

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DE N-ACETILCISTEÍNA E/OU DEFEROXAMINA NO
ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERATIVIDADE INDUZIDOS POR
ANFETAMINA EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA**

VIRGINIA BARISSON MARQUES DE OLIVEIRA

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VIRGINIA BARISSON MARQUES DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE N-ACETILCISTEÍNA E/OU DEFEROXAMINA NO
ESTRESSE OXIDATIVO E HIPERATIVIDADE INDUZIDOS POR
ANFETAMINA EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientador : Prof. Dr. João Quevedo
Co-orientadora: Prof. Dra. Carina R. Boeck

CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

O48e Oliveira, Virginia Barisson Marques de.
Efeitos de n-acetilcisteína e/ou deferoxamina no estresse oxidativo e hiperatividade induzidos por anfetamina em um modelo animal de mania / Virginia Barisson Marques de Oliveira ; orientador: João Quevedo. – Criciúma: Ed. do Autor, 2007.

67f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2007.

1. Estresse oxidativo. 2. Antioxidantes. 3. Transtorno bipolar. I. Título.

CDD. 21ª ed. 615.10724

Bibliotecária: Flávia Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **VIRGÍNIA BARISSON MARQUES DE OLIVEIRA**, sob o título: “Efeitos de antioxidantes sobre o estresse oxidativo e a hiteratividade induzidos pela anfetamina em um modelo animal de mania” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Elaine Cristina Gavioli
Membro Relator

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa
Membro Externo

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Membro Interno

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Orientador

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Coordenador do PPGCS

À minha filha Carla, pelos momentos irrecuperáveis que perdemos para que eu pudesse me tornar mestre.

Aos meus pais, Ribas e Jane, e aos meus irmãos, Netto e Carolina, pelo incentivo.

Dedico

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Quevedo, por todo o apoio e confiança.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Carina R. Boeck, pela colaboração na orientação e grandes sugestões.

À Prof. Dra. Elaine Gavioli, pelos esclarecimentos.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela formação acadêmica e oportunidade.

Ao Laboratório de Neurociências, pela oportunidade e disponibilização da estrutura.

Aos colegas-mestrandos pela acolhida.

A todos os bolsistas de iniciação científica e mestrandos do Laboratório de Neurociências e do Laboratório de Fisiopatologia Experimental pela inestimável ajuda. Agradecimentos especiais a: Samira, Gislaine, Leandra, Adalberto, Josimar, Fabrícia, Clarissa, Amanda, Luciana e Ana Maria.

À Salete, que cuidou carinhosamente da minha filha para que eu pudesse me dedicar ao mestrado.

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Lista de abreviaturas.....	9
Parte I	10
1 Introdução.....	10
1.1 Transtorno Afetivo Bipolar (TAB).....	10
1.2 Modelo Animal de Mania.....	11
1.3 Estresse Oxidativo e Neurodegeneração.....	13
1.4 Estresse Oxidativo em um Modelo Animal de Mania.....	16
1.5 Antioxidantes.....	18
1.5.1 N-acetilcisteína (NAC).....	18
1.5.2 Deferoxamina (DFX).....	18
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
Parte II	23
3. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania	23
Parte III	23
4. Discussão	45
Referências	54

Resumo

Estudos têm, consistentemente, reportado a participação de radicais livres em muitos transtornos psiquiátricos, incluindo Transtorno Bipolar (TAB). Administração de d-anfetamina (d-AMPH) é um relevante modelo animal de mania. Exposição à d-AMPH aumenta o stress oxidativo em cérebro de ratos. Evidências indicam que os antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) e Deferoxamina (DFX) exercem efeitos protetores no cérebro. O presente estudo foi desenhado a fim de avaliar se o tratamento com NAC, DFX ou NAC mais DFX tem efeito na atividade locomotora em um modelo dopaminérgico de mania e nos níveis de oxidação em proteínas no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos. No primeiro modelo (tratamento de reversão), ratos machos adultos Wistar receberam d-AMPH por 14 dias, e entre o 8º e o 14º dia, eles foram tratados com, NAC, DFX, NAC mais DFX ou salina.. No segundo modelo (tratamento de prevenção), ratos foram pré-tratados com NAC, DFX, NAC mais DFX ou salina, e entre o 8º e o 14º dia receberam d-anfetamina ou salina. Foi avaliada a atividade locomotora através de campo-aberto (“open-field”) e o estresse oxidativo foi avaliado através da mensuração de carbonilação de proteínas. No tratamento de reversão, a hiperlocomção induzida por d-anfetamina não foi alterada pelos antioxidantes. O dano oxidativo não foi revertido no córtex pré-frontal pelos antioxidantes, mas foi aumentado pelo tratamento com NAC mais DFX. No hipocampo, NAC mais DFX reverteu o dano oxidativo, mas NAC sozinho aumentou este dano. No tratamento de prevenção, a hiperlocomção induzida pela d-anfetamina não foi alterada pelos antioxidantes, mas o dano oxidativo no córtex pré-frontal foi prevenido por DFX ou NAC mais DFX. No hipocampo, NAC, DFX e a associação de NAC mais DFX preveniu o dano oxidativo. Em conclusão, NAC ou DFX e a associação de NAC com DFX não modifica a hiperlocomção induzida por d-anfetamina,

mas reverte e protege contra o estresse oxidativo induzido pela d-AMPH. Entretanto este efeito é variável, dependendo da região cerebral considerada e do regime de tratamento.

Palavras-chave: modelo animal; mania; transtorno bipolar; estresse oxidativo; deferoxamina; N-acetilcisteína.

Abstract

Studies have consistently reported the participation of free radicals in multiple brain disorders including Bipolar Disorder. Administration of d-amphetamine (d-AMPH) is a relevant animal model of mania and exposure to d-AMPH increases oxidative stress in rat brain. Evidences indicate that antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and Deferoxamine (DFX) exerted protective effects in the brain. The present study was designed to evaluate the effects of NAC, DFX or NAC plus DFX on locomotor activity in a dopaminergic animal model of mania and on protein oxidation levels in prefrontal cortex and hippocampus. In the first model (reversal treatment), adult male Wistar rats received d-AMPH or saline for 14 days, and between the 8th and 14th days, they were treated with NAC, DFX, NAC plus DFX or saline. In the second model (prevention treatment), rats were pretreated with NAC, DFX, NAC plus DFX or saline, and between the 8th and 14th days, they received d-AMPH or saline. We assessed locomotor activity by the open-field task and evaluated oxidative damage in prefrontal cortex and hippocampus by protein carbonyl assay. In the reversal treatment, d-AMPH-induced hyperlocomotion was not changed by antioxidants. In the prefrontal cortex, oxidative damage was not reversed by antioxidants alone and was increased by treatment with NAC plus DFX. In the hippocampus NAC plus DFX reversed the oxidative damage, but NAC alone increased this damage. In the prevention experiment d-AMPH-induced hyperlocomotion was not changed by antioxidants, but we observed that the oxidative damage in the prefrontal cortex was prevented by DFX or NAC plus DFX. In the hippocampus NAC, DFX and NAC plus DFX prevented oxidative damage. In conclusion, NAC or DFX and the association of NAC plus DFX not modifies d-AMPH-induced hyperactivity, but reverses and protect against d-AMPH-induced oxidative stress, however this effect vary depending on the brain region and treatment regimen.

Keywords: animal model; mania; bipolar disorder, oxidative stress; deferoxamine;
N-acetylcysteine;

LISTA DE ABREVIATURAS

CLP: Ligação cecal e punção

d-AMPH: anfetamina

DFX: Deferoxamina

ECT: Cadeia Transportadora de Elétrons

GSH: Glutathiona Reduzida

MDA: malondialdeído

NAC: N-acetilcisteína

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

TAB: Transtorno Afetivo Bipolar

TBARS : Espécies Reativas ao Tiobarbitúrico

PARTE I

1 Introdução

1.1 Transtorno Afetivo Bipolar (TAB)

O Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) é um transtorno mental crônico, com altos níveis de recaída, na maioria das vezes incapacitante, pois envolve uma gama de sintomas maníacos tipicamente precedidos e intercedidos por episódios depressivos (Moreno et al., 2005). O termo Bipolar expressa dois pólos de humor ou de estados afetivos que se alternam nesse transtorno: a depressão e seu oposto, a mania ou hipomania, cujas manifestações são euforia, energia exagerada, grandiosidade, aceleração e uma sensação de prazer intenso ou um estado irritável e agressivo (Lara, 2004). Dados do Sistema Único de Saúde de São Paulo mostram que o TAB é responsável por mais de 10 mil AIHs (Autorizações de Internação Hospitalar) ao ano naquele estado (Moreno et al., 2005).

As medicações com maiores evidências de ação no tratamento da mania aguda são lítio (Li), valproato (ácido valpróico) e carbamazepina (CBZ) além dos antipsicóticos típicos como clorpromazina e haloperidol, e dos atípicos como olanzapina e risperidona. O lítio continua sendo o medicamento de primeira escolha, pois apresenta maior número de estudos controlados demonstrando sua eficácia na mania/hipomania e na prevenção de recorrências. Além disso, é o único efetivo na prevenção de suicídios em pacientes bipolares: o risco de morte por suicídio foi 2,7 maior durante o tratamento com divalproato do que com lítio (Goodwin et al., 2003).

Estudos neuropatológicos *postmortem* em pacientes com TAB têm mostrado reduções anormais no volume cortical, número de células gliais e no tamanho neuronal no córtex pré-frontal, córtex dorso-antero-lateral, amígdala e hipocampo (Cotter et al., 2001; Manji & Duman, 2001). Não se sabe exatamente se estas evidências de déficit neuronal constituem anormalidade de desenvolvimento que pode conferir vulnerabilidade a transtornos de humor, mudanças compensatórias de outros processos patogênicos ou seqüelas de recorrentes episódios de mania e depressão (Manji et al., 2003). Portanto o possível papel da morte celular no declínio progressivo encontrado em muitos pacientes permanece a ser elucidado.

Recentemente, pesquisas na fisiopatologia dos transtornos de humor têm mudado de foco, dos neurotransmissores e receptores da superfície celular para as cascatas de sinalização intracelulares (Manji et al., 2003). As vias de sinalização intracelulares interagem entre si em vários níveis formando uma rede complexa através da qual a célula recebe, processa e responde a estímulos. Portanto, evidências crescentes apontam para a associação de eventos intracelulares, envolvendo o sistema de segundos mensageiros como parte das alterações neurobiológicas do TAB (Frey, 2004).

Também há evidências crescentes que a disfunção mitocondrial possui um importante papel na patofisiologia do TAB (Kuloglu et al., 2002; Sun et al., 2006; Andreazza et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Frey et al., 2007a). A disfunção mitocondrial resulta em anormalidades no metabolismo energético celular e aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), portanto a neuroproteção contra o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos de ação dos estabilizadores de humor usados no tratamento do TAB (Machado-Vieira et al., 2007).

1.2 Modelo animal de mania

O TAB é particularmente uma doença desafiadora no sentido de desenvolver um modelo animal adequado por causa da intrigante alternância de mania, depressão e estados mistos que estes pacientes freqüentemente apresentam. Sintomas depressivos incluem anedonia, desmotivação, perda de apetite, insônia, desequilíbrio cognitivo e pensamentos suicidas. Comportamentos maníacos incluem hiperatividade motora, excessiva energia e loquacidade, grandiosidade, agressividade, perda de apetite e insônia.

Muitos modelos animais têm sido propostos para refletir comportamentos maníacos ou depressão pela reprodução de suas características principais (Machado-Vieira et al., 2004).

Modelos animais de TAB podem ser muito úteis no sentido de prover modelos adicionais para entender a patofisiologia da doença e também auxiliar no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para seu tratamento.

Estudos anteriores descrevem que, para ser válido um modelo animal em transtornos psiquiátricos, ele deve preencher três critérios principais: validade de face, validade de construção e validade de predição (Ellenbroek & Cools, 1990). O primeiro, validade de face, pode ser avaliado pela similaridade entre a evolução dos sintomas maníacos e o modelo animal proposto. Validade de construção avalia a possível correlação do modelo animal com as mudanças moleculares descritas na patofisiologia da doença. Validade de predição avalia como o modelo responde aos mesmos fármacos utilizados para tratar a doença. Modelos que apresentam validade de construção usualmente apresentam algum grau de validade de face e de predição e vice-versa (Ellenbroek and Cools, 1990).

Desde a década de 70 tem sido proposto que o neurotransmissor dopamina está envolvida na patofisiologia da mania e alterações na neurotransmissão dopaminérgica têm sido reportadas, consistentemente, como anormalidades neurobiológicas no TAB (Serra et al., 1979). As anfetaminas aumentam os níveis de dopamina na sinapse através de um incremento

na liberação dos neurotransmissores pelos terminais dos neurônios pré-sinápticos (Jones et al., 1998; Kokosha et al., 1998). As vias dopaminérgicas estão interconectadas com o sistema límbico, especialmente *nucleos accumbens* (Schultz et al., 1997). A atividade dopaminérgica no *nucleos accumbens* está associada com hedonia e motivação. Hiperatividade motora, como um sintoma maníaco, tem sido associada com a ativação do sistema mesolímbico dopaminérgico (Di Chiara, 1995; Wise & Bozarth, 1987 ; D'Aquila et al., 2000). Em ratos, injeções de anfetamina e cocaína causam um aumento na liberação de dopamina nessa região (Koob & Bloom; Kuhar et al., 1991; Di Chiara et al., 1993).

A validade de face na maioria dos modelos animais de mania tem focado na hiperatividade como sintoma (Machado- Vieira et al., 2004). A validade de predição, num modelo de TAB, deve incluir o efeito profilático de estabilizadores de humor, como Lítio e Valproato. O presente estudo utilizou AMPH em injeções repetidas como modelo de mania. Em humanos, derivados de anfetamina têm sido associados com sensação de bem-estar e euforia. Anfetamina é capaz de induzir sintomas maníacos tanto em humanos saudáveis (Strakowski and Sax, 1998) como em pacientes com TAB (Anand et al., 2000) . Estudos anteriores (Koob & Bloom, 1988; Frey et al., 2006a; Frey et al., 2006b; Frey et al., 2006c; Frey et al., 2006d) mostram que a administração de AMPH aumenta a atividade locomotora em ratos e esse aumento pode ser revertido ou prevenido através da administração de estabilizadores de humor como Lítio e Valproato (Gould et al., 2001, Frey et al., 2006b, Frey et al., 2006c).

1.3 Estresse oxidativo e neurodegeneração

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo (Dalle-Donne et al., 2006).

Todas as células aeróbicas sofrem dano oxidativo e o cérebro dos mamíferos é especialmente susceptível a esse dano (Halliwell, 2001). Uma razão é seu alto consumo de oxigênio: apesar de corresponder a uma pequena parte da massa corporal, o cérebro responde cerca de 20% do consumo basal de oxigênio. Essa susceptibilidade do cérebro ao dano oxidativo também se deve a outros fatores, por exemplo:

1) As defesas antioxidantes no cérebro são modestas. Os níveis de catalase, enzima que detoxifica peróxido de hidrogênio, são baixos na maior parte das regiões cerebrais (Halliwell, 2001).

2) Muitos neurotransmissores são auto-oxidantes: dopamina, serotonina e norepinefrina podem reagir com O_2 e gerar não somente $O_2^{\bullet -}$, mas também quinonas/semiquinonas que podem ligar-se à glutatona (anti-oxidante endógeno) e grupos SH de proteínas (Spencer et al., 1998).

3) Desequilíbrio mitocondrial pode levar a um aumento de Ca^{++} intracelular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (Halliwell, 2006).

4) As mitocôndrias neuronais geram $O_2^{\bullet -}$, principalmente no Complexo I (Kudin et al., 2005).

5) As membranas neuronais são especialmente ricas em ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell & Gutteridge, 1997) e os produtos de peroxidação lipídica podem causar dano cerebral (Ong et al., 2000).

6) O cérebro contém grandes quantidades de ferro e danos cerebrais podem liberar íons Ferro capazes de catalisar reações produzindo ROS (Halliwell, 2001).

7) Desequilíbrio energético mitocondrial pode interromper mecanismos antioxidantes uma vez que a glutathione é sintetizada no citoplasma e seu transporte para o interior mitocondrial é um mecanismo dependente de ATP (Banaclocha, 2001)

Nos últimos anos há uma emergência de trabalhos evidenciando que as disfunções mitocondriais e, conseqüentemente a geração de radicais livres, estão envolvidas em transtornos psiquiátricos como TAB (Kato & Kato, 2000; Bezchibnyk et al., 2001; Kuloglu et al., 2002; Dager et al., 2004; Sun et al., 2006; Andrezza et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007; Frey et al., 2007a).

Kato & Kato (2000) encontraram mutações em DNA mitocondrial em córtex cerebral de pacientes com TAB. Disfunções mitocondriais podem levar a um decréscimo na fosforilação oxidativa e a um aumento na produção anaeróbica de energia, elevando os níveis de lactato e a geração de ROS. Tem sido reportado que pacientes com TAB possuem aumento dos níveis de lactato na substância cinzenta (Dager et al., 2004). Coerentemente com esses achados, Sun et al. (2006) encontraram diminuição no pH em córtex cerebral *post-mortem* de indivíduos com TAB.

Kuloglu et al. (2002) avaliaram os níveis plasmáticos de TBARS (Espécies Reativas ao Tiobarbitúrico), indicadores de peroxidação lipídica, e os níveis de atividade das enzimas anti-oxidantes: superóxido-dismutase e glutathione-peroxidase em hemolisado de eritrócitos de pacientes com TAB, utilizando indivíduos saudáveis como controle. Os níveis plasmáticos de TBARS nos pacientes com TAB estavam aumentados significativamente em relação ao grupo controle. Os níveis de atividade da superóxido-dismutase estavam significativamente aumentados em relação ao grupo controle, embora não houvesse diferença significativa entre os níveis de atividade da glutathione-peroxidase entre o grupo de pacientes com TAB e o grupo controle.

Sun et al. (2006), analisando perfis de expressão gênica no córtex pré-frontal *posmortem* de pacientes com TAB, encontraram diminuição na expressão de componentes da cadeia transportadora de elétrons, especialmente do complexo I, sugerindo, portanto, uma anormalidade no metabolismo energético e aumento da produção de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio).

Andreazza et al. (2007) avaliaram os níveis plasmáticos de TBARS (Espécies Reativas ao Tiobarbitúrico) e os níveis de atividade da superóxido-dismutase, glutational- peroxidase e catalase em pacientes com TAB em diferentes fases da doença: mania, depressão e eutimia, comparando-os com indivíduos saudáveis. Os níveis de atividade da superóxido-dismutase, glutational- peroxidase e catalase estavam significativamente aumentados nos pacientes com TAB nas fases de mania ou depressão. Já os níveis de TBARS estavam aumentados de maneira significativa nos indivíduos com TAB independentemente da fase da doença.

Machado-Vieira et al. (2007) avaliaram os níveis plasmáticos de TBARS e os níveis de atividade da superóxido-dismutase e catalase em indivíduos bipolares em fase inicial de mania comparando-os com indivíduos saudáveis. Os níveis de TBARS e os níveis de atividade da superóxido-dismutase e catalase estavam aumentados significativamente nos indivíduos com TAB. Contudo após tratamento agudo com Lítio, um estabilizador do humor, houve uma diminuição significativa nos níveis de TBARS, superóxido-dismutase e catalase, mostrando efeitos antioxidantes do Lítio na mania.

Juntos, estes estudos mostram um aumento na peroxidação lipídica e alterações nas enzimas anti-oxidantes, parâmetros marcadores de estresse oxidativo, em indivíduos com TAB.

1.4 Estresse oxidativo em um modelo animal de mania

Embora os mecanismos exatos pelos quais d-AMPH causa neurotoxicidade sejam desconhecidos, há fortes evidências de que estresse oxidativo pode estar envolvido (Brown & Yamamoto, 2003). Após administração de d-AMPH, dopamina pode se acumular no compartimento intracelular e predispor à formação de complexos DA-quinonas e pode reagir com proteínas e ácidos nucleicos, levando à degradação destes (LaVoie & Hastings, 1999). Além disso, Burrows et al. (2000) demonstraram que metanfetamina pode aumentar a produção de ROS pela inibição dos complexos da cadeia transportadora de elétrons. Frey et al. (2006e) reportaram um aumento dos níveis de ânion superóxido (O_2^-) em partículas submitocondriais do córtex pré-frontal e hipocampo de ratos após exposição crônica à d-AMPH, demonstrando um aumento na produção de ROS mitocondrial.

Tem sido sugerido que a excitotoxicidade glutamatérgica pode contribuir para a neurodegeneração induzida por d-AMPH (Battaglia, 2002). A administração de metanfetamina aumenta a liberação de glutamato em estriado de ratos (Abekawa et al., 1994; Brown & Yamamoto, 2003) e antagonistas ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato protegem contra neurotoxicidade induzida por d-AMPH (Battaglia, 2002).

A formação de produtos de oxidação de lipídios e proteínas após administração de d-AMPH depende do regime de dosagem e a região cerebral considerada. Por exemplo, Frey et al. (2006a) encontraram um aumento de produtos de oxidação lipídica (TBARS) em hipocampo, estriado e córtex de ratos tratados com d-AMPH (2mg/kg e 4 mg/Kg) por 7 dias, mas esses resultados não se repetiram num regime de administração única de anfetamina. Nesse mesmo trabalho, os autores encontraram um aumento dos níveis de carbonilação de proteínas (marcadores de estresse oxidativo) em hipocampo, estriado e córtex de ratos tratados com anfetamina por 7 dias, mas num regime de dose única de anfetamina, somente no hipocampo e estriado foi encontrado aumento da carbonilação de proteínas. Ratos tratados

com uma única dose de anfetamina (7,5mg/Kg) infundida diretamente no estriado, pré-tratados com desipramina, tiveram os níveis de malondialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica, aumentados no estriado (Wan et al., 2006).

Um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante pode levar ao aumento na suscetibilidade aos radicais livres. Carvalho et al. (2001) relataram um aumento nos níveis das principais enzimas antioxidantes (glutaciona-transferase, glutaciona-peroxidase, catalase e superoxidodismutase) em diferentes áreas cerebrais de ratos tratados com d-AMPH (20 mg/kg) durante 14 dias. Frey et al. (2006d) encontraram alterações nos níveis de superóxido-dismutase e catalase em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao tratamento com d-AMPH.

Trabalhos anteriores relatam uma inibição do dano oxidativo em lipídios e proteínas em tratamentos crônicos com lítio e valproato, o que mostra um efeito neuroprotetor desses estabilizadores de humor contra excitotoxicidade (Wang et al., 2003; Shao et al., 2005; Frey et al., 2006c).

Portanto, a geração de ROS mitocondrial induzida por d-AMPH e a utilização de estratégia antioxidante podem ser um modelo útil para esclarecer o envolvimento do estresse oxidativo e do desequilíbrio energético cerebral em transtornos psiquiátricos.

1.5 Antioxidantes

1.5.1 N-acetilcisteína (NAC)

A estratégia antioxidante, através da inibição da formação ou ação de radicais livres, tem sido o foco de atenção devido ao seu alto potencial de controlar doenças neurodegenerativas (Banaclocha, 2001).

A N-acetilcisteína (NAC), um tiol-composto, tem sido usado terapêuticamente devido à sua propriedade de ser um precursor da glutatona (De Flora et al, 1991), possuindo, portanto, um papel-chave na homeostase celular, visto que a depleção de glutatona pode causar morte celular devido à peroxidação lipídica e declínio nos níveis de tiol-proteínas (Reed et al., 1984). NAC também pode atuar diretamente reduzindo os níveis de ROS *in vivo* e *in vitro* (Aruoma et al., 1989).

Wan et al. (2006) relataram que NAC inibiu a formação de radicais hidroxila após infusão de d-AMPH em estriado de ratos, sugerindo que NAC poderia proteger contra o stress oxidativo induzido pela d-AMPH. Em um estudo anterior foi observado que NAC preveniu hiperatividade e exerceu efeitos protetores na neurotoxicidade induzida por metanfetamina em estriado de ratos (Fukami et al., 2004).

NAC pode atuar no metabolismo mitocondrial influenciando a fosforilação oxidativa (Miquel et al., 1995). NAC pode atuar na fosforilação oxidativa através de 2 mecanismos: protegendo proteínas da fosforilação oxidativa contra o dano oxidativo através da manutenção dos grupos SH que são essenciais para a atividade enzimática e evitando a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, o que poderia diminuir a atividade dos complexos (Banaclocha et al., 1997). Nessa mesma linha, Miquel et al (1995) relataram um aumento das atividade dos complexos I, IV e V em mitocôndrias hepáticas de ratos idosos tratados cronicamente com NAC.

Também há evidências sugerindo que NAC pode ter um papel na sobrevivência neuronal através de outros mecanismos não-relacionados com suas propriedades antioxidantes. Por exemplo, inibindo apoptose (Ferrari et al., 1995, Xiong et al.,1999).

1.5.2 Deferoxamina (DFX)

A Deferoxamina (DFX) é um potente quelante de ferro que pode inibir reações geradoras de radicais livres, catalisadas por ferro. Estudos anteriores mostram que DFX pode diminuir dano oxidativo em modelos animais para muitas doenças humanas (Halliwell, 1987; Halliwell, 1989).

A degradação enzimática ou auto-oxidação de dopamina resulta na formação de peróxido de hidrogênio e radical superóxido. Peróxido de hidrogênio e íons ferro podem gerar radicais hidroxila (OH^{\bullet}), que são potencialmente danosos, através da Reação de Fenton (Olanow, 1992; Kopin, 1992). Portanto, um aumento na concentração de ferro pode ser crítica devido à sua atuação, catalisando reações geradoras de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que DFX protege contra injúria isquêmica em cérebro de ratos neonatais quando administrada após a reperfusão (Mu et al, 2005). Em cérebro de ratos adultos, a administração de DFX protege contra danos da isquemia focal quando dada 72 horas antes do insulto isquêmico (Prass et al, 2002). Além disso, foi relatado que administração de NAC mais DFX reduz as conseqüências de choque séptico induzido por ligação cecal e punção (CLP) em ratos, pela diminuição do stress oxidativo e da disfunção mitocondrial (Ritter et al, 2004a).

Park et al. (2006) relataram que pré-tratamento subcutâneo com DFX diminui significativamente a peroxidação lipídica em cérebro de ratos tratados com metanfetamina. DFX também pode prevenir a degeneração de neurônios dopaminérgicos na substantia nigra induzida por administração de ferro intra-cerebro-ventricular (ICV) (Jiang et al, 2006).

O hipocampo recebe vias dopaminérgicas do cérebro e expressa todos os subtipos de receptores dopaminérgicos (D1-D5) (Jay, 2003; Otmakhova & Lisman, 1996) e o córtex pré-frontal medial é a principal área terminal da inervação dopaminérgica mesocortical (Berger et

al, 1991). Tanto o hipocampo quanto o córtex pré-frontal exercem um papel crucial na patofisiologia do TAB (Frey et al, 2007b).

São necessários mais estudos para esclarecer as ações de antioxidantes nas doenças neurodegenerativas. Nesse sentido, o propósito deste estudo é investigar os efeitos de antioxidantes, NAC e/ou DFX, na atividade locomotora e nos níveis de oxidação de proteínas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo animal de mania.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Investigar os efeitos dos antioxidantes NAC e DFX na atividade locomotora e nos níveis de oxidação de proteínas em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1 Investigar os efeitos, tanto preventivo quanto reversivo, de NAC na atividade locomotora em campo aberto e nos níveis de oxidação em proteínas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

2.2.2 Investigar os efeitos, tanto preventivo quanto reversivo, de DFX na atividade locomotora em campo aberto e nos níveis de oxidação em proteínas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

2.2.3 Investigar os efeitos, tanto preventivo quanto reversivo, da associação NAC mais DFX na atividade locomotora em campo aberto e nos níveis de oxidação em proteínas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo animal de mania induzido por d-AMPH.

PARTE II

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AND/OR DEFEROXAMINE ON OXIDATIVE STRESS AND HYPERACTIVITY IN AN ANIMAL MODEL OF MANIA

Samira S. Valvassori, Fabrícia C. Petronilho, Gislaine Z. Réus, Amanda V. Steckert, Virgínia
B. M. Oliveira, Carina R. Boeck, Flávio Kapczinski, Felipe Dal-Pizzol, and João Quevedo

Artigo submetido ao periódico **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological
Psychiatry** em 11/11/2007.

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AND/OR DEFEROXAMINE ON OXIDATIVE
STRESS AND HYPERACTIVITY IN AN ANIMAL MODEL OF MANIA

Samira S. Valvassori^a, Fabrícia C. Petronilho^b, Gislaine Z. Réus^a, Amanda V. Steckert^b,
Virgínia B. M. Oliveira^a, Carina R. Boeck^a, Flávio Kapczinski^c, Felipe Dal-Pizzol^b, and João
Quevedo^a

^aLaboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil;

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil;

^cBipolar Disorders Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author: Prof. João Quevedo, M.D., Ph.D – Laboratório de Neurociências, PPGCS, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brasil. Phone: #55 48 3443 4818. Fax: # 55 48 3443 4817. E- mail: quevedo@unesc.net

Abstract

Studies have consistently reported the participation of free radicals in multiple brain disorders including Bipolar Disorder. Administration of d-amphetamine (d-AMPH) is a relevant animal model of mania and exposure to d-AMPH increases oxidative stress in rat brain. Evidences indicate that antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and Deferoxamine (DFX) exerted protective effects in the brain. The present study was designed to evaluate the effects of NAC, DFX or NAC plus DFX on locomotor activity in a dopaminergic animal model of mania and on protein oxidation levels in prefrontal cortex and hippocampus. In the first model (reversal treatment), adult male Wistar rats received d-AMPH or saline for 14 days, and between the 8th and 14th days, they were treated with NAC, DFX, NAC plus DFX or saline. In the second model (prevention treatment), rats were pretreated with NAC, DFX, NAC plus DFX or saline, and between the 8th and 14th days, they received d-AMPH or saline. We assessed locomotor activity by the open-field task and evaluated oxidative damage in prefrontal cortex and hippocampus by protein carbonyl assay. In the reversal treatment, d-AMPH-induced hyperlocomotion was not reversed by antioxidants. In the prefrontal cortex, oxidative damage was not reversed by antioxidants alone and was increased by treatment with NAC plus DFX. In the hippocampus NAC plus DFX reversed the oxidative damage, but NAC alone increased this damage. In the prevention experiment d-AMPH-induced hyperlocomotion was not prevented by antioxidants, but we observed that the oxidative damage in the prefrontal cortex was prevented by DFX or NAC plus DFX. In the hippocampus NAC, DFX and NAC plus DFX prevented oxidative damage. In conclusion, NAC or DFX and the association of NAC plus DFX not modifies d-AMPH-induced hyperactivity, but reverses and protect against d-AMPH-induced oxidative stress, however this effect vary depending on the brain region and treatment regimen.

Keywords: animal model; bipolar disorder; oxidative stress; deferoxamine; N-acetylcysteine.

Abbreviations:

d-AMPH = d-amphetamine

DFX = deferoxamine

NAC = N-acetylcysteine

ROS = reactive oxygen species

1. Introduction

Free radicals have been implicated in multiple brain disorder such as schizophrenia and bipolar disorder (Kuloglu et al., 2002). Repeated injections of d-amphetamine (d-AMPH) induced hyperactivity in animals (Frey et al., 2006a) by elevation in extracellular dopamine (Martinez et al., 2003) and it have been suggested as a relevant model animal of mania (Frey et al, 2006b). Studies with this animal model showed that longer periods of induced manic-like hyperactivity are associated with severe brain damage by increased formation of lipid and protein oxidation products (Frey et al., 2006a; 2006c; 2006d; Robinson and Kolb, 1997).

N-acetyl-L-cysteine (NAC), a known thiolic antioxidant, can act through several mechanisms against cellular degeneration. It is a precursor for glutathione synthesis (De Flora et al, 1991), whose is the principal thiolic compound in the cell, and play a key role in cellular homeostasis since its loss is an accompanied by cell death because of lipid peroxidation and protein-thiol decline (Reed et al., 1984). The antioxidant NAC also acts by direct reaction between its reducing thiol group and reactive oxygen species (ROS), leading to a protection against oxidative damage in vitro and in vivo (Aruoma et al., 1989). In a previous study was observed that the NAC prevented methamphetamine-induced hyperactivity and exert protective effects on methamphetamine-induced neurotoxicity in rat striatum (Fukami et al., 2004). Pretreatment with deferoxamine (DFX) also improves the methamphetamine-induced neuronal damage by decreasing the level of oxidative stress in rats brain (Park et al., 2006). DFX is a powerful iron chelator that can inhibit iron dependent free radical reactions and it has already been successfully shown to diminish oxidant damage in several animal model systems for human disease (Halliwell, 1987, 1989). Some studies have demonstrated that DFX protect against brain ischemic injury in neonatal rats when it was administered after a pure ischemia reperfusion insult (Mu et al., 2005). In adult rat brain DFX protects against focal

cerebral ischemia when given as a preconditioning stimulus 72h before the ischemic insult (Prass et al., 2002). In addition, was described that NAC plus DFX reduce the consequences of septic shock induced by cecal ligation and puncture (CLP) in the rat by decreasing oxidative stress and limiting mitochondrial dysfunction (Ritter et al., 2004a). The hippocampus in rodents receives dopaminergic input from the midbrain and expresses all subtypes of dopamine receptor (D1-D5) (Bergson et al, 1995; Jay, 2003; Otmakhova and Lisman, 1996) and the medial prefrontal cortex is the main terminal field of the mesocortical dopaminergic innervations that is dense when compared to other cortical areas (Berger et al., 1991). Both hippocampus and prefrontal cortex play a crucial role in pathophysiology of bipolar disorder (Kaladjian et al., 2006; Frey et al., 2007).

Thus, the purpose of our study was investigate the effects of NAC, DFX or NAC plus DFX on locomotor activity (hyperlocomotion) in a dopaminergic animal model of mania and evaluate protein oxidation levels, a marker of oxidative stress, in both hippocampus and prefrontal cortex.

2. Methods

In vivo studies were performed in accordance with National Institute of Health guidelines and with approval of Universidade do Extremo Sul Catarinense Ethics Committee.

2.1 Animals

Male Wistar rats (age, 2-3 months; weight, 250-320g) were used in this study. They were housed five to a cage with food and water available and *libitum*, and were maintained on a

12h light/dark cycle (lights on at 7.00 a.m.) in a temperature controlled (22 °C) colony room. These conditions were maintained constant throughout the experiments.

2.2 Drugs

NAC, DFX and d-AMPH (Sigma, St. Louis, Mo.) were dissolved in saline (NaCl 0.9g %). The solutions were prepared immediately before use and were protected from the light during the experimental session.

2.3 Reversal treatment

In the reversal model, we reproduced the treatment of an acute manic episode according to proposed previously to the animal model of mania (Frey et al., 2006b). Rats received either a daily intraperitoneally (i.p.) injection of 2 mg/kg d-AMPH, or saline for 14 days. Between the 8th and the 14th days (treatment for 7 days), the animals were divided into 4 experimental groups (12–15 animals per group): one group received subcutaneously (s.c.) 20 mg/kg NAC, three times per day; the second group received 20 mg/kg DFX s.c, once a each three days; the third group received 20 mg/kg NAC s.c. (three times per day) plus 20 mg/kg DFX s.c. (once to each three days); the fourth group received saline i.p. twice a day. The animals were assessed to locomotor activity 2 hours following the last d-AMPH injection and they were sacrificed immediately after the open-field task. The prefrontal cortex and hippocampus were dissected, rapidly frozen and stored at –80°C until measurement of protein carbonyls assay.

2.4 Prevention treatment

The prevention model was designed to mimic the maintenance phase of treatment of mania according previously proposed to the animal model of mania (Frey et al., 2006b). Rats received s.c. either NAC 20 mg/kg, three times per day; DFX 20 mg/kg, once a each three days; NAC (20 mg/kg, three times to the day) plus DFX (20mg/kg, one time to each three days); or saline i.p. twice a day for 14 days. The animals were then divided into 2 groups (12–15 animals per group). Between the 8th and the 14th days (treatment for 7 days), each group received once a day i.p. injection of d-AMPH 2 mg/kg, or saline. The animals were assessed to locomotor activity 2 hours following the last d-AMPH injection and rats were sacrificed immediately after the open-field task. The prefrontal cortex and hippocampus were dissected, rapidly frozen and stored at -80°C until measurement of protein carbonyls assay.

2.5 Locomotor activity

We used the open-field task to assess the locomotor activity after treatments (reversal or prevention) (Frey et al., 2006a). The task was performed in a 40 x 60 cm open field surrounded by 50 cm-high walls. The floor of the open field was divided into 9 equal rectangles by black lines. The animals were gently placed on the left rear rectangle and were allowed to explore the arena. Crossings of the black lines and rearings were counted for 5 minutes.

2.6 Measurement of protein carbonyls

The oxidative damage to proteins was assessed in prefrontal cortex and hippocampus by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described (Levine et al., 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH. The quantification of protein

carbonyls in the samples was determined in the absorbance of 370 nm. The protein content was normalized by quantification according Lowry method (Lowry et al., 1951).

2.8 Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. Differences among experimental groups evaluating behavior parameters were determined by one-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test. The oxidative damage data were analyzed by one-way ANOVA and multiple comparisons were performed by a Newman-Keuls test. In all comparisons $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

The treatment with d-AMPH increased locomotor and rearing behaviors in both reversal (Fig. 1A and 1B) and prevention (Fig. 2A and 2B) experimental protocols, such as previously reported (Frey et al., 2006a; 2006b; 2006c; 2006d). The administration of NAC, DFX, or NAC plus DFX did not change d-AMPH-induced hyperactivity at both reversal (Fig. 1A and 1B) and prevention (Fig. 2A and 2B) treatment. Oxidative protein damage was induced by d-AMPH in prefrontal cortex and hippocampus for both reversal (Fig. 1C) and prevention protocols (Fig. 2C).

In the reversal experimental model (Fig. 1C) the antioxidants did not reverse d-AMPH-induced protein damage in both brain regions analyzed. In addition, the d-AMPH-induced protein oxidative damage was increased by NAC plus DFX treatment in the prefrontal cortex, but in this structure the treatment with NAC or DFX alone have no effect. In the hippocampus NAC plus DFX reversed d-AMPH-induced oxidative damage, and treatment with NAC administrated alone increase the oxidative damage induced by d-AMPH.

In the prevention treatment (Fig. 2C), the formation of carbonyl group induced by d-AMPH was prevented by DFX, or NAC plus DFX in both prefrontal cortex and hippocampus. The NAC pretreatment alone decreased partially the protein oxidative damage in the prefrontal cortex, but blocked the damage in the hippocampus.

4. Discussion

Our data showed that NAC, DFX, or NAC plus DFX neither reversed nor prevented d-AMPH-induced hyperactivity associated to an animal model of mania. Recently, Wan and colleagues (2006) showed that NAC could protect against d-AMPH-induced oxidative stress in the striatum from rats independent of lowering the core body temperature of rats, whose is the other parameter associated to d-AMPH treatment. This is opposite to others previous findings that demonstrated that DFX (Park et al., 2006; Borisenko et al., 2000) or NAC (Fukami, 2004) attenuate alterations in the hyperactivity induced by dopaminergic psychoestimulants (i.e. methamphetamine). Differences in experimental animal design model may account for this discrepancy.

The formation of carbonyl proteins induced by administration of d-AMPH in the present study is in agreement with our previous studies (Frey et al., 2006a; 2006c). In the present study, DFX prevented d-AMPH-induced formation of carbonyl grouping in the prefrontal cortex; NAC pretreatment decreased this damage; in the hippocampus NAC or DFX prevented this damage. No effects in the reversal treatment with NAC administered alone were observed in the hippocampus. AMPH, as well as methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity, is believed to be associated with an increase in the formation of free radicals (O'Callaghan and Miller, 1994; Richarte et al., 1983; Martinez, 2003). Recent studies have demonstrated that NAC prevent the brain neurotoxicity and behavioral changes

in rats following administration of methamphetamine (Fukami et al., 2004). Wan and colleagues (2006) demonstrated that NAC attenuated long-term dopaminergic depletion and lipid peroxidation formation in the rat striatum inhibiting the production of hydroxyl radical following AMPH infusion into the striatum. The large release of dopamine by AMPH and methamphetamine (Coyle and Snyder 1969; Ferris et al. 1972; Harris and Baldessarini 1973; Heikkila et al. 1975; Holmes and Rutledge 1976; Cadet et al., 2003; La Voie et al., 1999; Stokes et al., 1999) may be implicated in the formation of dopamine-quinones and free radicals by auto-oxidation of dopamine (Asanuma et al., 2003; La Voie et al., 1999; Stokes et al., 1999).

The observed protective effect of NAC in prevention treatment might be associated with total glutathione increase that could block the cytotoxic activity by ROS (Froissard et al., 1997). Park and colleagues (2006) reported that subcutaneously pretreatment with DFX decrease the level of lipid peroxidation in the brain from rats treated with methamphetamine, suggesting that neuroprotection induced by DFX was due to decreasing in the oxidative stress level. DFX can also prevent the degeneration of dopaminergic neurons in substance nigra induced by iron-overland (Jiang et al., 2006). The enzymatic degradation or auto-oxidation of dopamine results in the formation of hydrogen peroxide and superoxide radical. Hydrogen peroxide is susceptible to iron-catalyzed formation of hydroxyl free radicals via Fenton reaction (Olanow, 1992; Kopin, 1992). In addition, Yamamoto and Zhu (1998) suggested that iron might be involved in mediating the long-term damage to dopamine neurons that follows the repeated administration of methamphetamine. These neuroprotective effects of DFX can be also related with its ability of inhibit iron dependent free radical reactions (Halliwell, 1987; 1989).

The pretreatment with the association of NAC plus DFX prevented the damage induced by d-AMPH in the prefrontal cortex and display partial protective effect in

hippocampus in our experiment. Previous studies demonstrated that oxidative stress and mitochondrial dysfunction was decrease by this antioxidants association (Ritter et al., 2006, 2004a). The protective effect of the NAC plus DFX treatment was also observed on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure (Ritter et al., 2004b) as well as in the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats (Ritter et al., 2006).

In this study, NAC plus DFX also was able to reverse the d-AMPH-induced damage in hippocampus. However, NAC alone increased this damage in the same structure. The oxidative metabolism of NAC can generate thiol free radicals that have been increasingly considered as intermediates in process that may be involved in the development of biological damage resulting from oxidative stress. In vitro, NAC increases hydroxyl radical generation in a system with Fe(III)-citrate and H₂O₂ by reducing ferric iron to its catalytic, active Fe⁺² form (Sagrasta et al., 2002). Ritter and colleagues (2006) supposed that the addition of DFX to the NAC regimen prevents its oxidation, and the occurrence of the Fenton chemistry reaction maintained by the iron recycling mediated by NAC. In contrast, in the reversal experiment, our results demonstrated that NAC plus DFX treatment increased the d-AMPH-induced damage in prefrontal cortex. Interestingly, in other studies were demonstrated that thiols glutathione and NAC widely used as antioxidants, in combination with BL2b show pro-oxidant characteristics, and induce apoptotic Hep-2 (cell cycle related antibody) cell death with the participation of extracellular iron (Solov'eva et al., 2007). In the present experiment of reversion, we did not observe effects in the treatment with DFX on the prefrontal cortex or hippocampus. In this experimental treatment, NAC also did not demonstrate effect in the prefrontal cortex. Differences between reversal and prevention experimental design may account for this paradoxal effects. Frey and colleagues (2006a; 2006b; 2006c) suggests that longer periods of induced manic-like hyperactivity are associated with more severe damages in brain. Thus, we suggested that either NAC or DFX alone was not able to revert the d-

AMPH-induced damage for longer period in the prefrontal cortex and hippocampus when administered after d-AMPH-induced maniac behavior in animals.

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that free radical scavengers such as NAC, DFX or both associated not modify d-AMPH-induced hyperactivity, but could reverse and protect against d-AMPH-induced oxidative stress, however this effect depends on the brain region analyzed and treatment regimen.

Acknowledgments

This study was partly supported by UNESC, CNPq, FAPESC and CAPES (Brazil).

References

- Aruoma O I, Halliwell B, Hoey B M, Butler J (1989). The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Biol Med*; 6: 593-7
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N (2003). Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*; 5: 165–176.
- Berger B, Gaspar P, Verney C (1991). Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci*; 14:21–27.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J. Neurosci*; 15: 7821–7836.
- Borinseko G G, Kagan V E, Hasia C J, Schor N F (2000). Interaction between 6-hydroxydopamine and transferrin: "Let my iron go". *Biochemistry*; 39: 3392-400.
- Cadet J L, Jayanthi S, Deng X (2003). Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *FASEB J*; 17: 1775– 1788.
- Coyle J T, Snyder S H (1969). Catecholamine uptake by synaptosomes in homogenates of rat brain: stereospecificity in different areas. *J Pharmacol Exp Ther*; 170: 221–23.
- De Flora S, Izzotti A, D'Agostin F, Cesarone C F (1991). Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med*; 91:122-130.
- Ferris R M, Tang F L, Maxwell R A (1972). A comparison of the capacities of isomers of amphetamine, deoxypipradrol and methylphenidate to inhibit the uptake of tritiated catecholamines into rat cerebral cortex slices, synaptosomal preparations of rat cerebral cortex, hypothalamus and striatum and into adrenergic nerves of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*; 181:407–416.
- Frey B N, Martins M R, Petronilho F C, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F (2006a). Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord*; 8: 275-80.
- Frey B N, Andreatza A C, Cereser K M, Martins M R, Valvassori S S, Réus G Z, Quevedo J, Kapczinski F (2006b). Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*; 79: 281-6.
- Frey B N, Valvassori S S, Réus G Z, Martins M R, Petronilho F C, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J (2006c). Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*; 31: 326-32.

- Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J (2006d). Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res*;31: 699-703.
- Frey BN, Andreazza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, Kapczinski F (2007). The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behav Pharmacol*; 18: 419-30.
- Froissard P, Monrocq H, Duval D (1997). Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*; 326: 93–99.
- Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okama N, Shimizu E, Iyo M (2004). Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res*; 1016:90-5.
- Halliwell B (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*; 1: 358-364.
- Halliwell B (1989). Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free Radic Biol Med*; 7:645-51.
- Harris J E, Baldessarini R J (1973). Uptake of (3H)-catecholamines by homogenates of rat corpus striatum and cerebral cortex: effects of amphetamine analogues. *Neuropharmacology*; 12: 669–679.
- Heikkila R E, Orlansky H, Mytilineou C, Cohen G (1975). Amphetamine: evaluation of D- and L-isomers as releasing agents and uptake inhibitors for 3H-dopamine and 3H-norepinephrine in slices of rat neostriatum and cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther*; 194: 47–56.
- Holmes J C, Rutledge C O (1976). Effects of the D- and L-isomers of amphetamine on uptake, release and catabolism of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine in several regions of rat brain. *Biochem Pharmacol*; 25: 447–45.
- Jay T.M (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol*; 69: 375–390.
- Jiang H, Luan Z, Wang J, Xie J (2006). Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. *Neurochem Int*; 49: 605-9.
- Kaladjian A, Mazzola-Pomietto P, Jeanningros R, Azorin JM (2006). Brain structural abnormalities of bipolar disorder. *Encephale*; 32: 421-36.
- Kopin I J (1992). The pharmacology of Parkinson's disease therapy: An update. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 32: 467–495.

- Kuloglu M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezcan AE, Cinkilink N (2002). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct*; 20:171-5.
- LaVoie M J, Hastings T G (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci*; 19: 1484– 1491.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*; 186: 464–478
- Lowry O.H, Rosebrough A L, Randal R J (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265–275.
- Martinez D, Slifstein M, Broft A, Mawlawi O, Hwang D R, Huang Y, Cooper T, Kegeles L, Zarah E, Abi-Dargham A, Heber S N, Laruelle M (2003). Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II. Amphetamine-induced dopaminerelease in the functional subdivisions of the striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*; 23: 285–300.
- Mu D, Chang Y S, Vexler Z S, Ferriero D M (2005). Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol*; 195: 407-15.
- Solov'eva ME, Solov'ev VV, Faskhutdinova AA, Kudriavtsev AA, Akatov VS (2007). Prooxidant and cytotoxic action of N-acetylcysteine and glutathione combined with vitamin B12b. *Tsitologiya*; 49: 70-8.
- Olanow C F (1992). An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol*; 32: S2–S9.
- O'Callaghan J P, Miller D B (1994). Neurotoxicity amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann N Y Acad Sci*; 648, 371–382.
- Otmakhova NA, Lisman JE (1996). D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J. Neurosci*; 16: 7478–7486.
- Park M J, Lee S K, Lima M A, Chung H S, Cho S I, Jang C G, Lee S M (2006). Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res*; 1109: 176-82.
- Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Magow D, Priller J, Scharff A, Dirnagl U, Meisel A (2002). Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab*; 22: 520-5.
- Reed D J, Farriss M W (1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*; 36: 255-335.

- Richarte G A, Seiden L A, Schuster C R (1983). Increased dopamine metabolism in rat neostriatum after toxic doses of D-methylamphetamine. *Neuropharmacology*; 22, 1383–1388.
- Ritter C, Andrades M E, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira J C, Dal-Pizzol (2004a). Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med*; 32: 342-9.
- Ritter C, Reinke A, andrades M, Martins M R, Rocha J, Menna-Barreto S, Quevedo J, Moreira J C, Dal-Pizzol F (2004b). Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. *Crit Care Med*; 32: 2079-83.
- Ritter C, da Cunha A A, Echer I C, Andrades M, Reinke A, Lucchiari N, Rocha J, Streck E L, Menna-Barreto S, Moreira J C, Dal-Pizzol F (2006). Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. *Crit Care Med*; 34: 471-7.
- Robinson TE, Kolb B (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci*; 17: 8491-7.
- Sagrista M L, Garcia A F, Madariaga M A, Mora M (2002). Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Radic Res*; 36: 329–340.
- Stokes A H, Hastings T G, Vrana K E (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res*; 55: 559–65.
- Wan F J, Tung C S, Shiah I S, Lin H C (2006). Effects of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrosonium and N-acetylcysteine on hydroxyl radical formation and dopamine depletion in the rat striatum produced by d-amphetamine. *Eur Neuropsychopharmacol*; 16: 147-53.
- Yamamoto B K, Zhu W (1998). The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*; 287: 107-14.

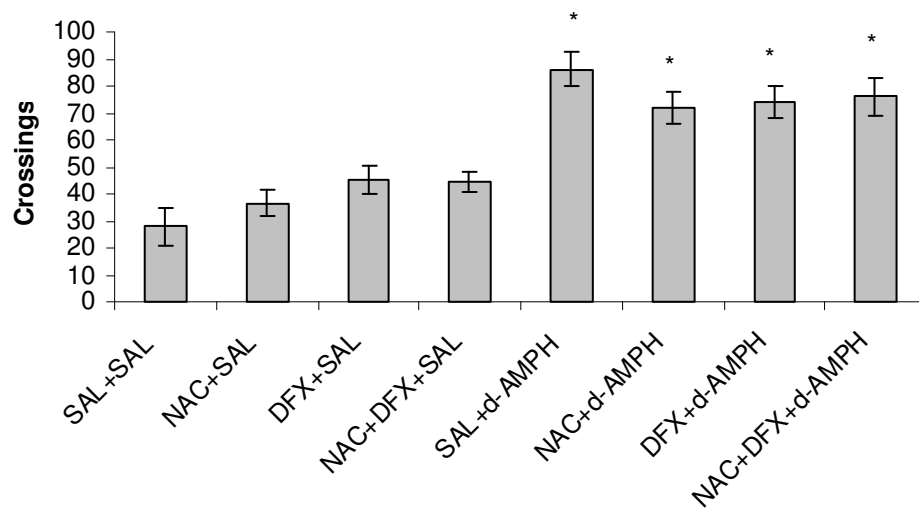
Figure Legends

Figure 1. Effect of antioxidants on d-AMPH induce hyperactivity and protein carbonyls in the reversal treatment on experimental model of mania. Rats were pretreated with d-AMPH for 7 days and then treated with d-AMPH plus NAC, DFX or NAC plus DFX between the 8th and 14th days. Number of crossings (A) and rearings (B) was evaluated. The data was analyzed by one-way ANOVA, Tukey's post hoc. Bars represent means; error bars represent standard error of the means (SEM) (n=15 for each group). $P < 0.001$, *different of the group saline and **different of the group d-AMPH (Crossings - $F = 11.99$; Rearings - $F = 12.01$). The d-AMPH-induced protein carbonyls in the reversal model (C) (n=5 for each group). $P < 0.0001$ *different of the group saline ($F = 12.239$). SAL = saline; d-AMPH = D-amphetamine; NAC = N-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

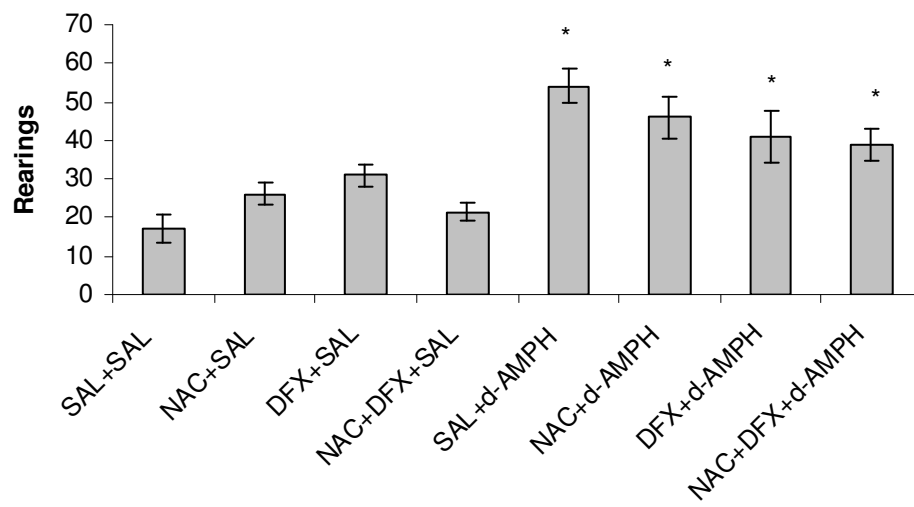
Figure 2. Effect of antioxidants on d-AMPH induce hyperactivity and protein carbonyls in the prevention treatment on experimental model of mania. Rats were pretreated with NAC, DFX or NAC plus DFX for 7 days and then treated with plus d-AMPH the 8th and 14th days. Number of crossings (A) and rearings (B) was evaluated. The data was analyzed by one-way ANOVA, Tukey's post hoc. Bars represent means; error bars represent standard error of the means (SEM) (n=15 for each group). $P < 0.0001$, *different of the group saline and **different of the group d-AMPH (Crossings - $F = 12.28$; Rearings - $F = 12.239$). The d-AMPH-induced protein carbonyls in the reversal model (C) (n=5 for each group). $P < 0.0001$ *different of the group saline ($F = 12.239$). SAL = saline; d-AMPH = D-amphetamine; NAC = N-acetylcysteine; DFX = deferoxamine.

Figure1- Reversal treatment

A



B



C

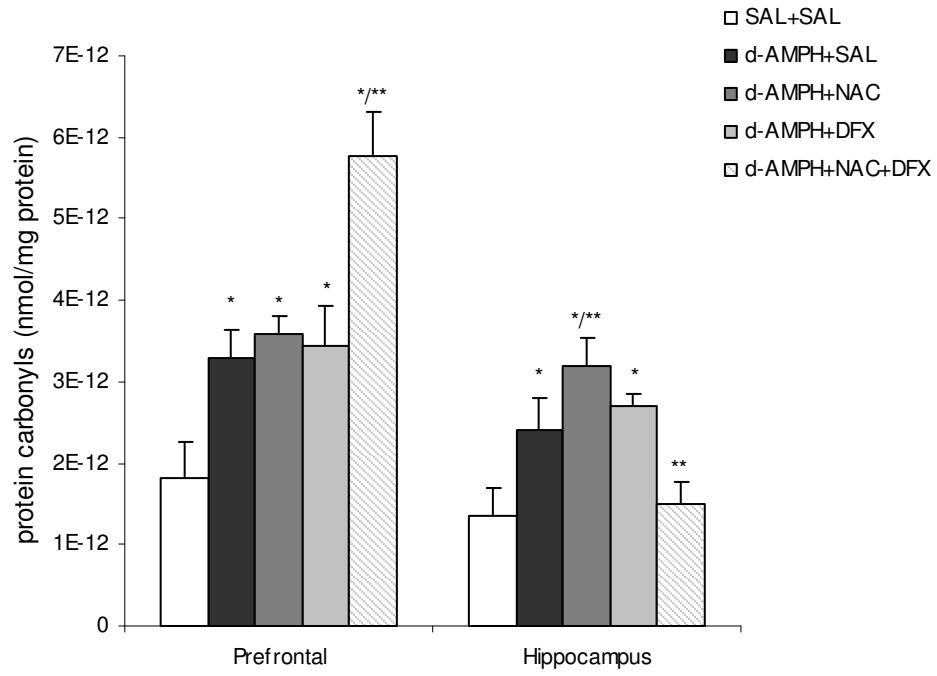
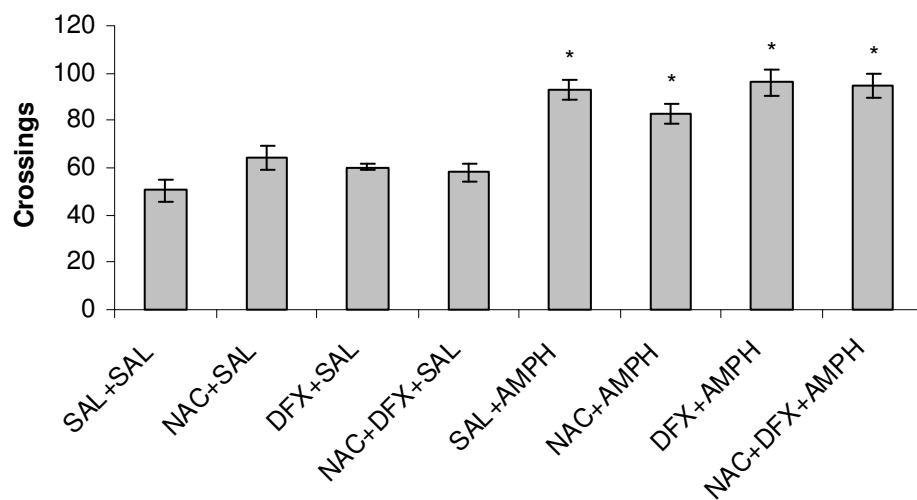
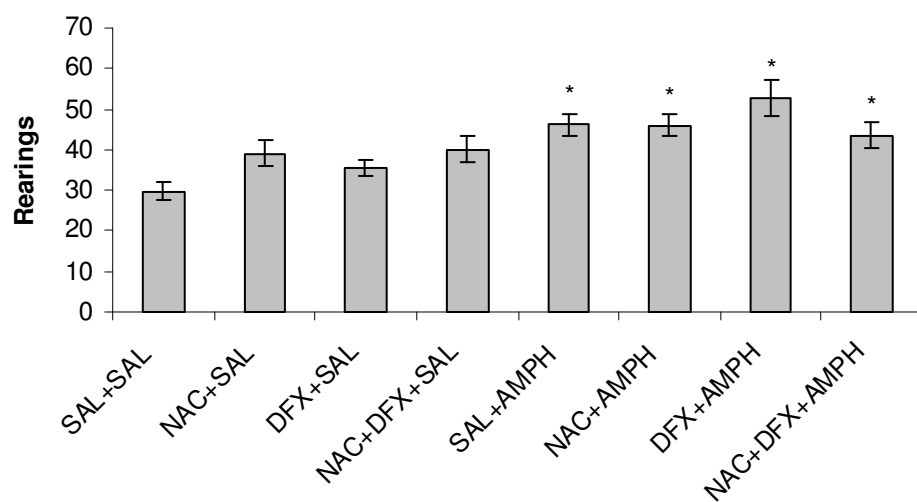


Figure 2- Prevention treatment

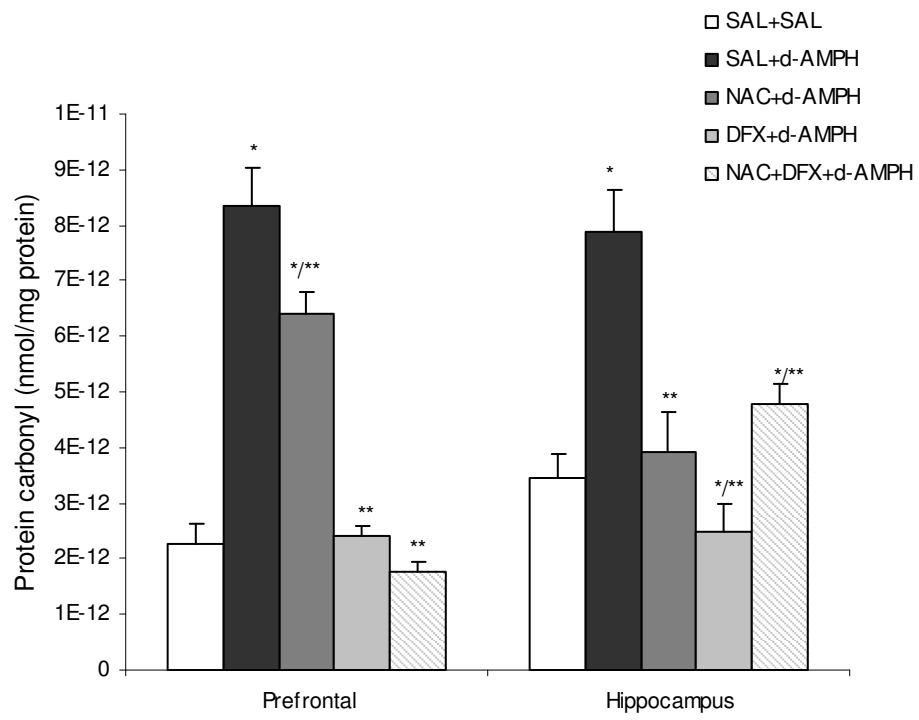
A



B



C



PARTE II

4. DISCUSSÃO

Embora os mecanismos exatos pelos quais d-AMPH e metanfetamina induzem neurotoxicidade sejam desconhecidos, tem sido fortemente sugerido que estresse oxidativo possa estar envolvido através do aumento na produção de radicais livres (Richarte et al., 1983; O'Callaghan & Miller, 1994; Martinez et al. 2003; Brown & Yamamoto, 2003).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de ROS e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo (Dalle-Donne, 2006). O alvo celular primário do estresse oxidativo pode variar dependendo do tipo de célula, do nível e duração da produção de oxidantes, da espécie de ROS gerada e do sítio de geração (intracelular ou extracelular). As Espécies Reativas de Oxigênio podem oxidar vários substratos biológicos incluindo lipídios, ácidos nucleicos e proteínas, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas (Dalle-Donne, 2006).

A grande liberação de dopamina causada pela administração de AMPH ou metanfetamina (Coyle & Snyder, 1969; Ferris et al, 1972; Harris & Baldessarini, 1973; Heikkila et al., 1975; Holmes & Rutledge, 1976; Cadet et al., 2003; La Voie & Hastings, 1999; Stokes et al., 1999) pode levar à formação de quinonas e radicais livres pela autooxidação da dopamina (Asanuma et al., 2003; La Voie & Hastings , 1999; Stokes et al, 1999), levando à inibição de proteínas intracelulares, o que pode ocasionar dano celular (Brown & Yamamoto, 2003). Além da auto-oxidação, o metabolismo da dopamina pela monoaminaoxidase pode aumentar a produção de

peróxido de hidrogênio e a produção de ROS por reações dependentes de ferro (Brown & Yamamoto, 2003).

O metabolismo da dopamina mediada pela monoaminaoxidase e a subsequente formação de peróxido de hidrogênio também podem inibir a atividade da Cadeia Transportadora de Elétrons mitocondrial. Por exemplo, Berman & Hastings (1999) demonstraram que a dopamina inibe os complexos II-III da Cadeia Transportadora de Elétrons via formação de peróxido de hidrogênio induzida pela monoaminaoxidase. Frey et al (2006e) reportaram um aumento dos níveis de ânion superóxido (O_2^-) em partículas submitocondriais do córtex pré-frontal e hipocampo de ratos após exposição crônica à D-anfetamina, demonstrando um aumento na produção de ROS mitocondrial.

Em outro estudo, foi demonstrado que a dopamina inibe Complexo I da ECT e este efeito é atenuado pelo quelante de ferro DFX (Ben-Shachar et al., 1995). Interessantemente, a perfusão de DFX em estriado de ratos também atenua a depleção duradoura de dopamina após um regime de quatro aplicações de metanfetamina (Yamamoto & Zhu, 1998).

Altas doses de metanfetamina aumentam a liberação de glutamato no estriado, podendo levar à ativação de receptores de glutamato em terminais dopaminérgicos (Nash & Yamamoto, 1992; Abekawa et al., 1994; Tarazi & Baldessarini, 1999). A ativação de receptores de glutamato, particularmente receptores NMDA, leva a um massivo influxo de cálcio e alterações mitocondriais, assim como a um aumento na formação de superóxido (Schinder et al., 1996; Prehn, 1998). Portanto, a ativação de receptores glutamatérgicos em terminais dopaminérgicos pode levar à geração de radicais livres nestes neurônios.

A hipertermia pode contribuir para o aumento na produção de ROS visto que a prevenção da hipertermia induzida por metanfetamina atenua a formação de ROS no

estriado (Fleckenstein et al, 1997). A Cadeia Transportadora de Elétrons é suscetível a altas temperaturas (Skonieczna et al.,1986; Lepock et al., 1987), assim, a hipertermia induzida por anfetaminas pode aumentar a formação de ROS pelo decréscimo na atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

Os dados do presente trabalho mostraram que a hiperatividade locomotora induzida por anfetamina nos ratos não foi prevenida nem revertida pela administração de antioxidantes: NAC, DFX ou NAC+ DFX (figuras 1A, 1B, 2A, 2B). Outros trabalhos obtiveram resultados discrepantes. Por exemplo, Park et al. (2006) demonstraram que DFX preveniu totalmente a hiperlocomoção e, parcialmente, a hipertermia geradas pela administração de metanfetamina, corroborando os achados de Borisenko et al. (2000), onde foi demonstrado que DFX pode prevenir as alterações locomotoras induzidas por um análogo dopaminérgico (6-hydroxydopamine). Wan et al. (2006) mostraram que o tratamento com NAC não afetou a elevação de temperatura causada por d-AMPH, apesar de proteger contra o estresse oxidativo, sugerindo que a neurotoxicidade induzida pela d-AMPH poderia ser secundária à hipertermia gerada. Um estudo anterior a este (Fukami et al., 2004) demonstrou que o pré-tratamento com NAC atenuou tanto a hiperlocomoção quanto a hipertermia geradas pela administração de metanfetamina em ratos. A hipertermia causada por metanfetamina tem sido associada aos déficits dopaminérgicos produzidos. (Bowyer et al., 1994)

Essas discrepâncias nos achados podem ser justificadas pelas diferenças metodológicas dos modelos animais utilizados.

Estudos anteriores demonstraram que a neurotoxicidade dopaminérgica induzida pela administração de metanfetamina está associada com a formação de radicais livres (O'Callaghan & Miller, 1994; Richarte et al, 1983) ocorrendo o mesmo com d-AMPH (Martinez, 2003; Brown & Yamamoto, 2003).

Os dados do presente estudo mostram, tanto em hipocampo quanto em córtex pré-frontal, uma elevação dos níveis de carbonilação de proteínas (indicadores de estresse oxidativo), induzida pela administração de d-AMPH, tanto no tratamento por 7 dias, quanto no tratamento por 14 dias (Figuras 1C e 2C). Estes dados estão em concordância com os achados de Frey et al.(2006 a), onde os autores encontraram um aumento na oxidação de proteínas em hipocampo e estriado de ratos tratados com uma única injeção de d-AMPH e ratos tratados com injeções repetidas de AMPH. Gluck et al. (2001) reportaram que 4 aplicações de d-AMPH promoveram um aumento nos níveis de carbonilação de proteína em várias áreas cerebrais, 4 e 24 horas após a última aplicação.

A carbonilação de proteínas é um dano oxidativo irreversível, freqüentemente levando à perda da função da proteína. As proteínas, como principais componentes dos sistemas biológicos, são os maiores alvos de radicais livres quando estes são formados, tanto em ambiente extracelular quanto intracelular (Nystrom, 2005). A carbonilação de proteínas é o principal biomarcador de dano oxidativo em proteínas e reflete dano celular induzido por múltiplas formas de ROS (Dalla-Donne, 2006)

Embora as modificações em proteínas provocadas por estresse oxidativo necessitem de maiores estudos para serem completamente compreendidas, a carbonilação em proteínas está bem caracterizada. Carbonilação é uma modificação irreversível e não-enzimática de proteínas, que pode ocorrer através de várias vias oxidativas. ROS (espécies reativas de oxigênio) podem reagir diretamente com a proteína ou podem reagir com moléculas como açúcares e lipídios, gerando produtos (RCS, espécies reativas carbonil) que reagem com a proteína. Portanto, a conseqüente perda da função de proteínas carboniladas pode ser a causa da subsequente disfunção celular e danos aos tecidos (Dalla-Donne, 2006).

A NAC tem sido usada terapêuticamente como antioxidante devido à sua propriedade de ser um precursor da glutathiona (De Flora et al, 1991) , podendo também atuar diretamente reduzindo os níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio) in vivo e in vitro (Aruoma et al, 1989).

A DFX tem sido utilizada como agente terapêutico, com ação antioxidante, em muitos modelos animais para doenças humanas devido à sua ação como quelante de ferro (Halliwell, 1987; Halliwell, 1989). O ferro catalisa a formação de radicais livres (hidroxilas) a partir de peróxido de hidrogênio via reação de Fenton (Olanow, 1992; Kopin, 1992).

No presente estudo, o pré-tratamento dos animais com DFX preveniu a carbonilação de proteínas induzida pela administração de d-AMPH no córtex pré-frontal e hipocampo (Fig. 2C). O pré-tratamento com NAC + DFX também preveniu a formação de proteínas carbonil no córtex pré-frontal, contudo o pré-tratamento com NAC sozinho apenas reduziu o dano oxidativo (Fig. 2C) induzido pela AMPH. No hipocampo, o pré-tratamento com NAC preveniu a carbonilação de proteínas, o mesmo ocorrendo com o pré-tratamento com NAC+ DFX (Fig. 2C).

Fukami et al (2004) demonstraram que o pré-tratamento com NAC atenuou significativamente a hiperlocomoção em ratos induzida por uma única aplicação de metanfetamina. No mesmo trabalho também foi demonstrado que o pré-tratamento com NAC durante cinco dias atenuou significativamente o decréscimo de dopamina em estriado de ratos após quatro aplicações de metanfetamina, o que sugere uma ação preventiva de NAC devido à sua ação antioxidante, visto que estudos anteriores indicam que a neurotoxicidade dopaminérgica induzida pela metanfetamina está relacionada com o aumento na formação de radicais livres (O'Callaghan & Miller, 1994; Richarte et al, 1983).

Wan et al (2006) demonstraram que a infusão direta de AMPH em estriado de ratos promove a formação de radicais hidroxila e esse efeito é abolido pela aplicação de NAC. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o tratamento com NAC atenuou a peroxidação lipídica e a depleção dopaminérgica induzidas pela administração de AMPH.

Borisenko et al (1999) demonstraram que a administração de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) a camundongos resulta em liberação de ferro da transferrina-férrica sérica (Fe-Tf) . Nesse mesmo trabalho foi demonstrado também que o pré-tratamento com DFX, quelante de ferro, preveniu a hiperatividade induzida pela 6-hidroxi-dopamina, o que sugere que o ferro liberado poderia provocar a geração de radicais livres e o uso de DFX poderia prevenir o dano oxidativo gerado.

Park et al (2006) reportaram que o pré-tratamento com DFX em ratos, submetidos à aplicações repetidas de metanfetamina, atenuou tanto o decréscimo nos níveis de GSH estriatal quanto a depleção nos níveis de serotonina e dopamina estriatal. Nesse mesmo trabalho foi observado que o pré-tratamento com DFX também preveniu a peroxidação lipídica induzida pelas aplicações de metanfetamina. Esses resultados mostram que a quelação de ferro livre pela DFX pode bloquear a formação de radicais hidroxila induzida pela metanfetamina, reduzindo o estresse oxidativo.

Estudos anteriores mostraram que o aumento nos níveis de ferro no Sistema Nervoso Central em ratos está associado ao estresse oxidativo (Dal-Pizzol et al, 2001; Jiang et al, 2006) levando à degeneração e morte de neurônios dopaminérgicos, o que pode ser revertido por aplicações de DFX (Jiang et al, 2006).

A habilidade do quelante DFX em proteger contra neurodegeneração dopaminérgica também está evidenciada em outros trabalhos. Por exemplo, Ben-Shachar et al (1991) demonstraram, em ratos, que o pré-tratamento com DFX leva à

uma significativa proteção contra a redução de dopamina estriatal induzida por 6-hidroxi-dopamina e à normalização na liberação de dopamina. Os ratos pré-tratados com DFX e expostos à 6-hidroxi-dopamina mostraram, também, uma atividade comportamental semelhante ao do grupo controle, evidenciando o efeito protetor de DFX.

Coerentemente com esses achados, os resultados do presente trabalho também evidenciam o efeito protetor do antioxidante DFX, visto que os ratos pré-tratados com DFX e submetidos a uma aplicação diária de d-AMPH por 7 dias não tiveram os níveis de carbonilação de proteínas aumentados significativamente em relação ao grupo controle, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal (Fig. 2C).

Por sua vez, o pré-tratamento com a associação NAC mais DFX preveniu o dano oxidativo induzido pela d-AMPH totalmente no córtex pré-frontal e parcialmente no hipocampo (Fig. 2C).

Estudos anteriores demonstraram que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem ser reduzidos pela associação de NAC mais DFX. Por exemplo, Ritter et al (2004a) relataram que ratos submetidos à sepse induzida por CLP (Ligação Cecal e Punção) e tratados com NAC mais DFX tiveram mortalidade reduzida significativamente em relação ao grupo não-tratado. Nesse trabalho, a associação NAC mais DFX reduziu as consequências do choque séptico pelo decréscimo no estresse oxidativo, evidenciado pelo decréscimo na peroxidação lipídica. Outro trabalho do mesmo grupo mostrou que ratos submetidos à sepse induzida por CLP e tratados com NAC mais DFX tiveram menor dano cognitivo que os não-tratados ou tratados isoladamente com NAC ou DFX (Barrichello et al, 2007).

A ação protetora de NAC mais DFX também foi observada na falência hepática induzida por tetracloreto de carbono (Ritter et al, 2004b) assim como na injúria

pulmonar aguda induzida por instilação de lipopolissacarídeo (LPS), onde os animais tratados com NAC mais DFX tiveram redução nos níveis de carbonilação de proteínas e TBARS e uma diminuição na produção de superóxido mitocondrial (Ritter et al, 2006).

No experimento de reversão do presente estudo, a associação NAC mais DFX foi capaz de reverter o dano oxidativo induzido por d-AMPH no hipocampo (Fig. 1C), visto que os níveis de proteínas-carbonil no grupo tratado com NAC mais DFX e expostos à d-AMPH estavam diminuídos significativamente em relação aos animais expostos apenas à d-AMPH.

Entretanto, no experimento de reversão, a administração de NAC sozinho aumentou de maneira significativa o dano oxidativo induzido pela d-AMPH no hipocampo (Fig. 1C). O metabolismo oxidativo de NAC pode gerar radicais livres. *In vitro*, NAC aumenta a geração de radicais hidroxila em um sistema com Fe (III)-citrato e H₂O₂ pela redução do ferro à sua forma catalítica, Fe⁺², que atua na reação de Fenton (Sagrasta et al, 2002). Ritter et al (2006) sugeriram que a associação de NAC mais DFX poderia prevenir a oxidação de NAC através da quelação de ferro, diminuindo assim a formação de radicais hidroxila.

No tratamento de reversão, a associação NAC mais DFX diminuiu significativamente o dano oxidativo induzido pela d-AMPH no hipocampo, mas, paradoxalmente, houve aumento do dano oxidativo no córtex pré-frontal (Fig. 1C). Solov'eva et al, 2007 demonstraram que GSH (glutathiona) e NAC, agentes antioxidantes, podem ter propriedades pró-oxidantes quando combinadas com vitamina B12b, induzindo ao estresse oxidativo e causando apoptose celular em cultura de células Hep-2 (*human carcinoma*). Interessantemente, neste mesmo trabalho a administração de DFX inibiu a morte celular causada pela associação de NAC e GSH com a vitamina B12b.

No tratamento de reversão, não foram observadas efeitos de DFX no dano oxidativo induzido por d-AMPH no córtex pré-frontal nem no hipocampo. (Fig. 1C).

Apesar de NAC ter aumentado significativamente, no hipocampo, o dano oxidativo induzido por d-AMPH, no córtex pré-frontal não foi observado esse efeito. Também em relação ao esquema de tratamento houve diferenças, uma vez que, no experimento de prevenção, NAC preveniu totalmente o dano oxidativo induzido por d-AMPH, enquanto que no experimento de reversão, NAC aumentou o dano oxidativo induzido por d-AMPH. Essas discrepâncias podem ser creditadas às diferenças entre o modelo de reversão de mania e o modelo de prevenção de mania.

Mais estudos são necessários para elucidar as ações de antioxidantes nas doenças neurodegenerativas como TAB. Neste sentido, o propósito deste estudo foi investigar os efeitos de antioxidantes, NAC e DFX, na atividade locomotora e nos níveis de oxidação de proteínas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo animal de mania.

Em conclusão, foi demonstrado que substâncias antioxidantes, como DFX e NAC ou a associação NAC mais DFX não modificaram a hiperatividade induzida por d-AMPH, mas puderam reverter e prevenir o estresse oxidativo induzido por d-AMPH. Contudo, estes efeitos de reversão e prevenção, variam de acordo com a região cerebral considerada e o regime de tratamento administrado aos animais.

Mais estudos, focados na estratégia antioxidante em modelos animais para transtornos psiquiátricos, podem ser úteis para esclarecer tanto o envolvimento do estresse oxidativo na patofisiologia desses transtornos quanto o papel antioxidante dos fármacos utilizados.

Referências

ABEKAWA T; OHMORI T; KOYAMA T. Effects of repeated administration of high dose of methamphetamine on dopamine and glutamate release in rat striatum and nucleus accumbens. **Brain research** 643: 276- 281. 1994.

ANAND A; VERHOEFF N; SENECA N; ZOGHBI SS; SEIBYL JP; CHARNEY DS; INNIS RB. Brain spect imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients. **The American Journal of Psychiatry** 157 : 1108-1114. 2000.

- ANDREAZZA AC; CASSINI C; ROSA AR; LEITE MC; DE ALMEIDA LM; NARDIM P; CUNHA AB; CERESER KM; SANTIM A; GOTTFRIED C; SALVADOR M, KAPCZINSKI F; GONÇALVES CA. Serum S100B e antioxidants enzymes in bipolar patients. **Journal of Psychiatric Research** 41(6): 523-529. 2007.
- ARUOMA OI; HALLIWELL B; HOEY BM; BUTLER J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free radical Biology & Medicine** 6: 593-597.1989.
- ASANUMA M; MIYAZAKI I; OGAWA N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research** 5: 165–176.2003.
- BANACLOCHA MM, HERNANDEZ AI; MARTINEZ N; FERRANDIZ ML. N-acetylcysteine protects against age-related increased in oxidized proteins in mouse synaptic mitochondria. **Brain Research** 762 (1-2): 256-258. 1997.
- BANACLOCHA MM. Therapeutic potential of n-acetylcyteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. **Medical Hypotheses** 56: 472-477.2001.
- BARRICHELLO T; MACHADO RA; CONSTANTINO L; VALVASSORI SS; RÉUS GZ; MARTINS MR; PETRONILHO F; RITTER C; QUEVEDO J; DAL-PIZZOL F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment. **Critical Care Medicine** 35(9): 2233-2234. 2007.
- BATTAGLIA G; FORNAI F; BUSCETI C; ALOSSI G; CERRETTO F; DE BLASI A; MELCHIONI D; NICOLETTI F. Selective blockade of metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience** 22 (6): 2135-2141. 2002.

- BEN-SACHAR D; ESHEL G; FINBERG JP; YODIM MB. The iron chelator desferrioxamine (desferal) retard 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. **Journal of Neurochemistry** 56 (4): 1441-1444. 1991.
- BEN-SACHAR D; ZUK R; GLINKA Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. **Journal of Neurochemistry** 64: 718-723.1995.
- BERGER B; GASPAR P; VERNEY C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. **Trends in Neuroscience** 14: 21–27. 1991.
- BERGSON C; MRZLJAK L ; SMILEY JF; PAPPY M; LEVENSON R; GOLDMAN-RAKIC PS. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. **The Journal of Neuroscience** 15: 7821–7836. 1995.
- BERMAN SB; HASTINGS, TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry** 73: 1127-1137.
- BEZCHIBNYK YB; WANG JF; YOUNG LT. Gene expression differences in bipolar disorder revealed by c-DNA array analysis of postmortem frontal cortex. **Journal of Neurochemistry** 79 (4) : 826-834.2001.
- BORINSEKO GG; KAGAN VE; HASIA CJ; SCHOR NF. Interaction between 6-hydroxydopamine and transferrin: "Let my iron go". **Biochemistry** 39: 3392-3400. 2000.
- BOEYER JF; DAVIES DL; SCHMUED L; BROENING HW; NEWPORT GD; SLIKKER W Jr; HOLSON RR. Further studies of the role of hyperthermia in

- methamphetamine neurotoxicity. **The Journal of Pharmacology and Therapeutics** 268(3): 1571-1580.1994.
- BROWN JM; YAMAMOTO BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function : role of free radicals and oxidative stress. **Pharmacology & Experimental Therapeutics** 99: 45-53. 2003.
- BURROWS KB; GUDELKY G; YAMAMOTO BK. Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4 methylenedioxy-methamphetamine administration. **European Journal of Pharmacology** 398(1):11-18.2000.
- CADET JL; JAYANTHI S; DENG X. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. **The FASEB Journal** 17: 1775– 1788. 2003.
- CARVALHO F; FERNANDES E; REMIÃO F; GOMES-DA-SILVA J; TAVARES MA; BASTOS MD. Adaptative response of antioxidant enzymes in different areas of rat brain after repeated d-amphetamine administration. **Addict Biol.** 6(3): 213-221.2001.
- COOTER D; MACKAY D; LANDAU S; KERWIN R. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. **Archives of General Psychiatry** 58: 545-553. 2001.
- COYLE JT; SNYDER SH. Catecholamine uptake by synaptosomes in homogenates of rat brain: stereospecificity in different areas. **Pharmacology and Experimental Therapeutics** 170: 221–223. 1969.
- DAGER SR; FRIEDMAN SD; PAROW A; DEMOPULA C; STOLL AL; LYOO IK; DUNNER DL; RINSHAR PF. Brain metabolic alterations in medication-free patients with bipolar disorder. **Pharmacotherapy** 61(5):450-458.2004

- D'AQUILA PS; COLLU M; GESSA GL; SERRA,G. effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology & Behavior** 56: 861-867. 1994.
- DALLE-DONNE I; ALDINI G; CARINI M; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** 10 (2): 389-406.2006.
- DAL-PIZZOL F, KLANT F, FROTA ML Jr; ANDRADE ME; CAREGNATO FF; VIANNA MM; SCHODER N; QUEVEDO J; IZQUIERDO I; ARCHER T; MOREIRA JC. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rats. **Brain Research. Development Brain Research** 130 (1): 109-114. 2001.
- DE FLORA S; IZZOTTI A; D'AGOSTIN F; CESARONE CF.. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. **The American Journal of Medicine** 91:122-130. 1991.
- DI CHIARA G. Psychobiology of the role of dopamine in drug-abuse and addiction. **Neuroscience Research Communication** 17:133-143. 1995.
- DI CHIARA G; ACQUAS E; TANDA G; CADONI C. drugs of abuse: biochemical surrogates os specific aspects of natural reward? **Biochemical Society Symposium** 59: 65-81. 1993.
- ELLEENBROEK BA; COOLS AR. Animal Models with construct validity for schizophrenia. **Behavioural Pharmacology** 1(6): 469-490.1990.
- FERRARI G; YAN YI; GREENE LA. N- acetylcysteine (D- and l- stereoisomers) prevent apoptotic death of neuronal cells. **The Journal of Neuroscience** 15: 2857-2866. 1995.
- FERRIS RM; TANG FL; MAXWELL RA. A comparison of the capacities of isomers of amphetamine, deoxypipradrol and methylphenidate to inhibit the uptake of

tritiated catecholamines into rat cerebral cortex slices, synaptosomal preparations of rat cerebral cortex, hypothalamus and striatum and into adrenergic nerves of rabbit aorta. **Pharmacology and Experimental Therapeutics** 181:407–416.1972.

FLECKENSTEIN AE; WILKINS DG; GIBB JW; HANSON GR. Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 283(1): 281-285. 1997.

FREY BN; FONSECA MMR; MACHADO-VIEIRA R; SOARES JC; KAPCZINSKI F. Anormalidades neuropatológicas e neuroquímicas no transtorno afetivo bipolar. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 26(3): 180-188.2004.

FREY BN; MARTINS M ; PETRONILHO FC; DAL-PIZZOL ; QUEVEDO J, KAPCZINSKI F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disorders** 8: 275-80.2006a.

FREY BN; ANDREAZZA AC; CERESER KM; MARTINS MR; VALVASSORI SS; RÉUS GZ; QUEVEDO J; KAPCZINSKI F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Science** 79: 281-286. 2006b.

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. **Journal of Psychiatry & Neuroscience** 31: 326-332. 2006c.

FREY BN, VALVASSORI SS; RÉUS GZ; MARTINS MR; PETRONILHO FC; BARDINI K; DAL-PIZZOL F; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Changes in antioxidante defense enzymes after d-amphetamine exposure; implication as an animal model of mania. **Neurochemical Research** 31 (5): 699-703. 2006d.

- FREY BN, VALVASSORI SS; GOMES KM; MARTINS MR; DAL-PIZZOL F; KAPCZINSKI F; QUEVEDO J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. **Brain Research** 1097(1): 224-229. 2006e.
- FREY B; ANDREAZZA A; KUNZ M; GOMES F; QUEVEDO J; SALVADOR M; GONÇALVES CA; KAPCZINSKI F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 31 (1): 283-285. 2007a.
- FREY BN; ANDREAZZA AC; NERY FG; MARTINS MR; QUEVEDO J; SOARES JC; KAPCZINSKI F. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. **Behavioural Pharmacology** 18 (56) : 419-430.2007b.
- FROISSARD P; MONROCQ H; DUVAL D. Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. **European Journal of Pharmacology** 326: 93–99. 1997.
- FUKAMI G; HASHIMOTO K; KOIKE K; OKAMA N; SHIMIZU E; IYO M. Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. **Brain Research** 1016: 90-95. 2004.
- GOODWIN FK; FIREMAN B; SIMON GE. Suicide risk in bipolar disorder during treatment with lithium and divalproex. **The Journal of American Medical Association** 290: 1467-1473. 2003.
- GOULD TJ; KEITH RA; BHAT RV. Differential sensitivity to lithium's reversal of amphetamine-induced open-field activity in two inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research** 118 : 95-105. 2001.

- GLUCK MR; MOY LY; JAYATILLEKE E. Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. **Journal of Neurochemistry** 79: 152-160. 2001.
- HALLIWELL B. Oxidants and human disease: some new concepts. **The FASEB Journal** 1: 358-364. 1987.
- HALLIWELL B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? **Free Radical Biology & Medicine** 7:645-651. 1989.
- HALLIWELL B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging** 18, 685-716. 2001.
- HALLIWELL B. Proteasomal dysfunction; a common feature of all neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. **Antioxidants & Redox Signaling** .8 (11-12): 2007-2019. 2006.
- HALLIWELL B; GUTTERIDGE, JM. Lipid peroxidation in brain homogenates : the role of iron and hydroxyl radicals. **Journal of Neurochemistry** 69, 1330-1331.
- HARRIS JE; BALDESSARINI RJ. Uptake of (3H)-catecholamines by homogenates of rat corpus striatum and cerebral cortex: effects of amphetamine analogues. **Neuropharmacology** 12: 669-679. 1973.
- HEIKKILA RE; ORLANSKY H; MYTILINEOU C; COHEN G. Amphetamine: evaluation of D- and L-isomers as releasing agents and uptake inhibitors for 3H-dopamine and 3H-norepinephrine in slices of rat neostriatum and cerebral cortex. **Pharmacology & Experimental Therapeutics** 194: 47-56. 1975.
- HOLMES JC; RUTLEDGE CO . Effects of the D- and L-isomers of amphetamine on uptake, release and catabolism of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine in several regions of rat brain. **Biochemical Pharmacology** 25: 447-45.1976.

- JAY TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Progress in Neurobiology** 69: 375–390. 2003.
- JIANG H; LUAN Z; WANG J; XIE J. Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. **Neurochemistry International** 49: 605-609.2006.
- JONES SR; GAINETDINOV RR; WIGHTMAN RM; CARON MG. Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. **The Journal of Neuroscience** 18: 1979-1985. 1998.
- KATO T; KATO N. Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. **Bipolar Disorders** 2 (3 Pt 1): 180-190. 2000.
- KOOB GF; BLOOM FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science** 242 : 715-723. 1988.
- KOPIN I J. The pharmacology of Parkinson's disease therapy: An update. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 32: 467–495. 1992.
- KOKOSHA JM; VAUGHAN GR; HANSON GR; FLECKENTEIN AE. Nature of methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporters. **European Journal of Pharmacology** 361: 269-275. 1998.
- KOOB GF; BLOOM FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science** 242: 715-723. 1988.
- KUDIN AP; DEBSKA-VIELHABER G; KUNZ WS. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 59, 163-168.
- KUHAR MJ; RITZ MC; BOJA JW. The dopamine hypothesis os the reinforcing proprieties of cocaine. **Trends of neuroscience**. 14: 299-302. 1991.

- KULUGLU M; USTUNDAG B; ATMACA M; CANATAN H; TEZCAN AE; CINKILINK N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Cell Biochemistry and Function** 20:171-175. 2002.
- LARA, D. **Temperamento Forte e Bipolaridade**. 4.ed. Porto Alegre. Sandra Simon. 2004. 120p.
- LAVOIE MJ; HASTINGS TG. Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. **The Journal of Neuroscience** 19: 1484–1491.1999.
- LEDOCK JR; CHENG KH; AL-QUS IH; SIM I; KOCK CJ; KRUUV J. Hyperthermia-induced inhibition of respiration and mitochondrial protein denaturation in CHL cells. **International Journal of Hyperthermia** 3(2):123-132. 1987.
- LEVINE RL; GARLAND D; OLIVER CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology** 186: 464–478. 1990.
- LOWRY OH; ROSEBROUGH AL; RANDAL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193: 265–275. 1951.
- MACHADO-VIEIRA R; KAPCZINSKI F; SOARES JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** 28: 209-224. 2004.
- 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 maniac episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neuroscience Letters** 421 (1): 33-36. 2007.
- MANJI H; DUMAN R. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorder: implications for the development of novel therapeutics. **Psychopharmacology Bulletin** 35: 45-49. 2001.
- MANJI HK; QUIROZ JA; PAYNE JL; SINGH J; LOPES BP; VIEGAS JS; ZARATE CA. The underlying neurobiology of bipolar disorder. **World Psychiatry** 2:3, oct. 2003.
- MARTINEZ D; SLIFSTEIN M; BROFT A; MAWLAWI O; HWANG DR; HUANG Y; COOPER T; KEGELES L; ZARAHN E; ABI-DARGHAM A; HEBER SN; LARUELLE M. Imaging human mesolimbic dopamine transmission with positron emission tomography. Part II. Amphetamine-induced dopaminerelease in the functional subdivisions of the striatum. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** 23: 285–300. 2003.
- MIQUEL J; FERRANDIZ ML; DE JUAN E; SEVILA I; MARTINEZ M. N-acetyl-cysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. **European Journal of Pharmacology** 292: 333-335. 1995.
- MORENO RA; MORENO DH; RATZEZ R. Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar. **Rev. Psiq.Clín.**32 supl1: 39-48. 2005.
- MU D; CHANG YS; VEXLER ZS; FERRIERO DM. Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. **Experimental Neurology** 195: 407-415. 2005.
- NASH JF; YAMAMOTO BK. Methamphetamine neurotoxicity and striatal release: comparison to 3,4-methylenedioxyamfetamine. **Brain Research** 581: 237-243. 1992.

- NYSTROM T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal** 24(7):1311-1317 .2005.
- ONG WY; LU XR; HU CY; HALLIWELL B. Distribution of hydroxynonenal-modified proteins in the Kainate-lesioned rat hippocampus: evidence that hydroxynonenal formation precedes neuronal cell death. **Free Radical Biology & Medicine** 28, 1214-1221. 2000.
- OLANOW CF. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. **Annals of Neurology** 32: S2–S9. 1992.
- O'CALLAGHAN JP; MILLER DB. Neurotoxicity amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. **Annals of New York Academy of Science** 648: 371–382. 1994.
- OTMAKHOVA NA; LISMAN JE. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. **The Journal of Neuroscience** 16: 7478–7486. 1996.
- PARK MJ; LEE SK; LIMA MA; CHUNG HS; CHO SI; JANG CG; LEE SM. Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. **Brain Research** 1109: 176-182. 2006.
- PRASS K; RUSCHER K; KARSCH M; ISAEV N; MAGOW D; PRILLER J; SCHARFF A; DIRNAGL U; MEISEL A. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism** 22: 520-525. 2002.
- PREHN JH . Mitochondrial transmembrane potential and free radical production in excitotoxic neurodegeneration. **Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 357: 316-322.1998.

- REED DJ; FARRISS MW. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacological Reviews** 36: 255-335. 1984.
- RICHARTE GA; SEIDEN LA; SCHUSTER CR. Increased dopamine metabolism in rat neostriatum after toxic doses of D-methylamphetamine. **Neuropharmacology** 22: 1383–1388. 1983.
- RITTER C; ANDRADES ME; REINKE A; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JC; DAL-PIZZOL F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine** 32: 342-9. 2004a.
- RITTER C; REINKE A; ANDRADES M; MARTINS MR; ROCHA J; MENNA-BARRETO S; QUEVEDO J; MOREIRA JC; DAL-PIZZOL F. Protective effect of N-acetylcysteine and deferoxamine on carbon tetrachloride-induced acute hepatic failure in rats. **Critical Care Medicine** 32: 2079-2083. 2004b.
- RITTER C; DA CUNHA AA; ECHER IC; ANDRADES M; REINKE A; LUCCHIARI N; ROCHA J; STRECK EL; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JC; DAL-PIZZOL F. Effects of N-acetylcysteine plus deferoxamine in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in the rat. **Critical Care Medicine** 34: 471-477. 2006.
- SAGRISTA ML; GARCIA AF; MADARIAGA MA; MORA M . Antioxidant and pro-oxidant effect of the thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. **Free Radical Research** 36: 329–340. 2002.
- SHAO L; YOUNG LT; WANG JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cells. **Biological Psychiatry** 58 (11): 879-884.2005.

- SCHINDER AF; OLSON EC; SPITZER NC; MONTAL M. mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience** 16: 6125-6133.1996.
- SCHULTZ W; DAYAN P; MONTAGUE PR. A neural substrate of prediction and reward. **Science** 275: 1593- 1599. 1997.
- SERRA G; ARGIOLAS A; KLIMEK F; FADDA F; GESSA GL. Chronic treatment with antidepressants prevents the inhibitory effect of small doses of apomorphine on dopamine synthesis and motor activity. **Life Science** 25: 59- 64. 1979.
- SKONIECZNA M; KRUSZEWSKA J; BICZ W. Oxidation in brain mitochondria of rats exposed to heat. **Neuropatologia polska** 25(2):177-185. 1987.
- SPENCER JP; JENNER P; DANIEL SE; LEES AJ; MARSDEN DC; HALLIWELL B. Conjugates of catecholamines with cysteine and GHS in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. **Journal of Neurochemistry** 71, 212-2122.1998.
- SOLOV'eva ME; SOLOV'EV VV; FASKHUTDINOVA AA; KUDRIAVTSEV AA; AKATOV VS. Prooxidant and cytotoxic action of N-acetylcysteine and glutathione combined with vitamin B12b. **Tsitologija** 49: 70-8. 2007.
- STOKES AH; HASTINGS TG; VRANA KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. **Journal of Neuroscience Research** 55: 559– 65. 1999.
- STRAKOWSKI SM; SAX KW. Progressive behavioral response to repeated D-amphetamine challenge: further evidence for sensitization in humans. **Biological Psychiatry** 44 (11): 1171-1177. 1998.
- 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. **Journal of Psychiatry & Neuroscience** 31(3):189-196. 2006.

- TARASI FI; BALDESSARI RJ. Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. **J neurosci res** 55: 401-410. 1999.
- WAN FJ; TUNG CS; SHIAH IS; LIN HC. Effects of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine on hydroxyl radical formation and dopamine depletion in the rat striatum produced by d-amphetamine. **European Neuropsychopharmacology** 16: 147-153. 2006.
- WANG JF; AZZAM JE; YOUNG LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. **Neuroscience** 116(2): 485-489. 2003.
- WISE RA; BOZARTH MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychological Review** 94: 469-492. 1987.
- XIONG Y; PETERSON PL; LEE CP. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. **Journal of Neurotrauma** 16:1067-1082. 1999.
- YAMAMOTO BK; ZHU W. The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. **Pharmacology & Experimental Therapeutics** 287: 107-14. 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)