência das medicações, comorbidades clínicas e psiquiátricas, hábitos alimentares e estilo de vida estes junto podem ser responsáveis pelas discrepâncias dos resultados encontrados na literatura (Kuloglu et al 2002; Rajenkar et al 2003; Ozcan et al 2004).

É importante salientar que os estabilizadores do humor podem exercer um efeito antioxidante, dados atuais mostraram que o lítio e o valproato possuem

efeitos antioxidante em células neuronais tratadas sob condições excitotóxicas (Shao et al 2005). Porém, em outro estudo o lítio não foi capaz de proteger contra o estresse oxidativo gerado por peptídeos beta-amiloide em hipocampo de coelho (Ghribi et al 2003).

Nos estudos realizados por Kuloglu et al (2002), Rajenkar et al (2003) e Ozcan et al (2004) os pacientes não foram separados nas diferentes fases da doença (eutimiana, mania e depressão), provavelmente pelo número pequeno de pacientes, assim os pacientes nesses estudos estão predominantemente em episódio maníaco. Encontramos níveis aumentados de TBARS tanto nos pacientes eutímicos, maníacos e deprimidos, o que está de acordo com os estudos de Kuloglu et al (2002) e Ozcan et al (2004). O dano oxidativo aos lipídeos pode ocorrer nos ácidos graxos polinsaturados das bicamadas lipídicas podendo levar a alteração na fluidez da mesma.

Em adição, nós encontramos atividade sérica da Sod aumentada nos pacientes em episódio depressivo e maníaco, como observado por Kuloglu et al (2002) nos eritrócitos dos pacientes com THB. Rajenkar et al (2003) e Ozcan et al (2004) não encontraram alterações na atividade da Sod nos pacientes Bipolares. A Sod é um membro da família das metaloenzimas, amplamente distribuída nos tecidos humanos, e desempenha um papel fundamental papel na detoxificação da ERO, a Sod é responsável pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Johnson & Giulivi, 2005). Existem três tipos de Sod: a CuZnSod (Sod1), a MnSod (Sod2), e a EC-Sod (Sod3). Oury et al (1996) propôs que a Sod3 poderia desenvolver um papel fundamental na remoção de superóxido do meio extracelular prevenindo a formação de $ONOO^-$. No entanto, Carlsson et al (1995)

já havia mostrado que ratos sem EC-Sod pareciam ter um desenvolvimento normal, porém esses se tornaram mais sensíveis a hiperoxia sob certas condições experimentais. Ratos com superexpressão de EC-Sod mostraram defeitos na potenciação de longa duração do hipocampo (Thiels & Klann 2002). A Sod mitocondrial (Sod2) também exerce um importante papel na diminuição da formação de ONOO⁻, pois esse se apresenta em grande quantidade na mitocôndria (Halliwell 2001).

De um modo geral a ação da Sod é gerar H₂O₂ o qual pode ser removido pela catalase uma enzima exclusiva dos peroxissomos estando presente em diversos tecidos (Halliwell & Gutteridge 2000). Além da catalase o H₂O₂ pode ser detoxificado por selenoproteínas como a glutathiona peroxidase (Chance & Boveris 1979). Existem outros sistemas que podem remover o H₂O₂ incluindo peroxidases que usam proteínas tioredoxinas ligadas a um grupo ditiol (reação 6) (Mustacich & Powis 2000). Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que os pacientes maníacos não apresentam alterações na atividade sérica da GPx e reduzem a atividade da catalase quando comparados ao grupo controle, sugerindo um possível dano oxidativo. Nos pacientes deprimidos não verificamos variação nas atividades séricas nem da GPx e nem da catalase o que pode representar um mecanismo compensatório entre a catalase e GPx, porém ainda não está claro porque os pacientes eufímicos apresentam uma elevação da atividade da GPx e diminuição da atividade da catalase. Para tentarmos esclarecer melhor o que estava acontecendo com as enzimas antioxidantes nos pacientes e controles, calculamos o balanço do estresse oxidativo inferido pela razão entre Sod/(catalase+ GPx) os dados mostraram um aumento dessa proporção nos

pacientes deprimidos e maníacos. Em resumo, nossos resultados indicam que os pacientes bipolares em episódio de mania ou depressão apresentam um potencial dano oxidativo que não parece estar sendo prevenido pelos estabilizadores do humor. A figura 7 ilustra os resultados encontrados com os pacientes bipolares para os parâmetros S100B, Sod, Cat, GPx e TBARS.

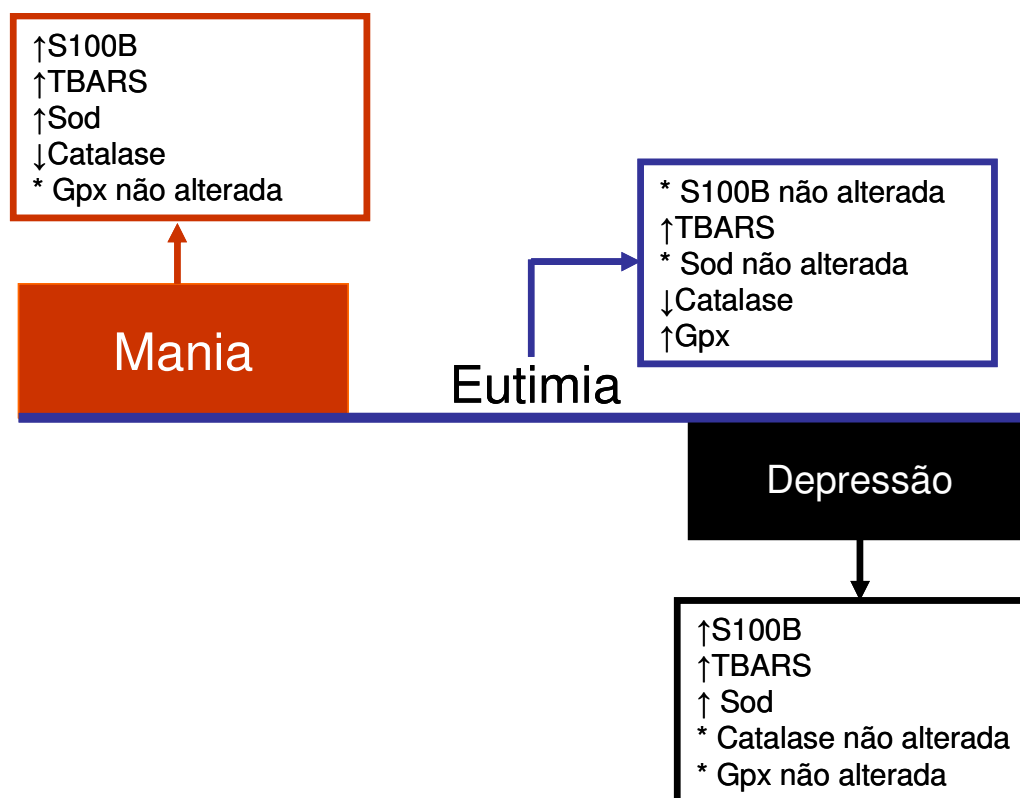


Figura 5. Diagramação dos resultados avaliados nos pacientes bipolares. Sod (superóxido dismutase); TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico); GPx (Glutathione peroxidase).

Embora a etiologia do THB ainda não esteja completamente esclarecida, existem algumas teorias que propõem bases biológicas para o THB. As teorias monoaminérgicas (catecolaminas e indolaminas) sugerem que durante os episódios de mania ocorre um aumento das catecolaminas (especialmente a norepinefrina) e sua diminuição durante os episódios depressivos. Existem evidências de que a dopamina está aumentada em pacientes deprimidos com psicose. De acordo com a chamada hipótese permissiva da função serotoninérgica, tanto na depressão quanto na mania, haveria uma função serotoninérgica diminuída (Schatzberg et al 1987; Shansis & Grevet, 2002; Machado-Vieira et al 2004). Essas alterações nas catecolaminas e indolaminas parecem influenciar na formação do quadro de estresse oxidativo, uma vez que a oxidação das mesmas pode levar a formação de ERO (Obata 2002). Diversos fármacos com ação antioxidante vêm sendo patenteados, entre eles análogos da vitamina E, inibidores da peroxidação lipídica, agentes quelantes de íons, inibidores da NOS e compostos que aumentam os níveis de GSH no cérebro (Halliwell 1991; Floyd 1999; Dorey et al 2000; Marshall 2001; Molina et al 2004). Estudos futuros serão necessários para verificarmos se os antioxidantes podem diminuir o estresse oxidativo nos pacientes bipolares.

O segundo artigo desta dissertação versa sobre o dano ao DNA, verificado através do ensaio Cometa em 32 pacientes bipolares tipo I, não fumantes e que não possuam comorbidades clínicas, esses foram comparados a um grupo controle composto por 32 voluntários pareados por sexo, idade e renda familiar. Foi utilizado como critério de inclusão ao grupo controle não ser fumante, não usar medicações e não sofrer condições médicas gerais. Os resultados mostraram que

os pacientes possuem um dano ao DNA muito elevado (10 vezes aumentado) em relação ao controle ($p < 0.01$).

Como já descrito anteriormente o THB é considerada a sexta causa de incapacidade pela Organização Mundial de Saúde (Murray and Lopez, 1997) e está associado ao aumento da morbidade e mortalidade por condições médicas gerais, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e obesidade (Kupfer, 2005). Estas doenças, bem como o câncer, estão associadas com o aumento do dano ao DNA (Faust et al 2004).

O dano ao DNA pode ser avaliado através da verificação de alterações cromossômicas que são detectadas por uma técnica chamada Micronúcleos, essa é uma técnica demorada e cara (Maluf 2004). Os micronúcleos são fragmentos acêntricos ou cromossomos completos que não se ligaram durante o processo da divisão celular (Tucker & Preston 1996). Diferentes mecanismos estão envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas (clastogênese) ou ausência do fuso acromático (aneuplogênese) (Heddle et al 1983). A vantagem de desse método é verificarmos o dano permanente ao DNA das células (Fenech 1997). O dano recente ao DNA pode ser avaliado através do ensaio Cometa, que é um método é simples, rápido e de baixo custo (Ross et al 1995; Maluf & Erdtmann 2000) e além de estar sendo muito utilizado para biomonitorar trabalhadores expostos a condições genotóxicas (Maluf 2004). Para realizamos essa técnica é necessário utilizarmos células integras, porém não necessitam estar em crescimento, podendo ser aplicado a diversos tipos celulares (Maluf 2004). Singh et al (1988) modificaram o método inicialmente descrito por Ostling & Johanson (1984) permitindo avaliarmos os danos ao DNA em células individuais

sob condições alcalinas. Primeiramente ocorre uma desnaturação do DNA permitindo verificarmos quebras simples e duplas e sítios álcali-labeis, estas regiões são quebradas quando incubamos o DNA em pH alto. O dano ao DNA é quantificado analisando-se 100 células por indivíduo, as células recebem um escore que varia de 0 (célula sem dano) à 4 (dano máximo) de acordo com a intensidade da cauda (Figura 8), ou seja quanto maior a cauda mais dano ao DNA como em pH alcalino esse dano vai ser quebrado quanto menor os pedaços mais rápida a migração e maior a cauda (Maluf 2004).

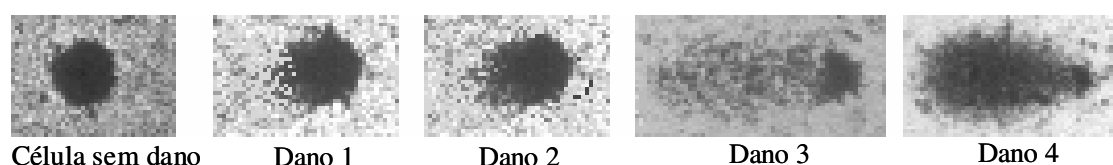


Figura 6. Caracterização do tipo de dano ao DNA verificado no ensaio Cometa.

Dano 0 = célula sem dano – Dano 4 = dano máximo ao DNA.

Da mesma maneira que o estresse oxidativo, os ensaios que avaliam o dano ao DNA sofrem a influência de fatores como estilo de vida, hábitos alimentares, medicações e fatores associados ao genótipo (Piperakis et al 1998; Hartmann et al 1998). Os fatores biológicos, na maioria das vezes, não podem ser controlados para isso busca-se selecionar indivíduos controles pareados por sexo e idade e se possível que se assemelhem no estilo de vida e ao interpretarmos os resultados procuramos levar em consideração esses fatores (Maluf 2004)

Os pacientes avaliados pelo nosso estudo estavam usando medicações psiquiátricas em especial estabilizadores do humor. A fim de verificarmos se as

medicações podiam causar dano ao DNA procedemos a um ensaio *in vitro* onde incubamos as medicações (lítio, carbamazepina, ácido valpróico, fluoxetina, amitriptilina, lamotrigina, sertralina, levomepromazina, sulpirida, haloperidol, diazepam e clonazepam) com o sangue por 30 minutos à 37°C. As medicações testadas não apresentaram, nessas condições, capacidade de induzirem dano ao DNA superior ao encontrado no controle (sangue puro), com exceção do haloperidol que apresentou um aumento não significativo em relação ao controle.

A maioria dos estudos tem mostrado um efeito protetor dos estabilizadores do humor e de alguns antidepressivos (Shao et al 2005; King e Jope 2005; Wang et al 2004). Recentemente um estudo mostrou que o lítio e o ácido valpróico diminuem a peroxidação lipídica induzida pelo glutamato e os níveis de carbonilação das proteínas além de inibirem a fragmentação do DNA induzida pelo glutamato em neurônios corticais (Shao et al 2005). Além disso, ambos os estabilizadores do humor (lítio e ácido valpróico) aumentam a expressão do glutathione-S-transferase em cultura de neurônios corticais (Wang et al 2004). Curiosamente, King e Jope (2005) demonstraram que o lítio é capaz de diminuir a atividade da caspase-3 quando o estresse oxidativo foi induzido por rotenona ou H₂O₂. Em resumo, o uso crônico de ácido valpróico ou lítio podem estimular a expressão de bcl-2, bem como a inibir a atividade da GSK-3 β e reduzir a atividade da caspase-3 fazendo com que a célula perca a suscetibilidade à apoptose (Mora et al 1999; Mora et al 2002; Gould & Manji 2002; Chuan et al 2004). O papel neuroprotetor dos estabilizadores do humor está bem reportado e pode estar

relacionado, além dos fatores já mencionados, com a inibição dos receptores de N-metil-D-aspartato e ativação da rota de sinalização PI3 quinase/ AKT.

Em dois estudos que usaram o ensaio Cometa, a clorpromazina não demonstrou potencial lesivo ao DNA (Frotschl et al 2005), enquanto a flufenazina aumentou o reparo ao DNA após as células sofrerem dano ao DNA induzido por H₂O₂ (Gaziorowski and Brokos, 2001). A amitriptilina tem sido descrita como não – genotóxica (Spanova et al 1997; Saxena & Ahuja 1998), o valproato tem mostrado um efeito antiproliferativo em certas linhagens de câncer *in vivo* e *in vitro* (Singh et al 2005). Psimadas et al (2004) estudou o envolvimento do dano ao DNA na esquizofrenia mostrando que os pacientes esquizofrênicos não diferem do controle quando ao dano ao DNA e capacidade de reparo. Eles também demonstraram que altos níveis de antipsicóticos não aumentam o dano ao DNA.

Um resultado interessante encontrado nesse estudo foi a correlação positiva entre o índice de dano ao DNA e os sintomas maníacos ($r=0.620$; $P=0.001$) e deprimidos ($r=0.450$; $P=0.001$), quando analisamos num modelo de regressão linear múltipla o número de medicações não influenciou os resultados. Portanto, as evidências sugerem que o uso de medicações psiquiátricas pode atuar como um fator protetor e não lesivo. Seguindo essa linha, os achados do nosso estudo podem estar mais relacionados à gravidade dos sintomas do que a exposição a medicações.

Os radicais livres (especialmente o OH[•]) podem causar dano ao DNA (Cooke et al 2005; Culmsee and Mattson, 2005), o qual em certas circunstâncias pode levar a mutação ao DNA. Existem múltiplos sistemas para prevenir a formação de lesão, e se o dano ocorrer poderá rapidamente ser removido (Cooke

et al 2005). O dano ao DNA pode levar fosforilação do p53 nos resíduos serina ou treonina favorecendo a apoptose celular (Evan and Littlewood, 1998; Culmsee and Mattson, 2005). Benes et al 2003, em um estudo *post mortem*, avaliaram a fragmentação ao DNA de pessoas portadores de THB, porém eles não encontraram um aumento da fragmentação do DNA no córtex cingular.

O papel do dano ao DNA no THB pode estar relacionado ao fato que estes pacientes apresentam aumento da morbidade e da mortalidade por condições médicas gerais. Doença cardiovascular (Demirbag et al 2005), obesidade (Gao et al 2004) e diabetes mellitus (Blasiak et al 2004) estão associadas com o aumento do dano ao DNA. Sendo que, essas condições médicas são mais prevalentes em pacientes bipolares do que na população em geral (Kupfer 2005). Além disso, existem fortes evidências mostrando que o estresse oxidativo pode estar aumentado no THB (Kuloglu et al 2000; Rajenkar et al 2002; Ozcan et al 2004) como mencionados anteriormente os radicais livres podem induzir o dano ao DNA.

Devemos considerar que verificamos o dano recente ao DNA nos pacientes bipolares e um futuro estudo envolvendo a avaliação do dano permanente às células será necessário para compreendermos se o sistema de reparo foi capaz de eliminar o dano. Além disso, é importante salientar, novamente, que o dano ao DNA pode ser causado por diversos fatores como hábitos alimentares e estilo de vida, mais uma vez demonstrando a necessidade novos estudos na área.

3.1 Conclusões

Os resultados encontrados nessa dissertação mostram que no THB, em especial nos episódios de depressão e mania, está ocorrendo um aumento na proporção Sod/(catalase+GPx), ou seja a defesa primária (Sod) está aumentada e as enzimas catalase e GPx sofrem um balanço entre elas para eliminar o H₂O₂ formado na ação da Sod (objetivo 2, desta dissertação), porém a elevação da atividade das enzimas antioxidantes não foram suficientes para prevenir a peroxidação lipídica (TBARS) aumentada nas três fases da doença (objetivo 3). Além disso, verificamos um aumento do dano recente ao DNA nos pacientes bipolares tipo I, como é de conhecimento os radicais livres, entre outros fatores, podem causar dano ao DNA assim, fica evidente que pelo menos em parte essa elevação do dano ao DNA nos pacientes bipolares pode ser explicada pelo estresse oxidativo (objetivo 4). O aumento dos níveis de estresse oxidativo periférico pode estar indicando que o SNC esteja parcialmente afetado e talvez de uma maneira mais grave. O envolvimento cerebral, particularmente dos astrócitos, foi confirmado pelo aumento da S100B sérica (objetivo 1).

Referências Bibliográficas

Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. (2001): S100B expression in and effects on microglia. *Glia*. 33(2):131-42.

Almeida N, Mari JJ, Coutinho E, Andreolli SB, Busnello ED. (1992): Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas de Porto Alegre. *Revista ABP-APAL* 14(3):93-104.

Adami C, Bianchi R, Pula G, Donato R. (2004): S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim Biophys Acta*. 1742(1-3):169-77.

Andreazza AC, Soares DG, Kehl LF, Borella MLL, Salvador M. (2004): Transtorno Neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: Kapczinski F, Quevedo J, Isquierdo I. (2004): *Bases Biológicas dos Trnstornos Psiquiátricos*, ed. 2^a, Artmed, Porto Alegre.

Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Donato R. (2005): S100B increases proliferation in PC12 neuronal cells and reduces their responsiveness to nerve growth factor via Akt activation. *J Biol Chem*. 280(6):4402-14

Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B. (1997): Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J.* 324 (Pt 1):25-8.

Baudier J, Delphin C, Grunwald D, Khochbin S, Lawrence JJ. (1992): Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(23):11627-31.

Beckman KB, Ames BN. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 78(2):547-81.

Belmaker RH. (2004): Medical progress: bipolar disorder. *N Eng J Med* 351:476-486.

Benes FM, Walsh J, Bhattacharyya S, Sheth A, Berretta S. (2003): DNA fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder. *Archives of General Psychiatry* 60, 359-64.

Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. (1994): Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.* 307(1):323-33.

Bianchi R, Giambanco I, Arcuri C, Donato R. (2003): Subcellular localization of S100A11 (S100C) in LLC-PK1 renal cells: Calcium- and protein kinase c-dependent association of S100A11 with S100B and vimentin intermediate filaments. *Microsc Res Tech.* 60(6):639-51.

Bianchi R, Garbuglia M, Verzini M, Giambanco I, Ivanenkov VV, Dimlich RV, Jamieson GA Jr, Donato R. (1996): S-100 (alpha and beta) binding peptide (TRTK-12) blocks S-100/GFAP interaction: identification of a putative S-100 target epitope within the head domain of GFAP. *Biochim Biophys Acta.* 13(3):258-67.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. (2004): DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research.* 554, 297-304.

Bowie A, O'Neill LA. (2000): Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 59(1):13-23.

Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. (2002): Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 27;31(25):1174-84.

Bolann BJ, Ulvik RJ. (1990): On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. *ur J Biochem.* 193(3):899-904.

Borela L & Varela Q. (2004): Antioxidantes enzimáticos. In: Salvador M & Henriques JAP (2004): Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Ed. Ulbra, 1º ed., Porto Alegre.

British Pharmacopoeia (1999) London . Her Majesty's Stationery Office.

Brunello N. (2004) Mood stabilizers: protecting the mood...protecting the brain. *Journal of Affective Disorders*. 79, 15-20.

Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. (1995): Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(14):6264-8.

Chance B, Machley AL (1954): Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzimol* 2:764-775.

Chance B, Sies H, Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 59(3):527-605.

Chuang DM (2004): Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Crit Rev Neurobiol* 16:83-90.

Chuang DM. (2004): Neuroprotective and neurotrophic actions of the mood stabilizer lithium: can it be used to treat neurodegenerative diseases? *Critical Reviews in Neurobiology*. 16, 83-90.

Chuang DM (2005): The Antiapoptotic Actions of Mood Stabilizers: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potentials. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1053, 195-204.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. (1997): Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental Molecular Mutagenic* 30, 139-146.

Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. (1996): Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104, 465-469.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. (2005): Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry*, *in press*.

Culmsee C, Mattson MP. (2005): p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331,761-777.

Das Gupta R, Guest JF. (2002): A model to estimate the cost benefit of an occupational vaccination programme for influenza in the UK. *Pharmacoeconomics* 20, 475-484.

Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigit A. (2005): Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutation Research* 570,197-203.

Donato R (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668.

Dorey G, Lockhart B, Lestage P, Casara P. (2000): New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000 May 1;10(9):935-9.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. (2004): Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research.* 43, 200-27.

Drevets WC, Ongur D, Price JL. (1998): Neuroimaging abnormalities in the subgenual prefrontal cortex: implications for the pathophysiology of familial mood disorders. *Mol Psychiatry.* 3(3):220-6, 190-1.

Droge W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.

Emerit J, Edeas M, Bricaire F. (2004): Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58, 39-46.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 11(1):81-128.

Evan G, Littlewood T. (1998): A matter of life and cell death. *Science*. 281, 1317-1322.

Esplugues JV. (2002): NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol*. 135(5):1079-95

Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch- Sundermann, V. (2004): The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research* 566, 209-229.

Fenech M. (1997): The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*. 392(1-2):11-8.

First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JB (1998): *Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-I)*. New York: Biomedics Research Department.

Floyd RA (1999): Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:236-245.

Friedman E, Hoau-Yan-Wang, Levinson D, Connell TA, Singh H. (1993): Altered platelet protein kinase C activity in bipolar affective disorder, manic episode. *Biol Psychiatry* 33(7):520-5.

Fridovich I. (1978): Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp.* 6-8;(65):1-4.

Fridovich I. (1998): The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci.* 7(12):2688-90

Frotschl R, Weickardt S, Staszewski S, Kaufmann G, Kasper P. (2005): Effects of chlorpromazine with and without UV irradiation on gene expression of HepG2 cells. *Mutation Research* 575, 47-60.

Fujikawa K, Kamiya H, Kassay H. (1998): The mutatojns induced by oxidatively damage nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxyl and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acidis Res.* 26: 4582-87.

Fulle S, Mariggio MA, Belia S, Petrelli C, Ballarini P, Guarnieri S, Fano G. (1999): Rapid desensitization of PC12 cells stimulated with high concentrations of extracellular S100. *Neuroscience.* 89(3):991-7.

Gao D, Wei C, Chen L, Huang J, Yang S, Diehl AM. (2004): Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 5, 1070-1077.

Gasiorowski K, Brokos B, (2001): DNA repair of hydrogen peroxide-induced damage in human lymphocytes in the presence of four antimutagens. A study with alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Mutagenesis* 6, 897-911.

Garbuglia M, Verzini M, Dimlich RV, Jamieson GA Jr, Donato R. (1996): Characterization of type III intermediate filament regulatory protein target epitopes: S-100 (beta and/or alpha) binds the N-terminal head domain; annexin II2-p11(2) binds the rod domain. *Biochim Biophys Acta*. 13(3):268-76.

Ghribi O, Herman MM, Savory J (2003): Lithium inhibits Abeta-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. *J Neurosci Res* 71:853-862.

Goncalves DS, Lenz G, Karl J, Goncalves CA, Rodnight R. (2000): Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. *Neuroreport*. 20;11(4):807-9.

Gould TD, Manji HK. (2002): The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *Neuroscientist*. 8(5):497-511.

Gutteridge JM, Halliwell B. (2000): Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 899:136

Selinfreud RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik L. (1991): Neurotrophic protein S100B stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* . 88:3554-3558.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. (2005): Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:51-88.

Hakkaart-van Roijen L, Hoeijenbos MB, Releer EJ, Tem-have M, Nolen WA, Veraart CP, Rutten FF. (2004): The societal costs and quality of life of patients suffering from bipolar disorder in the Netherlands. *Acta Psychiatrica Scandinavia* 110, 383-392.

Halliwell B. & Guteridge (2000): *Free radicals in biology and medicine*, 3ed. Clarendon, Oxford.

Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18, 685-716.

Hamilton M (1960): A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psych* 23: 56–62.

Halliwell B, Gutteridge JM. (1990): The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8.

Halliwell B, Gutteridge JM. (1984): Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*. 10;2: 8411-1095.

Halliwell B, Whiteman M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 142(2):231-55.

Hamilton M. (1960): A rating scale for depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 23, 56–62.

Hartmann A, Fender H, Speit G. (1998): Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay. *Environ Mol Mutagen*. 32(1):17-24.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR; 4th International Comet Assay Workshop. (2003): Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*. 18(1):45-51.

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. (1983): The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 123(1):61-118.

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. (1999): Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:191-220.

Isobe T, Okuyama T. (1981): The amino acid sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain S-100 protein. *J Neurochem.* 37(2):522-4.

Johnson F, Giulivi C. (2005): Superoxide dismutases and their impact upon human health.

Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH (2000): Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 5:142-149.

Judd LL, Akiskal HS (2003): The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking in account subthreshold cases. *J Affect Disord.* 73(1-2):123-31.

Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. (2000) : Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research.* 463, 13-31.

Kessler RC, Stang P, Wittchen HU, Stein M. (1999): Walters Lifetime co-morbidities between social phobia and mood disorders in the US National Comorbidity Survey. *Psychol Med* 29(3):555-67.

King TD, Jope RS. (2005): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* 16, 597-601.

Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan E, Cinkilinc N (2002): Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 20: 171-175.

Kupfer DJ. (2005): The increasing medical burden in bipolar disorder. *JAMA* 293: 2528-2530.

Laming PR. (2000): Potassium signalling in the brain: its role in behaviour. *Neurochem Int.* 36(4-5):271-90.

Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Goncalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO (2001): Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res* 35:11-14.

Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Goncalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO (2002): Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:269-272.

Machado-Vieira R, Ceresér KMC, Frey BN , Soares JC (2004): Transtorno do humor bipolar. In: Kpaczinski F, Quevedo J, Izquierdo I (2004): Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. Artmed, Porto Alegre, 2° ed.

Mahalik SP, Evans D, Lal H. (2001): Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 25(3):463-93.

Maluf SW. (2004): Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. Clin Chim Acta. 347(1-2):15-24.

Maluf SW, Erdtmann B. (2000): Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. Mutation Research 471, 21-27.

Marshall JM. (2001): Roles of adenosine and nitric oxide in skeletal muscle in acute and chronic hypoxia. Adv Exp Med Biol. 502:349-63.

Mariggio MA, Fulle S, Calissano P, Nicoletti I, Fano G. (1994): The brain protein S-100ab induces apoptosis in PC12 cells. Neuroscience. 60(1):29-35.

McCord JM, Edeas MA. (2005): SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother.* 59(4):139-42. *Medicine* 351, 476-486.

Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. (2005): Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 26, 587-595.

Mirsa HP, Fridovich I (1972): The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 217:3170-3175.

Molina MM, Belli G, de la Torre MA, Rodriguez-Manzanque MT, Herrero E. (2004): Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):51923-30.

Morselli PL, Elgie R, Cesana BM. (2004): GAMIAN-Europe/BEAM survey II: cross-national analysis of unemployment, family history, treatment satisfaction and impact of the bipolar disorder on life style. *Bipolar Disord.* 6(6):487-97.

Mora A, Rosa A, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. (1999): Different mechanisms of protection against by valproate and of lithium. *European Journal of Biochemistry* 266, 886–891.

Mora A, Sabio G, Soler G, Centeno F. (2002): Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar Disorder* 4, 195–200.

Murray CJ, Lopez AD (1997): The utility of DALYs for public health policy and research: a reply. *Bull World Health Organ* 75:377-381.

Mustacich D, Powis G. (2000): Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 346:1-8.

Netto CB, Portela LV, Ferreira CT, Kieling C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R (2005): Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem* 38:433-435.

Niki E, Noguchi N. (2004): Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Acc Chem Res.* 37(1):45-51.

Obata T. (2002): Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. *J Neural Transm.* 109(9):1159-80.

Ongur D, Drevets WC, Price JL. (1998): Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13290-295.

Ostling O, Johanson KJ. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.*

30;123(1):291-8.

Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. (2004): Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 19:89-95

Pawlak W, Kedziora J, Zolynski K, Kedziora-Kornatowska K, Blaszczyk J, Witkowski P. (1998): Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. *J Gravit Physiol.* 5(1):P131-2.

Palyvoda O, Polanska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. (2003): DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol.* 50(1):181-90.

Piperakis SM, Petrakou E, Tsilimigaki S, Sagnou M, Monogiudis E, Haniotakis G, Karkaseli H, Sarikaki E. (2003): Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environ Mol Mutagen.* (2):104-10.

Psimadas D, Messini-Nikolaki N, Zafiropoulou M, Fortos A, Tsilimigaki S, Piperakis SM. (2004): DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Letters* 204(1), 33-40.

Post RM, Ballenger JC, Uhde TW, Smith C, Rubinow DR, Bunney WE Jr. (1982): Effect of carbamazepine on cyclic nucleotides in CSF of patients with affective illness. *Biol Psychiatry*. 1982 (9):1037-45

Rajeswari N, Ahuja YR, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khar A. (2000): Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*. 21(4):557-61.

Ranjekar, PK, Hinge, A, Hegde, MV, Ghate, M, Kale, A, Sitasawad, S, Wagh, UV, Debsikdar, VB, Mahadik, SP (2003): Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research* 121:109-122.

Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P, Collins AR. (1995): The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res*. 337(1):57-60. No

Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, Missler U, Peters M, Rudolf S, Kirchner H (2001): S-100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression. *J Affect Disord* 66:89-93.

Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003): S100B in brain damage and

neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614-632.

Rustandi RR, Drohat AC, Baldisseri DM, Wilder PT, Weber DJ. (1998): The Ca(2+)-dependent interaction of S100B(beta beta) with a peptide derived from p53. *Biochemistry*. 37(7):1951-60.

Salvador M, Poletto NP, Andrezza AC, Soares DG. (2004) Estresse oxidativo e doenças. In: Radicais Livres e a resposta células ao estresse oxidativo.

Sajatovic M. (2005): Bipolar disorder: disease burden. *Am J Manag Care*. 11(3 Suppl):S80-4

Spanova A, Kovaru H, Lisa V, Lukasova E, Rittich B. (1997): Estimation of apoptosis in C6 glioma cells treated with antidepressants. *Physiol Res*. 46(2):161-4.

Saxena R, Ahuja YR. (1988): Genotoxicity evaluation of the tricyclic antidepressants amitriptyline and imipramine using human lymphocyte cultures.

Schaf DV, Tort AB, Fricke D, Schestatsky P, Portela LV, Souza DO, Rieder CR. (2005): S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 11(1):39-43.

Schatzberg AF, Dessain E, O'Neil P, Katz DL, Cole JO. (1987): Recent studies on selective serotonergic antidepressants: trazodone, fluoxetine, and fluvoxamine. *J Clin Psychopharmacol.* 11:1-22.

Schmitt A, Bertsch T, Henning U, Tost H, Klimke A, Henn FA, Falkai P. (2005): Increased serum S100B in elderly, chronic schizophrenic patients: Negative correlation with deficit symptoms. *Schizophr Res* 15;80(2-3):305-13.

Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Diefenbacher A, Blasig IE (2002): S100B is increased in mood disorders and may be reduced by antidepressive treatment. *Neuroreport* 13:1675-8.

Shao L, Young LT, Wang JF (2005): Chronic Treatment with Mood Stabilizers Lithium and Valproate Prevents Excitotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortical Cells. *Biol Psychiatry* [In Press]

Shansis F, Grevet E, Mattevi B, Berlim M, Maldonado G, Santin A, Fleck M, Izquierdo I. (2003): Development and application of the mania rating guide (MRG). *Rev Bras Psiquiatr.* 25(2):91-5.

Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. (1997): Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 17(8):2653-7.

Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U, Beal MF. (1996): Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int.* 29(2):167-71.

Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. (1997): The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem.* 174(1-2):193-7.

Sies H. (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 15;215(2):213-9

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175(1):184-91.

Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL. (1991): Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res.* 256(1):1-6.

Singh G., Driever P.H., Sander J.W., (2005). Cancer risk in people with epilepsy: the role of antiepileptic drugs. *Brain* 128, 7-17.

Spanova A., Kovaru H., Lisa V., Lukasova E., Rittich B., 1997 Estimation of apoptosis in C6 glioma cells treated with antidepressants. *Physiological Research* 46, 161-164.

Spitzer RL, Williams JB, Gibbon M, First MB. (1992): The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID). I: History, rationale, and description. *Archives of General Psychiatry* 49, 624-629.

Takuma K, Baba A, Matsuda T (2004): Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 72:111-127.

Thiels E & Klann E. (2002): Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice. *Physiol Behav.* 77(4-5):601-5.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Tramontina F, Conte S, Goncalves D, Gottfried C, Portela LV, Vinade L, Salbego C, Goncalves CA. (2002): Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol* 22:373-378.

Tucker JD, Preston RJ. (1996): Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 365(1-3):147-59.

Van Eldik LJ, Wainwright MS. (2003): The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 21(3-4):97-108.

Von Sonntag C. (1987): *The chemical basis of radiation biology.* London: Taylor and Francis.

Wang JF, Shao L, Sun X, Young,LT. (2004): Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *Journal of Neurochemistry* 88, 1477-1484.

Wyatt RJ, Henter I. (1995) An economic evaluation of manic-depressive illness--1991. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 30(5):213-9

Wendel A (1981): Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325-333.

Wiesmann M, Wandinger KP, Missler U, Eckhoff D, Rothermundt M, Arolt Kirchner H (1999): Elevated plasma levels of S-100b protein in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 45:1508-1511.

Wills ED (1966): Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99:667-676.

Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroglu SS, Savas HA, Herken H, Kocyigit A, Keles H, Akyol O. (2004): The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 254(1):43-7.

Young, R.C., Biggs, J.T., Ziegler, V.E., Meyer, D.A., 1978. A rating scale for mania: reliability, validity, and sensitivity. *British Journal of Psychiatry* 133, 429–435.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 33(3):337-49.