

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**COMPARAÇÃO ENTRE NÍVEIS SÉRICOS DA ATIVIDADE DA ENZIMA
SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO
TIOBARBITÚRICO NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E NA
ESQUIZOFRENIA**

Maurício Kunz

Orientador: Flávio Kapczinski

Co-Orientadora: Clarissa Severino Gama

Porto Alegre, 2008

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**COMPARAÇÃO ENTRE NÍVEIS SÉRICOS DA ATIVIDADE DA ENZIMA
SUPERÓXIDO DISMUTASE E SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO
TIOBARBITÚRICO NO TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E NA
ESQUIZOFRENIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Maurício Kunz

Orientador: Flávio Kapczinski

Co-Orientadora: Clarissa Severino Gama

Porto Alegre, Julho de 2008

Catalogação-na-Publicação

K96 Kunz, Maurício

Comparação entre níveis séricos da atividade da enzima superóxido dismutase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no transtorno de humor bipolar e na esquizofrenia / Maurício Kunz. – 2008.

82 f.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Kapczinski.

Co-orientadora: Dra. Clarissa Severino Gama.

1. Transtorno bipolar 2. Esquizofrenia 3. Estresse oxidativo 4. Peroxidação de lipídeos 5. Superóxido dismutase I. Kapczinski, Flávio II. Gama, Clarissa Severino III. Título

NLM WM 207

Sometimes scientific progress is not based on a discovery or the generation of new data but on a change of viewpoint that allows one to see a set of already existing data in a new light.

Michael Reth

Agradecimentos

Ao Professor Flávio Kapczinski, exemplo de entusiasmo e dedicação à pesquisa, por todo apoio, confiança e estímulo.

À Doutora Clarissa Severino Gama, pela energia e carinho com que me ajudou ao longo dessa trajetória.

Aos colegas do Laboratório de Psiquiatria Molecular e do Programa de Atendimento de Transtorno do Humor Bipolar, em especial a Ana Cristina Andreazza, Fabiano Gomes, Juliana Tramontina, Keila Ceresér e Márcia Kauer Sant'Anna.

Aos colegas do Ambulatório de Esquizofrenia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A todos - amigos, colegas, familiares e professores – que contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa e de minha formação profissional, cujo sofrimento buscamos minorar com nosso trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.1 A DICOTOMIA TRANSTORNO BIPOLAR X ESQUIZOFRENIA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO	16
2.2.1 RADICAIS LIVRES.....	16
2.2.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	19
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROPATOLOGIA	21
2.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO E ESQUIZOFRENIA.....	22
2.3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E TRANSTORNO BIPOLAR	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
4 OBJETIVOS.....	45
5 METODOLOGIA	46
6 ASPECTOS ÉTICOS	48
7 ARTIGO.....	49
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
AODS	sistema de defesas antioxidantes
CAT	catalase
DA	dopamina
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribo nucléico
DSM-IV-TR	do inglês, <i>diagnostic and statistical manual of mental disorders</i> - manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, 4 ^a . Ed
ERO	espécies reativas do oxigênio
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx	glutathiona peroxidase
GST	glutathiona- S-transferase
GR	glutathiona redutase
NO	óxido nítrico
RL	radicais livres
SOD	superóxido dismutase
TB	transtorno bipolar
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

Existe um crescente conjunto de evidências de que o estresse oxidativo desempenha um papel na patofisiologia tanto da Esquizofrenia quanto do Transtorno Bipolar.

Métodos: Nós comparamos a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e os produtos da peroxidação lipídica, através das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), em pacientes bipolares deprimidos (N=21), maníacos (N=32) e eufímicos (N=31), em pacientes com esquizofrenia cronicamente medicados (N=97), todos preenchendo critérios diagnósticos do DSM-IV-TR, e um grupo de controles saudáveis (N=32). Os grupos foram comparados após controle de variáveis clínicas.

Resultados: A atividade da SOD sérica (U/mg proteína) estava significativamente aumentada ($p < 0,001$) em pacientes bipolares maníacos ($7,44 \pm 3,88$), deprimidos ($6,12 \pm 4,64$), e em pacientes com esquizofrenia ($9,48 \pm 4,51$), quando comparada tanto com controles ($1,81 \pm 0,63$) quanto com pacientes bipolares eufímicos ($2,75 \pm 1,09$). Níveis de TBARS (mol/L) estavam aumentados significativamente no grupo de pacientes com esquizofrenia ($4,95 \pm 1,56$, $p = 0,016$), nos bipolares eufímicos ($6,36 \pm 1,46$, $p < 0,001$), bipolares maníacos ($7,54 \pm 1,74$, $p < 0,001$), e bipolares deprimidos ($5,28 \pm 1,54$, $p = 0,028$) em comparação aos controles ($3,96 \pm 1,51$).

Discussão: Nossos achados mostram níveis elevados de atividade da SOD em pacientes com esquizofrenia, assim como em pacientes bipolares deprimidos e maníacos, porém não em pacientes bipolares eufímicos. Isso sugere uma desregulação das defesas oxidativas em ambos os transtornos. É

provável que tais mudanças reflitam alterações de estado no transtorno bipolar. Resultados do TBARS mostram aumento de peroxidação lipídica na mania, que foi diferenciado de todos os outros grupos. Níveis de TBARS em pacientes com esquizofrenia, assim como em bipolares eutímicos e deprimidos estavam mais elevados do que em controles. Isso sugere aumentos persistentes na esquizofrenia, o que pode refletir sintomatologia continuada ou tratamento, e um gradiente estado-dependente no transtorno bipolar, com maior estresse oxidativo na mania.

Esses dados apontam que a biologia oxidativa pode ser um componente chave da patofisiologia tanto do transtorno bipolar quanto da esquizofrenia, bem como que o uso de agentes moduladores do estresse oxidativo pode ser uma estratégia promissora de intervenção em ambos os transtornos.

Palavras-Chaves: transtorno bipolar, peroxidação lipídica, estresse oxidativo, esquizofrenia, superóxido dismutase.

ABSTRACT

There is an increasing body of evidence suggesting that oxidative stress may play a role in the pathophysiology of both schizophrenia and bipolar disorder (BD).

Methods: We compared the antioxidant enzyme, serum superoxide dismutase (SOD) and the lipid peroxidation product, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as assessed in depressive (N=21), manic (N=32) and euthymic (N=31) bipolar patients (BD), and in chronically medicated patients with schizophrenia (SZ; N=97), all fulfilling DSM-IV-TR diagnostic criteria, and a group of healthy controls (N=32). Groups were compared after controlling for clinical variables.

Results: Serum SOD (U/mg protein) levels were significantly increased ($p < 0.001$) in manic (7.44 ± 3.88) and depressed (6.12 ± 4.64) BD patients and SZ (9.48 ± 4.51) when compared to either controls (1.81 ± 0.63) or euthymic (2.75 ± 1.09) BD patients. TBARS (mol/L) levels were significantly higher in the SZ group (4.95 ± 1.56 , $p = 0.016$), bipolar euthymic (6.36 ± 1.46 , $p < 0,001$), bipolar manic (7.54 ± 1.74 , $p < 0,001$), and bipolar depressed patients (5.28 ± 1.54 , $p = 0.028$) compared to controls (3.96 ± 1.51).

Discussion: Our findings show increased SOD levels in SZ, as well as in depressed and manic bipolar patients, but not in euthymic BP subjects. This suggests a dysregulation in oxidative defences in both disorders. It is likely that such changes reflect state changes in bipolar disorder. It is possible that this is a compensatory response to the oxidative stress that occurs in the acute phase of bipolar episodes. TBARS results show increases in lipid peroxidation in mania, which was differentiated from all other groups. TBARS levels in SZ and

in euthymic as well as depressed individuals with BP were higher than in controls. This suggests persistent increases in SZ, which may reflect ongoing symptomatology or treatment, and a state dependant gradient in BP, with greatest oxidative stress in mania.

These data support oxidative biology as both a key component of the pathophysiology of both BP and SZ, and the use of agents that modulate oxidative biology as a promising avenue for intervention in both disorders.

Keywords: Bipolar Disorder; Lipid peroxidation; Oxidative stress; Schizophrenia; Superoxide Dismutase

1. INTRODUÇÃO

A classificação de Esquizofrenia (SZ) e Transtorno Bipolar (TB) como duas entidades separadas tem sido questionada desde o momento de sua concepção com as descrições de Kraepelin de “demência precoce” e “insanidade maníaco depressiva” em 1896. A distinção nosológica de Kraepelin foi baseada na observação clínica de sintomatologia e curso da doença, e mesmo hoje, apesar de grandes avanços na medicina, o diagnóstico diferencial das psicoses é ainda baseado no curso clínico do transtorno. No entanto, novas evidências de diversas áreas, como genética, neuropsicologia e neuroimagem, têm restabelecido o debate, com muitos postulando que esquizofrenia e transtorno bipolar representam diferentes manifestações de psicose ao longo de um continuum, com o Transtorno Esquizoafetivo representando um subtipo intermediário (Selemon et al, 2003).

Diferentes estudos genéticos exploraram a possibilidade de que SZ e TB tenham origens hereditárias comuns. Regiões de susceptibilidade comuns aos dois transtornos foram identificadas nos cromossomos 10, 13, 18 e 22 (Berrettini, 2003; Craddock et al, 2005).

Ambos os transtornos também foram associados com eventos perinatais. Evidência epidemiológica sugere que existe um aumento de incidência de SZ e transtornos afetivos na prole de mães expostas ao vírus influenza no segundo trimestre de gravidez (Machon et al, 1997; Mednick et al, 1988). Dados mostrando uma associação entre um aumento do risco de SZ e TB e complicações obstétricas também foram evidenciados (Kinney et al., 1998).

A caracterização dos déficits cognitivos associados com SZ e TB revelou vários traços em comum, mas também confirmou que pacientes com SZ têm comprometimento mais grave em determinados domínios cognitivos, como atenção, velocidade psicomotora, memória visual e verbal, resolução de problemas e abstração (Mojtabai et al., 2000).

Alguns estudos de imagem funcional também não diferenciam claramente os dois transtornos, no entanto, muitos apontam diferenças marcantes. Um estudo descreveu aumento de ventrículo, não evidente no primeiro episódio do transtorno, mas que se mostrou progressivo após outros episódios no TB (Strakowski et al., 2002), enquanto um padrão de alargamento ventricular já era evidente no primeiro episódio em pacientes com SZ, semelhante ao observado em pacientes crônicos com SZ (Velakoulis et al., 2006). Atividade metabólica em córtex mediofrontal está diminuída em pacientes com SZ durante uma série de condições de teste; em contraste, atividade mediofrontal em pacientes com TB foi descrita como inalterada em estado de repouso, ou aumentada quando os sujeitos realizavam um teste de fluência verbal. A disparidade na mudança direcional da atividade cortical parece estar ligada ao fato de que, assim como o desempenho cognitivo, a atividade metabólica pode estar relacionada mais diretamente à sintomatologia do que a uma categoria diagnóstica específica (Dye et al, 1999; Curtis et al, 2001; Frangou et al, 2006).

Alguma indicação de que os mecanismos celulares por trás da SZ e do TB podem ser diferentes pode ser obtida a partir do tratamento farmacológico dos dois transtornos. Apesar de ambos os diagnósticos serem responsivos ao

bloqueio dopaminérgico dos antipsicóticos, apenas a sintomatologia do transtorno bipolar responde a estabilizadores de humor, destacando-se em especial o lítio, que entre outras ações, parece exercer efeitos neuroprotetores através de aumento de fatores anti-apoptóticos.

Existe evidência crescente de que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na patofisiologia tanto do TB (Ozcan et al., 2004; Rajenkar et al., 2003; Kuloglu et al., 2002; Andreazza et al., 2007) quanto da SZ (Lohr et al., 1995; Mahadik et al., 1996; Reddy et al., 1996; Yao et al., 1998; Gama et al., 2006; Gama et al., 2008). No entanto, não se tem definido de que forma esse papel se diferencia nos dois transtornos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A Dicotomia Transtorno Bipolar x Esquizofrenia

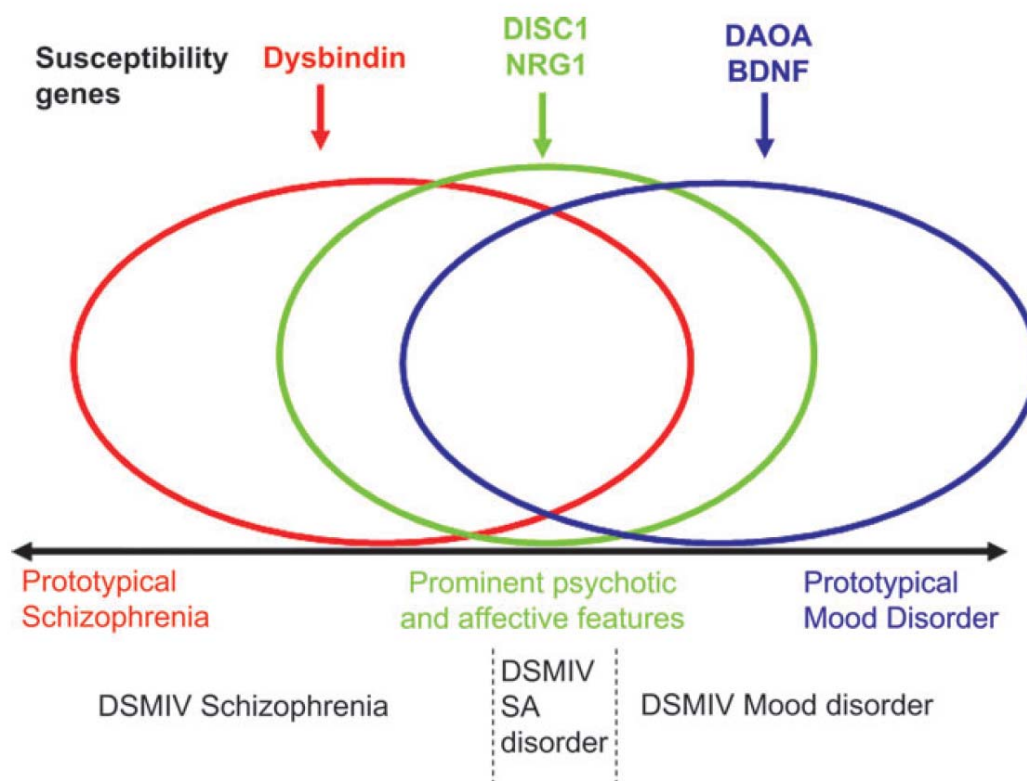
Muito do foco dado às fronteiras do TB é direcionado à depressão bipolar. Talvez devido à longa tradição da assim chamada “Dicotomia Kraepeliniana”, que dividiu as duas grandes entidades nosológicas do TB e da SZ. Apenas recentemente as confluências entre os dois transtornos voltaram a receber maior atenção (Craddock & Owen, 2005).

A observação da existência de padrões distintos, em meio a uma massa de fenômenos clínicos, levou Kraepelin a propor uma dicotomia de doenças psicóticas fundamentalmente diferentes. Na ausência de informações quanto à etiologia ou à patofisiologia, ele baseou sua distinção em história familiar, idade de início, curso e desfecho. Na sua formulação original, a demência precoce era marcada por um curso contínuo deteriorante até a demência crônica e a doença maníaco-depressiva seguia um curso episódico com períodos intermitentes de recuperação.

A contribuição original de Kraepelin foi seguida pela revisão de Bleuler, que modificou o termo “demência precoce” para “esquizofrenia”, estendendo as fronteiras do transtorno e focando em sintomas intrapsíquicos. O conceito de doença maníaco-depressiva, em contraste, foi progressivamente se estreitando, sobretudo na América do Norte, até a introdução do DSM-III, que além de contribuir para um maior equilíbrio entre os dois conceitos, estabeleceu critérios para o diagnóstico de Transtorno Esquizoafetivo.

O conceito de Transtorno Esquizoafetivo pode ser visto como uma rejeição à dicotomia Kraepeliniana (Crow 1998). No entanto, a evidência atualmente disponível não suporta a validade do Transtorno Esquizoafetivo como uma entidade única. Muitos pesquisadores defendem um modelo de continuum pelo fato de que estudos neurobiológicos não conseguem claramente diferenciar entre transtornos afetivos e esquizofrenia (Crow 1990). Contudo, duas doenças podem ser diferentes fenomenologicamente, assim como em suas etiologias, mas compartilharem diversos mecanismos patofisiológicos. No caso do cérebro, a existência de muitas “vias finais comuns” (final common pathways) é uma característica bem determinada do funcionamento cerebral.

Considerando-se os achados de estudos genéticos, se tem evidência crescente de uma sobreposição entre susceptibilidade genética através das categorias classificatórias tradicionais – incluindo achados de associação com os genes DAOA (G72), DTNBP1 (dysbindin), COMT, BDNF, DISC1 e NRG1. Essa evidência sugere a possibilidade de relações relativamente específicas entre genótipo e psicopatologia (Craddock et al., 2006).



Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. Schizophrenia Bulletin 2006

Ilustração da relação hipotética entre genes específicos conferindo susceptibilidade (acima da linha) e fenótipos clínicos (abaixo da linha) usando o modelo desenvolvido por Craddock e Owen. As elipses sobrepostas representam grupos sobrepostos de genes: em vermelho os que conferem susceptibilidade a fenótipos com características proeminentemente esquizofrenicas, azul para características de transtorno de humor e em verde aos fenótipos com uma mistura proeminente de ambos.

De qualquer forma, os achados neurobiológicos e neuropsicológicos de alguns estudos sugerem diferenças entre pacientes com SZ e transtornos afetivos (Keri et al., 2001), apesar da existência de relatos contraditórios. Atualmente, muitos pesquisadores propõem um modelo misto dimensional/categórico que acreditam que proporcione uma abordagem mais flexível ao considerar achados patofisiológicos e opções de tratamento. Nesse sentido, um constructo dimensional pode ser melhor ao se avaliar a relação entre variáveis biológicas e sintomas como psicose no TB e na SZ, enquanto um constructo categórico permite a avaliação de confiabilidade diagnóstica (Craddock and Owen, 2007).

2.2. Estresse Oxidativo

2.2.1. Radicais Livres

O termo radical livre se refere a um átomo ou molécula altamente reativos que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell and Guteridge 1990). É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Por esta característica química, reagem indiscriminadamente nos organismos com carboidratos, proteínas, lipídeos e DNA.

Nos mamíferos são produzidos radicais livres (RL) de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio, mas os que ganham mais destaque devido à 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 à formação do radical hidroxila, quando em presença de metais (Halliwell & Guteridge 2007).

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. 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 (Halliwell & Guteridge 2007).

Existem diversos mecanismos independentes que podem levar à formação de RL:

- **Toxinas exógenas:** fatores como tabagismo, hábitos nutricionais inadequados e exposição a poluentes desempenham grande papel na produção de RL.
- **Defesas antioxidantes ineficientes:** Ver item 2.2.2 (Defesas Antioxidantes).
- **Cálcio intracelular:** As alterações na fluidez de membrana pela peroxidação lipídica podem levar a alterações nos receptores de membrana, aumentando o cálcio intracelular. Este aumento perpetua o dano oxidativo.
- **Disfunção mitocondrial:** As mitocôndrias são responsáveis pelo processamento da maior parte do oxigênio intracelular, com a finalidade de prover energia aos processos metabólicos; também são locais de grande produção de RL. Aproximadamente 3% do oxigênio consumido é convertido em superóxido e posteriormente em peróxido de hidrogênio (Nicholls et al., 2000). No entanto, o sistema de defesa antioxidante, em condições fisiológicas, trata de equilibrar esta produção de RL. As membranas das mitocôndrias, de maneira similar às membranas neuronais, são vulneráveis à peroxidação lipídica (Yao et al., 2001), qualquer problema na fosforilação oxidativa pode levar a diversos problemas celulares, incluindo diminuição da neurotransmissão, diminuição do reparo no DNA e morte celular.

- **Outros fatores:** Alguns estudos (Lohr & Browning, 1995) têm apontado que o metabolismo das catecolaminas, especialmente da dopamina, está associado com a geração de radicais livres e que condições ligadas ao aumento do metabolismo das catecolaminas podem aumentar o aporte dos radicais livres (Zhang et al., 2003).

Em condições normais, os níveis de radicais livres produzidos pelas reações celulares são controlados pelas defesas enzimáticas e/ou não enzimáticas. O estresse oxidativo acontece quando existe um desequilíbrio entre os processos antioxidantes e pró-oxidantes, esse processo ocorre por consequência do aumento da formação de RL ou pela ineficiência das defesas antioxidantes ou, ainda, pela combinação de ambas. O estresse oxidativo, independente da causa, pode levar a processos patofisiológicos que resultam em toxicidade celular que pode culminar em morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O assim chamado dano oxidativo é de interesse particular, sobretudo o dano oxidativo aos lipídeos ou peroxidação lipídica, pelas alterações causadas na membrana celular. Os produtos da peroxidação lipídica ou peróxidos de lipídeos plasmáticos, como o MDA, são medidos pelo TBARS (Grignon et al., 2007).

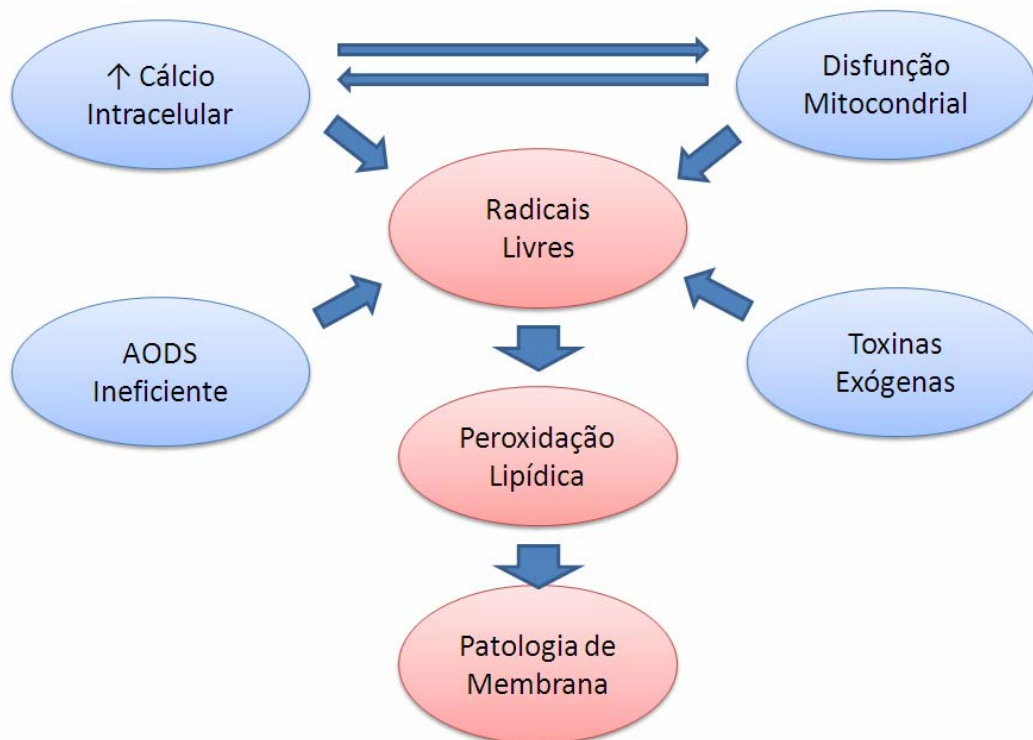


FIGURA 2.2.2 – Esquema demonstrativo de mecanismos patológicos independentes que podem levar a formação de radicais livres e a consequente patologia de membrana (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).

2.2.2. Defesas Antioxidantes

Sob condições fisiológicas o potencial dano mediado por radicais livres é mantido sob controle pelo sistema de defesas antioxidantes (AODS) que é formado por uma série de componentes enzimáticos e não-enzimáticos. 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), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathiona- S-transferase (GST) e outras que não participam diretamente do processo, mas fornecem suporte à GPx, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a glutathiona redutase (GR) (Halliwell & Gutteridge, 2007; Droge, 2002). Estas agem de maneira

cooperativa em diferentes fases do metabolismo dos radicai livres, prevenindo os potenciais danos causados por estes.

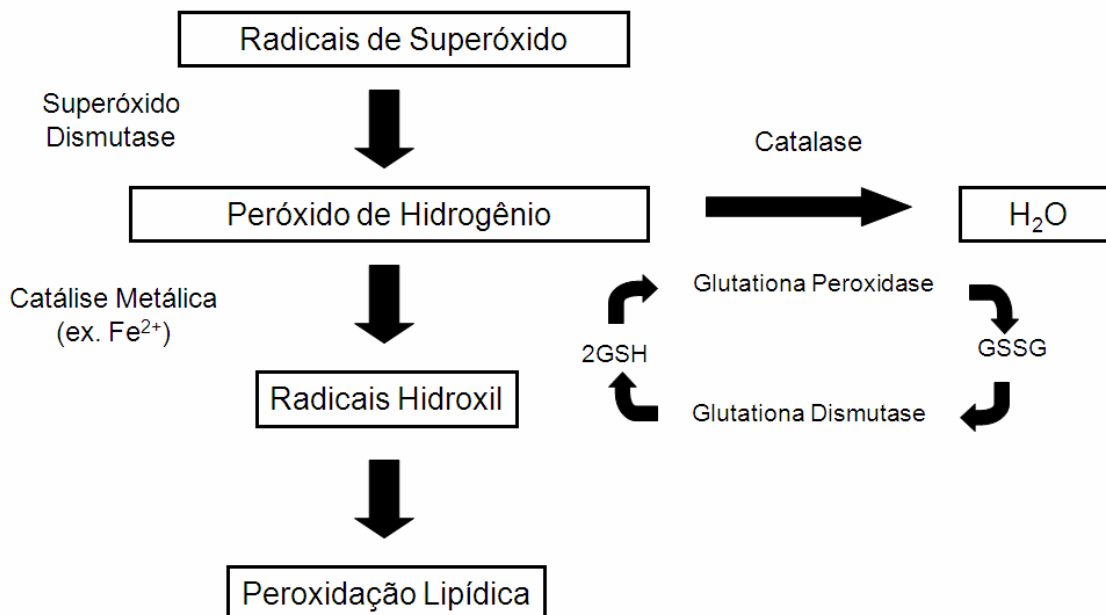


FIGURA 2.3.1 Representação esquemática das enzimas que protegem contra o processo oxidativo na via que leva os radicais de superóxido à peroxidação lipídica (adaptado de Reddy & Yao, 1999 In: Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry).

A espécie reativa do oxigênio peróxido de hidrogênio, que é produzido, entre outras fontes, pela SOD, pode ser decomposto em água e oxigênio pela CAT ou pela GPx, assim prevenindo a formação de radicais hidroxil. Uma falha dessas defesas antioxidantes pode dar início a peroxidação lipídica ou a lesão oxidativa em DNA ou proteínas. Uma vez que SOD, CAT e GPx são essenciais para diferentes estágios do metabolismo de radicais livres, alteração da atividade de uma enzima sem mudanças compensatórias nas outras deixa a membrana celular vulnerável a dano. Assim, os diferentes padrões de atividade das enzimas antioxidantes podem fornecer informações sobre os mecanismos

patogênicos envolvidos no metabolismo anormal de radicais livres (Yao et al. CNS Drugs 2001).

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).

Dentre as defesas antioxidantes primárias, a SOD tem recebido especial atenção em estudos com população de pacientes psiquiátricos (Ng et al. 2008). Foi sugerido que a atividade aumentada da SOD na ausência de um aumento da produção do radical superóxido pode diminuir as reações dependentes de radicais livres, como as que são catalisadas por oxigenases, assim resultando na produção diminuída de catecolaminas (Bartosz G. 1987).

Também se sabe que a atividade da SOD no cérebro aumenta significativamente com a idade refletindo a existência de um mecanismo auto-protetor contra um aumento da produção de radicais superóxido no cérebro. (Yao et al. CNS Drugs 2001).

2.3. Estresse Oxidativo e Neuropatologia

Todos os tecidos são vulneráveis ao EO, porém o sistema nervoso central é particularmente sensível (Mahadik et al., 2001). Esta situação pode ser desenvolvida por alguns fatores: (1) alta taxa de consumo de oxigênio; (2)

elevados níveis de lipídios poliinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica; (3) uso extensivo do glutamato como neurotransmissor - o glutamato ao se ligar no seu receptor (NMDA) libera Ca^{2+} que estimula a ativação da oxido nítrico sintase neuronal (NOSn), levando a produção de NO^- (Schulz et al 1997; Schulz et al 1996); (4) auto-oxidação de alguns neurotransmissores podem levar a formação de ERO (Obata, 2002).

Muito do foco dado à patofisiologia dos transtornos psiquiátricos é direcionado aos sistemas de neurotransmissores. Apesar do papel da dopamina (DA) na SZ manter-se preeminente, estudos recentes sugerem alterações em múltiplos neurotransmissores. O mesmo acontece com o TB. No entanto ainda não é claro se essas alterações são primárias ou secundárias a outros processos patológicos, como o estresse oxidativo. É importante reconhecer, no entanto, que alterações no metabolismo de diversos sistemas de neurotransmissores podem tanto contribuir para o estresse oxidativo quanto ser afetadas por ele (Yao et al. CNS Drugs 2001).

Já é bem estabelecido que o metabolismo da DA produz radicais livres sob condições fisiológicas normais. Diferentes rotas metabólicas da DA levam à formação de radical hidroxila. E a DA é sobretudo suscetível à auto-oxidação quando o sistema de defesa antioxidante é ineficiente (Cohen G, 1994).

2.3.1. Estresse Oxidativo e Esquizofrenia

As evidências relacionadas a mecanismos de estresse oxidativo na SZ podem ser agrupadas em três categorias: primeiro, os estudos que demonstram polimorfismos genéticos de enzimas oxidativas e quantificação de

antioxidantes, radicais livres e marcadores de dano oxidativo; segundo, aqueles que demonstram mecanismos antioxidantes das medicações antipsicóticas; terceiro, os estudos que mostram benefícios com o uso de medicações antioxidantes.

A maior parte dos dados demonstrando distúrbio oxidativo na esquizofrenia examinou medidas indiretas de estado oxidativo, como níveis periféricos e cerebrais de antioxidantes. Alguns estudos examinaram as concentrações periféricas do radical livre óxido nítrico (NO) em pacientes com esquizofrenia através da medida de seus metabólitos, mas encontraram resultados inconsistentes – enquanto alguns observaram aumento de NO no plasma (Akyol et al., 2002; Li et al., 2006; Taneli et al., 2004; Yanik et al., 2003; Zoroglu et al., 2002), outros não encontraram a mesma alteração (Srivastava et al., 2001).

Estudos envolvendo concentrações sanguíneas de antioxidantes intrínsecos demonstraram atividade antioxidante significativamente alterada. Níveis reduzidos das principais enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GSH-Px) foram encontrados em pacientes com SZ comparados com controles (Ben Othmen et al., 2007; Li et al., 2006; Ranjekar et al., 2003). Outros relataram níveis inalterados dessas três enzimas (Srivastava et al., 2001), ou alterações apenas na concentração de enzimas individuais (Abdalla et al., 1986; Akyol et al., 2002; Altuntas et al., 2000; Dietrich-Muszalska et al., 2005; Herken et al., 2001; Kuloglu et al., 2002; Zhang et al., 2006).

Uma forte correlação negativa entre nível sérico de GSH-Px e medidas de atrofia cerebral foi também relatada (Buckman et al., 1987). Além disso, alguns estudos diferenciaram alterações enzimáticas entre subtipos de esquizofrenia (Herken et al., 2001; Zhang et al., 2006), e um estudo mostrou uma correlação linear entre níveis de enzimas antioxidantes e severidade de sintomas positivos (Li et al., 2006).

Dentre as três principais enzimas antioxidantes, a SOD tem sido a mais freqüentemente estudada na SZ. Aumento da atividade da SOD em pacientes com SZ foi encontrada por diversos estudos (Michelson et al., 1977; Abdalla et al., 1986; Reddy et al., 1991; Yao et al., 1998b), porém não por todos (Sinet et al., 1983). Pacientes virgens de tratamento antipsicótico em primeiro episódio esquizofreniforme e esquizofrenia demonstram tanto níveis aumentados (Khan et al., 1997) quanto diminuídos (Mukherjee et al., 1996) de SOD. No estudo de Mukherjee et al., o tempo médio de doença foi 4,46 dias, muito menor do que em outros estudos, o que pode ser responsável pelos achados discordantes. É possível que com a progressão da doença os níveis de SOD aumentem como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo (Mukherjee et al., 1996).

Em contrapartida, foi encontrada atividade reduzida da SOD em eritrócitos de pacientes em primeiro episódio psicótico até então não tratados, que foi também associada a baixo desempenho escolar pré-mórbido (Mukherjee et al., 1994).

Um estudo *post mortem* examinou diversas áreas corticais e subcorticais de doadores com SZ e controles e encontrou níveis elevados de duas

isoenzimas de SOD no córtex frontal e substância innominata (Michel et al., 2004).

Estimativas dos níveis dos produtos de reações oxidativas são outra forma de determinar o impacto do estresse oxidativo. A maioria dos estudos têm se concentrado nos produtos da peroxidação lipídica e oxidação de DNA como marcadores de dano oxidativo. Um método largamente usado para avaliação de peroxidação lipídica é a medida de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). TBARS são substâncias de baixo peso molecular, constituídas a partir de malondialdeído (MDA), formado a partir da decomposição de produtos instáveis da peroxidação lipídica (Fukunaga et al., 1998).

Níveis elevados de TBARS foram encontrados no plasma (Akyol et al., 2002; Dietrich-Muszalska & Olas, 2007; Kuloglu et al., 2002; Mahadik et al., 1998; Ranjekar et al., 2003; Zhang et al., 2006), eritrócitos (Altuntas et al., 2000; Herken et al., 2001), e plaquetas (Dietrich-Muszalska et al., 2005) de pacientes esquizofrênicos.

Quanto a dano ao DNA, um estudo encontrou uma tendência ao aumento do dano ao DNA em pacientes com SZ comparado com controles (Young et al., 2007), porém outro estudo não demonstrou diferença significativa (Psimadas et al., 2004).

Em um estudo post-mortem avaliando córtex pré-frontal encontrou uma grande proporção de alterações de transcrição, níveis de proteínas e metabólitos que se demonstraram associados com funcionamento mitocondrial, metabolismo energético e oxidativo. Além disso, mais de 90% dos pacientes com esquizofrenia puderam ser diferenciados dos controles nesse estudo,

incluindo pacientes virgens de tratamento com neurolépticos e aqueles com menos de um ano de doença, com base em um grupo de genes que codificam complexos mitocondriais e proteínas sensíveis ao equilíbrio oxidativo (Prabakaran et al., 2004).

Existe assim evidência persuasiva de que função mitocondrial e estresse oxidativo estão intrinsecamente envolvidos na patogênese da esquizofrenia, apesar da natureza exata do seu papel em particular, se primário ou secundário, ainda não estar esclarecida.

Evidência indireta dos mecanismos patofisiológicos mediados pelo estresse oxidativo também é produzida pelos efeitos antioxidantes dos agentes antipsicóticos. Alterações dos níveis de antioxidantes e produtos de reação oxidativa são revertidos ao longo do tratamento com antipsicóticos atípicos, coincidindo com melhora sintomática (Dakhale et al., 2004; Zhang et al., 2003b). Em dois estudos, níveis de SOD, MDA e ácido ascórbico diferiram significativamente dos controles pareados por idade e gênero, considerando tabagismo, e apresentaram alterações significativas em relação à normalidade após tratamento com antipsicóticos atípicos ao longo da duração dos estudos. (Dakhale et al., 2004; Zhang et al., 2003b).

Um impacto diferente pode existir entre os antipsicóticos típicos e atípicos. Níveis mais elevados de produtos de peroxidação lipídica foram encontrados em pacientes tratados com típicos do que com antipsicóticos atípicos (Kropp et al., 2005), com a existência de estudos contraditórios (Gama et al., 2006; Zhang et al., 2006c).

2.3.2. Estresse Oxidativo no Transtorno Bipolar

Diversos estudos têm produzido evidências de alterações de estresse oxidativo no TB (Ng et al., 2008).

Estudos avaliando marcadores de estresse oxidativo em pacientes com TB, encontraram níveis aumentados de SOD em comparação com controles (Abdalla et al., 1986; Kuloglu et al., 2002), apesar de outro estudo encontrar uma tendência à redução de SOD e CAT no TB (Ranjekar et al., 2003).

Diferentes estudos replicaram o achado de níveis elevados de peroxidação lipídica em sangue periférico de pacientes bipolares (Ranjekar et al., 2003; Ozcan et al., 2004; Kuloglu et al., 2002).

Um estudo comparando pacientes em diferentes fases do TB evidenciou aumento de TBARS independente do estado de humor, enquanto níveis de GPx apresentaram-se elevados nos pacientes eutímicos, porém não nos pacientes maníacos ou deprimidos. Aumento de SOD foi associada à depressão e à mania mas não à eutímia e redução de CAT foi observada na mania e eutímia porém não na depressão (Andreazza et al., 2007).

No entanto, outro estudo demonstrou níveis reduzidos de SOD na depressão bipolar, em conjunto com níveis aumentados de NO (Selek et al., 2008). Em um estudo comparando pacientes sem uso de medicação, pacientes tratados com lítio em episódios maníacos e controles, o grupo tratado com lítio apresentou níveis mais baixos de TBARS e SOD que o grupo de pacientes não medicados (Machado-Vieira et al., 2007). Níveis elevados de NO e nitritos têm sido encontrados em pacientes com transtorno bipolar (Gergerlioglu et al., 2007; Savas et al., 2006; Yanik et al., 2004) e foram correlacionados com o

número prévio de episódios maníacos (Gergerlioglu et al., 2007; Savas et al., 2006).

Outro aspecto importante são as evidências de efeito antioxidante de agentes terapêuticos já bem estabelecidos no tratamento do TB. Diversos estudos mostraram normalização de parâmetros de estresse oxidativo ao longo do tratamento (Frey et al., 2007; Gergerlioglu et al., 2007; Ozcan et al., 2004). Isso foi ilustrado por um relato de caso de duas pacientes gêmeas, ambas em episódio maníaco, com níveis aumentados de TBARS, SOD e dano ao DNA, além da diminuição de CAT. Enquanto a paciente que foi adequadamente tratada demonstrou normalização de TBARS e SOD, a irmã que recusou o tratamento manteve os parâmetros alterados (Frey et al., 2007). Em adição, as evidências em relação às propriedades antioxidantes dos antipsicóticos, mencionadas anteriormente, também são relevantes para o TB.

Em estudos com modelos animais de mania, tanto lítio quanto valproato preveniram e reverteram a hiperatividade induzida por anfetamina em ratos, também prevenindo peroxidação lipídica no hipocampo e revertendo peroxidação lipídica no córtex pré-frontal (Frey et al., 2006).

Um estudo recente sugeriu uma desregulação inata de processos apoptóticos e oxidativos, através da avaliação do hipocampo de pacientes bipolares, encontrando uma diminuição da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e genes anti-apoptóticos, ao mesmo tempo em que a regulação de genes pró-apoptóticos encontrava-se aumentada (Benes et al., 2006).

Recentemente, as idéias sobre a patofisiologia do TB têm se focado na hipótese de alteração do metabolismo mitocondrial (Kato, 2006). Em condições

fisiológicas, as mitocôndrias são a principal fonte de ERO. Em situações de estresse oxidativo, a formação excessiva de ERO pode prejudicar a mitocôndria, e em compensação, a disfunção mitocondrial pode aumentar ainda mais a produção de ERO (Serrano & Klann, 2004). Diferentes estudos postmortem demonstraram que a expressão dos genes que regulam a função mitocondrial está diminuída no hipocampo e córtex préfrontal de indivíduos com TB (Iwamoto et al., 2005; MacDonald et al., 2006; Sun et al., 2006).

Outra fonte responsável pelo aumento de estresse oxidativo no TB pode ser a hiperativação do sistema dopaminérgico durante os episódios (Berk et al., 2007). A dopamina (DA) é metabolizada via monoamina oxidase (MAO), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido dihidroxifenilacético (Maker et al. 1981; Berman & Hastings, 1999). Se não reduzido por mecanismos antioxidantes como a GSH e GSH peroxidase, o H_2O_2 pode reagir com metais de transição como o ferro e formar radicais hidroxilas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Essas moléculas podem imediatamente reagir com lipídios, DNA e aminoácidos suscetíveis, assim causando dano celular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo está associado com dano a DNA, disfunção endotelial e encurtamento de telômeros. Recentemente foi demonstrado que pacientes com TB apresentam aumento de dano ao DNA em glóbulos brancos, e o aumento foi correlacionado à severidade dos sintomas (Andreazza et al., 2007b).

Também foi demonstrado que indivíduos com TB e depressão unipolar apresentam maior encurtamento de telômeros, uma medida de envelhecimento, em comparação com controles sem transtorno de humor

(Simon et al., 2006). O encurtamento de telômeros, cujo principal fator causador estudado é o dano oxidativo (Saretzki & Von Zglinicki, 2002), é um marcador de senescência também observado em diferentes condições clínicas como em doenças cardiovasculares (Brouillette et al., 2003).

Por fim, recente evidência do papel do estresse oxidativo na fisiopatologia do TB provém de um estudo, controlado por placebo, de N-Acetilcisteína como adjuvante ao tratamento do TB que demonstrou desfechos favoráveis (Berk, 2007).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, Cunha AB, Cereser KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Goncalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007 Sep;41(6):523-9.

Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, Gonçalves CA, Kapczinski F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2007 Sep 30;153(1):27-32.

Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioğlu E, Unal S, Söğüt S, Ozyurt H, Savaş HA. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002 Jun;26(5):995-1005.

Abdalla DS, Monteiro HP, Oliveira JA, Bechara EJ. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clin Chem.* 1986 May;32(5):805-7.

Altuntas I, Aksoy H, Coskun I, Cayköylü A, Akçay F. Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2000 Dec;38(12):1277-81.

Bartosz G. Free radicals and the developmental pathology of schizophrenic burnout [commentary]. *Integr Psychiatry* 1987 5:43-4

Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, Kerkeni A.

- Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Jan 1;32(1):155-9.
- Benes FM, Matzilevich D, Burke RE, Walsh J. The expression of proapoptosis genes is increased in bipolar disorder, but not in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006 Mar;11(3):241-51.
- Berk M, Dodd S, Kauer-Sant'anna M, Malhi GS, Bourin M, Kapczinski F, Norman T. Dopamine dysregulation syndrome: implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 2007;(434):41-9.
- Berk M. The glutathione precursor N-acetyl cysteine as a treatment for oxidative stress in bipolar disorder : a double-blind randomised placebo controlled trial. *Bipolar Disorders* 2007; 9 (Suppl. 2), 3.
- Berman SB, Hastings TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1999 Sep;73(3):1127-37.
- Berrettini W. Bipolar disorder and schizophrenia: not so distant relatives? *World Psychiatry*. 2003 Jun;2(2):68-72.
- Bonnefoy M, Drai J, Kostka T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med* 2002; 31(25):1174-84.
- Borela L & Varela Q. Antioxidantes enzimáticos. In: Salvador M & Henriques JAP (2004): *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Ed. Ulbra, 1° ed., Porto Alegre.

- Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 May 1;23(5):842-6.
- Buckman TD, Kling AS, Eiduson S, Sutphin MS, Steinberg A. Glutathione peroxidase and CT scan abnormalities in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1987 Nov;22(11):1349-56.
- Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defences. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 8-14
- Craddock N et al. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *J Med Genet* 2005; 42:193–204.
- Craddock N, Owen MJ. The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy. *Br J Psychiatry.* 2005 May;186:364-6.
- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. Genes for schizophrenia and bipolar disorder? Implications for psychiatric nosology. *Schizophr Bull.* 2006 Jan;32(1):9-16. Epub 2005 Nov 30.
- Craddock N, Owen MJ. Rethinking psychosis: the disadvantages of a dichotomous classification now outweigh the advantages. *World Psychiatry.* 2007 Jun;6(2):84-91.
- Crow TJ. From Kraepelin to Kretschmer leavened by Schneider: the transition from categories of psychosis to dimensions of variation intrinsic to homo sapiens. *Arch Gen Psychiatry.* 1998 Jun;55(6):502-4.
- Crow TJ. The continuum of psychosis and its genetic origins. The sixty-fifth Maudsley lecture. *Br J Psychiatry.* 1990 Jun;156:788-97.
- Curtis VA, Dixon TA, Morris RG, Bullmore ET, Brammer MJ, Williams SC, Sharma T, Murray RM, McGuire PK. Differential frontal activation in

schizophrenia and bipolar illness during verbal fluency. *J Affect Disord.* 2001 Oct;66(2-3):111-21.

Dakhale G, Khanzode S, Khanzode S, Saoji A, Khobragade L, Turankar A. Oxidative damage and schizophrenia: the potential benefit by atypical antipsychotics. *Neuropsychobiology.* 2004;49(4):205-9.

Dietrich-Muszalska A, Olas B, Rabe-Jablonska J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets.* 2005 Nov;16(7):386-91.

Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2007 May 11;:1-7

Dye SM, Spence SA, Bench CJ, Hirsch SR, Stefan MD, Sharma T, Grasby PM. No evidence for left superior temporal dysfunction in asymptomatic schizophrenia and bipolar disorder. PET study of verbal fluency. *Br J Psychiatry.* 1999 Oct;175:367-74.

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

Frangou S, Dakhil N, Landau S, Kumari V. Fronto-temporal function may distinguish bipolar disorder from schizophrenia. *Bipolar Disord.* 2006 Feb;8(1):47-55.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci.* 2006 Sep;31(5):326-32.

- Frey BN, Andreazza AC, Kunz M, Gomes FA, Quevedo J, Salvador M, Gonçalves CA, Kapczinski F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Jan 30;31(1):283-5. Epub 2006 Jul 20.
- Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N. A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 1998 Sep-Oct;12(5):300-3.
- Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: a study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006 May;30(3):512-5.
- Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu PS. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett*. 2008; 433:270-273.
- Gergerlioglu HS, Savas HA, Bulbul F, Selek S, Uz E, Yumru M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Apr 13;31(3):697-702.
- Grignon S, Chianetta JM. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: a meta-analysis and some methodological

considerations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007 Mar 30;31(2):365-9.

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

Halliwell B. & Guteridge. *Free radicals in biology and medicine*, 4ed. Oxford University Press 2007.

Herken H, Uz E, Ozyurt H, Söğüt S, Virit O, Akyol O. Evidence that the activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes and the products of lipid peroxidation are increased in different forms of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001 Jan;6(1):66-73.

Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan 15;14(2):241-53. Epub 2004 Nov 24.

Kato T. The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Drug News Perspect*. 2006 Dec;19(10):597-602.

Kéri S, Kelemen O, Benedek G, Janka Z. Different trait markers for schizophrenia and bipolar disorder: a neurocognitive approach. *Psychol Med*. 2001 Jul;31(5):915-22.

Khan NS, Das I. Oxidative stress and superoxide dismutase in schizophrenia. *Biochem Soc Trans* 1997; 25 (3): 418S

Kinney DK, Yurgelun-Todd DA, Tohen M, Tramer S. Pre- and perinatal complications and risk for bipolar disorder: a retrospective study. *J Affect Disord*. 1998 Sep;50(2-3):117-24.

- Kropp S, Kern V, Lange K, Degner D, Hajak G, Kornhuber J, R  ther E, Emrich HM, Schneider U, Bleich S. Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005 Spring;17(2):227-31.
- 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.
- Li HC, Chen QZ, Ma Y, Zhou JF. Imbalanced free radicals and antioxidant defense systems in schizophrenia: a comparative study. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Dec;7(12):981-6.
- Lohr JB, Browning JA. Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacol Bull* 1995; 31 (1): 159-65.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V Jr, da Silva Vargas R, Kapczinski F, Portela LV, Souza DO, Salvador M, Gentil V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett*. 2007 Jun 21;421(1):33-6. Epub 2007 May 22.
- Machon RA, Mednick SA, Huttunen MO. Adult major affective disorder after prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Apr;54(4):322-8.
- Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophrenia Research* 1996; 19(1): 1-17.

- Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry*. 1998 May 1;43(9):674-9.
- Mahadik 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.
- Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem*. 1981 Feb;36(2):589-93.
- McDonald C, Marshall N, Sham PC, Bullmore ET, Schulze K, Chapple B, Bramon E, Filbey F, Quraishi S, Walshe M, Murray RM. Regional brain morphometry in patients with schizophrenia or bipolar disorder and their unaffected relatives. *Am J Psychiatry*. 2006 Mar;163(3):478-87.
- Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D. Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch Gen Psychiatry*. 1988 Feb;45(2):189-92.
- Michel TM, Thome J, Martin D, Nara K, Zwerina S, Tatschner T, Weijers HG, Koutsilieri E. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis. *J Neural Transm*. 2004 Sep;111(9):1191-201.
- Michelson AM, Puget K, Durosay P, et al. Clinical aspects of the dosage of erythrocyte. In: Michelson AM, McCord JM, Fridovich I, editors.

Superoxide and superoxide dismutase. London: Academic Press, 1977; 467-99.

Mojtabai R, Bromet EJ, Harvey PD, Carlson GA, Craig TJ, Fennig S. Neuropsychological differences between first-admission schizophrenia and psychotic affective disorders. *Am J Psychiatry*. 2000 Sep;157(9):1453-60.

Mukherjee S, Mahadik SP, Correnti EE. The antioxidant defense system at the onset of psychosis. *Biol Psychiatry* 1994; 35: 701.

Mukherjee S, Mahadik SP, Scheffer R, et al. Impaired antioxidant defense at the onset of psychosis. *Schizophr Res* 1996; 19: 19-26.

Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008 Jan 21; 1-26

Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 2000 Jan;80(1):315-60.

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

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

Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, Wayland M, Freeman T, Dudbridge F, Lilley KS, Karp NA, Hester S, Tkachev D, Mimmack ML, Yolken RH, Webster MJ, Torrey EF, Bahn S. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for

compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry*. 2004 Jul;9(7):684-97, 643.

Psimadas D, Messini-Nikolaki N, Zafiropoulou M, Fortos A, Tsilimigaki S, Piperakis SM. DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Lett*. 2004 Feb 10;204(1):33-40.

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

Reddy R, Yao JK. Membrane-protective strategies in schizophrenia: Conceptual and treatment issues. In: *Phospholipid Spectrum Disorder in Psychiatry*, Peet M, Glen I, Horrobin DF, Marius press, 1999.

Reddy R, Mahadik SP, Mukherjee M, et al. Enzymes of the antioxidant system in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1991; 30: 409-12

Reddy R, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 2003; 62(3): 205-12.

Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Apr;959:24-9.

Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, Selek S, Tutkun H, Zoroglu SS, Akyol O. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry*. 2006;7(1):51-5.

- Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U, Beal MF. Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int.* 1996; 29(2):167-71.
- Schulz JB, Matthews RT, Klockgether T, Dichgans J, Beal MF. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174(1-2):193-7.
- Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord.* 2008 Apr;107(1-3):89-94. Epub 2007 Sep 14.
- Selemon LD, Rajkowska G. Cellular pathology in the dorsolateral prefrontal cortex distinguishes schizophrenia from bipolar disorder. *Curr Mol Med.* 2003 Aug;3(5):427-36.
- Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* 2004 Nov;3(4):431-43.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 15;215(2):213-9
- Simon NM, Smoller JW, McNamara KL, Maser RS, Zalta AK, Pollack MH, Nierenberg AA, Fava M, Wong KK. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol Psychiatry.* 2006 Sep 1;60(5):432-5.
- Sinet PM, Debray Q, Carmagnol F, et al. Normal erythrocyte SOD values in two human diseases: schizophrenia and cystic fibrosis. In: Greenwald RA, Cohen G, editors. *Oxy radicals and their scavenger systems. Vol. II. Cellular and medical aspects.* New York (NY): Elsevier, 1983: 302-4

- Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK, Dikshit M. Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Nov;158(2):140-5.
- Strakowski SM, DelBello MP, Zimmerman ME, Getz GE, Mills NP, Ret J, Shear P, Adler CM. Ventricular and periventricular structural volumes in first-versus multiple-episode bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159(11):1841-7.
- Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2006 May;31(3):189-96.
- Taneli F, Pirildar S, Akdeniz F, Uyanik BS, Ari Z. Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia. *Arch Med Res*. 2004 Sep-Oct;35(5):401-5.
- Velakoulis D, Wood SJ, Wong MT, McGorry PD, Yung A, Phillips L, Smith D, Brewer W, Proffitt T, Desmond P, Pantelis C. Hippocampal and amygdala volumes according to psychosis stage and diagnosis: a magnetic resonance imaging study of chronic schizophrenia, first-episode psychosis, and ultra-high-risk individuals. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63(2):139-49.
- Yanik M, Vural H, Kocyigit A, Tutkun H, Zoroglu SS, Herken H, Savaş HA, Köylü A, Akyol O. Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology*. 2003;47(2):61-5.

- Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroğlu SS, Savaş HA, Herken H, Koçyiğit A, Keleş H, Akyol O. The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2004 Feb;254(1):43-7.
- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, Van Kammen DP. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 32(1): 1-8, 1998a.
- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, et al. Effect of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1998b; 32: 385-91
- Yao JK, Reddy RD, van Kammen DP. Oxidative damage and schizophrenia: an overview of the evidence and its therapeutic implications. *CNS Drugs*. 2001;15(4):287-310.
- Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KW, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007 Feb;76(2):73-85.
- Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY. Elevated blood superoxide dismutase in neuroleptic-free schizophrenia: association with positive symptoms. *Psychiatry Research* 2003a, 117(1): 85-8.
- Zhang XY, Zhou DF, Cao LY, Zhang PY, Wu GY, Shen YC. The effect of risperidone treatment on superoxide dismutase in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 2003b Apr;23(2):128-31.
- Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, Zhou DF. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia

treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res.* 2006 Jan 31;81(2-3):291-300.

Zoroglu SS, Herken H, Yürekli M, Uz E, Tutkun H, Savaş HA, Bağcı C, Ozen ME, Cengiz B, Cakmak EA, Dogru MI, Akyol O. The possible pathophysiological role of plasma nitric oxide and adrenomedullin in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2002 Sep-Oct;36(5):309-15.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Comparar níveis séricos de Superóxido Dismutase (SOD) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) medidos em pacientes bipolares eufímicos, deprimidos e maníacos com pacientes esquizofrênicos cronicamente medicados e controles sem doença psiquiátrica.

Objetivos específicos

- comparar níveis séricos de superóxido dismutase (SOD) de pacientes bipolares eufímicos, deprimidos e maníacos com pacientes esquizofrênicos, correlacionando a variáveis clínicas (idade, sexo, tempo de diagnóstico, número de internações, medicação em uso).
- comparar níveis séricos de *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) de pacientes bipolares eufímicos, deprimidos e maníacos com pacientes esquizofrênicos, correlacionando a variáveis clínicas (idade, sexo, tempo de diagnóstico, número de internações, medicação em uso).

5. METODOLOGIA

Delineamento

Estudo transversal com amostragem por conveniência.

População

Pacientes com diagnóstico de esquizofrenia atendidos no Ambulatório de Esquizofrenia do HCPA (PRODESQ), pacientes com diagnóstico de transtorno bipolar atendidos no Ambulatório de Transtorno Bipolar do HCPA (PROTAHBI) e na Unidade de Internação Psiquiátrica do HCPA.

Como controles foram selecionados acompanhantes de pacientes em atendimento no HCPA, que aceitaram participar voluntariamente do estudo.

Critérios de Inclusão Para Pacientes:

- 1) Diagnóstico de Esquizofrenia ou Transtorno de Humor Bipolar – episódio atual maníaco, deprimido ou eufímico, de acordo com os critérios do DSM-IV.
- 2) Idade entre 18-60 anos.
- 3) Capacidade de entender e fornecer consentimento informado.

Critérios de Inclusão Para Controles:

- 1) Sem diagnóstico psiquiátrico ou história de tratamento psiquiátrico.
- 2) Sem história familiar de transtorno bipolar, esquizofrenia, depressão ou outro transtorno psicótico.
- 3) Capacidade de entender e fornecer consentimento informado.

Critérios de Exclusão:

1) Doença clínica importante (HIV, diabetes melito, hepatite, doença renal,...)

Coleta e análise do material biológico

Foram coletados cinco mililitros de sangue por punção venosa de cada sujeito, e colocado em um tubo a vácuo sem anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado a 300 x g por 5 minutos, e o soro congelado a menos 80°C até ser analisado. Níveis séricos de SOD e TBARS foram dosados utilizando-se kits comerciais, segundo instruções dos fabricantes.

6. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado previamente ao estudo. Foi assegurada a ausência de vinculação da concordância em participar do estudo com a continuidade do atendimento no programa de atendimento de transtorno de humor bipolar (PROTAHBI) ou ambulatorio de esquizofrenia (PRODESQ).

Posteriormente foram coletados dos pacientes 5mL de sangue venoso em tubos EDTA. As amostras foram armazenadas de forma a assegurar que a identificação de cada participante fosse possível apenas por um pesquisador.

Este estudo abrangeu os princípios bioéticos de autonomia, beneficência, não-maleficência, veracidade e confidencialidade, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

7. ARTIGO

Submetido a Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.

Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia.

Maurício Kunz^{1,2,3*}, Clarissa Severino Gama^{1,2,4,5}, Ana Cristina Andreazza^{1,3,6}, Mirian Salvador⁶, Keila Mendes Ceresér^{1,3}, Fabiano Alves Gomes^{1,2,3}, Paulo Silva Belmonte-de-Abreu^{1,2,5}, Michael Berk^{7,8,9}, Flavio Kapczinski^{1,2,3}

¹ Laboratório de Psiquiatria Molecular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035 003, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Bipolar Disorders Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035 003, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Department of Clinical and Biomedical Sciences, Barwon Health, University of Melbourne, Geelong, VIC, Australia.

⁵ Schizophrenia Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035 003, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getulio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, 95070-560, Brazil

⁷ Orygen Research Centre, Parkville, Australia.

⁸ Mental Health Research Institute, Parkville, Australia.

⁹ Department of Clinical and Biomedical Sciences, Barwon Health, University of Melbourne, Geelong, VIC, Australia

Abstract:

There is an increasing body of evidence suggesting that oxidative stress may play a role in the pathophysiology of both schizophrenia and bipolar disorder (BD).

Methods: We compared the antioxidant enzyme, serum superoxide dismutase (SOD) and the lipid peroxidation product, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as assessed in depressive (N=21), manic (N=32) and euthymic (N=31) bipolar patients (BD), and in chronically medicated patients with schizophrenia (SZ; N=97), all fulfilling DSM-IV diagnostic criteria, and a group of healthy controls (N=32).

Results: Serum SOD (U/mg protein) levels were significantly increased ($p < 0.001$) in manic (7.44 ± 3.88) and depressed (6.12 ± 4.64) BD patients and SZ (9.48 ± 4.51) when compared to either controls (1.81 ± 0.63) or euthymic (2.75 ± 1.09) BD patients. TBARS (mol/L) levels were significantly higher in the SZ group (4.95 ± 1.56 , $p = 0.016$), bipolar euthymic (6.36 ± 1.46 , $p < 0.001$), bipolar manic (7.54 ± 1.74 , $p < 0.001$), and bipolar depressed patients (5.28 ± 1.54 , $p = 0.028$) compared to controls (3.96 ± 1.51).

Discussion: Our findings show increased SOD levels in SZ, as well as in depressed and manic bipolar patients, but not in euthymic BP subjects. This suggests a dysregulation in oxidative defences in both disorders. It is likely that such changes reflect state changes in bipolar disorder. It is possible that this is a compensatory response to the oxidative stress that occurs in the acute phase of bipolar episodes. TBARS results show increases in lipid peroxidation in mania, which was differentiated from all other groups. TBARS levels in SZ and in euthymic as well as depressed individuals with BP were higher than in

controls. This suggests persistent increases in SZ, which may reflect ongoing symptomatology or treatment, and a state dependant gradient in BP, with greatest oxidative stress in mania.

These data support oxidative biology as both a key component of the pathophysiology of both BP and SZ, and the use of agents that modulate oxidative biology as a promising avenue for intervention in both disorders.

Keywords: Bipolar Disorder; Lipid peroxidation; Oxidative stress; Schizophrenia; Superoxide Dismutase

Abbreviations: ATP, Adenosine 5'-triphosphate; BD, Bipolar Disorder; CAT, Catalase; CGI, Clinical Global Impression; DMS-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition; ETC, Electron Transport Chain; GSH-Px, Glutathione Peroxidase; HDRS, Hamilton Depression Rating Scale; MDA, Malondialdehyde; ROS, Reactive Oxygen Species; SCID-I, Structured Clinical Interview for DMS-IV – Axis I; SOD, Superoxide Dismutase; SZ, Schizophrenia; TBARS, Thiobarbituric Acid-Reactive Substances; YMRS, Young Mania Rating Scale.

Introduction

Bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SZ) are illnesses that share many epidemiologic and clinical features (Berrettini WH, 2000). There is also increasing data suggesting an overlap in genetic susceptibility across the two traditional classification categories (Craddock et al., 2006). Although the pathophysiological mechanisms underlying these disorders remain unclear, many studies point towards an involvement of oxidative stress in both BD (Andreazza et al, 2007a; Kuloglu et al, 2002; Ranjekar et al., 2003) and SZ (Akyol et al, 2002; Gama et al., 2006, 2008; Grignon and Chianetta, 2007; Lohr and Browning, 1995; Mahadik and Murkherjee, 1996; Yao et al., 1998; Ng et al., 2008).

Zeviani and Di Donato (Zeviani and Di Donato, 2004) have described that neurological syndromes are the most frequent presentations of mitochondrial disorders. This is concordant with the brain being the body's most metabolically active organ. Several postmortem studies have recently demonstrated the involvement of mitochondrial dysfunction in the brains of both BD and SZ patients (Iwamoto et al., 2005; Karry et al., 2004; Konradi et al., 2004; MacDonald et al., 2006; Sun et al., 2006), suggesting that mitochondrial dysfunction may be a pathophysiological mechanism in these disorders.

Mitochondria are the major sources of reactive oxygen species (ROS), which are quenched by the antioxidant defense system, most notably, the enzymes: superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Of these, SOD activity has been the most frequently examined. However, in situations of imbalance between ROS production and antioxidant activity, oxidative damage occurs, generating deleterious effects on

signal transduction, structural plasticity and cellular resilience, mostly by inducing lipid peroxidation in membranes, and oxidation of proteins and genes (Takuma et al., 2004). Excessive formation of ROS can damage mitochondria, and at the same time, mitochondrial dysfunction increases the production of ROS (Serrano and Klann, 2004).

The end products of lipid peroxidation, especially malondialdehyde (MDA) assessment through thiobarbituric reactive substances levels (TBARS), have been by far the most widely used indices of oxidative stress in clinical studies (Grignon and Chianetta, 2007; Andreazza et al., 2008 [in press]). Oxidative stress is associated with secondary DNA damage, and notably, it has been demonstrated that BD patients have a marked increase in DNA damage in white blood cells, the extent of which was positively correlated with the severity of symptoms (Andreazza et al., 2007b).

Despite the proliferation of information on oxidative stress mechanisms in the psychiatric literature on the last decade (Ng et al., 2008), the different biochemical pathways that might mediate oxidative stress in different psychiatric disorders are not yet fully explained.

Thus, in attempt to clarify different ways in which oxidative stress is involved in BD and SZ, we compared serum SOD and TBARS measured in depressive, manic and euthymic bipolar patients, in chronically medicated schizophrenic patients and in a group of healthy controls.

Methods

This study protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil (HCPA). In accordance with

the Declaration of Helsinki, all subjects were advised about the procedure and signed the informed consent prior to participation in the study. Ninety-seven SZ outpatients from the HCPA Schizophrenia Program and 83 BD patients from the HCPA Bipolar Disorder Program were enrolled in this study protocol. The diagnosis of BD was carried out using the Structured Clinical Interview for DMS-IV – Axis I (SCID-I) (First et al., 1998). SZ patients were all on chronic pharmacotherapy, and had a Clinical Global Impression (CGI) (Guy, 1976) score ≤ 3 assessed by a trained psychiatrist. None of them had a psychiatric hospitalization for the last five years. Forty-four were taking clozapine, 23 were taking typical antipsychotics and 30 other atypical antipsychotics. This group of patients had to fulfill criteria for schizophrenia according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth Edition (DSM-IV) (Azevedo, 1999).

In BD patients, 32 were manic, 19 depressive and 32 euthymic. Symptoms were assessed using the Young Mania Rating Scale (YMRS) (Young, 1978) and the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) (Hamilton, 1960). Patients were considered euthymic if they scored <7 on both YMRS and HDRS scales. Only patients that met DSM-IV mood episode criteria were included in the depressed and manic groups. All patients were in regular use of medication.

The control group was consisted of 32 medication free healthy volunteers who had no current, past history or first-degree family history of a major psychiatric disorder, dementia or mental retardation. Subjects were matched for age, but not for gender.

Each subject had 5 ml blood samples without anticoagulants collected by venipuncture, and serum was obtained by centrifugation at 3,000xg for 5 minutes and kept frozen at -70°C for up to 6 months, until the 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 1mM adrenaline and 50mM glycine (pH 10.2). This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C for 3 min. Enzyme activity is expressed as superoxide dismutase units per gram of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the ratio of adrenochrome formation by 50% (Mirsa and Fridovich, 1972).

Serum lipid peroxidation

The levels of lipid peroxidation were measured using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method described by (Wills, 1966). In vivo, free radicals react with lipids, generating malandialdehyde (MDA). In this method, the MDA present in the sample reacts with tiobarbituric acid which forms a pink chromogen that may be detected at 530nm. Data were expressed as nmol/mL.

Statistical analysis

Statistical Product and Service Solutions, version 12.0 (SPSS) was used to perform statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test was used to compare observed cumulative distribution functions with a theoretical cumulative distribution; our sample presented a normal distribution. Groups were compared using ANOVA and the Tukey post test.

Results

The subjects' characteristics are summarized in table 1. A greater prevalence of male over female patients was found in both manic and schizophrenic groups, when compared to any of the other groups. There was no significant difference on the mean age of the different groups, except for the comparison between depressed and schizophrenic patients ($p < 0.02$).

Serum SOD (U/mg protein) activity was significantly increased ($p < 0.001$) in manic (7.44 ± 3.88) and depressed (6.12 ± 4.64) BD patients and individuals with SZ (9.48 ± 4.51) when compared to either healthy controls (1.81 ± 0.63) or euthymic (2.75 ± 1.09) BD patients. Euthymic BD individuals and controls showed no significant difference ($p = 0.848$). Comparing SOD levels between BD depressed, manic and SZ, there was statistical difference only among BD depressed and SZ patients ($p = 0.003$). SOD activity for BD manic and SZ were not statistically different; neither was there difference between manic and depressed BD.

TBARS (mol/L) levels were significantly higher in the SZ group (4.95 ± 1.56 , $p = 0.016$), BD euthymic (6.36 ± 1.46 , $p < 0.001$), BD manic (7.54 ± 1.74 , $p < 0.001$), and BD depressed patients (5.28 ± 1.54 , $p = 0.028$) compared to controls (3.96 ± 1.51). The depressed BD group was not statistically different from euthymic BD or SZ groups, while the manic BD group had higher levels of TBARS when compared to any of the other groups ($p < 0.01$, figure 2).

Discussion

The present findings provide additional evidence of increased oxidative stress in SZ and BD. There is increasing evidence that mitochondrial dysfunction is important in the pathophysiology of BD (Kato, 2007) and SZ (Karry et al., 2004). During periods of high neuronal activity, a significant volume of oxygen is used to maintain neuronal membrane potentials, which subsequently may produce excessive ROS (Chance et al., 1979; Coyle and Puttfarcken, 1993). Mitochondrial dysregulation associated with decreased oxidative phosphorylation shifts metabolism toward anaerobic energy production via glycolysis, increasing lactate levels and pH and leading to ROS, glutamate excitotoxicity, and apoptosis (Nicholls et al., 2000). The major component of mitochondria is the electron transport chain (ETC), consisting of a series of multimeric protein complexes. Mitochondrial ETC creates a proton gradient for generating energy in the form of adenosine 5'-triphosphate (ATP) through the process of oxidative phosphorylation, and its normal functioning is essential to providing the energy for brain functioning. A dysfunctional mitochondrial ETC will generate excessive ROS that subsequently cause oxidative damage, if not adequately scavenged by endogenous antioxidants (Wang, 2008). A major endogenous antioxidant system involves SOD, which catalyzes superoxide anion into hydrogen peroxide. Increased antioxidant activity may reflect a preceding cellular oxidative stress or serve as a compensatory mechanism (Zoroglu et al., 2004).

The body of evidence of the involvement of oxidative stress, DNA damage and mitochondria dysfunction in the pathophysiology of BD and SZ has been increasing in the last few years. Several studies reported that patients with

BD have significant alterations in antioxidant enzymes (Abdalla et al., 1986; Andrezza et al., 2007; Gergerlioglu et al., 2007; Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Savas et al., 2006; Selek et al., 2007), increased lipid peroxidation (Andrezza et al., 2007a; Gergerlioglu et al., 2007; Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003) and increased nitric oxide levels (Gergerlioglu et al., 2007; Savas et al., 2006; Selek et al., 2008) as well as the expression of major antioxidant enzymes, SOD and catalase, and that apoptotic genes are upregulated in hippocampi of individuals with BD (Benes et al., 2006). Alterations in TBARS, SOD and NO have also been well established in SZ (Akyol et al., 2002; Gama et al., 2006, 2008; Grignon and Chianetta, 2007; Mahadik and Murkherjee, 1996; Yao et al., 1998).

Previous studies considering BD and SZ did no comparison between the two disorders and did not consider bipolar disorder's different mood states in their analysis (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003). We found increased levels of TBARS in all phases of BD, including euthymic patients, and in SZ. In manic patients it was significantly higher than any other group. SOD activity was increased only in acute phases of BD with no significant difference between euthymic BD and controls. Interestingly the level of SOD in SZ was higher than any other group, including manic patients. Continued exposure to therapy such as antipsychotics, avoidance of stressors, or the course of illness by itself could decrease the allostatic load (Kapczinski et al., 2008) and oxidative stress during psychotic symptomatic remission (Gama et al., 2008) and activate additional mechanisms of neuronal plasticity (Gama et al., 2007), such as the anti-oxidative repair systems like SOD (Gama et al., 2006). These findings suggest

different patterns of oxidative stress in each disorder, which had been previously evidenced only by post-mortem studies (Benes et al., 2006).

As all subjects were treated, we could not analyze the effects of medication on the different groups. Previous studies considering medications' action on oxidative stress have shown a decrease on oxidative stress parameters associated with both antimanic treatment in BD (Gergerlioglu et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007) and chronic antipsychotic treatment in SZ (Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002). The small numbers of people on individual agents did not allow reliable assessment of the effect of those treatments on markers in this study. Although there are studies that did not find an effect on oxidative stress with antipsychotics (Parikh et al., 2003; Tarazi et al., 2002), studies have clearly demonstrated that lithium and valproate exert antioxidant effects (Frey et al., 2006, 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Shao et al., 2005).

The main limitation of our analysis is the lack of control for potential confounders. Factors such as diet, sedentariness, and smoking can contribute substantially to oxidative stress. Both BD and SZ present high prevalence of metabolic abnormalities which are known to contribute to increased lipid peroxidation (Block et al., 2002). Schizophrenic patients also tend to resist the trend in smoking reduction and their nicotine intake can reach quite high levels even after controlling for the daily number of cigarettes (Williams et al., 2005). This renders their correct matching with controls highly problematic with respect to these potential confounders (Grignon and Chianetta, 2007). Also, although cigarette smoking is a well-known environmental oxidant, the literature relating it to markers of lipid peroxidation in the general population has provided

conflicting results, with the majority of studies finding no association (Trevisan et al. 2001). There is, however, a strong negative correlation between smoking and SOD activity (Reddy Thavanati et al., 2008), which perhaps would increase the SOD results in our SZ sample, if adequately considered in our analysis. Regarding aging and oxidative stress, different studies suggest that while oxidative damage to DNA may accumulate with age, oxidative damage to lipids is related not to age but to behavioral and physiologic conditions concurrent with aging – such as increasing levels of body fat and cholesterol, and inflammation (Block et al. 2002). Previous studies in BD and SZ found no association with duration of illness or number of previous episodes with TBARS and SOD activity (Akyol et al., 2002; Arvindakshan et al., 2003; Gama et al., 2006; Savas et al., 2006).

In BD, the greater levels of TBARS in mania than in euthymia, depression or in controls, suggests that mania is the state with the greatest oxidative stress. There is evidence that increased dopamine levels are associated with the symptoms of mania and that a reduction in dopamine transmission through reduction in dopamine synthesis or blockade of dopamine D2 receptors may be associated with antimanic effects (Yatham et al., 2005). Interestingly, increased dopamine levels are an important source of oxidative stress in the brain, due to oxidative metabolism of dopamine (Chen et al., 2008). Dopamine may be metabolized via monoamine oxidase with production of H₂O₂ and dihydroxyphenylacetic acid (Berman and Hastings, 1999) or can go through nonenzymatic hydroxylation in the presence of Fe²⁺ and H₂O₂ leading to the formation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Hastings et al., 1996; Obata, 2002). 6-OHDA is toxic to the nervous systems, and the mechanisms involved

in this toxicity include: endoplasmic reticulum stress, activation of GSK-3-beta by phosphorylation at tyrosine 216, and inhibition of protein kinase AKT by phosphorylation at Ser473 (Obata, 2002). A clinical implication of this finding is that mania is more toxic than depression, and that clinical attempts at neuroprotection may need mania as a principal target. In SZ, difficulties in defining remission in a chronically ill and stable population, do not allow clear differentiation of state and trait effects with respect to TBARS, but support a chronically increased, although not static, oxidative load, since lipid peroxidation seems to be directly related to acute symptomatology (Gama et al., 2008).

With regard to SOD, its increased activity might be caused by either a compensatory response to oxidative stress or a baseline over expression. In BD, SOD may be increased in response to ROS overproduction as a compensatory mechanism in the acute phases of the disorder. The increased level of TBARS even in euthymic bipolar patients suggests that this compensatory mechanism is incompletely effective. In SZ SOD activity remains extremely elevated while TBARS levels are not extensively increased, when compared to controls, as it is in BD patients. This suggests that individuals with SZ have either a more effective antioxidant defense system or a decreased ROS production in the chronic phase of the disorder.

These results are in line with a gene expression profile study showing that several antioxidation and antiapoptotic genes are downregulated in BD but not in SZ (Benes et al., 2006; Rego et al., 2003). As recently suggested (Benes, 2007), although BD and SZ may share common clinical and even cellular phenotypes, the molecular endophenotypes involved in both disorders, particularly oxidative stress damage, seem to be different.

Remediation of oxidative stress with the glutathione precursor, N-acetyl cysteine in both SZ and BP reduces core symptoms of both disorders (Berk et al., 2008 [in press]). These data support oxidative biology as both a core component of the pathophysiology of both disorders and as a promising avenue for intervention, also warranting further investigation into the mechanisms involved in its regulation.

Acknowledgements

Clarissa Severino Gama is funded by CNPq (PDE #200310/2007-0), Brazil; and Endeavour Awards Programme (#539/2008), Australia.

References

- Abdalla DS, Monteiro HP, Oliveira JA, Bechara EJ. Activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in schizophrenic and manic-depressive patients. *Clin Chem* 1986; 32(5):805-7.
- Akyol O, Herken H, Uz E, Fadillioglu E, Unal S, Sogut S, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26(5):995-1005.
- Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, Almeida LMV, Nardin P, et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *Journal of Psychiatric Research* 2007; 41:523-529.
- Andreazza AC, Frey BN, Erdtmann B, Salvador M, Rombaldi F, Santin A, et al. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2007; 153:27-32.
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in Bipolar disorder: a meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* 2008 [in press].
- Arvindakshan M, Sitasawad S, Debsikdar V, Ghate M, Evans D, Horrobin DF, et al. Essential polyunsaturated fatty acid and lipid peroxide levels in never-medicated and medicated schizophrenia patients. *Biol Psychiatry* 2003; 53(1):56-64.
- Azevedo MH, Soares MJ, Coelho I, Dourado A, Valente J, Macedo A, et al. Using consensus OPCRIT diagnoses – an efficient procedure for best-estimate lifetime diagnoses. *Br J Psychiatry* 1999; 175:154-157.

- Benes FM, Matzilevich D, Burke RE, Walsh J. The expression of proapoptosis genes is increased in bipolar disorder, but not in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11:241-151.
- Benes FM. Searching for unique endophenotypes for schizophrenia and bipolar disorder within neural circuits and their molecular regulatory mechanisms. *Schizophr Bull* 2007; 33(4):932-6.
- Berk M. Oxidative stress in bipolar disorder: a double blind randomized placebo controlled trial of n-acetyl cysteine as glutathione precursor. *Bipolar Disorders* 2007; 9(s1): 21.
- Berman SB, Hastings TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 1999. 73(3):1127-37.
- Berrettini WH. Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies. *Biol Psychiatry* 2000; 48:531-538.
- Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, Packer L. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156(3):274-85.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3):527-605.
- Chen L, Ding Y, Cagniard B, Van Laar AD, Mortimer A, Chi W, et al. Unregulated cytosolic dopamine causes neurodegeneration associated with oxidative stress in mice. *J Neurosci* 2008; 28(2):425-33.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262(5134):689-95.

- Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. Genes for schizophrenia and bipolar disorder? Implications for psychiatric nosology. *Schizophrenia Bulletin* 2006; 32(1):9-16.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JB. Structured clinical interview for DSM-IV (SCID-I). New York: Biomedics Research Department; 1998.
- Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31:326-332.
- Frey BN, Andreazza AC, Kunz M, Gomes FA, Quevedo J, Salvador M, et al. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: A twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 283-285.
- Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Kapczinski F, Silva Belmonte-de-Abreu P. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in schizophrenia: A study of patients treated with haloperidol or clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30(3):512-5.
- Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett* 2007; 420(1):45-48.
- Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett* 2008; 433:270-273.

- Gergerlioglu HS, Savas HA, Bulbul F, Selek S, Uz E, Yumru M. Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31(3):697-702.
- Grignon S, Chianetta JM. Assessment of malondialdehyde levels in schizophrenia: A meta-analysis and some methodological considerations. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 365-369.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23:56–62.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:1956–61.
- Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet* 2005; 14:241-253.
- Kapczinski F, Vieta E, Andreazza AC, Frey BN, Gomes FA, Tramontina J, et al. Allostatic load in bipolar disorder: Implications for pathophysiology and treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32(4):675-92.
- Karry R, Klein E, Shachar DB. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: A postmortem Study. *Biol Psychiatry* 2004; 55:676-684.
- Khan MM, Evans DR, Gunna V, Scheffer RE, Parikh VV, Mahadik SP. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid

peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. *Schizophr Res* 2002; 58(1):1-10.

Konradi C, Eaton M; MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S. Molecular Evidence for Mitochondrial Dysfunction in Bipolar Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61:300-308.

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

Lohr JB, Browning JA. Free radical involvement in neuropsychiatry illnesses. *Psychopharmacol Bull* 1995; 31(1):159-65.

Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser Jr V, Vargas RS, et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: A possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 2007; 421(1):33-6.

Mahadik SP, Mukherjee S. Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr Res* 1996; 19(1):1-17.

Mahadik SP, Mukherjee S, Scheffer R, Correnti EE, Mahadik JS. Elevated plasma lipid peroxides at the onset of nonaffective psychosis. *Biol Psychiatry* 1998; 43(9):674-9.

MacDonald ML, Naydenov A, Chu M, Matzilevich D, Konradi C. Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2006; 8:255-264.

- Mirsa HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 1972; 217:3170-5.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008 Jan 21;:1-26 [Epub ahead of print]
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000; 80(1):315-60.
- Obata T. Nitric oxide and MPP⁺-induced hydroxyl radical generation: a review. *J Neural Transm* 2002; 113(9):1131-44.
- Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R, Akyol O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 2004;19(2):89-95.
- Parikh V, Khan MM, Terry A, Mahadik SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res* 2003; 37:43–51.
- Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghate M, Kale A, Sitasawad S, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Research* 2003; 121:109-122.
- Reddy Thavanati PK, Kanala KR, de Dios AE, Cantu Garza JM. Age-related correlation between antioxidant enzymes and DNA damage with smoking and body mass index. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; 63(4):360-4.

- Rego AC, Monteiro NM, Silva AP, Gil J, Malva JO, Oliveira CR. Mitochondrial apoptotic cell death and moderate superoxide generation upon selective activation of non-desensitizing AMPA receptors in hippocampal cultures. *J Neurochem* 2003; 86:792-804
- Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, et al. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry* 2006;7(1):51-5.
- Scott J, Colom F, Vieta E. A meta-analysis of relapse rates with adjunctive psychological therapies compared to usual psychiatric treatment for bipolar disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 2007;10(1):123-9.
- Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E, Yumru M. The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* 2008;107(1-3):89-94.
- Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 2004; 3:431-443.
- Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic Treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005; 58:879-884.
- Sun X, Wang JF, Tseng M, Young LT. Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci* 2006; 31:189-196.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2004; 72:111-127.

- Tarazi FI, Zhang K, Baldessarini RJ, Zhang K. Long-term effects of newer antipsychotic drugs on neuronal nitric oxide synthase in rat brain. *Nitric Oxide* 2002; 7:297–300.
- Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol* 2001; 154(4):348-56.
- Wang Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 2008; 21(2):276-81.
- Williams JM, Ziedonis DM, Abanyie F, Steinberg ML, Foulds J, Benowitz NL. Increased nicotine and cotinine levels in smokers with schizophrenia and schizoaffective disorder is not a metabolic effect. *Schizophr Res* 2005; 79(2-3):323-35.
- Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemical Journal* 1966; 99:667-76.
- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, van Kammen DP. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1998; 32(1):1-8.
- Yatham LN, Goldstein JM, Vieta E, Bowden CL, Grunze H, Post RM, et al. Atypical antipsychotics in bipolar depression: potential mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* 2005; 66(5):40-8.
- Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 1978; 133:429–435.
- Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; 127:2153-2172.
- Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O, et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical

scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 254:143–7.

Table 1

Characteristics of healthy controls, euthymic bipolar disorder (BD) patients, depressed BD patients, manic BD patients and schizophrenic (SZ) patients.

	Control group (n=32)	BD euthymic (n=32)	BD depressed (n=19)	BD manic (n=32)	SZ (n=97)
Gender (M/F)	11/21	12/20	3/16	18/14	77/20
Mean age (S.D.), years	40.69 (12.12)	40.28 (12.00)	43.43 (8.00)	40.13 (12.65)	35.13 (10.14)

Figure 1. Mean serum superoxide dismutase (SOD) activity in BD and SZ.

Depressed, manic and schizophrenic SOD values statistically different from either controls or euthymic patients ($p < 0.01$).

Euthymic BD patients and controls not significantly different ($p = 0.848$).

Schizophrenic group statistically different from manic group ($p = 0.003$).

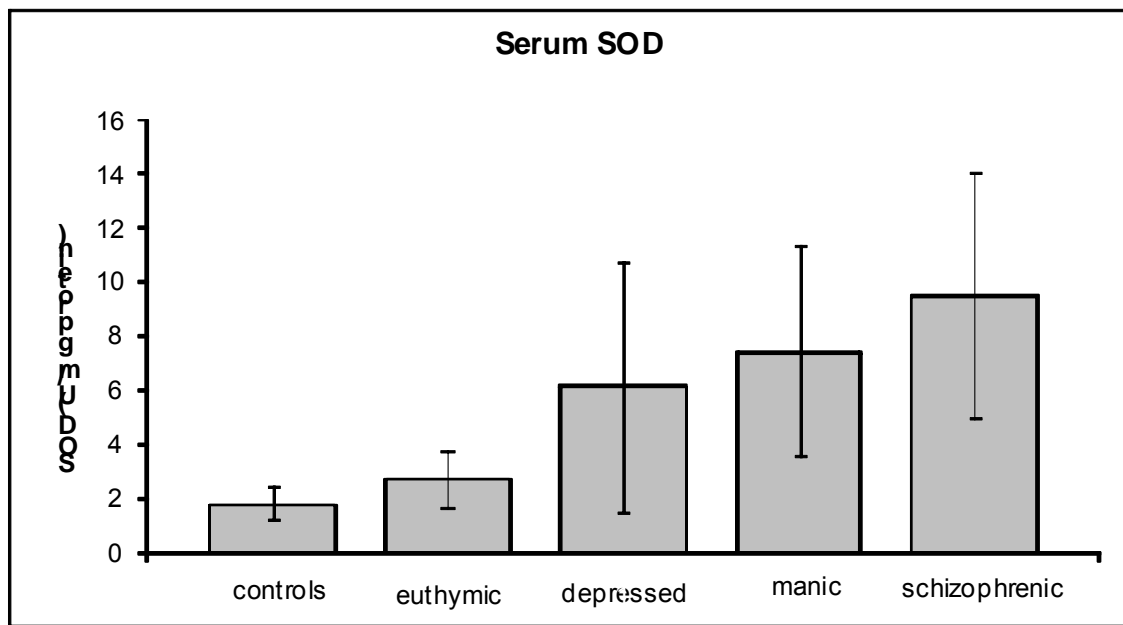
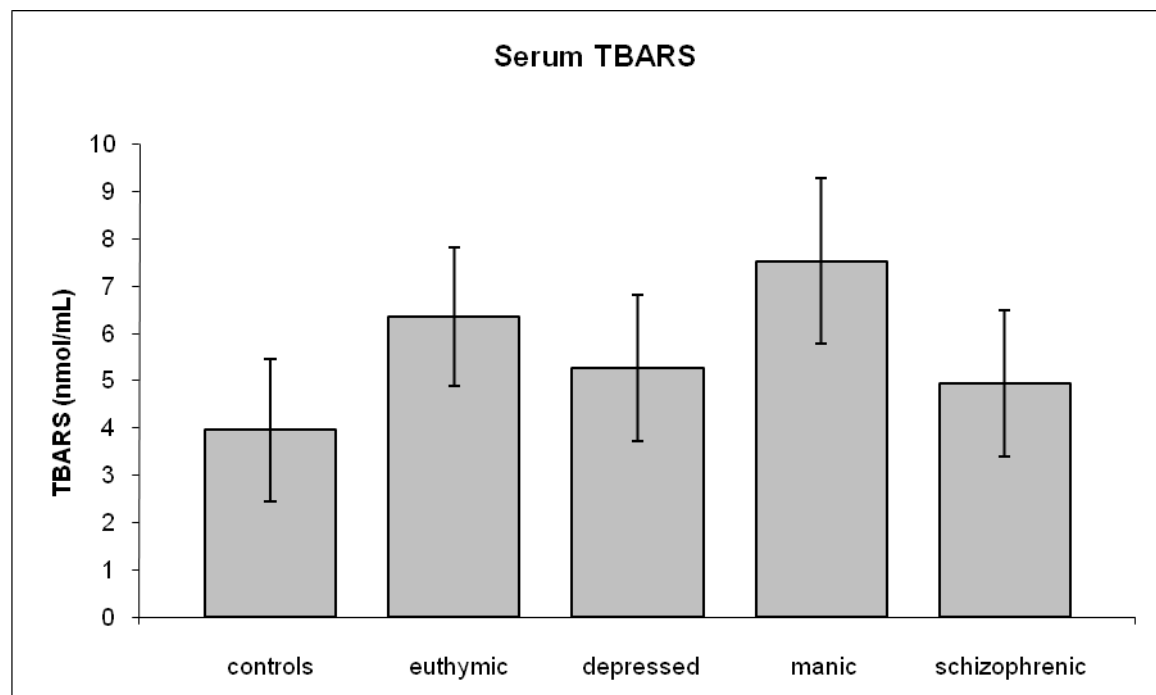


Figure 2. Mean serum TBARS in BD and SZ.

Euthymic, depressed, manic and schizophrenic TBARS values statistically different ($p < 0.01$) from controls.

Manic BD group statistically different ($p < 0.01$) from all other groups.



8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo não apenas produz evidência adicional do envolvimento do estresse oxidativo na patofisiologia do TB e da SZ como também sugere diferentes padrões de envolvimento nos dois transtornos.

Nós observamos níveis elevados de TBARS em todas as fases do TB, inclusive em pacientes eufímicos, e na SZ. Em pacientes maníacos, os níveis se encontravam mais elevados do que qualquer outro grupo, sugerindo que a mania é o estado com maior estresse oxidativo. Uma possível explicação seria a hiperatividade dopaminérgica sabidamente associada a estados maníacos. Ainda assim, é interessante a observação de que pacientes bipolares em eutímia também apresentam níveis elevados de TBARS em relação aos controles, o que sugere o envolvimento de estresse oxidativo mesmo em pacientes tidos como “assintomáticos”. Tal achado pode ser explicado pela possível existência de sintomatologia subsindrômica nessa população ou pela existência de alterações no metabolismo oxidativo de base, independentes de estado.

Níveis de SOD demonstraram-se elevados apenas nas fases agudas do TB, sem diferença significativa entre pacientes bipolares eufímicos e controles. No entanto, o nível de SOD na SZ encontrava-se significativamente mais elevado em relação a todos os outros grupos, incluindo o grupo de pacientes maníacos. Aumento da atividade de SOD pode ser explicado como um mecanismo compensatório em resposta a um aumento de estresse oxidativo ou como uma super-expressão basal da enzima antioxidante. O fato de que pacientes esquizofrênicos apresentam um aumento importante da SOD ao

mesmo tempo que em os níveis de TBARS não se encontram tão aumentados sugere a existência de um sistema de defesa antioxidante mais eficiente na SZ do que no TB ou uma diminuição da produção de ERO na fase crônica do transtorno.

Algumas limitações do estudo devem ser levadas em consideração. Neste estudo todos os pacientes estavam em tratamento medicamentoso e não foram analisadas as diferentes categorias das medicações devido à grande variabilidade de esquemas terapêuticos utilizados; sendo, na maioria das vezes, mais de uma medicação. Desta forma, não foi possível determinar o papel das medicações sobre os achados observados. No entanto, como apresentado anteriormente, a maioria das medicações utilizadas parecem exercer importante efeito antioxidante, como demonstrado por diferentes estudos que avaliaram o efeito de estabilizadores de humor, especificamente lítio e valproato (Frey et al., 2006, 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Shao et al., 2005), e de antipsicóticos (Arvindakshan et al., 2003; Khan et al., 2002).

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo a comparar diretamente medidas séricas de parâmetros oxidativos entre TB e SZ (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003). Estudos anteriores apenas compararam os dois transtornos em relação a controles. Diferentes padrões de estresse oxidativo foi previamente sugerido apenas por estudos post-mortem (Benes et al., 2006), onde foi encontrado, no TB, uma diminuição da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e genes anti-apoptóticos, além de um aumento da expressão de genes pró-apoptóticos, enquanto na SZ, observou-se apenas aumento da expressão de genes anti-apoptóticos.

ANEXO

Consentimento Informado

11.3.1 - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PACIENTES

Número do estudo:

Nome do sujeito:

Data de nascimento:

Cód. de identidade do sujeito:

Médico supervisor:

Informações sobre o estudo ao paciente

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima para quem considerar participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas.

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo, o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra Clarissa Severino Gama pelo telefone (51) 99885851.

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar se há relação entre a quantidade algumas substâncias no sangue e a esquizofrenia. Caso haja esta relação, estas substâncias poderão ser úteis para ajudar no entendimento e tratamento da doença.

Quais são os riscos em participar?

O único risco a que o paciente será submetido é o da punção venosa, que é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco. Serão retirados 5 ml de sangue, o que não compromete a saúde do paciente. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica para tal.

Itens importantes

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa aumentar o conhecimento científico sobre a esquizofrenia. Em curto e médio prazos, não haverá ganhos específicos para o paciente ao participar deste estudo.

Quais são os meus direitos?

Os pesquisadores do Serviço de Psiquiatria e os representantes da Comissão de Ética do HCPA podem necessitar examinar os seus registros a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isso não afetará o tratamento normal ao qual você tem direito.

DECLARAÇÃO:

Eu,.....declaro
que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.
3. Informei o médico sobre medicamentos que estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura.
6. Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Paciente

Ass: _____

Data:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Ass: _____

Data:

Assinatura do Familiar Responsável pelo Paciente

Ass: _____

Data:

11.3.2 - Termo de consentimento informado para voluntários saudáveis

Número do estudo:

Nome do sujeito:

Data de nascimento:

Cód. de identidade do sujeito:

Médico supervisor:

Informações sobre o estudo ao voluntário do grupo controle

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação mínima para o sujeito que considere participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas. Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar a Dra. Clarissa Severino Gama pelo telefone (51)99885851.

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar se há relação entre a quantidade algumas substâncias no sangue e a esquizofrenia. Caso haja esta relação, estas substâncias poderão ser úteis para ajudar no entendimento e tratamento da doença.

Quais são os riscos em participar?

O único risco a que o paciente será submetido é o da punção venosa, que é um procedimento corriqueiro e de baixíssimo risco. Serão retirados 5 ml de sangue, o que não compromete a saúde do voluntário. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde com competência técnica para tal. O voluntário será submetido a um questionário e uma avaliação cognitiva para verificar se em algum momento de sua vida já sofreu algum transtorno mental grave, como esquizofrenia, transtornos de humor (como depressão), demência ou dependência de substâncias psicoativas.

Itens importantes

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a

ser feito. Caso seja constatada alguma patologia na avaliação cognitivo-psiquiátrica, este resultado lhe será informado e você será encaminhado para a triagem do ambulatório de psiquiatria do HCPA.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo visa aumentar o conhecimento científico sobre a esquizofrenia. Em curto e médio prazos não haverá ganhos específicos pelo voluntário ao participar deste estudo.

Quais são os meus direitos?

Os resultados do teste cognitivo e das dosagens serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, não lhe acarretará problema algum.

DECLARAÇÃO:

Eu,declaro
que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O médico me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.
3. Informei o médico sobre todos os medicamentos que tomei nas últimas 24 horas e medicamentos que ainda estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o médico supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, acarretar qualquer tipo de problema para mim.
6. Estou ciente de que a informação colhida no questionário é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Ass: _____

Ass: _____

Data:

Data: