

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Avaliação do Estresse Oxidativo em Tecido Cerebral de  
Ratos Submetidos a Choque Eletroconvulsivo

Tatiana Barichello

Orientador  
Prof. Dr. Ivan Izquierdo

Co-orientador  
Prof. Dr. João Quevedo

Porto Alegre  
2004

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Avaliação do Estresse Oxidativo em Tecido Cerebral de  
Ratos Submetidos a Choque Eletroconvulsivo

Tatiana Barichello

Orientador  
Prof. Dr. Ivan Izquierdo

Co-orientador  
Prof. Dr. João Quevedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre  
2004

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Izquierdo, agradeço a confiança depositada em mim para trilhar o caminho do Mestrado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Quevedo, austero, exigente, devo tudo que sei.

Ao Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol, que com seu conhecimento e dedicação tornou possível a realização dos experimentos.

Ao Centro de Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica da UFRGS, nas pessoas do Prof. Dr. Jose Cláudio F. Moreira e de Fernanda Bonatto, agradeço o apoio recebido.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Neurotoxicologia da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC): Gustavo, Fabiano, Rodrigo e Adalisa.

A minha companheira de final de mestrado, Jucelia: acredito que nossa caminhada esta somente começando.

A minha universidade, UNESC, que com sua infra-estrutura tornou possível a realização dos experimentos que compõe essa dissertação.

Ao Vice-Reitor, Prof. Gildo Volpato, agradeço o apoio e a confiança dedicada a minha pessoa.

Aos meus pais, Ângelo e Irmã, que sempre estiveram ao meu lado, e inúmeras vezes transformaram a vida mais suave, mais iluminada e mais fácil de viver.

Ao meu irmão, Tito Livio, companheiro de sonhos e planos, agradeço o incentivo e a companhia em horas de estudo.

“Aos amores da minha vida, João e João Luís, através de vocês descobri como a vida é maravilhosa, e que a felicidade se encontra em pequenos detalhes, basta um sorriso de vocês”.

## ABREVIATURAS

ACTH : adrenocorticotrofina

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*

CAT: catalase

CCK: colecistoquinina

CuZnSOD: superóxido dismutase dependente de cobre e zinco.

DNA: ácido desoxiribonucléico

EAO: espécies ativas de oxigênio

ECS: choque eletroconvulsivo

ECT: eletroconvulsoterapia

GABA: ácido aminobutírico

GPX: glutationa peroxidase

GSH: glutationa reduzida

GSSG: glutationa oxidada

H<sub>2</sub>O: água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HO<sub>2</sub><sup>•</sup>: radical hidroperoxila

MnSOD: superóxido dismutase dependente de manganês

NPY: neuropeptídeos Y

O<sub>2</sub>: oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>-•</sup>: superóxido

OH: hidroxila

<sup>•</sup>OH: radical hidroxil

SNC: Sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

SS: somatostatina

5-HT: serotonina

## RESUMO

(Tatiana Barichello - Avaliação do Estresse Oxidativo em Tecido Cerebral de Ratos Submetidos a Choque Eletroconvulsivo) Apesar dos inúmeros avanços ocorridos nos últimos vinte anos referentes ao refinamento do uso e a administração da terapia eletroconvulsiva de forma a minimizar os seus efeitos adversos, pouco progresso tem sido feito na compreensão dos mecanismos subjacentes aos seus efeitos terapêuticos e adversos. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar os níveis de dano oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes precocemente e tardiamente após choque eletroconvulsivo agudo ou crônico. Foi demonstrada uma diminuição na peroxidação de lipídios no hipocampo, estriado e cerebelo imediatamente após e trinta dias após uma única ou múltiplas sessões de choque eletroconvulsivo. Resultados semelhantes foram encontrados para oxidação de proteínas pelo método carbonyl no protocolo agudo. Da mesma forma, foi demonstrado um aumento nas atividades da catalase e da superóxido dismutase em diferentes tempos após único ou múltiplos choques eletroconvulsivos. Nossos resultados demonstram que após o choque eletroconvulsivo há um aumento nas atividades das enzimas antioxidantes, mas não houve demonstração de dano oxidativo no hipocampo, estriado e cerebelo.



## ABSTRACT

(Tatiana Barichello – Evaluation of oxidative stress in brain tissues of rats submitted to eletroconvulsive shock) Although several advances has occurred over the past 20 years concerning refining the use and administration of electroconvulsive therapy to minimize side effects of this treatment, little progress has been made in understanding the mechanisms underlying its therapeutic or adverse effects. Thus, this work was performed in order to determine the level of oxidative damage and antioxidant enzymes activities early and late after acute and chronic electroconvulsive shock. We demonstrated a decrease in lipid peroxidation in the hippocampus, striatum and cerebellum immediately after and up for 30 days after a single or multiple electroconvulsive shock. This was also true to protein carbonyls in the acute protocol. In this way, we demonstrated an increase in catalase and superoxide dismutase activities different times after single and multiple electroconvulsive shock. Our findings, for the first time, demonstrated that after ECS there is an increase in antioxidant enzymes activities and we cannot demonstrate oxidative damage in hippocampus, striatum and cerebellum.

## SUMÁRIO

Abreviaturas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Capítulo 1. Introdução Geral.	1
1.1. Eletroconvulsoterapia – ECT	2
1.1.1. Histórico	3
1.1.2. Refratariedade, indicações e avaliação para tratamento	6
1.1.3. Técnica bilateral e unilateral	8
1.1.4. Alterações neurobiológicas induzidas pelo ECT	10
1.2. Estresse Oxidativo	17
1.2.1. Espécies reativas do metabolismo do oxigênio	17
1.2.2. Sistemas de defesas antioxidantes	23
1.2.3. Estresse Oxidativo e sistema nervoso central	26
1.3. Objetivos e organização dos trabalhos apresentados na dissertação	28
1.4. Referências bibliográficas	29
Capítulo 2. No evidence for oxidative damage in hippocampus after acute and chronic electroshock in rats. Brain Research, submetido.	39
Capítulo 3. Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic eletroshock. Neurochemical Research, submetido.	58
Capítulo 4. Discussão Geral	85
4.1. Discussão	86

4.1.1. Avaliação do dano oxidativo no hipocampo após choque eletroconvulsivo agudo e crônico	86
4.1.2. Estudo do dano oxidativo em hipocampo, córtex, estriado e cerebelo após choque eletroconvulsivo agudo e crônico	88
4.2. Referencias Bibliográficas	90

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Eletroconvulsoterapia (ECT)

O tratamento através da eletroconvulsoterapia tem sido disponibilizado há mais de 60 anos e é ainda o mais efetivo tratamento antidepressivo disponível (McCall et al., 2001). O ECT é um tratamento altamente eficaz, com indicações precisas, e com dificuldade em revelar os processos bioquímicos responsáveis pelo seu sucesso terapêutico. Na aurora da integração do processo entre mente e cérebro, a elucidação das engrenagens biológicas da estabilização aguda dos quadros depressivos e psicóticos ocasionada pela ECT certamente será uma contribuição maior. O estado atual do conhecimento científico acerca dele já permite apontar casos e situações específicas onde há um máximo benefício do método, o perfil daqueles mais adequadamente indicados a receberem o tratamento e alterações bioquímicas que vêm candidatando-se a um papel não meramente coadjuvante nas bases biológicas dessa importante ferramenta do atual arsenal terapêutico em psiquiatria. O ECT continua a ter um papel estabilizado e importante no manejo e tratamento de depressões resistentes, catatonia, síndrome neuroléptica maligna (Eranti et al., 2003), depressão bipolar, esquizofrenia e doença de Parkinson (Pekary et al., 2000), além de não existirem evidências que o ECT cause danos estruturais no cérebro (Devanand et al., 1994). Entretanto, apesar dos avanços em segurança e técnica na rotina do uso da eletroconvulsoterapia, é ainda um dos mais negligenciados tratamentos em psiquiatria (Eranti et al., 2003).

### 1.1.1. Histórico

Um dos primeiros investigadores a induzir convulsões sistemáticas como método terapêutico no século passado foi Ladislav Joseph von Meduna. Ao examinar os cérebros de pacientes do hospital psiquiátrico de Budapeste, acreditou que havia um espessamento da neuroglia de pacientes epiléticos, enquanto nos esquizofrênicos parecia ocorrer o oposto. Essa observação, nunca comprovada, levou-o a postular haver um antagonismo entre epilepsia e estados psicóticos, e que a indução de crises convulsivas poderia ter um papel terapêutico no manejo desses. Para obtê-las, usou uma injeção intramuscular de cânfora, o que foi capaz de produzir uma crise do tipo grande mal por aproximadamente 45 minutos após a aplicação. O paciente escolhido fora um catatônico em estado de mutismo quase completo há quatro anos. Após a quinta injeção, o paciente levanta de sua cama e pede algo para comer. O seu discurso torna-se coerente, embora apresentasse lapsos de memória. Quando toma conhecimento de que estava no asilo há quatro anos, o paciente fica incrédulo (Shorter, 1997). A cânfora é posteriormente substituída por pentilenotetrazol, mas a agonizante fase de espera pela crise convulsiva, e o mal estar profundo do paciente nesse período, levam a procurar outros métodos de indução da crise convulsiva (Thuillier, 1999). Dessa maneira, o Professor Ugo Cerletti e seu médico residente Lucio Bini, na Universidade de Roma, no dia 18 de abril de 1938, após a aplicação de dois choques elétricos subconvulsivos através de um aparelho primitivo montado pelo último, já com o paciente implorando - “De novo não! Irá me matar!”- ignoram os apelos e colocam o aparelho na voltagem máxima, conseguindo uma crise convulsiva nessa terceira tentativa,

inaugurando um método que, com algumas alterações, permanece em uso até hoje (Dubovski, 1995).

O uso da ECT difundiu-se rapidamente e, nas suas duas primeiras décadas, houve uma progressiva aceitação e refinamento na técnica de aplicação. Abram Bennett, na Universidade de Nebraska, administrava curare para crianças com paralisia espástica. Em 1939, num encontro fortuito com o neurologista Walter Freeman, posteriormente celebrizado pela realização em série de lobotomias em excursões pelos Estados Unidos, esse sugeriu que o fármaco poderia ser usado para reduzir as taxas de fraturas associadas à ECT. A ele, logo se incorporou o uso sistemático de anestésicos gerais. Assim, houve uma primeira época de ampla utilização do método em diversos hospitais e clínicas psiquiátricas, não só na Europa e Estados Unidos, mas mundialmente. No Rio Grande do Sul, Álvaro Murillo da Silveira introduziu em 1942, no Hospital Psiquiátrico São Pedro, a eletroconvulsoterapia usando um aparelho construído pelo engenheiro Olmiro Ilgenfritz. (Busnello, 1995).

Nos anos 1960 e 70, há uma marcada diminuição na utilização da ECT, não só pelo advento da psicofarmacologia, mas principalmente pelo movimento antipsiquiátrico, que influenciou as elites universitárias gerando um sentimento de desconforto e raiva na sociedade contra as internações psiquiátricas e a psiquiatria de um modo geral. Uma queda de 46% no uso de ECT entre os anos de 1975 a 1980 foi demonstrada em um levantamento do National Institutes of Mental Health (Thompson et al., 1994). Na Europa, a prática do ECT é distribuída desigualmente (Philpot et al., 2002). O ECT está disponível somente em centros especializados na Bélgica, Alemanha, e com limitada disponibilidade na Polónia e Roménia. A ECT é proibida em varias partes da Suíça desde 1994, e não pode ser utilizado na Slovenia, mas é comumente usado em algumas partes da Índia (Eranti et al., 2003).

Ao longo de sua história, as indicações para o uso do ECT têm sido ditadas não pelos resultados que demonstra em ensaios clínicos, mas pelas percepções do público, meio cultural onde ele é empregado e por inclinações dos profissionais que lidam com transtornos mentais graves, além de peculiaridades da legislação local (Winslade et al., 1984). Hoje, mesmo com indicações precisas para diagnósticos definidos, a realização da ECT ainda está sujeita a esses fatores, o que explica taxas altamente discrepantes de utilização entre diferentes populações. Dados demonstram que há, proporcionalmente, uma maior utilização por membros das classes média e alta (Babigian & Guttmancher, 1984), ao contrário do que ocorria na década de 1950 quando classes desprivilegiadas tinham uma maior probabilidade de serem submetidas ao procedimento (Hermann et al., 1995). Negros são sub-representados entre aqueles que recebem ECT (Thompson et al., 1994). Hospitais privados aplicam mais que os públicos (Thompson et al., 1987) e a presença de um centro acadêmico na área aumenta a chance de aplicação (Hermann et al., 1995). Idade e sexo devem ser destacados quando se fala da distribuição demográfica da ECT. Os estudos já mencionados do NIMH demonstraram que mulheres eram 71% dessa população em 1986. Idosos têm formado uma importante fatia da distribuição etária. Sua baixa tolerância às medicações psiquiátricas mais potentes pode explicar, em parte, esse fato. Além desses, atualmente temos o diagnóstico como um importante preditor de uso, sendo os Transtornos do Humor a principal categoria representada.



### 1.1.2. Refratariedade, indicações e avaliação para tratamento.

Apesar das discrepâncias em seus índices de utilização e as percepções negativas do público em geral quanto à sua administração, a ECT tem conseguido estabelecer de maneira cada vez mais firme o seu papel no arsenal terapêutico atual. Isso se deve, em primeiro lugar, ao rigor das avaliações às quais foi submetida (UK ECT Review Group, 2003). A comunidade psiquiátrica pode, graças a esses ensaios, oferecer respostas com bastante credibilidade às principais perguntas sobre o tratamento. Esses testes rigorosos, observados num contexto histórico, definiram com maior precisão as indicações, ou mostraram suas limitações para determinadas doenças. Adeptos à técnica foram levados a avaliações mais criteriosas de seu posicionamento, do mesmo modo que aqueles mais descrentes tiveram provas que pediam uma reconsideração de seus posicionamentos.

Índices demonstrando resposta em até 85% dos casos já foram publicados (Crowe, 1984; UK ECT Review Group, 2003). Acreditamos que, nas condições atuais, onde se vêem pacientes refratários como uma parcela importante daqueles submetidos à ECT, isso seja um número otimista. No passado, tínhamos na intolerância aos antidepressivos uma das principais indicações para ECT, o que levava um grande número de idosos em primeiro episódio depressivo grave a serem submetidos ao tratamento. Sabe-se, agora, que nesta população o método goza de excepcional eficácia (Sackeim et al., 1993). O advento dos novos antidepressivos, principalmente após a introdução dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, fez com que o perfil da população encaminhada para tratamento mudasse. Agora, dificilmente são levados à ECT pacientes que já não tenham sido

submetidos a um curso adequado de tratamento com fármacos, o qual não logrou sucesso (UK ECT Review Group, 2003).

As evidências mais robustas avaliaram o uso da ECT em três diagnósticos psiquiátricos – depressão, mania e esquizofrenia. Esses trabalhos mostraram se o tratamento era indicado nestas circunstâncias e o tamanho de seu efeito. Na depressão, as evidências apontando sua eficácia são fartas (UK ECT Review Group, 2003). Nos primeiros anos após seu estabelecimento, relatos de caso e estudos não controlados apoiavam sua indicação, e, com o rigor epidemiológico surgido a partir dos anos 1970, trabalhos controlados foram realizados submetendo-a novamente ao crivo científico (Crowe, 1984). Os resultados, mais uma vez, demonstraram sua eficácia. Uma metanálise demonstrou que, em quadros depressivos, a ECT era superior a todos demais grupos de comparação. Havia grupos em uso de antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoaminoxidase, além de um grupo placebo, onde o participante era levado à sala de ECT, submetido ao procedimento anestésico padrão do estudo e tinha inclusive os eletrodos posicionados, apenas não recebendo o choque eletroconvulsivo (“*sham treatment*”) (Janicak et al., 1985).

A indicação da ECT para quadros agudos de mania, apesar de infrequente, não é controversa. O ECT, nesse caso, é considerado como uma segunda opção devido à presença de psicofármacos com um desempenho adequado na resolução dos episódios. Normalmente, ele é ativado nos casos refratários à medicação (Mukherjee et al., 1994). Um estudo controlado demonstrou o ECT como superior ao lítio ao final de oito semanas (Small et al., 1988). Todavia, no estudo de seguimento o comportamento dos grupos não demonstrou diferença significativa na reincidência de crises maníacas. Em um estudo averiguando o uso de ECT concomitante à clorpromazina comparado a um grupo utilizando

o antipsicótico sem ECT, o tratamento combinado foi superior em reduzir o tempo necessário para o controle do episódio bem como atingiu um maior número de indivíduos livres de doença ao final do estudo (Sikdar et al., 1994).

Ao contrário dos quadros maníacos e depressivos agudos, no controle dos sintomas psicóticos, a ECT não demonstra uma efetividade tão evidente. Estudos antigos já propunham que o manejo das psicoses era melhor estabelecido através do uso de medicações e que essas seriam superiores à ECT. Este teria lugar, novamente, em casos refratários (May et al., 1976).

O encaminhamento do paciente à ECT deve ser encarado como um marco no tratamento e não como apenas mais um passo na escalada terapêutica. Uma das principais causas de falha terapêutica deste procedimento é o erro diagnóstico. Então, temos, nesse momento, o tempo ideal para uma reavaliação psiquiátrica completa, incluindo exames clínicos.

E, principalmente pelo fato de haver um desconforto público quanto à aplicação da ECT, a sua associação a uma psiquiatria rigorosa quanto aos seus diagnósticos e precisa nas suas indicações terapêuticas é fundamental para uma mudança na percepção errônea que a sociedade tem dela (UK ECT Review Group, 2003).

### 1.1.3. Técnica bilateral e unilateral direita

Até meados da década de 1990, acreditava-se que o efeito antidepressivo da ECT estivesse relacionado à crise convulsiva por ele gerada. Sugeria-se, e era amplamente aceito, que convulsões com mais de 25 segundos de duração eram suficientes para obtenção

de efeito antidepressivo (Fink et al., 1982). Isso levou muitas clínicas a tentarem obter uma convulsão tônico-clônica generalizada com a menor dose de energia possível, almejando, dessa forma, uma minimização dos efeitos adversos sobre a memória. Sackeim e colaboradores (2000) questionaram essa conclusão e demonstraram em ensaios clínicos controlados que a resposta terapêutica ao ECT era dose dependente.

Não só a dosagem de energia foi estudada como um fator importante nos desfechos do procedimento, mas o método de posicionamento dos eletrodos durante o choque eletroconvulsivo também (Sackeim et al., 1987). O objetivo dessas investigações passou a ser a descoberta da dose associada com uma taxa de resposta terapêutica ideal e um mínimo de efeitos adversos sobre a cognição. Um elegante ensaio randomizado controlado comparou a técnica bilateral com a unilateral em três diferentes intensidades de dosagem. A taxa de resposta nos grupos que receberam dosagem alta pela técnica unilateral e bilateral foi semelhante e superior àquelas percebidas nos grupos submetidos à dosagem baixa e moderada pelo método unilateral (Sackeim et al., 2000).

Diversos estudos tentaram avaliar os efeitos desses métodos sobre a cognição dos pacientes. Porém os instrumentos e métodos utilizados nesses estudos deixavam margem para ocorrência de vieses. Lisanby e colaboradores (2000) construíram um instrumento de avaliação de memória desenvolvido especificamente para o estudo da memória quanto a fatos autobiográficos e impessoais em sujeitos submetidos à ECT e aplicaram-no em pessoas submetidas às técnicas bilateral e unilateral em diferentes dosagens. Os resultados após dois meses de seguimento demonstraram que os prejuízos eram mais pronunciados em eventos impessoais do que nos pessoais e na técnica bilateral mais do que na unilateral independente da dosagem aplicada. Efeitos persistentes sobre a memória carecem de evidências controladas como as fornecidas por esse elegante ensaio. Todavia, ressaltamos

que existem relatos de amnésia permanente para eventos ocorridos próximos aos dias do tratamento (Squire et al., 1983).

#### 1.1.4. Alterações neurobiológicas induzidas pelo ECT

O entendimento dos mecanismos pelo qual a ECT melhora sérios transtornos mentais poderia levar a tratamentos mais seguros e efetivos. As pesquisas nesse sentido fazem uso do choque eletroconvulsivo (CEC) como modelo animal de eletroconvulsoterapia (Busnello et al., 2004). Os fatos disponíveis têm demonstrado ser muito mais fácil descobrirem-se alterações em diversos sistemas fisiológicos do que acusar precisamente quais dessas respondem pela eficácia do CEC. Obviamente, um evento tal qual a crise convulsiva, ainda mais provocada pela aplicação de uma descarga elétrica direta, é a manifestação dramática de uma diversidade de processos bioquímicos subjacentes. Isso atrai o interesse de cientistas que avidamente medem quaisquer variáveis relacionadas ao sistema nervoso central, com uma considerável chance de encontrarem diferenças significativas quando comparados pacientes ou cobaias submetidos ao CEC com controles adequados. Infelizmente, determinar quais variáveis alteradas respondem diretamente pelo efeito antidepressivo do choque não é igualmente fácil. Desse modo, consideramos mais apropriado falar-se em alterações do que em bases neurobiológicas da ECT.

Dentre as alterações endócrinas, a prolactina foi um dos hormônios mais investigados. Ela é liberada de maneira aguda após cada aplicação, atingindo um pico em 15 a 30 minutos (Whalley et al., 1987). Este aumento rápido do nível da prolactina

prolactina plasmática tem sido confirmado em animais e humanos. Entretanto, o mecanismo mediado desta resposta parece desconhecido (Golan et al., 1993; Papakostas et al., 1988).

O eixo hipotálamo-hipofise-tireóide demonstra um rápido aumento nos níveis de TSH logo após o CEC. Esse aumento diminui a cada choque, o que pode ser relacionado com a também decrescente duração das convulsões ao longo das diversas sessões de tratamento. Esse fenômeno é comum à maioria dos cursos de ECT, não se relacionando com desfecho clínico (Papakostas et al., 1990). Postulou-se, também, que o uso de triiodotironina concomitante às sessões resultaria numa melhor eficácia do procedimento. Apesar de achados sustentando essa hipótese, o uso da técnica não logrou consagração clínica e foi incapaz de estimular a realização de estudos posteriores metodologicamente adequados que esclarecessem o seu verdadeiro desempenho na otimização dos resultados da ECT (Stern et al., 1991). A convulsão induzida tem sido relacionada ao aumento da síntese e ação do TRH em muitas regiões límbicas (Sattin et al., 1994). Uma teoria do mecanismo de ação da ECT, a hipótese diencefálica, assumiu que o grau da resposta de ECT foi relacionado com a estimulação das estruturas subcorticais que regulam a atividade do eixo endócrino hipotálamo-hipofisário. A estimulação desse sistema resultou na liberação de hormônios hipofisários como a adrenocorticotrofina (ACTH), tirotrófina, prolactina, ocitocina e vasopressina. Entretanto, o eixo neuroendócrino hipotálamo-hipofise-tireoide é o mais extensamente estudado em depressão, e é controlado por vários sistemas de neurotransmissores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença (Esel et al., 2002).

O metabolismo cerebral de glicose e o fluxo sanguíneo cerebral foram avaliados em animais e humanos submetidos a ECT (Obergruesser et al., 2003; Sartorius et al., 2003).

Estudos em ratos demonstraram significativa redução no metabolismo da glicose um dia após o último CEC (Ackermann et al., 1986). Do mesmo modo, em humanos, uma diminuição nos índices metabólicos foi demonstrada após um curso de ECT (Obergruesser et al., 2003). Essas alterações não foram correlacionadas com resposta clínica. Um estudo conseguiu demonstrar correlação entre melhor taxa de remissão de episódio depressivo e diminuição no metabolismo cerebral de glicose imediatamente após a última aplicação da série de CECs (Ackermann et al., 1986).

O ECS produz várias alterações no sistema serotoninérgico (5-HT). A ativação nos receptores 5-HT<sub>3</sub> da serotonina aumenta a liberação de dopamina e colecistoquinina no estriado e no córtex (Blandina et al., 1989), mas inibe a liberação de acetilcolina no córtex (Barnes et al., 1989). Na região hipocampal CA1, a ativação do 5-HT<sub>3</sub> é conhecido por aumentar a liberação de noradrenalina e ácido aminobutírico (GABA) (Feuerstein et al., 1986). Em animais, o uso do eletrochoque foi reportado como potenciador serotoninérgico nos neurônios corticais (De Montigny et al., 1984). Foi demonstrado que o receptor 5-HT<sub>1A</sub> foi potencializado após repetição de CECs em ratos (Ishihara & Sasa, 1999) e houve um aumento na densidade do receptor no giro dentado do hipocampo (Hayakawa et al., 1994). Os efeitos do ECS no 5HT permanecem desconhecidos (Ishihara et al., 2001).

Recentes experimentos têm demonstrado que diferentes neurotransmissores que sintetizam enzimas, neuropeptídeos, e receptores para neurotransmissores podem ser afetados pela ECS (Brodin et al., 1989). Especialmente, ambos neuropeptídeos Y (NPY) e somatostatina (SS) são alterados em específicas regiões do cérebro pela ECS (Mathé et al., 1994). NPY e SS mostram várias ações no cérebro e tem uma variedade de efeitos (Heilig et al., 1994). NPY, um peptídeo com 36 aminoácidos, é um membro da família dos polipeptídeos pancreáticos (Tatemoto et al., 1982), e aparece no cérebro principalmente na

forma de 36 aminoácidos (Allen,1993). SS ocorre no cérebro como um peptídeo de 14 aminoácidos, mas outras formas de SS podem ser encontradas no cérebro (Benoit et al., 1982). A somatostatina (SS-LI) pode ser liberada do hipocampo e estriado *in vivo* pela despolarização estimulada e pelos efeitos da atividade neuronal desta região (Dodd et al.,1978). A concentração de NPY está reduzida em cérebros pós-mortem de indivíduos com história de transtornos depressivos (Widdowson et al.1992). Foram encontrados também reduzidos os níveis de NPY e SS no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com depressão e as concentrações desses peptídeos foram aumentando de acordo com as aplicações de ECT (Mathé et al.,1994). Estudos demonstraram que a ECT modificou a síntese, liberação e metabolismo de neuropeptídeos como NPY, SS, substância P e colecistoquinina (CCK) (Lindfors et al.,1991). Mostrou-se também um aumento nos fatores de transcrição do RNAm para serotonina, receptores GABA (Butler et al.,1993) e tirosina-hidroxilase (Leviel et al.,1990).

Estudos recentes avaliaram o uso da ECT dosando diferentes marcadores de degeneração neuronal e de células gliais (proteína tau, neurofilamentos, proteína S-100beta) no líquido cefalorraquidiano, porém não foram encontrados níveis significantes destes marcadores (Zachrisson et al., 2000). Isso apóia evidências que indicam não haver danos neuronais causados pela ECT. Outra preocupação a ser considerada seria a integridade da barreira hematoencefálica após a administração de ECT. Existe um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica imediatamente após a indução de estímulos elétricos, mas esse efeito parece ser transitório (Devanand et al., 1994). A passagem de albumina sérica marcada com rádio para o líquido cefalorraquidiano (CSF) comprova essa permeabilidade, porém 24 horas após o curso de ECT os níveis dessa passagem são reduzidos aos valores encontrados antes do início do tratamento. Portanto supõe-se que esse



aumento fugaz na permeabilidade da barreira não desempenhe um papel importante nos mecanismos antidepressivos (Devanand et al., 1994).

Estudos prévios sugerem que a ECT promove alterações duradouras na expressão gênica. Estas alterações na atividade genômica são mediadas por *immediate early genes* (IEGs) que funcionam como código para a transcrição de fatores via estímulos extracelulares na futura expressão de genes (Duman & Hosoda, 1992). Um único ECT resulta em rápido aumento na expressão de IEGs, incluindo c-fos e, ECT crônica resulta em redução de c-fos. Isto é possível porque a ECT crônica modifica o sistema 5HT em particular 5HT<sub>2A</sub>, via IEGs como a própria c-fos (Moorman et al., 1996). O *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) está implicado na diferenciação de progenitores celulares de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, sendo encontrado, também, na formação de novas sinapses, além de ter um efeito neuroprotetor. Após convulsões induzidas por ECT, ocorre aumento na expressão de RNAm para FGF-2 no hipocampo, que permanece por muitas horas após a convulsão (Gwinn et al., 2002).

Estímulos elétricos induzem ativação de proteínas de regulação associadas ao citoesqueleto (Yamagata et al., 2002). É levantada a possibilidade de que muitos tratamentos antidepressivos, incluindo a ECT, regulem fatores neurotróficos. A sinapsina é uma proteína associada às vesículas sinápticas, tendo um papel regulador na liberação de neurotransmissores, e também na organização da arquitetura do citoesqueleto no terminal pré-sináptico (Yamagata et al., 2002; Yamagata, 2003). Essa proteína é fosforilada por várias proteínas quinases. A ECT induz uma mudança bidirecional na fosforilação da sinapsina. Imediatamente após a convulsão, ocorre um rápido aumento na desfosforilação da sinapsina, o que implica em uma maior rigidez na organização da actina-citoesqueleto que modula a liberação de vesículas sinápticas. Este fato impede que ocorra uma liberação

maciça de neurotransmissores na fenda sináptica, provocada pela ECT, promovendo, assim, um efeito protetor. No entanto, alguns minutos após a convulsão, ocorre um aumento na fosforilação da sinapsina, desaparecendo a rede de actina e aumentando a liberação de neurotransmissores e, possivelmente induzindo plasticidade neural, tal como uma reorganização sináptica (Yamagata et al., 2002; Yamagata, 2003).

Estudos prévios têm demonstrado que a indução de convulsões agudas ou crônicas aumentam a expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) e seu receptor trKB, no cérebro de roedores (Lindfors et al. 1995). O mecanismo das convulsões induzidas ainda não está claro, entretanto BDNF mRNA abundante nos neurônios hipocâmpais tem sido demonstrado ser aumentado pelo CEC. A expressão de BDNF está associada à remodelação sináptica, induzindo surgimento de novas vias de fibras musgosas no hipocampo, distribuição de receptores e efeitos antidepressivos (Zetterstrom et al., 1998).

Estudos já comprovaram previamente a existência de um aumento de moléculas de adesão celular neuronal (N-CAM), as quais são envolvidas na sinaptogênese, seguido de uma série de CECs em ratos sob condições experimentais (Kragh et al., 1993). Isso sugere que os novos circuitos não são somente formados entre neurônios preexistentes, mas podem também envolver um grande número de novos neurônios. A proliferação, diferenciação e sobrevivência de neurônios granulares do giro dentado são influenciados por condições fisiológicas e ambientais.

Evidências recentes indicam que as novas células neuronais formadas integram-se funcionalmente e mostram as mesmas características anatômicas, no cérebro adulto, dos demais neurônios (Hellsten et al, 2002). Foi demonstrado um significativo aumento no número de neurônios hipocâmpais em um modelo animal de ECT, uma máxima

proliferação celular entre 3 e 5 dias depois a administração de um único choque eletroconvulsivo, na qual a taxa de proliferação aumentou aproximadamente 3 vezes quando comparada com um controle. A taxa de proliferação celular se relaciona com o número de estímulos administrados. Foi constatado que a nova geração de neurônios sobrevive por pelo menos três meses, sendo, precisamente, a área de maior proliferação a zona subgranular da borda do hilo do giro denteado. Evidências recentes indicam que esses novos neurônios interagem funcionalmente e tem as mesmas características anatômicas quando comparadas às dos neurônios antigos (Madsen et al., 2000; Hellsten et al, 2002). A atividade motora por si pode ser suficiente para induzir a neurogênese (Van Praag et al., 1999), sendo possivelmente a atividade motora ictal responsável por esse efeito. Estudos demonstraram que uma atividade elétrica sem convulsões motoras pode induzir neurogênese (Bengzon et al.,1997). Além disso, quando os animais recebem ECT sob anestesia com halotano, reduzindo assim a atividade motora, um similar aumento de células marcadas com BrdU (marcador de proliferação celular) são observadas. Esses achados indicam que a atividade cerebral por si só é suficiente para induzir neurogênese. Entretanto, em animais de laboratório, quando é administrada ECT provocando uma convulsão tônico-clônica generalizada, ocorre um aumento nas novas células nervosas (Madsen et al., 2000). A diminuição do volume do hipocampo tem sido reportado em humanos após recorrentes episódios de depressão (Sheline et al., 2003). A diminuição do volume hipocampal simultaneamente combinado com a depressão, demonstrando um aumento da neurogênese para este modelo de desordem, adiciona uma nova dimensão para a conceitualização e interesse pela ação do ECT. Os efeitos antidepressivos do ECT podem estimular a proliferação celular e a plasticidade sináptica na formação do hipocampo. (Madsen et al., 2000).

Além dos benéficos da eletroconvulsoterapia, o procedimento pode causar diminuição na memória, caracterizando as amnésias retrógrada e anterógrada, podendo ser explicadas por uma redução no número de receptores muscarínicos em diversas regiões do cérebro (Gleiter et al., 1989). Adicionalmente, mudanças no sistema glutaminérgico podem estar vinculadas (Chamberlin et al., 1998). De acordo com essas hipóteses, a ECT causa um insulto neuronal por excessiva liberação de aminoácidos excitatórios e ativação de seus receptores. Esses insultos no hipocampo durante as sessões de ECT provavelmente são importantes para a disfunção no processo de consolidação da memória. Além disso, a ECT aumenta a afinidade no sítio de ligação de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, sendo que a estimulação da neurotransmissão serotoninérgica prejudica o processo de aprendizado e memória (Erakovic et al., 2001).

### 1.2.1. Espécies Reativas do Oxigênio

O elemento oxigênio existe na atmosfera na forma diatômica O<sub>2</sub>. Com exceção de certos microorganismos unicelulares anaeróbios e aeróbios tolerantes, todos os animais, plantas e bactérias necessitam de O<sub>2</sub> para eficiente produção de energia através do uso do oxigênio dependente da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias de eucariontes (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A necessidade do O<sub>2</sub> obscurece o fato de que é um gás potencialmente tóxico e mutagênico oferecendo sérios riscos, as espécies aeróbicas sobrevivem devido a defesas antioxidantes que as protegem. Os efeitos dos danos em organismos aeróbicos variam consideravelmente com o tipo de organismo, a idade, estado fisiológico e a dieta. A toxicidade do oxigênio é influenciada pela presença na dieta de variadas quantidades de

vitaminas A, E, e C, metais tais como Zinco, Cobre e Ferro, antioxidantes sintéticos e ácidos graxos poliinsaturados (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Para formar o oxigênio molecular  $O_2$ , os dois elétrons do subnível p de um elemento oxigênio fazem intercâmbio com os dois elétrons de outro elemento oxigênio, formando um composto estável com 12 elétrons na última camada (L). Quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular  $O_2$ , este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Mello et al.,1983). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, durante este processo são formados intermediários reativos como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Ferreira et al., 1997, Cuzzocrea et al.,2001), conforme figura 1. Normalmente a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EAO é neutralizada pela entrada de quatro elétrons (Cohen, 1989). Entre as espécies reativas de oxigênio formadas o radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos (Halliwell & Gutteridge, 1990). O radical superóxido reage com alvos biológicos, sendo que o efeitos nos tecidos é resultado da formação secundaria de novos radicais livres em adição à reação do superóxido com lipídios, catecolaminas (Macarthur et al.,2000), e Dna (Dix et al.,1996).

Entre as EAO o oxigênio *single*, que é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados na ultima camada (Halliwell & Gutteridge, 1990), é reconhecido como um possível contribuinte para o estresse oxidativo nos sistemas vivos,

altamente energético e mutagênico, sendo capaz de oxidar moléculas biológicas (Cuzzocrea et al.,2001; Ravanat et al.,1992).

O  $H_2O_2$  é capaz de atravessar camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, sendo assim altamente tóxico para as células, podendo ser aumentada esta toxicidade em presença de ferro (Eaton,1991).

O radical mais reativo proposto muitos anos atrás é o  $HO_2^{\bullet}$ , produzido pela interação do  $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$  pela reação química conhecida como Haber-Weiss, traços do metal ferro na forma de íons, reage com  $H_2O_2$  produzindo o radical hidroxil, o íon ferro não está presente em vivo, mas os íons são produzidos pela ação do superóxido sobre os íons ferro armazenados em proteínas (Cuzzocrea et al.,2001). A liberação do ferro intracelular, a baixa capacidade líquórica de ligação ferro-proteína e a deficiência de enzimas antioxidantes no sistema nervoso central ampliam o risco de lesão induzida pelo trauma com a liberação de ferro (Ferreira, et al.,1997). Estas espécies ativas de oxigênio são capazes de reagir indiscriminadamente com qualquer tipo de molécula orgânica, extraíndo elétrons e gerando novos radicais livres em reação em cadeias altamente citotóxicas (Ames et al.,1993).

Quando existe um aumento na produção ou diminuição das defesas antioxidantes existe uma condição chamada de estresse oxidativo, em que os radicais livres em excesso começam a produzir danos a lipídios, proteínas, DNA, carboidratos (Halliwell & Gutteridge, 1999), inibição das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, inativação do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, inibição da atividade da SÓDIO/POTÁSSIO ATPase na membrana plasmática (Cuzzocrea, et al.,2001), levando a subsequente morte celular pela necrose ou apoptose (Evans,1993). Conforme demonstrado na figura 2. A

capacidade das células em diminuir os efeitos do estresse oxidativo é determinada pelo balanço entre as quantidades de espécies oxidantes geradas e a capacidade dos processos metabólicos de sintetizar antioxidantes (Beutler et al., 1989).

Várias enzimas cerebrais expressadas no cérebro incluindo monoaminoxidase, tirosina hidroxilase e L-aminoácido oxidase produzem  $H_2O_2$  como um subproduto normal de suas atividades. A atividade de outras enzimas neuronais podem produzir oxidantes através da ativação da fosfolipase  $A_2$  dependente de  $Ca^{2+}$ , que pode levar à liberação de ácido araquidônico, produzindo diretamente  $O_2^{\cdot-}$  através do seu subsequente metabolismo pela lipoxigenases e ciclo-oxigenases para formar eucosanóides (Gilgun-Sherki et al., 2002). A auto-oxidação de substâncias endógenas como ácido ascórbico e catecolaminas pode aumentar os níveis de peróxido de hidrogênio (Coyle & Puttfarcken, 1993). As EAO tem sido foco de interesse como possíveis candidatos para a elucidação de várias respostas na patogênese do dano agudo do sistema nervoso central e como alvo terapêutico (Bromont et al., 1989, Oliver, et al., 1990), é bem conhecido que as células gliais são mais resistentes ao estresse oxidativo do que os neurônios, provavelmente devido a *up regulation* da síntese de glutathione (Rice & Russo-Mena, 1998; Iwata-Ichikawa et al., 1999).

O estresse oxidativo gerado tem sido implicado principalmente no mecanismo neuronal de várias patologias cerebrais, incluindo doença de Alzheimer (Calabrese et al., 2003), isquemia cerebral, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica familiar, transtorno degenerativo dos neurônios motor (Ames et al., 1993, Moosmann & Behl, 2002), doença de Huntington, esquizofrenia (Rao & Balachandran, 2002), Friedreich's ataxia, citopatologias mitocondriais e outras doenças neuromusculares (Baker & Tarnoplski, 2003). Indicado também como potencial contribuinte para patologias agudas do sistema

nervoso central, após dano por acidente hemorrágico cerebral, as espécies ativas de oxigênio podem aumentar muitas vezes ocorrendo danos teciduais por diferentes caminhos molecular celulares (Gilgun-Sherki et al., 2002).

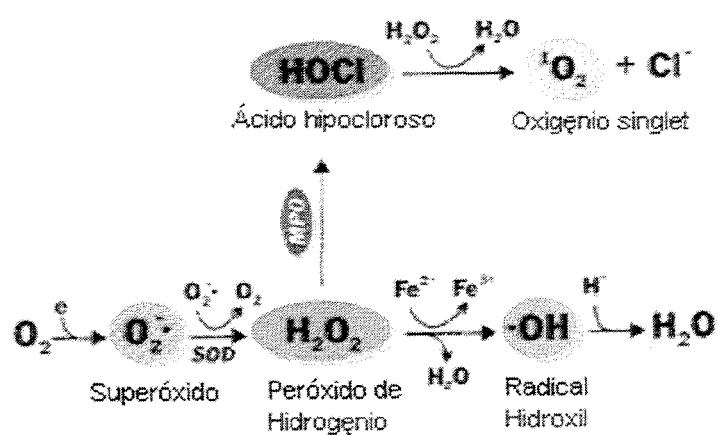


Figura 1: Formação das principais espécies ativas de oxigênio (Adaptado Ritter et al., 2004)



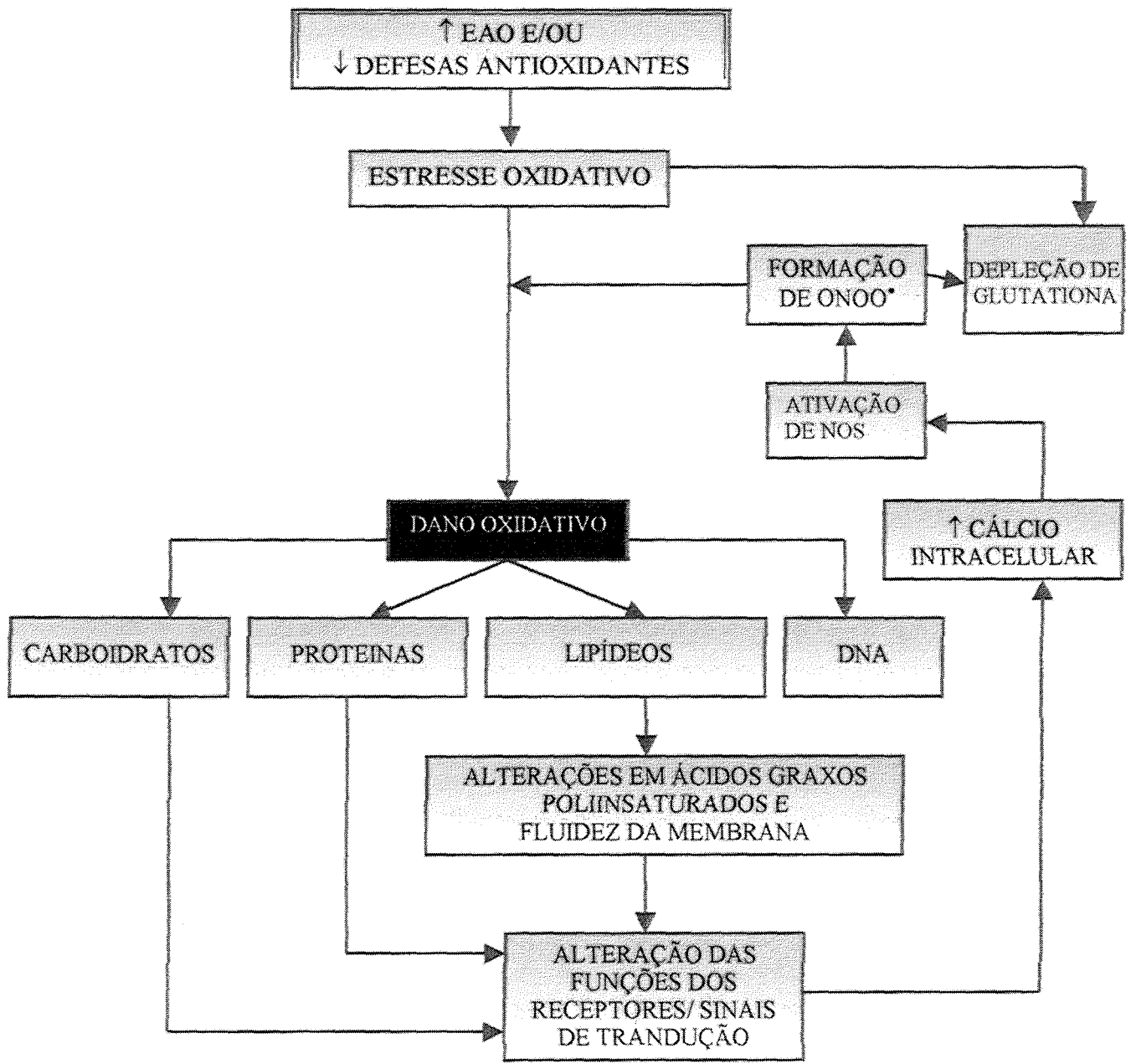


Figura 2: Principais alterações celulares geradas pelo estresse oxidativo. (EAO) espécies ativas do oxigênio; (ONOO<sup>\*</sup>) peroxinitrito; (NOS) óxido nítrico sintetase (adaptado de Halliwell & Gutteridge, 1999).

### 1.2.2. Sistemas de defesas antioxidantes

Existem distintas estratégias celulares de defesa contra os processos mediados pelas espécies ativas de oxigênio que incluem defesas enzimáticas e não enzimáticas. Estes compostos são encarregados de manter baixas as concentrações em estado estacionário das EAO, atuam prevenindo a formação ou a sua atividade uma vez formadas. As células também possuem sistemas de defesa que reparam os danos celulares ocorridos em biomoléculas (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos) (Llesuy et al.,2002).

Entre as defesas enzimáticas encontramos a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (Michiels et al.,1994; Halliwell & Gutteridge,1999), conforme figura 3 e figura 4.

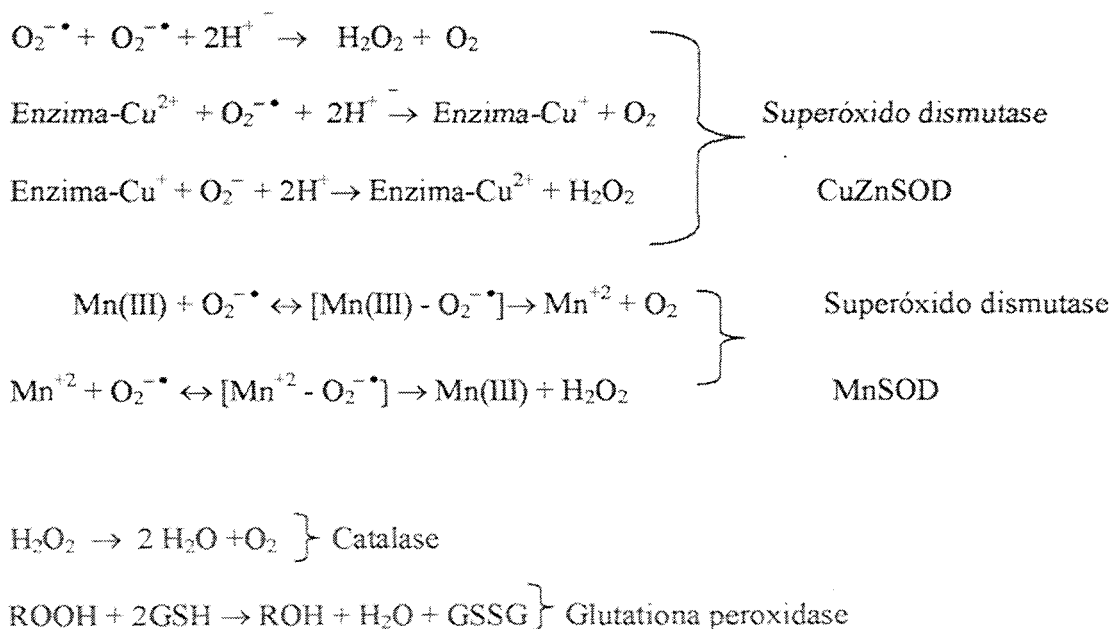


Figura 3: Principais enzimas antioxidantes em eucariontes (adaptado Halliwell & Gutteridge,1999).

A enzima CuZnSOD está presente em todas as células eucariontes. Nos animais a maioria da CuZnSOD ESTÁ localizada no citosol, algumas aparecem nos lisossomos e núcleo (Halliwell & Gutteridge,1999, Desideri et al.,2003). As CuZnSODs estão amplamente distribuídas e compreendem um total de 90% do total das SODs, esta enzima que requer Cobre e Zinco para a sua atividade, tem grande significado fisiológico e potencial terapêutico. Possui peso molecular de 32.000 daltons e contém um Cu(II) e um Zn(II) por subunidade. As subunidades estão estabilizadas por uma ligação dissulfeto entre cadeias. Esta enzima requer Cu e Zn para a sua atividade biológica e a perda do Cu resulta em completa inativação levando em muitos casos ao desenvolvimento de doenças em humanos (Noor et al., 2002). A MnSOD está amplamente distribuída nas mitocôndrias. As atividades relacionadas à MnSOD está baseada no tipo de tecido e espécie animal variando de acordo com o número de mitocôndrias presentes nas células. Normalmente contém 4 subunidades proteicas e 0.5 ou 1 íon de Mn por subunidade. A remoção do Mn do sitio de atividade da MnSOD causa perda da atividade catalítica (Halliwell & Gutteridge,1999, Noor et al.,2002). A SOD converte superóxido em peróxido de hidrogênio e representa a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (Gilgun-Sherki et al.,2002).

A catalase em mamíferos é uma hemoproteína de ampla distribuição tecidual, localizada em organelas subcelulares conhecidas como peroxissomos. Contém quatro subunidades proteicas, cada qual contém um grupo heme com Fe ligado ao sitio ativo. Forma uma reação altamente eficiente com peróxido de hidrogênio, seu único substrato, para formar água e oxigênio molecular (Halliwell & Gutteridge,1999; Llesuy et al.,2002).

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima formada por quatro subunidades de proteicas, cada qual contém um átomo do elemento Selênio (Se) ligado ao sitio ativo que é

o sítio de atividade (Halliwell & Gutteridge,1999), sua ação se baseia na oxidação da glutathiona (GSH) ao seu dissulfeto correspondente GSSG (Andreazza et al., 2004). A glutathiona reduzida (GSH,L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) contém duas subunidades protéicas, cada qual com flavina FAD no sítio ATIVO de atividade (Halliwell & Gutteridge, 1999). A GSH está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (Meister et al., 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento (-SH), presente na cisteína.. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (Galleano et al.,1995). A glutathiona é conhecida como oxiradical scavenger (Darley-Usmar & Halliwell,1996). A GSH é essencial para a desintoxicação celular pelas espécies reativas de oxigênio no cérebro. Dados recentes demonstram que além da função intracelular tem um importante papel extracelular no cérebro (Dringen & Hirrlinger, 2003).

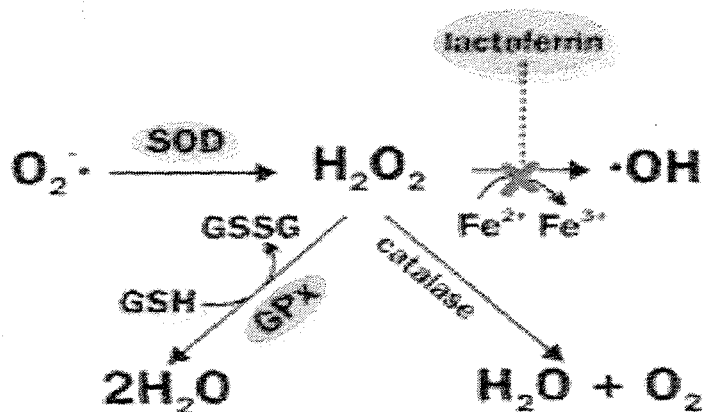


Figura 4: Defesas antioxidantes, GSH:glutathiona reduzida, GSSG:glutathiona oxidada, GPx: Glutathiona peroxidase, SOD: Superóxido dismutase, catalase (adaptado Ritter et al., 2004).

### 1.2.3. Estresse oxidativo e sistema nervoso central

O cérebro consome grandes quantidades de oxigênio, em torno de 20% do oxigênio consumido pelo corpo todo, 160  $\mu\text{mol}$  por 100g do peso cerebral por minuto (Magistretti et al.,1999). Pelo constante uso do oxigênio nas mitocôndrias para suprir a energia necessária são gerados os radicais livres, tornando o cérebro particularmente suscetível ao estresse oxidativo (Gilgun-Sherki et al., 2002).

O SNC é propenso ao dano oxidativo por várias razões:

- a) O metabolismo de alguns dos principais neurotransmissores, como a dopamina, que é precursora do L-DOPA, e noradrenalina reagem com  $\text{O}_2$  para gerar  $\text{O}_2^{\cdot -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e reativas quinonas/semiquinonas podem destruir GSH e ligar-se com o grupo  $-\text{SH}$  de proteínas, capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro (Halliwell & Gutteridge,1999).
- b) Muitas enzimas que se encontram no cérebro incluindo monoamino oxidase, tirosina hidroxilase, e L-amino ácido oxidase produzem  $\text{H}_2\text{O}_2$  como um subproduto de suas atividades metabólicas. (Gilgun-Sherki et al., 2002).
- c) A presença de aminoácidos excitotóxicos, tem sido sugerido que podem promover o estresse oxidativo, pela liberação de aminoácidos excitatórios em neurônios (Halliwell & Gutteridge,1999).
- d) Outra possibilidade é a habilidade de várias EAO em diminuir a captura de glutamato pelas células gliais e a inativação da enzima glutamina sintetase (Halliwell & Gutteridge,1999). A exotoxicidade do glutamato esta envolvida na gênese de uma série de doenças do SNC, epilepsia, esquizofrenia e acidente vascular encefálico (Ritter et al.,2004)

- e) As membranas neuronais contêm níveis elevados de ácidos graxos poliinsaturados capazes de sofrer peroxidação lipídica (Halliwell & Gutteridge 1999; Floyd & Hensley,2002).
- f) A presença da barreira hematoencefálica com o intuito de manter a constância dos líquidos intersticiais, age seletivamente sobre muitos substratos, mas permite a passagem de ferro e cobre, capaz de participar da reação de Haber-Weiss/Fenton (Andreazza et al., 2004).
- g) Os macrófagos do SNC quando ativados podem produzir superóxido, peróxido de hidrogênio, sendo capazes de secretar citocinas como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ . O interferon e TNF $\alpha$  podem produzir espécies ativas do oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 1999).
- h) A grande concentração de Ca<sup>++</sup> que atravessa a membrana neuronal, interfere com os transportes de íons, podendo produzir rápida elevação do Ca<sup>++</sup> livre intracelular, muitas vezes levando ao estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999; Koutsilieri et al.,2002).
- i) O cérebro tem uma alta concentração de ferro e ascorbato, os quais são ingredientes chaves na peroxidação dos lipídios de membrana (Floyd & Hensley,2002).
- j) O cérebro não possui grande concentração de defesas antioxidantes existindo um grande potencial para danos oxidativos (Floyd, 1999).
- k) Estudos referentes à separação de mitocôndrias do cérebro e outros órgãos demonstram que de 2 a 5% do total do oxigênio consumido pela respiração mitocondrial formam EAO, sendo a maior parte de peróxido de hidrogênio (Hensley K. et al, 1998).

### 1.3. Objetivos e organização dos trabalhos apresentados na dissertação.

Este trabalho apresenta a compilação dos principais experimentos carreados ao longo de 2001-2003.

O **Capítulo 1.** Apresenta sucintamente o marco teórico dos trabalhos. Inicialmente são discutidos aspectos da eletroconvulsoterapia. Após, alguns elementos da bioquímica das espécies reativas de oxigênio são apresentados no intuito de permitir estabelecer um entendimento da eletroconvulsoterapia e a formação de radicais livres e defesas antioxidantes no SNC.

O **Capítulo 2.** Apresenta os primeiros dados experimentais obtidos através do seguinte artigo: *No evidence for oxidative damage in hippocampus after acute and chronic electroshock in rats.* Brain Research (2004) submitted.

O **Capítulo 3.** Apresenta a seqüência dos dados dos experimentos através do seguinte artigo: *Structure-related oxidative damage in rat brain after acute and chronic electroshock.* Neurochemical Research (2004) submitted.

O **Capítulo 4.** Apresenta a discussão geral onde busca-se integrar esses achados descritos nos capítulos anteriores. Além disso, abre discussão acerca de possíveis novas possibilidades de pesquisa.

#### 1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, R.F.; ENGEL, J. Jr.; BAXTER, L.; Positron emission tomography and autoradiographic studies of glucose utilization following electroconvulsive seizures in humans and rats. *Annals of New York Academy of Science*. v.462, p.263-269, 1986.

ALLEN, Y.S.; ADRIAN, T.E.; ALLEN, J.M.; TATEMOTO, K.; CROW, T.J.; BLOOM, S.R.; POLAK, J.M.; NPY distribution in the rat brain. *Science*, v.221, p.877-879, 1993.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, v.90, 7915-7922. Sep. 1993.

ANDREAZZA, A.C.; SOARES, D.G.; KEHL, L.F.; LIMA BORELLA, M.L.; SALVADOR, M. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. in: IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI. *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 489-496.

BABIGIAN, H.M.; GUTTMACHER, L.B. Epidemiologic considerations in electroconvulsive therapy. *Arch Gen Psychiatry*; v.41, p. 246-253, 1984.

BAKER, S.K.; TARNOPLSKI, M.A. Targeting cellular energy production in neurological disorders, *Expert. Opin Investig Drugs*, v.12, oct, p.1655-1679, 2003.

BARNES, J.M.; BARNES, M.N.; COSTALL, B.; NAYLOR, R.J.; TYERS, M.B. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate inhibition of acetylcholine release in cortical tissue, *Nature*, v.338, p.762-763, 1989.

BENZON, J.; KOKAIA, Z.; ELMER, E. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single ant intermittent limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.94. p.10432-10437. 1997.

BENOIT, R.; LING, N.; ALFORD, B.; GUILLEMIN, R. Seven peptides derived from pro-somastostatin in rat brain. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, v.107, p.944-950. 1982.

BEUTLER, E. Nutritional and Metabolic aspects of Glutathione. *Annual Review of Nutrition*; v.9, p.287-302. 1989.

BLANDINA, P.; GOLDFARB, J.; CRADDOCK-ROYAL, B.; GREEN, J.P. Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in rat striatum, *Journal Pharmacology*, v.251, p.803-809, 1989.



BREMNER, J.; RANDALL, P.; SCOTT, T.M. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients combat-related posttraumatic stress disorder. *American Journal of Psychiatry*. v.152. p.973-981.1995.

BRODIN, K.; ROSEN, A.; IWARSON, K.; OGREN, S.O.; BRODIN, E. Increased levels of substance P and cholecystinin in rat cerebral cortex following repeated electroconvulsive shock and subchronic treatment with serotonin uptake inhibitor, *Acta Physiology Scand*.v.136. p.613-614, 1989.

BROMONT, C.; MAREIE, C.; BRALET, J. Increased lipid peroxidation in vulnerable brains regions after transient forebrain ischemia. *Stroke*, v.20, p.918-924.1989.

BUSNELLO E. Eletroconvulsoterapia-ECT. In TABORDA J.G., PRADO-LIMA P. BUSNELLO E., *Rotinas em Psiquiatria*. 1ªed. Artes Médicas, Porto Alegre 1995.

BUSNELLO, J.V.; AGOSTINHO, F.; FEIER, G.; MARTINS, M.R.; QUEVEDO, J.; Eletroconvulsoterapia in: IZQUIERDO, I; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 489-496.

BUTLER, M.O.; MORINOBU, S.; DUMAN, R.S. Chronic electroconvulsive seizures increase the expression of Serotonin-2 receptor mRNA in rat frontal cortex. *Journal Neurochemistry* . v.61, p.1270-1276.1993.

CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; COLOMBRITA, C.; RAVAGNA, A.; PENNISI G.; GIUFFRIDA, S.A.M.; GALLI, F.; BUTTERFIELD, D.A. Redox regulation of heat shock protein expression in aging neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: nutritional approach. *Amino Acids*. v25(3-4), p.437-444.Dec.2003.

CHAMBERLIN, E.; TSAI, G.E. A glutamatergic model of ECT-induced memory dysfunction. *Harvard Rev. Psychiatry*. v.5, p.307-317.1998.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?. *Ann. International Med*. v.111, p.918-931, 1989.

COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P.; Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*.v.262, p.689-695.1993.

CROWE, R.R., Electroconvulsive therapy – a current perspective *New England Journal of Medicine*,v. 311, p. 163-167,1984.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P.; CAPUTI, A.P.; SALVEMINI, A., Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*.v.53, p.135-159. 2001.

- DARLEY-USMAR, V.; HALLIWELL, B. Blood radicals, Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm. Res.*, v.13, p.649-662, 1996.
- DE MONTIGNY, C. Eletroconvulsive shock treatments enhanced responsiveness of forebrain neurons to serotonin, *Journal Pharmacology Exp. Ther.*, v.228, p.230-234. 1984.
- DESIDERI, A.; FALCONI M. Prokaryotic Cu, Zn Superoxide dismutases. *Biochem Soc Trans.* v.31(6): p.1322-1325. Dec.2003.
- DEVENAND, D.P.; DWORK, A. J.; HUTCHINSON, E. R.; BOLWING, T.G.; SACKEIM H. A. Does ECT Alter Brain Structure? Special Articles. *American Journal of Psychiatry.* v.151, p.957-966. jul. 1994.
- DIX, T.A., HESS, K.M.; MEDINA, M.A.; SULLIVAN, R.W.; TILLY, S.L.; WEBB, L.L. Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydrodioxyl (perhydroxyl) radical. *Biochemistry.* v.35, p.4578-4583, 1996.
- DODD, J.; KELLY, J.S. Is somatostatin and excitatory transmitter in the hippocampus?, *Nature*, v.273, p.674-675. 1978.
- DUBOVSKI, L. Electroconvulsive therapy. In: KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; *Comprehensive Textbook of Psychiatry.* 6° ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
- DUMAN, R.S.; HOSODA, K. Molecular mechanism of electroconvulsive therapy: regulation of signal transduction and gene expression. *Neuropharmacology*, supl. 1, p.667-668, 1992.
- EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *Journal Lab. Clin. Med*, v.118, p.3-4, 1991.
- ERAKOVIC, V.; ZUPAN, G.; VARLJEN, J.; LAGINJA, J.; SIMONIE, A. Altered activities of rat brain metabolic enzymes in electroconvulsive shock-induced seizures. *Internacional League Against Epilepsy.* v.42, p.181-189. 2001.
- ERANTI, S.V.; McLOUGHLIN, D.M. Eletroconvulsive therapy - state of the art. *British Journal of Psychiatry*, v.182, p.8-9. 2003.
- ESEL, E.; TURAN, T.; KULA, M.; REYHANCAN, M.; GONUL, A.; BASTURK, M.; SOFUOGLU, S. Effects of eletroconvulsive therapy on hypothalamic-pituitary-thyroid axis activity in depressed patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* v.26, p.1171-1175. 2002.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Medica Brasileira*, v.43 ,p 61-68. 1997.

FEUERSTEIN, T.J.; HERTTING, G. SEROTONIN (5-HT). Enhances hippocampal noradrenaline (NA) release: evidence for facilitatory 5-HT receptors within the CNS, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacology*, v.333, p.191-197. 1986.

FINK, M.; JOHNSON, L. Monitoring the duration of electroconvulsive therapy seizures: "cuff" and EEG methods compared. *Archives General Psychiatry*, v.39, p.1189-1191, 1982.

FINK, M.; SACKEIM, H.A. Convulsive therapy in Schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin*, v.22, p.27-39. 1996.

FLOYD, R.A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging implications for therapeutics of neurodegenerative diseases, *Neurobiology of Aging*, v.23, p.795-807, 2002.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.222, p.236-245, 1999.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta*. v.1271 (2-3) p.321-326. 1995.

GILGUM-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous injury: current state. *Pharmacology Review*, 54(2). p.271-284. Jun. 2002.

GLEITER, C.H.; NUTT, D.J. Chronic electroconvulsive shock and neurotransmitter receptors: an update. *Life Science*. v.44.p.985-1006. 1989.

GOLAN, D.; AHARONI, A.; HALBREICH, U. Prolation To eletroconvulsive shock in anesthetized rats. *Journal Psychiatry Research*.v.27,n.3., p.235-240. 1993.

GUR, E.; DREMENCOV, E.; GARCIA, F.; VAN DE KAR, L. D.; LERER, B.; NEWMAN, M.F. Funcional effects of chronic electroconvulsive shock on serotonergic 5-HT1A and 5-HT1B receptor activity in rat hippocampus and hypothalamus. *Brain Research* 952, p.52-60. 2002.

GWINN, R.P.; KONDRATYEV, A.; GALE, K. Time dependent increase in basic fibroblast growth factor protein in limbic regions following electroshock seizures. *Neuroscience*, v.114, p.403-409, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*.v.186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAYAKAWA, H.; SHIMIZU, M.; NISHIDA, A. MOTOHASHI, N.; YAMAWAKI, S.; Increase in serotonin receptors in the dentate gyrus as revealed by autoradiographic analysis

following repeated electroconvulsive shock but not imipramine treatment. *Neuropsychobiology*, v.30, p.53-56,1994.

HEILIG, M.; KOOB, G.F.; EKMAN, R.; BRITTON, K.T. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends Neuroscience*.v.17, p.80-85,1994.

HELLSTEN, J.; WENNSTROM, M.; MOHAPEL, P.; EKDAHL, C.T.; BENGZON, J.; TINGSTROM, A. Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *European Journal Neuroscience*.v.16, p.283-290,2002.

HENSLEY, K.; PYE, Q.N.; MAIDT, M.L.; STEWART, C.A.; ROBINSON, K.A.; JAFFREY, F. Interaction of  $\alpha$ -phenyl-*N-tert*-butylnitron and alternative electron acceptors with complex 1 indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site. *Journal Neurochemistry*, v.71, p.2549-2557,1998.

HERMANN, R.; DORWART, R.A.; HOOVER, C.W.; BRODY J. Variation in ECT use in the United States *Am J Psychiatry*;v.152. p.869-875.1995.

ISHIHARA, I.; SASA, M. Potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. *Neuroscience Letters*, v.307. p.37-40,2001.

IWATA-ICHIKAWA, E.; KONDO, Y.; MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M.; OGAWA, N. Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of glutathione synthesis. *Journal Neurochemistry*, v.72, p.2344-2344.1999.

JANICAK, P.G.; DAVIS, J.M.; GIBBONS, R.D. Efficacy of ECT: a meta-analysis. *American Journal Psychiatry*, v.142, p. 297-302,1985.

KONDRATYEV, A.; SAHIBZADA, N.; GALE, K., Electroconvulsive shock exposure prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Molecular Brain Research* .v.91 p.1-13.2001.

KOUTSILIERI, E.; SCHELLER, C.; TRIBL, F.; RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress-microglial contribution. *Parkinsonism and Related Disorders*, v.8, p.401-406, 2002.

KRAGH, J.; BOLWIG, T.G.; WOLDBYE, D.P.; JORGENSEN, O.S. Electroconvulsive shock and lidocaine-induced seizures in the rat activate astrocytes as measured by glial fibrillary acidic protein. *Biology Psychiatry*, v.33, p.794-800, 1993

LAMONT, S.R.; PAULLS, A.; STEWART, C. A. Repeated electroconvulsive stimulation, but not antidepressant drugs, induces mossy fibre sprouting in the rat hippocampus. *Brain Research*, v.893, n.1-2, p.53-58, 2001.

LEVIEL, V.; FAYADA, C.; GUIBERT, B.; CHAMINADE, M.; MACHEK, G.; MALLET, J.; BIGUET, N.F. Short-and Long-term alterations of gene expression in limbic structures

by repeated electroconvulsive-induced seizures. *Journal Neurochemistry*, v.54, p.899-904, 1990.

LINDEFORS, N.; BRODIN, F.; METSIS, M.; Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and trk B messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock, *Neuroscience*. v.65, p.661-670.1995.

LINDEFORS, N.; BRODIN, K.; STILLER, C.O.; PERSON H.; BRODIN E. Repeated electroconvulsive shock increases tachykinin and cholecystokin mRNA in ventral periaqueductal grey. *Neuroscience*, v.45, p.73-80. 1991.

LISANBY, S.H.; MADDOX, J.H.; PRUDIC, J.D.; DEVANARD, D.P.; SACKEIM, H.A. The effects of electroconvulsive therapy on memory of autobiographical an public events *Arch Gen Psychiatry*; v.57. p.581-590.2000.

LLESUY, S.F. Introducción y Especies Activas de Oxígeno. In Marrón N. P. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. 1ed. Canoas: ULBRA, 2002. 21-32.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T.C.; RILEY, D.P.; MISKO, T.P.; SALVEMINI, D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc. Natl. Acad. Science*, v.97, p.9753-9758, 2000.

MADSEN, T.M.; TRESCHOW, A.; BENGZON, J.; BOLWIG, T.G.; LINDVAL, O.; TINGSTROM, A. Increased Neurogenesis in a model os eletroconvulsive therapy. *Society of Biological Psychiatry*.v.47,p.1043-1049.2000.

MAGISTRETTI, Pierre. Brain Energy Metabolism, in: SQUIRE, L.R.; BLOOM, F.E.; McCONNELL, S.K.; et al. *Fundamental Neuroscience*. 2 ed., U.S.A.,1999, p.339-360.

MANCILAS, J.R.; SIGGINS, G.R.; BLOOM, F.B. Somatostatin selectively enhances acetylcholine-induced excitations in rat hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.83. p.73-80, 1991.

MATHE, A.A.; NOMIKOS, G.G.; SVENSSON, T.H. Effects of acute and chronic electroconvulsive treatment on somastostatin in the rat hippocampus and striatum. *Prog. Neuro-Psychofarmacology. Biology Psychiatry*. v.18.1994.

MAY, P.R.; TUMA, A.H.; YALE, C.; THIELE, D.A.; KRAUDE W.H. Schizophrenia – a follow-up study of results of treatment *Arch Gen Psychiatry*; v.33, p.481-86.1976

McCALL,W.Y. Eletroconvulsive therapy in the era of modern psychopharmacology. *Internacioanl Journal of Neuropsychopharmacology*. v.4, p.315-324.2001.

MEISTER A., ANDERSON M.E., Glutathione. *Annu Rev Biochem.*, v.52,p. 711-760. 1883.

- MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell Killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediate by intracellular iron. *Journal Biochemistry*, v.218, p.273-275, 1993.
- MIKKELENS, J.D.; WOLDBYE, D., KRAGH, J.; LARSEN, P.J.; BOLWIG, T.G. Eletroconvulsive shock increase the expression of neuropeptide Y (NPY), mRNA in the piriform cortex and the dentate gyrus. *Molecular Brain Research*. v.23, p.317-322,1994.
- MOORMAN, J.M.; GRAHAME-SMITH, D.G.; SMITH, S.E.; LESLIE, R.A. Chronic electroconvulsive shock enhances 5-HT2 receptor-mediated head shakes but not brain C-fos induction. *Neuropharmacology*, v.35, p.303-313,1996.
- MOOSMANN, B.; BEHL, C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders. *Expert. Opin Investig Drugs*, v.10, p.1407-1435, 2002.
- MUKHERJEE, S.; SACKEIM, HÁ; SCHNUR, D.B. Electroconvulsive therapy of acute manic episodes: a review of 50 year's experience *Am J Psychiatry*; v.151 p.169-176.1994.
- NOOR, R.; MITTAL, S.; IQBAL J. Superóxido dismutase applications and relevance to human diseases. *Medical Science Monitor*, v.9, p.210-215. Set.2002.
- OBERGRIESSER, T.; ENDE, G.; BRAUS, D.F.; HENN, F.A. Long-term follow-up magnetic resonance-detectable choline signal changes in the hippocampus of patients treated with electroconvulsive therapy. *Journal of Clinical Psychiatry*, v.64, p.775-780,2003.
- OLIVER, C.N.; STARKE-REED, P.E.; STADTMAN, E.R.; LIU, G.J.; CARNEY, J.M.; FLOYD, R.A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Science USA*, v.87, p.5144-5157,1990.
- PAPAKOSTAS, Y.; MARKIANOS, M.; PAPADIMITRIOU, G.; STEFANIS, C. Thyrotropin and prolactin secretion during ECT: Implications for the mechanism of ECT action. *Convulsive Ther*; v.6, p.214-220.1990.
- PAPAKOSTAS, Y.; MARKIANOS, M.; STEFANIS, C. Methysergide reduces the prolactin response to ECT. *Biological Psychiatry*.v.24. p.465-468.1988.
- PEKARY, A.E.; MEYERHOFF,J.L.; SATTIN,A. Eletroconvulsive seizures modulate levels of thyrotropin releasinghormone and related peptides in rat hypothalamus, cingulated and lateral cerebellum. *Brain Research*, v.884, p.174-183,2000.
- PHILPOT, M.; TRELOAR, A.; GORMLEY,N. Audit of eletroconvulsive treatment in two National Health services regions. *Bristh Journal of Psychiatry*, v.160, p.621-637.1992.
- RAO, A.V.; BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr. Neuroscience*. v.5, p.291-309, 2002.

RAVANAT, J.L.; BERGER, M.; BENARD, F.; LANGLOIS, R.; OUELLET, R.; VAN LIER, J.E.; CADET, J. Photochem. Photobiology, v.55, p.809-814,1992.

RICE, M.E.; RUSSO-MEMA, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. Neuroscience.v.82, p.1213-1222.1998.

RITTER, C.; BARICHELLO, T.; DAL-PIZZOL, F. Neurotoxicologia in: IZQUIERDO, I.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 489-496, 2004.

SACKEIM, H.A.; DECINA, P.; KANZLER, M. Effects of electrode placement on the efficacy of titrated, low dose ECT. American Journal Psychiatry;v.144, p. 1449-155,1987.

SACKEIM, H.A.; PRUDIC, J.; DEVANAND, D.P. Effects of stimulus intensity and electrode placement on the efficacy and cognitive effects of electroconvulsive therapy. New England Journal. Med; v.328, p.839-846.1993.

SACKEIM, H.A.; PRUDIC, J.; DEVANAND, D.P.; KRUEGER, R.B. A prospective, randomized, double-blind comparison of bilateral and right unilateral electroconvulsive therapy at different stimulus intensities Arch Gen Psychiatry; v.57, p.425-434. 2000.

SAJATOVIC, M.; MELTZER, H.Y. The effect of short-term electroconvulsive treatment plus neuroleptics in treatment-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder. Convulsive Therapy, v.9, p.167-175,1993.

SARTORIUS, A.; NEUMANN-HAEFELIN, C.; VOLLMAYR, B.; HOEHN, M.; HENN, F.A. Biology Psychiatry, v.53, p.620-623, 2003.

SATTIN, A.; PEKARY, A.E.; LLOYD, R.L. TRH gene products are implicated in the antidepressant mechanisms of seizures. Ann. NY Acad.Sci. v.739, p.135-153, 1994.

SHELINE, Y.I.; GADO, M.K.; KRAEMER, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. American Journal Psychiatry. v.160, p.1516-1518, 2003.

SHEN, H.; NUMACHI, Y.; YOSHIDA, S.; TODA, S.; AWATA S.; MATSUOKA, H.; SATO, M. Electroconvulsive shock regulates serotonin transporter mRNA expression in rat raphe nucleus. Psychiatry and Clinical Neurosciences. v.55 , p.75-77, 2001.

SHORTER, E., A history of Psychiatry: from the era of the asylum to the age of Prozac. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SIKDAR, S.; KUKHARA, P.; AVASTHI, A.; Combined chlorpromazine and electroconvulsive therapy in mania Br. Journal of Psychiatry;v.164, p. 806-810, 1994.

SMALL, J.G.; KLAPPER, M.H.; KELLAMS, J.J. Electroconvulsive treatment compared with lithium in the management of manic states. Archives of General Psychiatry;v.45, p. 727-732,1988.

- SQUIRE, L.R.; SLATER, P.C. Electroconvulsivetherapy and complaints of memory dysfunction: a prospective three year follow-up study. *British Journal Psychiatry*, v.142, p. 1-8,1983.
- STERN, R.A.; NEVELS, C.T.; SHELHORSE, M.E.; PROHASCA, M.L.; MASON, G.A.; PRANGC, A.J. Antidepressant and memory effects of combined thyroid hormone treatment and eletroconvulsive therapy: Preliminary findings. *Biology Psychiatry*, v.30, p.623-627. 1991.
- TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. Neuropeptide Y and pancreatic polypeptide, *Nature*. v.296. p.659-660. 1982.
- THOMPSON, J.W.; BLAINE, J.D. Use of ECT in the United States in 1975 and 1980. *American Journal Psychiatry*, v.144,p. 557-562 ,1987.
- THOMPSON, J.W.; WEINER, R.D.; MYERS C.P. Use of ECT in the United States in 1975, 1980, 1986. *American Journal of Psychiatry*, v.151, p.1657-1661.1994.
- THUILLIER J. Ten years that changed the face of mental illness. London:Martin Dunitz, 1999.
- UK ECT Rewiew Group. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, v.361, p. 799-808, 2003.
- VAN PRAGA, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neuroscience*. v.2. p.266-270. 1999.
- YAMAGATA, Y. News aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and diffeential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation in vivo. *Journal Pharmacology Science*, v.93, p.22-29, 2003.
- YAMAGATA, Y.; JOVANOVIC, J.N.; CZENIK, A.J.; GREENGARD, P.; OBATA K. Bidirectional changes in synapsin I phosphorylation at MAP kinase-dependent sites by acute neuronal excitation in vivo. *Journal of Neurochemistry*. V.80, p.835-842, 2002.
- WHALLEY, L.J.; EAGLES, J.M.; BOWLER, G.M.R.; BENNIE, J.G.; DICK, H.; McGUIRE, R.J.; FINK, G. Selective effects of ECT on hypothalamic pituitary activity. *Psychology of Medicine*, v.17, p.319-328. 1987.
- WIDDOWSON, P.S.; ORDWAY, G.A.; HALARIS, A.E. Reduced neuropeptide Y in suicide brain. *Journal Neurochemistry*. V.59. p.69-79,1992.
- WINSLADE, W.J.; LISTON, E.H.; ROSS, J.W.; WEBER, K.D. Medical, Judicial and statutory regulation of ECT in the United States *Am J Psychiatry*,v.141, p.1349-1355,1984.



ZACHRISSON, O.C.; BALLDIN, J.; EKMAN, R.; NAESH, O.; ROSENGREN, L.;  
AGREN, H.; BLENNOW, K. No evident neuronal damage after electroconvulsive  
therapy. *Psychiatry Research*. v.96, p.157-165, 2000.

ZETTERSTROM, T. S. C.; GRAHAME-SMITH, D.G.; PEI Q. Repeated electroconvulsive  
shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared  
with a single administration. *Molecular Brain Research*, v.57, p.106-110, 1998.

## CAPÍTULO 2

No evidence for oxidative damage in hippocampus after acute and chronic electroshock in rats

Brain Research (2004): submetido.

No evidence for oxidative damage in hippocampus  
after acute and chronic electroshock in rats

Tatiana Barichello<sup>1</sup>, Fernanda Bonatto<sup>2</sup>, Gustavo Feier<sup>1</sup>,

Marcio R. Martins<sup>1</sup>, Jose Cláudio F. Moreira<sup>2</sup>,

Felipe Dal-Pizzol<sup>3</sup>, Ivan Izquierdo<sup>4</sup> and Joao Quevedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratorio de Neurotoxicologia, Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil;*

<sup>2</sup>*Centro de Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de  
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-  
003 Porto Alegre, RS, Brazil;*

<sup>3</sup>*Laboratorio de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil; and*

<sup>4</sup>*Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto  
Alegre, RS, Brazil.*

Correspondence: Prof. João Quevedo, M.D., Ph.D. - Laboratório de  
Neurotoxicologia, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma,  
SC, Brazil. Fax: #55 48 443 4817. E-mail: quevedo1@terra.com.br

## Abstract

Although several advances has occurred over the past 20 years concerning refining the use and administration of electroconvulsive therapy to minimize side effects of this treatment, little progress has been made in understanding the mechanisms underlying its therapeutic or adverse effects. Thus, this work was performed in order to determine the level of oxidative damage and antioxidant enzymes activities early and late after acute and chronic electroconvulsive shock. We demonstrated a decrease in lipid peroxidation in the hippocampus immediately after and up for 30 days after a single or multiple electroconvulsive shock. This was also true to protein carbonyls in the acute protocol. In this way, we demonstrated an increase in catalase and superoxide dismutase activities different times after single and multiple electroconvulsive shock. Our findings, for the first time, demonstrated that after ECS there is an increase in antioxidant enzymes activities and we cannot demonstrate oxidative damage in hippocampus.

## **THEME J: DISORDERS OF THE NERVOUS SYSTEM**

Neuropsychiatric disorders

Key-Words: electroconvulsive shock, electroconvulsive therapy, free radicals, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase

## Introduction

Electroconvulsive therapy (ECT) has been used as a treatment for mental disorder since 1930s. Particularity is the most effective treatments for refractory depression [23]. However, several features of this treatment elicit concern among professionals and the public. These include the passage of electricity through the brain, the elicitation of grand mal seizure, and the images of patients receiving ECT during the early unmodified era, without anesthesia or muscle relaxation. For some critics, the cognitive deficits associated with ECT raise the specter of brain damage [2], particularly in regions such as the hippocampus that critically subserve memory functions and are highly sensitive to hypoxic or ischemic insults [4,10,13]. Although several advances has occurred over the past 20 years concerning refining the use and administration of ECT to minimize side effects of this treatment, little progress has been made in understanding the mechanisms underlying its therapeutic or adverse effects. The animal equivalent of ECT, electroconvulsive shock (ECS) has been shown to have many effects in experimental animals, and these findings have contributed to explain the therapeutic and side effects of ECT [17]. In contrast to several others animal models of convulsions, previous studies did not find biochemical and structural evidence of brain damage following a therapeutic course of ECS [19].

Reactive oxygen species (ROS) are a part of normal human metabolism. When produced in excess can cause tissue injury including lipid peroxidation, DNA damage and enzyme inactivation. ROS has been implicated in a variety of acute and chronic neuropsychiatric conditions, including convulsion [5,6,8]. Although the involvement of ROS during both acute and chronic period of drug-induced status epilepticus has been studied [5], there is none study investigating the putative role of oxidative stress after ECS-induced convulsions.

Thus, this work was performed in order to determine the level of oxidative damage and antioxidant enzymes activities early and late after acute and chronic ECS.

## *Material and Methods*

### Animals and study design

Adult and male Wistar rats (250-300 g) were obtained from our own breeding colony. They were caged in group of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ . The experiments were performed between 2 p.m. and 5 p.m.

The rats were divided in two protocols: acute and chronic treatment. In acute treatment the animals received a single ECS. In chronic treatment, animals received eight ECS every other day. In both protocols the animals were sacrificed by decapitation at different times after last ECS: immediately after, 48 hours, 7 and 30 days (n=5 animals per group). The hippocampus was dissected out immediately after the rat to be sacrificed, and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . In vivo studies were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

### *Electroconvulsive stimulation*

The electroconvulsive shock was applied via bilateral ear clip electrodes. The stimulus parameters were 150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds. Each stimulation elicited tonic-clonic seizure. The sham groups (acute and chronic) were handled identically to the ECS-treated rats except no current was passed.

### *Drugs and chemicals*

Thiobarbituric acid, catalase, superoxide dismutase, dinitrophenylhydrazine, adrenaline, hydrogen peroxide, were purchased from Sigma, St. Louis, MO. Glycine was purchased from Nuclear, Diadema, SP, Brasil.

### *Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)*

As an index of ROS production we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described [12]. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as MDA (malondialdehyde) equivalents (nmol / mg protein).

### *Measurement of protein carbonyls*

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described [21]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370nm.

### *Superoxide dismutase activity (SOD)*

Brain structures were homogenized in 50 mM glycine buffer (pH 10.2). SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described [15].

### *Catalase activity (CAT)*

To determine CAT activity brain structures were sonicated in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) and the resulting suspension was centrifuged at 3000g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was assayed by measuring the rate of decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorbance at 240 nm [11].

### *Protein Quantification*

All the results were normalized by the protein content [20].

### *Statistical analysis*

All data are presented as means  $\pm$  S.E.M. Differences among experimental groups in experiments evaluating oxidative parameters were determined by One-way ANOVA. Multiple comparisons were performed by a Newman-Keuls test. In all experiments, P values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## Results

### *Oxidative damage parameters*

It is shown in Figure 1A a decrease in TBARS in the hippocampus immediately after a single ECS. TBARS levels returns to control levels 48h and 7d after a single ECS. Late after ECS (30d) there is a decrease in TBARS in the hippocampus (Figure 1A). This pattern was similar when chronic ECS was performed. There is a decrease in TBARS immediately after, 7d and 30d after the last ECS in the chronic group (Figure 1B). As shown for TBARS, protein carbonyls are decreased immediately after, 7d and 30d after a single ECS (Figure 2A). In chronic ECS there was no differences in protein carbonyls in all groups tested (Figure 2B).

### *SOD and CAT activities*

The adaptation of central nervous system (CNS) after ECS seems to include antioxidant enzymes modulation. A single ECS induces an increase in CAT activity 48h after ECS (Figure 3A). This is accompanied by a proportional increase in SOD activity (Figure 4A).



In the same way, during chronic ECS protocol there is an increase in CAT and SOD activities immediately and for 7 days after ECS, returning to basal levels 30d after ECS (Figures 3B and 4B).

## Discussion

We for the first time demonstrated that after ECS there is a modulation of CAT and SOD activities in CNS and this is accompanied by a decrease in oxidative damage parameters in hippocampus until 30 days after ECS.

We expect that after ECS the liberation of excitatory neurotransmitters could induce oxidative stress in CNS, as we demonstrated in animal models of epilepsy [5]. However, in both single and chronic ECS there is a decrease in oxidative damage parameters (namely TBARS and protein carbonyls) in hippocampus early and late after ECS induced convulsion. In single ECS the reduction of oxidative parameters 30d after ECS could reflect the increase on antioxidant enzyme activities demonstrated. This adaptation, however could not explain the reduction on oxidative damage parameters immediately after a single ECS, since in this time there is no detectable increase in CAT or SOD activity. We supposed that acute ECS could increase non-enzymatic antioxidant defenses, in this way protecting hippocampus from oxidative damage during seizure activity. In chronic ECS, an increase in CAT and SOD is evident even immediately after the last ECS, demonstrating CNS adaptation.

On the other hand, we can suppose that NMDA receptors and the excitotoxicity demonstrated after convulsions in others animal models do not play a major role in ECS. There is no report in the literature that describes glutamatergic activity during acute or chronic ECS. Generally, status epilepticus seem to induce an acute increase in oxidative damage in CNS secondary to the excessive release of excitatory neurotransmitters [14,24,25]. The chronic effects of convulsions on oxidative damage parameters are less studied [5]. In the

pilocarpine model of temporal lobe epilepsy we demonstrated a reduction on TBARS levels 7d and 75d after status epilepticus [5]. In contrast, in the kainic acid model, TBARS levels are not different from control 7d and 75d after status epilepticus [5]. These differences could be related with the neuronal loss and hypometabolism observed in the chronic epileptic animals [9]. After ECT, some studies reported an increase in blood flow, while others a decrease [1,3,7,16,22]. In addition it seems that there is no difference on cerebral glucose metabolism after ECT [18]. In this way, it seems unlikely that the reduction on oxidative damage parameters is secondary to cerebral hypometabolism, as demonstrated in chronic epileptic animals.

The acute oxidative damage in pilocarpine and kainic acid models seems to be, at least in part, responsible to the chronic effects of drug administration [8]. The difference in oxidative damage parameters could explain the different outcomes after ECS or pilocarpine and kainic acid induced convulsions. In pilocarpine model, all animals invariably develop spontaneous recurrent seizures and in kainic acid around 50% of animals presented spontaneous recurrent seizures [5]. In ECS induced convulsion, even in the chronic protocol, we do not observe spontaneous recurrent seizures in any animal. It seems that there is different mechanisms involved in ECS effects on CNS when compared to others models of animal convulsion. We supposed that these differences could explain the therapeutic value of ECT in contrast to the detrimental effects of convulsion in different clinical situations (i.e. status epilepticus).

Our findings, for the first time, demonstrated that after ECS there is an increase in antioxidant enzymes activities and we cannot demonstrate oxidative damage in hippocampus. This findings help us to understand the differences between ECS and others models of animal convulsion, and suggests that oxidative damage do not participate in adverse events after ECT (i.e. retrograde amnesia).

## References

- [1] A. Conca, M. Prapotnik, W. Peschina, P. Konig. Simultaneous pattern of rCBF and rCMRGlucose in continuation ECT: case reports. *Psychiatry Res.* 124 (2003) 191-8.
- [2] D.P. Devanand, A.J. Dwork, E.R. Hutchinson, T.G. Bolwing and H.A. Sackeim. Does ECT alter the brain structure?. *Am J Psychiatry* 151 (1994) 957-970.
- [3] E. Mervaala, M. Kononen, J. Fohr, M. Husso-Saastamoinen, M. Valkonen-Korhonen, J.T. Kuikka, H. Viinamaki, A.K. Tammi, J. Tiihonen, J. Partanen, J. Lehtonen. SPECT and neuropsychological performance in severe depression treated with ECT. *J Affect Disord.* 66 (2001) 47-58.
- [4] E.R. Kandel. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294 (2001) 1030-8.
- [5] F. Dal-Pizzol, F. Klamt, M. Vianna, N. Schroder, J. Quevedo, M.S. Benfato, J.C. Moreira and R. Walz. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters.* 291 (2000) 179 - 182.
- [6] F. Dal-Pizzol, F. Klamt, M.L.C.Jr. Frota, M.E. Andrades, F.F. Caregnato, M. Vianna, N. Schroder, J. Quevedo, I. Izquierdo and T. Archer. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Dev Brain Res.* 130 (2001) 109 - 114.
- [7] F. Fabbri, M.E. Henry, P.F. Renshaw, S. Nadgir, B.L. Ehrenberg, M.A. Franceschini, S. Fantini. Bilateral near-infrared monitoring of the cerebral concentration and oxygen-saturation of hemoglobin during right unilateral electro-convulsive therapy. *Brain Res.* 992 (2003) 193-204.
- [8] F. Klamt, F. Dal-Pizzol, M.L.C.Jr Frota, R. Walz, M.E. Andrades, E.G. Silva, R. Brentani, I. Izquierdo and J.C.F. Moreira. Imbalance of antioxidant defence in mice lacking cellular prion protein. *Free Radical Biology & Medicine.* 30 (2001) 1137 – 1144.

- [9] F.A. Scorza, E.R. Sanabria, L. Calderazzo, E. Cavalheiro. Glucose utilization during interictal intervals in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study. *Epilepsia*. 39 (1998) 1041-1045.
- [10] G. Szapiro, J.M. Galante, D.M. Barros, M. Levi de Stein, M.R. Vianna, L.A. Izquierdo, I. Izquierdo and J. H. Medina. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem Res*. 11 (2002) 1491-8.
- [11] H. Aebi. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105 (1984) 121-126.
- [12] H.H. Draper and M. Hadley. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186 (1990) 421-431.
- [13] I. Izquierdo and J.L. McGaugh. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol*. 7-8 (2000) 517-34.
- [14] J.N. Shulz, D.R. Henshaw, D. Siwek, B.G Jenkins, R.J. Ferrante, P.B. Cipolloni, N.W. Kowall, B.R. Rosen, M.F. Beal. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem*. 64 (1995) 2239-2247.
- [15] J.V. Bannister and L. Calabrese. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal*. 32 (1987) 279-312.
- [16] M.D. Vangu, J.D. Esser, I.H. Boyd, M. Berk. Effects of electroconvulsive therapy on regional cerebral blood flow measured by <sup>99m</sup>technetium HMPAO SPECT. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27 (2003) 15-9.
- [17] M.E. Newman, E. Gur, B. Shapira and B. Lerer. Neurochemical mechanism of action of ECS: evidence from in vivo studies. *J Electroconvulsive Therapy*. 14 (1998) 153-171.
- [18] N.D. Volkow, S. Bellar, N. Mullani, L. Jould, S. Dewey. Effects of Electroconvulsive Therapy on Brain Glucose Metabolism: A Preliminary Study. *Convuls Ther*. 4 (1988) 199-205.

- [19] O.C. Zachrisson, J. Balldin, R. Ekman, O. Naesh, L. Rosengren, H. Agren and K. Blennow. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Res.* 96 (2000) 157-65.
- [20] O.H. Lowry, A.L. Rosebrough and R.J. Randal. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193 (1951) 265-275.
- [21] R.L. Levine, D. Garland and C.N. Oliver. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464-478.
- [22] S. Awata, M. Konno, R. Kawashima, K. Suzuki, T. Sato, H. Matsuoka, H. Fukuda, M. Sato. Changes in regional cerebral blood flow abnormalities in late-life depression following response to electroconvulsive therapy. *Psychiatry Clin Neurosci.* 56 (2002) 31-40.
- [23] The UK ECT Review Group. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet.* 361 (2003) 799-808.
- [24] Y. Ben-Ari. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 12 (1995) 375-403.
- [25] Y. Ueda, H. Yokoyama, R. Niwa, R. Konaka, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rat. *Epilepsy Res.* 26 (1997) 329-333.

## Figure Legends

### Figure 1

**A - Thiobarbituric acid reactive species in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Thiobarbituric acid reactive species in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

### Figure 2

**A - Protein carbonyls in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Protein carbonyls in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

### Figure 3

**A - Catalase activity in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of catalase activity as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Catalase activity in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of catalase activity as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

### Figure 4

**A - Superoxide dismutase activity in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150

V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of superoxide dismutase activity as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Superoxide dismutase activity in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus were collected for determination of superoxide dismutase activity as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- \* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).



Figure 1

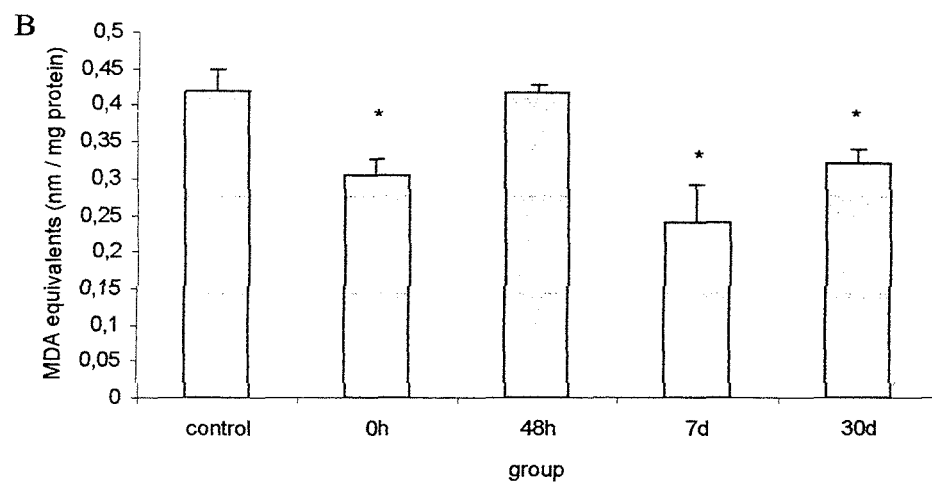
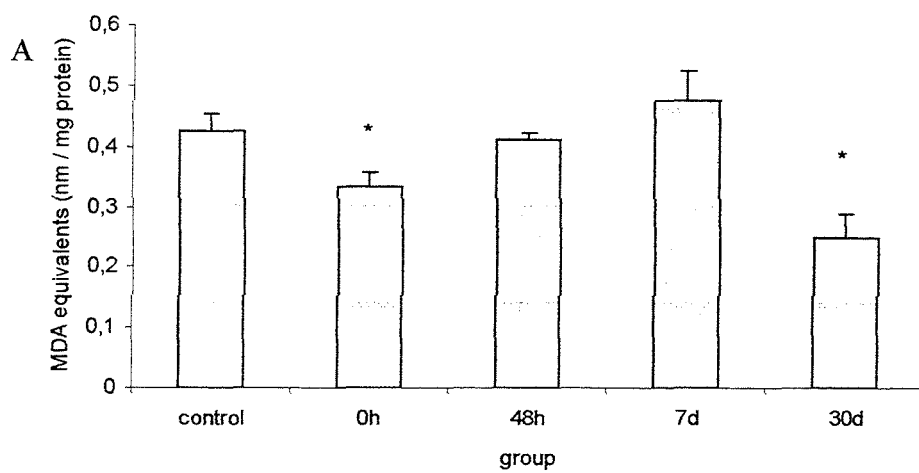


Figure 2

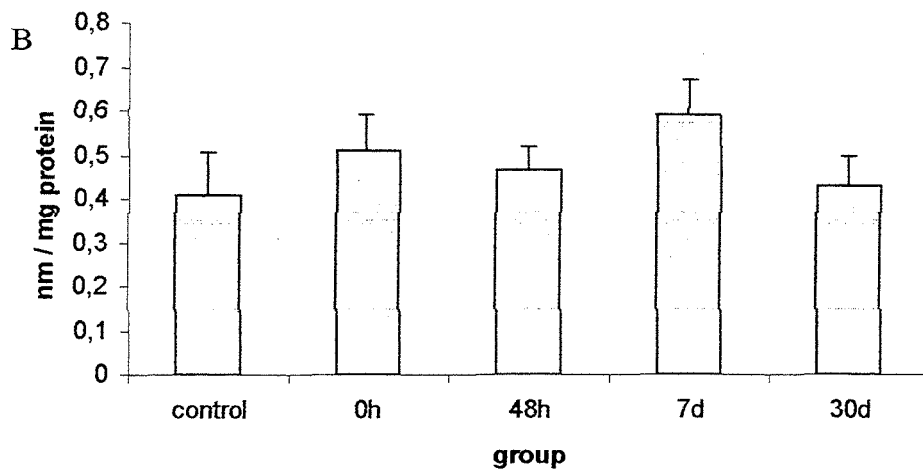
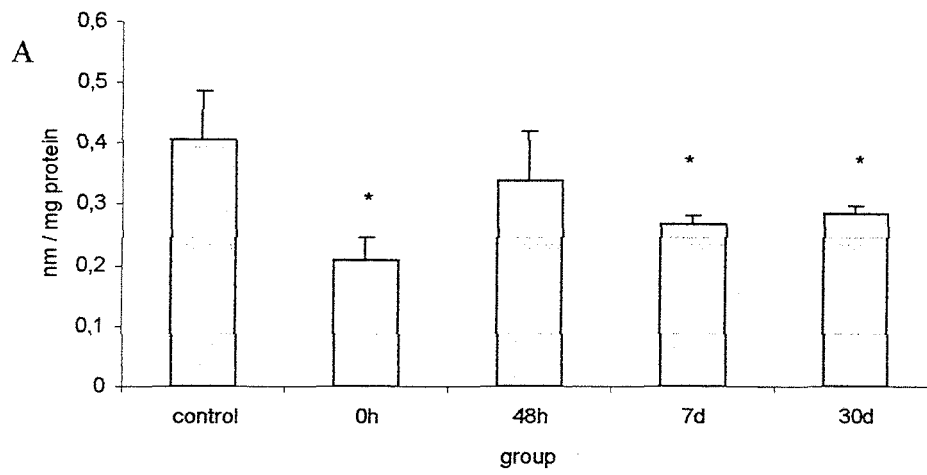


Figure 3

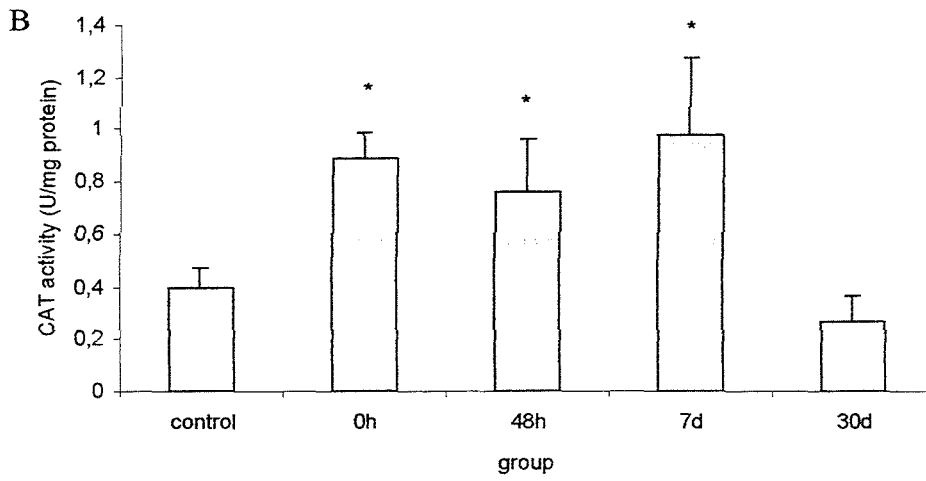
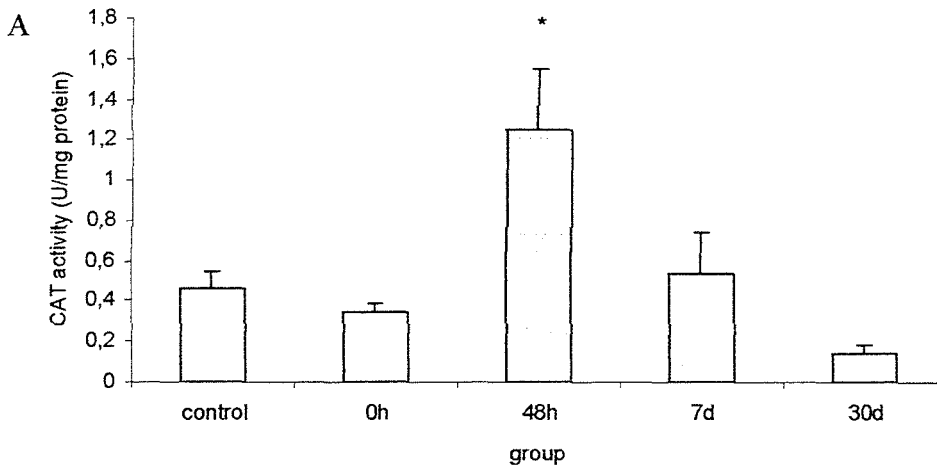
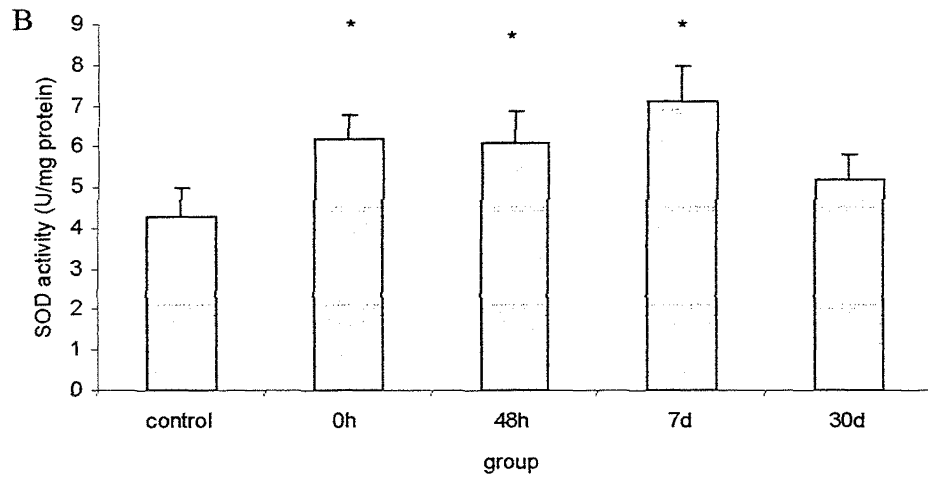
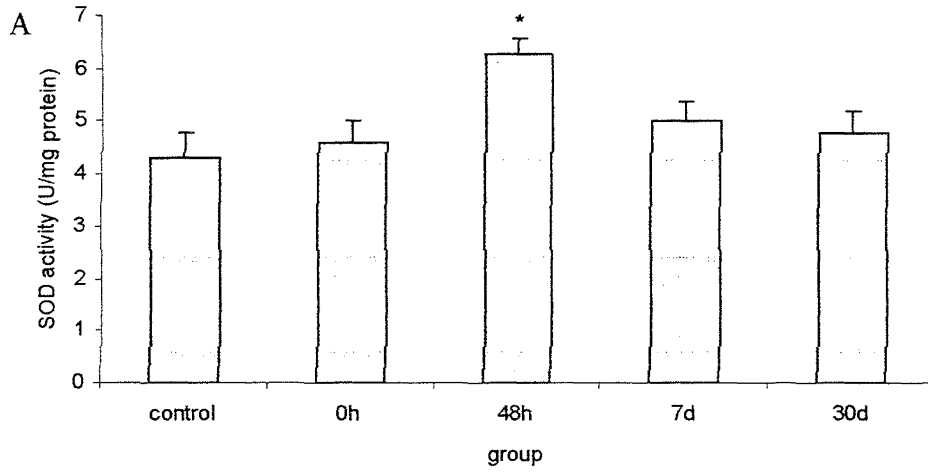


Figure 4



## CAPÍTULO 3

Structure-related oxidative damage in rat brain after  
acute and chronic electroshock

Neurochemical Research (2004): submetido.

STRUCTURE-RELATED OXIDATIVE DAMAGE IN RAT BRAIN  
AFTER ACUTE AND CHRONIC ELECTROSHOCK

Barichello T<sup>1</sup>, Bonatto F<sup>2</sup>, Agostinho FR<sup>1</sup>,

Reinke A<sup>3</sup>, Moreira JCF<sup>2</sup>,

Dal-Pizzol F<sup>3</sup>, Izquierdo I<sup>4</sup> and Quevedo J<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Laboratorio de Neurotoxicologia, Universidade do Extremo Sul*

*Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil;*

*<sup>2</sup>Centro de Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de  
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,*

*90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil;*

*<sup>3</sup>Laboratorio de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul*

*Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil; and*

*<sup>4</sup>Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,*

*90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.*

Running head: Oxidative damage and electroconvulsive shock

Correspondence: Prof. João Quevedo, M.D., Ph.D. - Laboratório de Neurotoxicologia,  
Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. Fax: #55 48  
443 4817. E-mail: quevedo1@terra.com.br

## ABSTRACT

The role of oxidative stress in electroconvulsive therapy-related effects is not well studied. In this way, the purpose of this study was to determine oxidative stress parameters in several brain structures after a single or multiple electroconvulsive seizures. Rats were given either a single or a series of eight-electroconvulsive shock. Brain regions were isolated and levels of oxidative stress in the brain tissue (cortex, hippocampus, striatum and cerebellum) were measured. We demonstrated a decrease in lipid peroxidation and protein carbonyls in the hippocampus, cerebellum and striatum several times after a single or multiple electroconvulsive shock. In contrast, lipid peroxidation increases both after a single or multiple electroconvulsive shock in cortex. Our findings demonstrated that after electroconvulsive shock there is a structure-related oxidative damage in rat brain. These results could contribute to understanding therapeutic and adverse effects of electroconvulsive therapy.

Key-Words: electroconvulsive shock, electroconvulsive therapy, free radicals, oxidative stress, TBARS, protein carbonyls.

## INTRODUCTION

Induction of seizures in the form of electroconvulsive therapy (ECT) has been used in the treatment of psychiatric disorders for more than 60 years (1,2). A large number of hypotheses on the mechanism of action of ECT have been proposed (3-6), however we still do not know precisely how ECT works (7). ECT is defined as a medical procedure in which a brief electrical stimulus is used to induce a cerebral seizure under controlled conditions (8). The main diagnostic indications for ECT include depression, mania, catatonia, bipolar disorder, schizophrenia disorders, particularly in the treatment of drug-resistant depression, probably more effective than drug therapy, and in the cases that can not wait to pharmacological interventions (1,2,9). Particularly in the treatment of severe major depression, evidences for the effectiveness and superiority of ECT over other treatments are clear and convincing (9,10). The science of ECT has progressed rapidly over the last 20 years, providing new insights into the mechanisms of action, improving both the acute and long-term efficacy and decreasing cognitive problems associated with the treatment. Some studies do not show credible evidences that ECT causes structural brain damage (11). There are no doubts about its clinical importance but the adverse effects are focus of much research. The principal adverse effect of ECT, which has been the root of much controversy, is memory impairment (2). The fact that ECT induces some cerebral dysfunctions complicates the treatment being this one of the major concern for both patients and providers. The advance to minimize side effects of this treatment assured an improvement in treatment for ECT becoming this procedure safe and, despite the advances in pharmacotherapy in the last four decade, effective treatment.

Electroconvulsive shock (ECS) seizures provide an animal model of ECT in humans. ECS has been widely studied and shown to have many effects in experimental animals, and these findings have contributed to explain the therapeutic and side effects of



ECT (12). In contrast to several others animal models of convulsions, previous studies did not find biochemical and structural evidence of brain damage following a therapeutic course of ECS (13).

Reactive oxygen species (ROS) are a part of normal human metabolism. When produced in excess can cause tissue injury including lipid peroxidation, DNA damage and enzyme inactivation. ROS has been implicated in a variety of acute and chronic neuropsychiatric conditions, including convulsion (14-16). Although the involvement of ROS during both acute and chronic period of drug-induced status epilepticus has been studied (15), there are few studies investigating the putative role of oxidative stress after ECS-induced convulsions (17).

Besides the increase knowledge of ECT mechanism there is few studies investigating the putative role of oxidative stress after ECT-induced convulsions. In this way, the aim of the present study was determine oxidative stress parameters in several brain regions after ECS.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### *Animals and design of Study*

Adult and male Wistar rats (250-300 g) were obtained from our own breeding colony. They were caged in groups of 5 with free access to food and water and were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights on 7:00 am), at a temperature of  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ . The experiments were performed between 2 p.m. and 5 p.m.

The rats were divided in two protocols: acute and chronic treatment. In acute treatment the animals received a single ECS. While in chronic treatment, the animals received eight ECS every other day. In both protocols the animals were sacrificed by decapitation at different times after last ECS: immediately after, 48 hours, 7 and 30 days

after. There were 5 animals in each of the 10 groups. The cerebellum, hippocampus, striatum and cortex were dissected out immediately after the rat to be sacrificed, and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The experimental procedures were carried out according to the guideline set by the Ethics Committee of Universidade do Extremo Sul Catarinense.

#### *Electroconvulsive stimulation*

The electroconvulsive shock was applied via bilateral ear clip electrodes. The stimulus parameters were 150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds. Each stimulation elicited tonic-clonic seizure. The sham groups (acute and chronic) were handled identically to the ECS-treated rats except no current was passed.

#### *Drugs and chemicals*

Thiobarbituric acid, catalase, superoxide dismutase, dinitrophenylhydrazine, adrenaline, hydrogen peroxide, were purchased from Sigma, St. Louis, MO. Glycine was purchased from Nuclear, Diadema, SP, Brasil.

#### Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

As an index of ROS production we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a sensitive method for measurement of lipid peroxidation, as previously described (18). Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as MDA (malondialdehyde) equivalents (nmol / mg protein).

### *Measurement of protein carbonyls*

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described (19). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370nm.

### *Protein Quantification*

All the results were normalized by the protein content (20).

### *Statistical analysis*

All data are presented as means  $\pm$  S.E.M. Differences among experimental groups in experiments evaluating oxidative parameters were determined by One-way ANOVA. Multiple comparisons were performed by a Newman-Keuls test. In all experiments, P values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## **RESULTS**

### *Oxidative damage in hippocampus*

It is shown in Figure 1A a decrease in TBARS in the hippocampus immediately after a single ECS. TBARS levels returns to control levels 48h and 7d after a single ECS. Late after ECS (30d) there is a decrease in TBARS in the hippocampus (Figure 1A). This pattern was similar when chronic ECS was performed. There is a decrease in TBARS immediately after, 7d and 30d after the last ECS in the chronic group (Figure 1B). As shown for TBARS, protein carbonyls are decreased immediately after, 7d and 30d after a single ECS (Figure 1C). In chronic ECS there was no differences in protein carbonyls in all groups tested (Figure 1D).

### *Oxidative damage in cortex*

It is shown in Figure 2A an increase in TBARS in the cortex 7d and 30d after a single ECS. Similarly when chronic ECS was performed we demonstrated an immediately increase in cortex TBARS that was observed 30d after the ECS (figure 2B). We cannot demonstrate any alteration in carbonyls levels both after a single and multiple ECS (Figure 2C, 2D).

### *Oxidative damage in striatum*

We cannot demonstrate any alteration in TBARS levels both after a single and multiple ECS in striatum (Figure 3A, 3B). In contrast, as demonstrated for hippocampus, we observed a decrease in protein carbonyls 7d after a single ECS and 48h and 7d after multiple ECS (Figure 3C, 3D).

### *Oxidative damage in cerebellum*

As we demonstrate in figure 4A and 4B, an opposite effect was observed in TBARS when compared a single and multiple ECS. We observed an increase in TBARS levels 48h after a single ECS, but a decrease 30d after multiple ECS. Both single and multiple ECS protocols induces a decrease in protein carbonyls in cerebellum (Figure 4C, 4D).

## **DISCUSSION**

We for the first time demonstrated that after ECS there is a structure-related occurrence oxidative damage to biomolecules after a single or multiple ECS. Hippocampus, striatum and cerebellum seem to have antioxidant mechanisms sufficient to avoid oxidative

damage. In contrast, the occurrence of oxidative damage in cortex suggests that this cerebral structure is more susceptible to oxidative stress after ECS.

We expect that after ECS the liberation of excitatory neurotransmitters could induce oxidative stress in CNS, as we demonstrated in animal models of epilepsy (15). In addition, the findings of Erakovic and co-workers (17) demonstrated a decrease in superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase in frontal cortex, cerebellum and hippocampus after ECS, which is compatible with the occurrence of oxidative stress. These observations were not supported by our findings. In both single and chronic ECS, generally, there is a decrease in oxidative damage parameters (namely TBARS and protein carbonyls) in hippocampus, cerebellum and striatum early and late after ECS induced convulsion. We can suppose that NMDA receptors and the excitotoxicity demonstrated after convulsions in others animal models do not play a major role in ECS, at least in these studied structures. There is no report in the literature that describes glutamatergic activity during acute or chronic ECS. Generally, status epilepticus seem to induce an acute increase in oxidative damage in CNS secondary to the excessive release of excitatory neurotransmitters (21-23). The chronic effects of convulsions on oxidative damage parameters are less studied (15). In the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy we demonstrated a reduction on TBARS levels 7d and 75d after status epilepticus (15). In contrast, in the kainic acid model, TBARS levels are not different from control 7d and 75d after status epilepticus (15). These differences could be related with the neuronal loss and hypometabolism observed in the chronic epileptic animals (24). After ECT, some studies reported an increase in blood flow, while others a decrease (25-29). In addition it seems that there is no difference on cerebral glucose metabolism after ECT (30). In this way, it seems unlikely that the reduction on oxidative damage parameters is secondary to cerebral hypometabolism, as demonstrated in chronic epileptic animals.

Cortical oxidative parameters resemble acute effects of pilocarpine or kainic acid epilepsy models. The acute oxidative damage in pilocarpine and kainic acid models seems to be, at least in part, responsible to the chronic effects of drug administration (15). We here demonstrate that as long as 30d after single or multiple ECS we can detect lipid peroxidation, but not protein carbonyls, in cortex. We cannot ascertain the exact explanation for these differences. We suppose that the heterogeneity of cortical regions could be, in part, responsible for the observed results. Future studies will address this issue.

Our findings, for the first time, demonstrated that after ECS there is no oxidative damage in several brain regions, namely hippocampus, striatum and cerebellum. This findings help us to understand the differences between ECS and others models of animal convulsion, and suggests that oxidative damage do not participate in adverse events after ECT (i.e. retrograde amnesia).

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by grants from CNPq/MCT-Brazil, UNESCO-Brazil and FUNCITEC-Brazil.

## REFERENCES

1. American Psychiatric Association. *The practice of ECT: recommendations for treatment, training and privileging, Task force report on ECT*. Washington DC: American Psychiatric Press, 1990.
2. Abrams, R. *Electroconvulsive therapy*. Oxford: Oxford University Press, 1988.
3. Lerer, B., Shapira, B. 1996. The cognitive side effects of electroconvulsive therapy. *Ann N Y Acad Sci* 462: 366-375.
4. Fink, M. *Convulsive Therapy: Theory and Practice*. New York: Reven Press, 1979.
5. Fink, M., Nemeroff, A. 1989. A neuroendocrine view of ECT. *Convulsive Therapy* 5: 296-304.
6. Herman, J.P., Schafer, K.H., Sladek, C.D., Day, R., Young, E.A., Akil, H., Watson, S.J. 1989. Chronic electro-convulsive shock treatment elicits up-regulation of CRF and AVP mRNA in select population of neuroendocrine neurons. *Brain Research* 501: 235-246.
7. Madsen, M.T., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T.G., Lindvall, O., Tingstrom, A. 2000. Increased Neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Society of Biological Psychiatry* 47:1043-1049.
8. Rosen, Y., Reznik, I., Sluvis, A., Kaplan, D., Mester, R. 2003. The significance of the nitric oxide in electro-convulsive therapy: a proposed neurophysiological mechanism. *Medical Hypotheses* 60: 424-429.
9. The UK ECT Review Group. 2003. Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 361: 799-808.
10. Janicak, P.G., Davis, J.M., Gibbons, R.D. 1995. Efficacy of ECT: A meta-analysis. *Am J Psychiatry* 142: 297-302.
11. Devanand, D.P., Dwork, A.J., Hutchinson, E.R., Bolwig, T.G., Sackeim, H.A. 1994. Does ECT alter brain structure? *Am J Psychiatry* 151: 957-970.

12. Newman, M.E., Gur, E., Shapira, B., Lerer, B. 1998. Neurochemical mechanism of action of ECS: evidence from in vivo studies. *J Electroconvulsive Therapy* 14: 153-171.
13. Zachrisson, O.C., Balldin, J., Ekman, R., Naesh, O., Rosengren, L., Agren, H., Blennow, K. 2000. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Res* 96:157-65.
14. Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Frota, M.R.C., Andrades, M.E., Caregnato, F.F., Vianna, M., Schroder, N., Quevedo, J., Izquierdo, I., Archer, T. 2001. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Dev Brain Res* 130: 109 - 114.
15. Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M., Schroder, N., Quevedo, J., Benfato, M.S., Moreira, J.C., Walz, R. (2000). Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett* 291: 179 - 182.
16. Klamt, F., Dal-Pizzol, F., Frota, M.L.C., Walz, R., Andrades, M.E., Silva, E.G., Brentani, R., Izquierdo, I., Moreira, J.C.F. 2001. Imbalance of antioxidant defence in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 30: 1137-1144.
17. Erakovic, V., Zupam, G., Varljen, J., Radosevic, S., Simonic, A. 2000. Electroconvulsive shock in rats: changes in superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity. *Mol Brain Res* 76: 266-274.
18. Draper, H.H., Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-431.
19. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N. 1990 Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-478.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
21. Ben-Ari, Y. 1995. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 12: 375-403.



22. Shulz, J.N., Henshaw, D.R., Siwek, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Cipolloni, P.B., Kowall, N.W., Rosen, B.R., Beal, M.F. 1995. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem.* 64: 2239-2247.
23. Ueda, Y., Yokoyama, H., Niwa, R., Konaka, R., Ohya-Nishiguchi, H., Kamada, H. 1997. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rat. *Epilepsy Res.* 26; 329-333.
24. Scorza, F.A., Sanabria, E.R., Calderazzo, L., Cavalheiro, E. 1998. Glucose utilization during interictal intervals in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study. *Epilepsia.* 39: 1041-1045.
25. Awata, S., Konno, M., Kawashima, R., Suzuki, K., Sato, T., Matsuoka, H., Fukuda, H., Sato, M. 2002. Changes in regional cerebral blood flow abnormalities in late-life depression following response to electroconvulsive therapy. *Psychiatry Clin Neurosci.* 56: 31-40.
26. Conca, A., Prapotnik, M., Peschina, W., Konig, P. 2003. Simultaneous pattern of rCBF and rCMRGlucose in continuation ECT: case reports. *Psychiatry Res.* 124: 191-8.
27. Fabbri, F., Henry, M.E., Renshaw, P.F., Nadgir, S., Ehrenberg, B.L., Franceschini, S., Fantini, S. 2003. Bilateral near-infrared monitoring of the cerebral concentration and oxygen-saturation of hemoglobin during right unilateral electro-convulsive therapy. *Brain Res.* 992: 193-204.
28. Mervaala, E., Kononen, M., Fohr, J., Husso-Saastamoinen, M., Valkonen-Korhonen, M., Kuikka, J.T., Viinamaki, H., Tammi, A.K., Tiihonen, J., Partanen, J., Lehtonen, J. 2001. SPECT and neuropsychological performance in severe depression treated with ECT. *J Affect Disord* 66: 47-58.
29. Vangu, M.D., Esser, J.D., Boyd, I.H., Berk, M. 2003. Effects of electroconvulsive therapy on regional cerebral blood flow measured by 99mtechnetium HMPAO SPECT. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 15-9.

30. Volkow, N.D., Bellar, S., Mullani, N., Jould, L., Dewey, S. 1988. Effects of Electroconvulsive Therapy on Brain Glucose Metabolism: A Preliminary Study. *Convuls Ther.* 4: 199-205.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1

**A - Thiobarbituric acid reactive species in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed and the hippocampus was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Thiobarbituric acid reactive species in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**C - Protein carbonyls in the hippocampus of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**D - Protein carbonyls in the hippocampus of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every

other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the hippocampus was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

## Figure 2

**A - Thiobarbituric acid reactive species in the cortex of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed and the cortex was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Thiobarbituric acid reactive species in the cortex of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cortex was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**C - Protein carbonyls in the cortex of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cortex was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

**D - Protein carbonyls in the cortex of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cortex was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

### Figure 3

**A - Thiobarbituric acid reactive species in the striatum of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed and the striatum was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

**B - Thiobarbituric acid reactive species in the striatum of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the striatum was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

**C - Protein carbonyls in the striatum of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the striatum was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**D - Protein carbonyls in the striatum of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the striatum was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

#### Figure 4

**A - Thiobarbituric acid reactive species in the cerebellum of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed and the cerebellum was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**B - Thiobarbituric acid reactive species in the cerebellum of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cerebellum was isolated for determination of thiobarbituric acid reactive species as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**C - Protein carbonyls in the cerebellum of rats submitted to a single electroconvulsive shock.** Rats were submitted to a single electroconvulsive shock (150

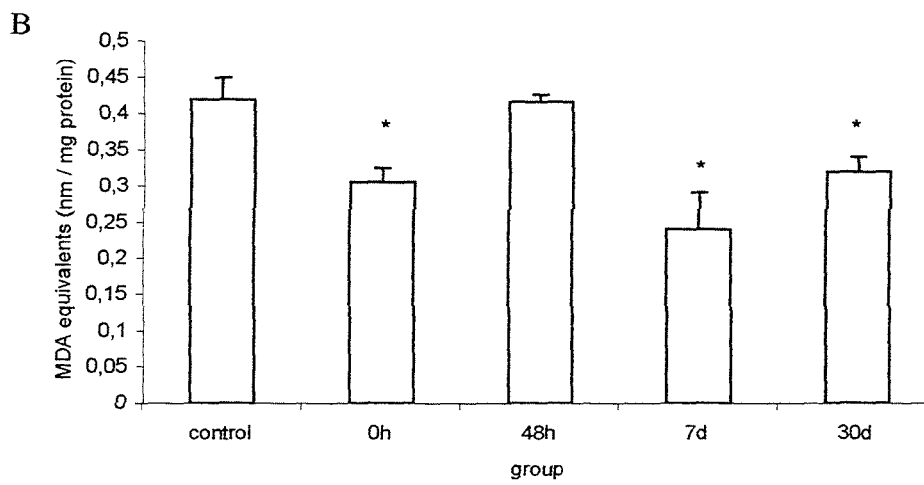
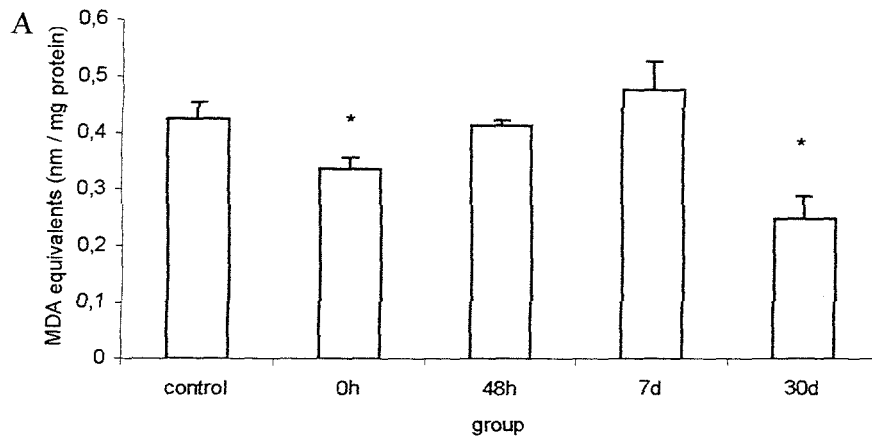
V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cerebellum was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

- different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

**D - Protein carbonyls in the cerebellum of rats submitted to chronic electroconvulsive shock.** Rats were submitted to eight electroconvulsive shock every other day (150 V, 60 Hz, sine wave, during 2 seconds) or sham manipulate. Immediately after, 48h, 7 days and 30 days after treatment animals were sacrificed, and the cerebellum was isolated for determination of protein carbonyls as described under "Materials and Methods". Values are expressed as means  $\pm$  S.D. (n=5 for each group).

\* different from sham (control) ( $p < 0.05$ ).

Figure 1





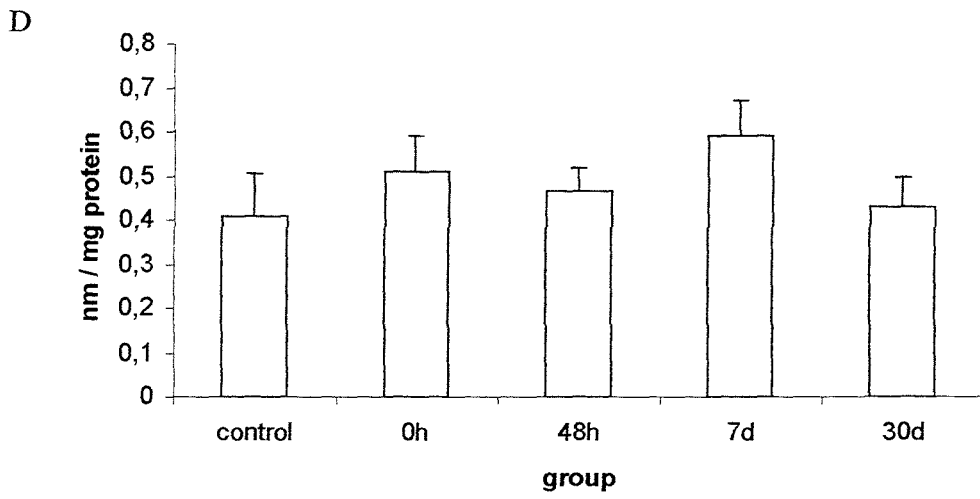
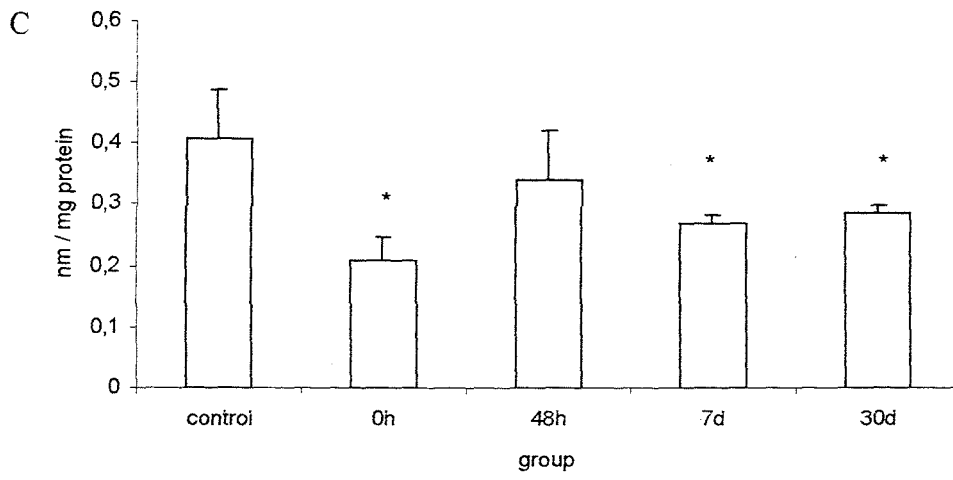
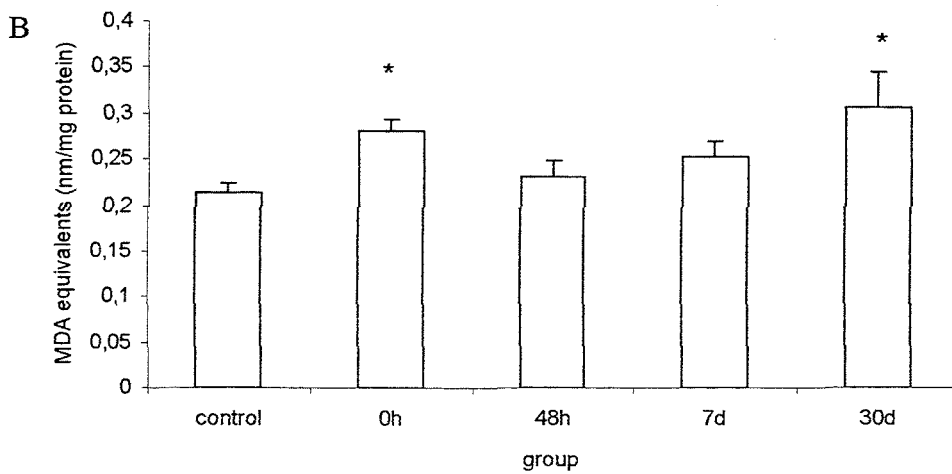
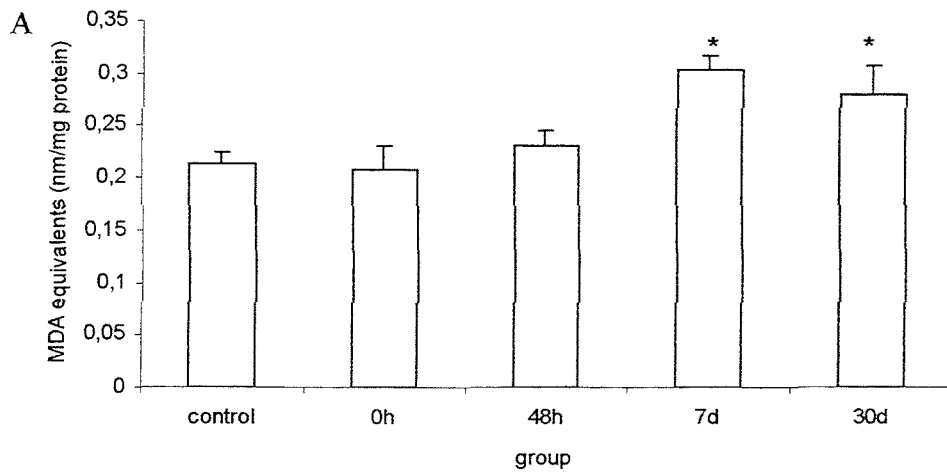
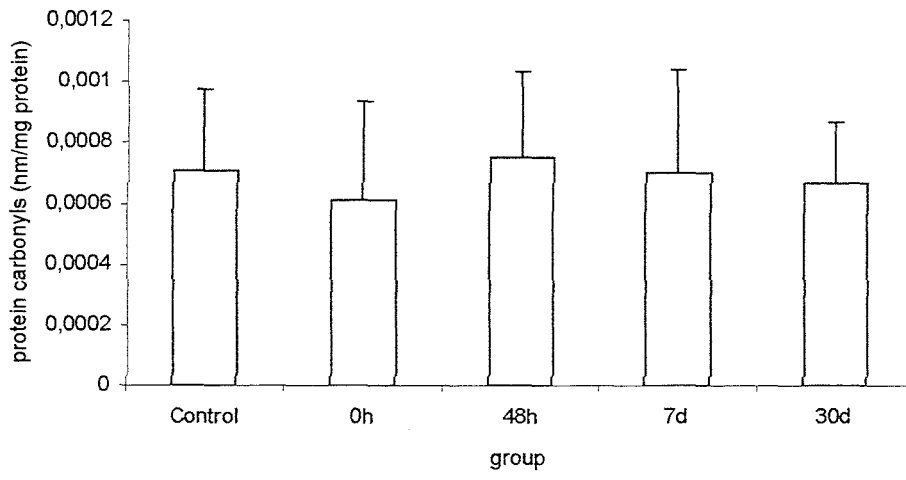


Figure 2



C



D

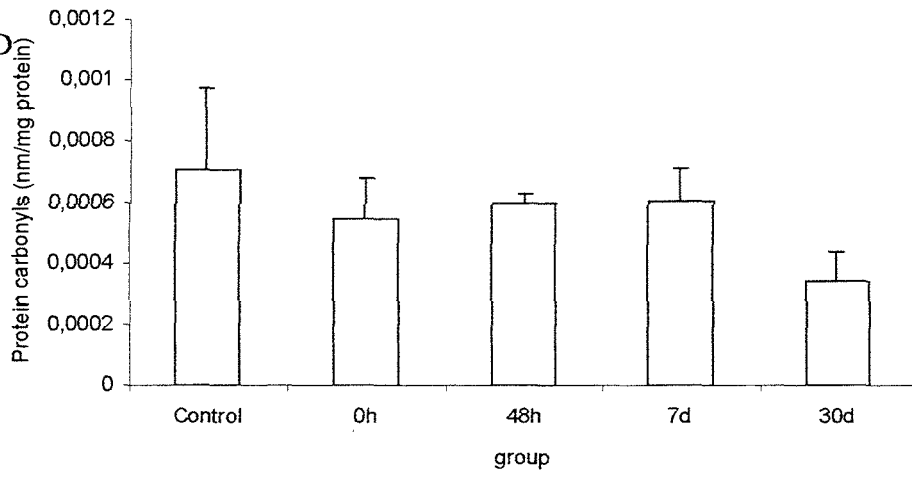
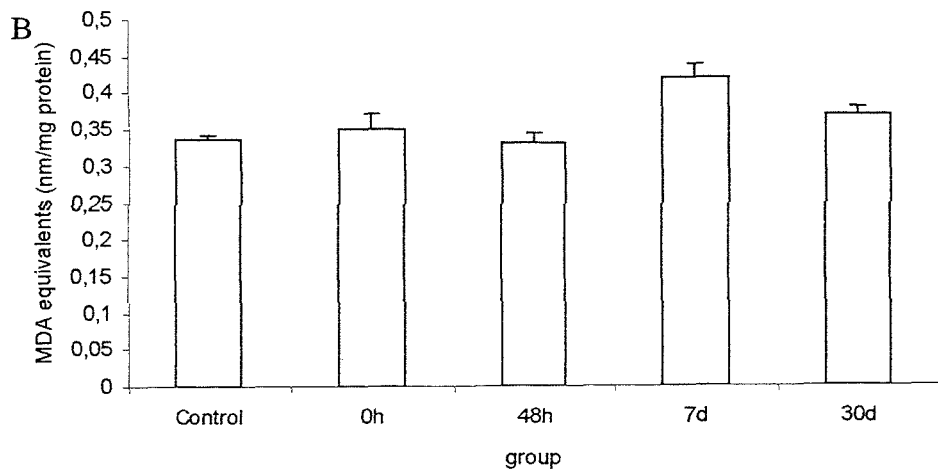
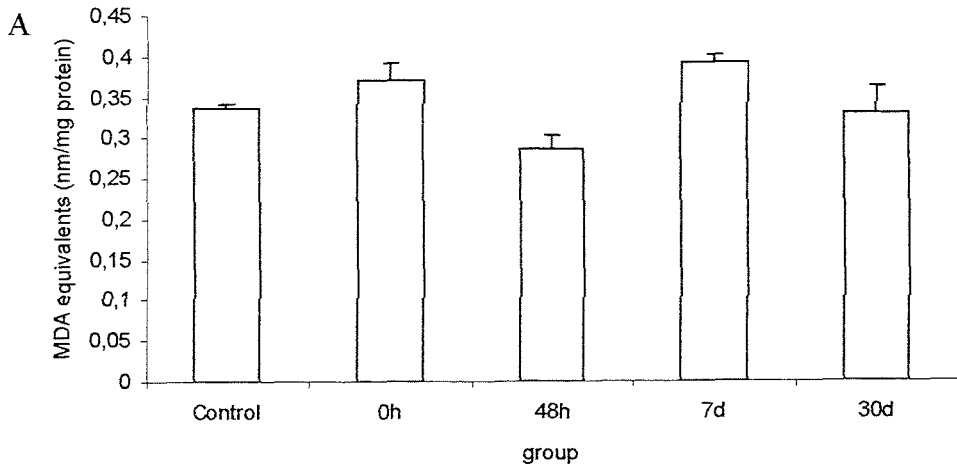


Figure 3



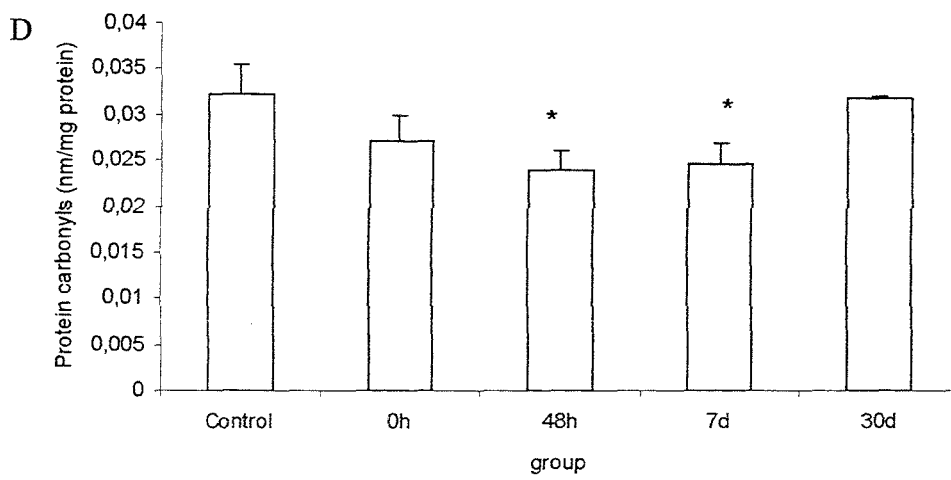
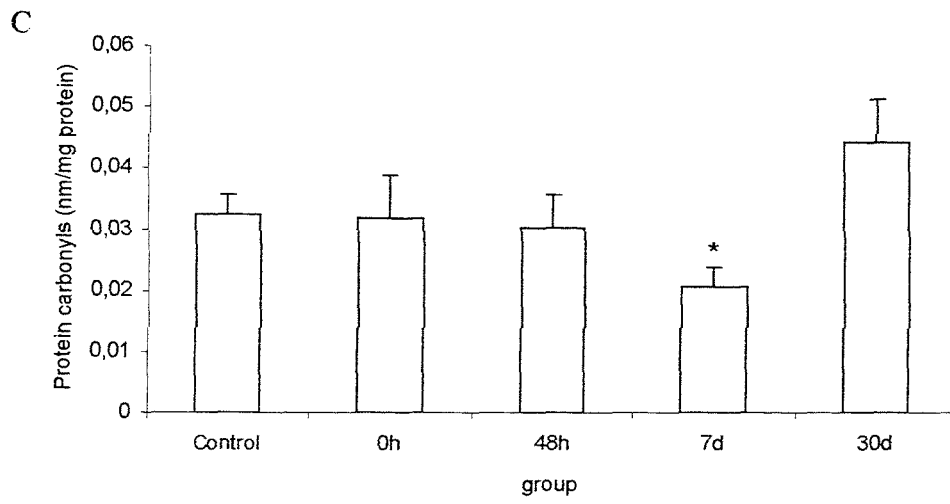
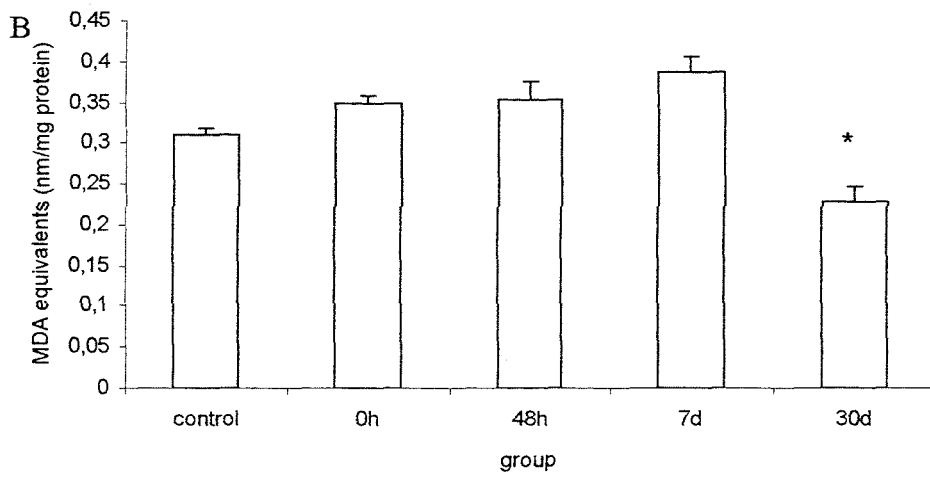
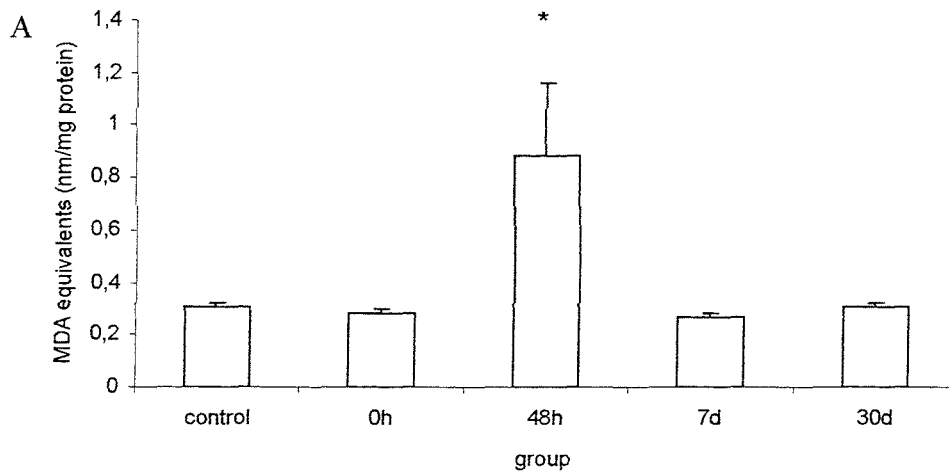
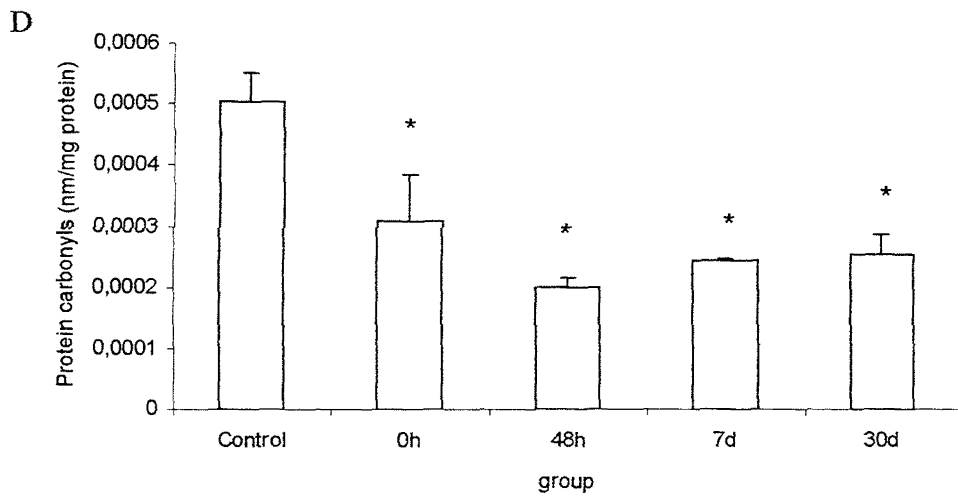
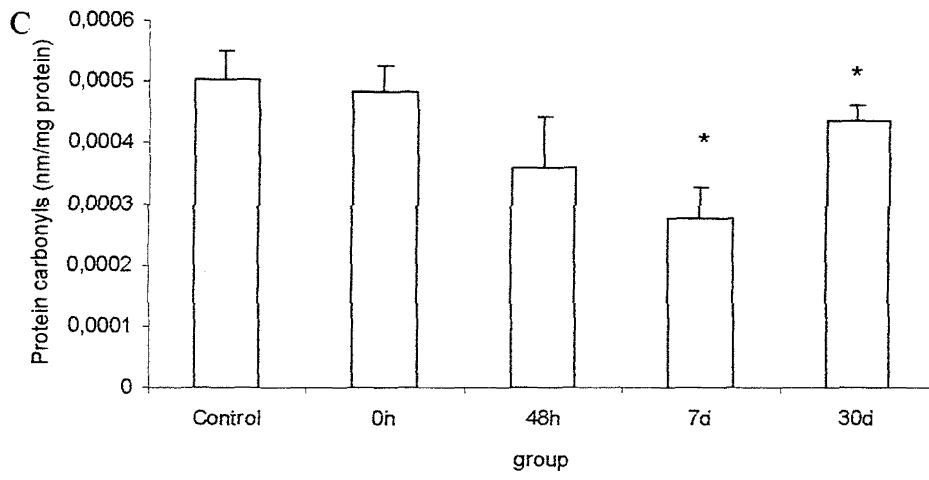


Figure 4





## CAPÍTULO 4

### DISCUSSÃO GERAL

1. Introdução

2. Objetivos

3. Metodologia

4. Resultados

5. Conclusões

6. Referências

7. Anexos

8. Bibliografia

9. Índice

10. Glossário

11. Siglas

12. Abreviações

13. Símbolos

14. Unidades

15. Fórmulas

16. Tabelas

17. Figuras

18. Gráficos

19. Diagramas

20. Fluxogramas

21. Mapas

22. Fotografias

23. Vídeos

24. Áudios

25. Softwares

26. Hardware

27. Redes

28. Segurança

29. Privacidade

30. Ética

31. Legislação

32. Normas

33. Padrões

34. Certificações

35. Licenças

36. Direitos

37. Obrigações

38. Responsabilidades

39. Riscos

40. Oportunidades

41. Desafios

42. Soluções

43. Inovações

44. Tendências

45. Perspectivas

46. Conclusões

47. Referências

48. Anexos

49. Bibliografia

50. Índice

51. Glossário

52. Siglas

53. Abreviações

54. Símbolos

55. Unidades

56. Fórmulas

57. Tabelas

58. Figuras

59. Gráficos

60. Diagramas

61. Fluxogramas

62. Mapas

63. Fotografias

64. Vídeos

65. Áudios

66. Softwares

67. Hardware

68. Redes

69. Segurança

70. Privacidade

71. Ética

72. Legislação

73. Normas

74. Padrões

75. Certificações

76. Licenças

77. Direitos

78. Obrigações

79. Responsabilidades

80. Riscos

81. Oportunidades

82. Desafios

83. Soluções

84. Inovações

85. Tendências

86. Perspectivas

87. Conclusões

88. Referências

89. Anexos

90. Bibliografia

91. Índice

92. Glossário

93. Siglas

94. Abreviações

95. Símbolos

96. Unidades

97. Fórmulas

98. Tabelas

99. Figuras

100. Gráficos

101. Diagramas

102. Fluxogramas

103. Mapas

104. Fotografias

105. Vídeos

106. Áudios

107. Softwares

108. Hardware

109. Redes

110. Segurança

111. Privacidade

112. Ética

113. Legislação

114. Normas

115. Padrões

116. Certificações

117. Licenças

118. Direitos

119. Obrigações

120. Responsabilidades

121. Riscos

122. Oportunidades

123. Desafios

124. Soluções

125. Inovações

126. Tendências

127. Perspectivas

128. Conclusões

129. Referências

130. Anexos

131. Bibliografia

132. Índice

133. Glossário

134. Siglas

135. Abreviações

136. Símbolos

137. Unidades

138. Fórmulas

139. Tabelas

140. Figuras

141. Gráficos

142. Diagramas

143. Fluxogramas

144. Mapas

145. Fotografias

146. Vídeos

147. Áudios

148. Softwares

149. Hardware

150. Redes

151. Segurança

152. Privacidade

153. Ética

154. Legislação

155. Normas

156. Padrões

157. Certificações

158. Licenças

159. Direitos

160. Obrigações

161. Responsabilidades

162. Riscos

163. Oportunidades

164. Desafios

165. Soluções

166. Inovações

167. Tendências

168. Perspectivas

169. Conclusões

170. Referências

171. Anexos

172. Bibliografia

173. Índice

174. Glossário

175. Siglas

176. Abreviações

177. Símbolos

178. Unidades

179. Fórmulas

180. Tabelas

181. Figuras

182. Gráficos

183. Diagramas

184. Fluxogramas

185. Mapas

186. Fotografias

187. Vídeos

188. Áudios

189. Softwares

190. Hardware

191. Redes

192. Segurança

193. Privacidade

194. Ética

195. Legislação

196. Normas

197. Padrões

198. Certificações

199. Licenças

200. Direitos

201. Obrigações

202. Responsabilidades

203. Riscos

204. Oportunidades

205. Desafios

206. Soluções

207. Inovações

208. Tendências

209. Perspectivas

210. Conclusões

211. Referências

212. Anexos

213. Bibliografia

214. Índice

215. Glossário

216. Siglas

217. Abreviações

218. Símbolos

219. Unidades

220. Fórmulas

221. Tabelas

222. Figuras

223. Gráficos

224. Diagramas

225. Fluxogramas

226. Mapas

227. Fotografias

228. Vídeos

229. Áudios

230. Softwares

231. Hardware

232. Redes

233. Segurança

234. Privacidade

235. Ética

236. Legislação

237. Normas

238. Padrões

239. Certificações

240. Licenças

241. Direitos

242. Obrigações

243. Responsabilidades

244. Riscos

245. Oportunidades

246. Desafios

247. Soluções

248. Inovações

249. Tendências

250. Perspectivas

251. Conclusões

252. Referências

253. Anexos

254. Bibliografia

255. Índice

256. Glossário

257. Siglas

258. Abreviações

259. Símbolos

260. Unidades

261. Fórmulas

262. Tabelas

263. Figuras

264. Gráficos

265. Diagramas

266. Fluxogramas

267. Mapas

268. Fotografias

269. Vídeos

270. Áudios

271. Softwares

272. Hardware

273. Redes

274. Segurança

275. Privacidade

276. Ética

277. Legislação

278. Normas

279. Padrões

280. Certificações

281. Licenças

282. Direitos

283. Obrigações

284. Responsabilidades

285. Riscos

286. Oportunidades

287. Desafios

288. Soluções

289. Inovações

290. Tendências

291. Perspectivas

292. Conclusões

293. Referências

294. Anexos

295. Bibliografia

296. Índice

297. Glossário

298. Siglas

299. Abreviações

300. Símbolos

301. Unidades

302. Fórmulas

303. Tabelas

304. Figuras

305. Gráficos

306. Diagramas

307. Fluxogramas

308. Mapas

309. Fotografias

310. Vídeos

311. Áudios

312. Softwares

313. Hardware

314. Redes

315. Segurança

316. Privacidade

317. Ética

318. Legislação

319. Normas

320. Padrões

321. Certificações

322. Licenças

323. Direitos

324. Obrigações

325. Responsabilidades

326. Riscos

327. Oportunidades

328. Desafios

329. Soluções

330. Inovações

331. Tendências

332. Perspectivas

333. Conclusões

334. Referências

335. Anexos

336. Bibliografia

337. Índice

338. Glossário

339. Siglas

340. Abreviações

341. Símbolos

342. Unidades

343. Fórmulas

344. Tabelas

345. Figuras

346. Gráficos

347. Diagramas

348. Fluxogramas

349. Mapas

350. Fotografias

351. Vídeos

352. Áudios

353. Softwares

354. Hardware

355. Redes

356. Segurança

357. Privacidade

358. Ética

359. Legislação

360. Normas

361. Padrões

362. Certificações

363. Licenças

364. Direitos

365. Obrigações

366. Responsabilidades

367. Riscos

368. Oportunidades

369. Desafios

370. Soluções

371. Inovações

372. Tendências

373. Perspectivas

374. Conclusões

375. Referências

376. Anexos

377. Bibliografia

378. Índice

379. Glossário

380. Siglas

381. Abreviações

382. Símbolos

383. Unidades

384. Fórmulas

385. Tabelas

386. Figuras

387. Gráficos

388. Diagramas

389. Fluxogramas

390. Mapas

391. Fotografias

392. Vídeos

393. Áudios

394. Softwares

395. Hardware

396. Redes

397. Segurança

398. Privacidade

399. Ética

400. Legislação

401. Normas

402. Padrões

403. Certificações

404. Licenças

405. Direitos

406. Obrigações

407. Responsabilidades

408. Riscos

409. Oportunidades

410. Desafios

411. Soluções

412. Inovações

413. Tendências

414. Perspectivas

415. Conclusões

416. Referências

417. Anexos

418. Bibliografia

419. Índice

420. Glossário

421. Siglas

422. Abreviações

423. Símbolos

424. Unidades

425. Fórmulas

426. Tabelas

427. Figuras

428. Gráficos

429. Diagramas

430. Fluxogramas

431. Mapas

432. Fotografias

433. Vídeos

434. Áudios

435. Softwares

436. Hardware

437. Redes

438. Segurança

439. Privacidade

440. Ética

441. Legislação

442. Normas

443. Padrões

444. Certificações

445. Licenças

446. Direitos

447. Obrigações

448. Responsabilidades

449. Riscos

450. Oportunidades

451. Desafios

452. Soluções

453. Inovações

454. Tendências

455. Perspectivas

456. Conclusões

457. Referências

458. Anexos

459. Bibliografia

460. Índice

461. Glossário

462. Siglas

463. Abreviações

464. Símbolos

465. Unidades

466. Fórmulas

467. Tabelas

468. Figuras

469. Gráficos

470. Diagramas

471. Fluxogramas

472. Mapas

473. Fotografias

474. Vídeos

475. Áudios

476. Softwares

477. Hardware

478. Redes

479. Segurança

480. Privacidade

481. Ética

482. Legislação

483. Normas

484. Padrões

485. Certificações

486. Licenças

487. Direitos

488. Obrigações

489. Responsabilidades

490. Riscos

491. Oportunidades

492. Desafios

493. Soluções

494. Inovações

495. Tendências

496. Perspectivas

497. Conclusões

498. Referências

499. Anexos

500. Bibliografia

501. Índice

502. Glossário

503. Siglas

504. Abreviações

505. Símbolos

506. Unidades

507. Fórmulas

508. Tabelas

509. Figuras

510. Gráficos

511. Diagramas

512. Fluxogramas

513. Mapas

514. Fotografias

515. Vídeos

516. Áudios

517. Softwares

518. Hardware

519. Redes

520. Segurança

521. Privacidade

522. Ética

523. Legislação

524. Normas

525. Padrões

526. Certificações

527. Licenças

528. Direitos

529. Obrigações

530. Responsabilidades

531. Riscos

532. Oportunidades

533. Desafios

534. Soluções

535. Inovações

536. Tendências

537. Perspectivas

538. Conclusões

539. Referências

540. Anexos

541. Bibliografia

542. Índice

543. Glossário

544. Siglas

545. Abreviações

546. Símbolos

547. Unidades

548. Fórmulas

549. Tabelas

550. Figuras

551. Gráficos

552. Diagramas

553. Fluxogramas

554. Mapas

555. Fotografias

556. Vídeos

557. Áudios

558. Softwares

559. Hardware

560. Redes

561. Segurança

562. Privacidade

563. Ética

564. Legislação

565. Normas

566. Padrões

567. Certificações

568. Licenças

569. Direitos

570. Obrigações

571. Responsabilidades

572. Riscos

573. Oportunidades

574. Desafios

575. Soluções

576. Inovações

577. Tendências

578. Perspectivas

579. Conclusões

580. Referências

581. Anexos

582. Bibliografia

583. Índice

584. Glossário

585. Siglas

586. Abreviações

587. Símbolos

588. Unidades

589. Fórmulas

590. Tabelas

591. Figuras

592. Gráficos

593. Diagramas

594. Fluxogramas

595. Mapas

596. Fotografias

597. Vídeos

598. Áudios

599. Softwares

600. Hardware

601. Redes

602. Segurança

603. Privacidade

604. Ética

605. Legislação

606. Normas

607. Padrões

608. Certificações

609. Licenças

610. Direitos

611. Obrigações

612. Responsabilidades

613. Riscos

614. Oportunidades

615. Desafios

616. Soluções

617. Inovações

618. Tendências

619. Perspectivas

620. Conclusões

621. Referências

622. Anexos

623. Bibliografia

624. Índice

625. Glossário

626. Siglas

627. Abreviações

628. Símbolos

629. Unidades

630. Fórmulas

631. Tabelas

632. Figuras

633. Gráficos

634. Diagramas

635. Fluxogramas

636. Mapas

637. Fotografias

638. Vídeos

639. Áudios

640. Softwares

641. Hardware

642. Redes

643. Segurança

644. Privacidade

645. Ética

646. Legislação

647. Normas

648. Padrões

649. Certificações

650. Licenças

651. Direitos

652. Obrigações

653. Responsabilidades

654. Riscos

655. Oportunidades

656. Desafios

657. Soluções

658. Inovações

659. Tendências

660. Perspectivas

661. Conclusões

662. Referências

663. Anexos

664. Bibliografia

665. Índice

666. Glossário

667. Siglas

668. Abreviações

669. Símbolos

670. Unidades

671. Fórmulas

672. Tabelas

673. Figuras

674. Gráficos

675. Diagramas

676. Fluxogramas

677. Mapas

678. Fotografias

679. Vídeos

680. Áudios

681. Softwares

682. Hardware

683. Redes

684. Segurança

685. Privacidade

686. Ética

687. Legislação

688. Normas

689. Padrões

690. Certificações

691. Licenças

692. Direitos

693. Obrigações

694. Responsabilidades

695. Riscos

696. Oportunidades

697. Desafios

698. Soluções

699. Inovações

700. Tendências

701. Perspectivas

702. Conclusões

703. Referências

704. Anexos

705. Bibliografia

706. Índice

707. Glossário

708. Siglas

709. Abreviações

710. Símbolos

711. Unidades

712. Fórmulas

713. Tabelas

714. Figuras

715. Gráficos

716. Diagramas

717. Fluxogramas

718. Mapas

719. Fotografias

720. Vídeos

721. Áudios

722. Softwares

723. Hardware

724. Redes

725. Segurança

726. Privacidade

727. Ética

728. Legislação

729. Normas

730. Padrões

731. Certificações

732. Licenças

733. Direitos

734. Obrigações

735. Responsabilidades

736. Riscos

737. Oportunidades

738. Desafios

739. Soluções

740. Inovações

741. Tendências

742. Perspectivas

743. Conclusões

744. Referências

745. Anexos

746. Bibliografia

747. Índice

748. Glossário

749. Siglas

750. Abreviações

751. Símbolos

752. Unidades

753. Fórmulas

754. Tabelas

755. Figuras

756. Gráficos

757. Diagramas

758. Fluxogramas

759. Mapas

760. Fotografias

761. Vídeos

762. Áudios

763. Softwares

764. Hardware

765. Redes

766. Segurança

767. Privacidade

768. Ética

769. Legislação

770. Normas

771. Padrões

772. Certificações

773. Licenças

774. Direitos

775. Obrigações

776. Responsabilidades

777. Riscos

778. Oportunidades

779. Desafios

780. Soluções

781. Inovações

782. Tendências

783. Perspectivas

784. Conclusões

785. Referências

786. Anexos

787. Bibliografia

788. Índice

789. Glossário

790. Siglas

791. Abreviações

792. Símbolos

793. Unidades

794. Fórmulas

795. Tabelas

796. Figuras

797. Gráficos

798. Diagramas

799. Fluxogramas

800. Mapas

801. Fotografias

802. Vídeos

803. Áudios

804. Softwares

805. Hardware

806. Redes

807. Segurança

808. Privacidade

809. Ética

810. Legislação

811. Normas

812. Padrões

813. Certificações

814. Licenças

815. Direitos

816. Obrigações

817. Responsabilidades

818. Riscos

819. Oportunidades

820. Desafios

821. Soluções

822. Inovações

823. Tendências

824. Perspectivas

825. Conclusões

826. Referências

827. Anexos

828. Bibliografia

829. Índice

830. Glossário

831. Siglas

832. Abreviações

833. Símbolos

834. Unidades

835. Fórmulas

836. Tabelas

837. Figuras

838. Gráficos

839. Diagramas

840. Fluxogramas

841. Mapas

842. Fotografias

843. Vídeos

844. Áudios

845. Softwares

846. Hardware

847. Redes

848. Segurança

849. Privacidade

850. Ética

851. Legislação

852. Normas

853. Padrões

854. Certificações

855. Licenças

856. Direitos

857. Obrigações

858. Responsabilidades

859. Riscos

860. Oportunidades

861. Desafios

862. Soluções

863. Inovações

864. Tendências

865. Perspectivas

866. Conclusões

867. Referências

868. Anexos

869. Bibliografia

870. Índice

871. Glossário

872. Siglas

873. Abreviações

874. Símbolos

875. Unidades

876. Fórmulas

877. Tabelas

878. Figuras

879. Gráficos

880. Diagramas

881. Fluxogramas

882. Mapas

883. Fotografias

884. Vídeos

885. Áudios

886. Softwares

887. Hardware

888. Redes

889. Segurança

890. Privacidade

891. Ética

892. Legislação

893. Normas

894. Padrões

895. Certificações

896. Licenças

897. Direitos

898. Obrigações

899. Responsabilidades

900. Riscos

901. Oportunidades

902. Desafios

903. Soluções

904. Inovações

905. Tendências

906. Perspectivas

907. Conclusões

908. Referências

909. Anexos

910. Bibliografia

911. Índice

912. Glossário

913. Siglas

914. Abreviações

915. Símbolos

916. Unidades

917. Fórmulas

918. Tabelas

919. Figuras

920. Gráficos

921. Diagramas

922. Fluxogramas

923. Mapas

924. Fotografias

925. Vídeos

926. Áudios

927. Softwares

928. Hardware

929. Redes

930. Segurança

931. Privacidade

932. Ética

933. Legislação

934. Normas

935. Padrões

936. Certificações

937. Licenças

938. Direitos

939. Obrigações

940. Responsabilidades

941. Riscos

942. Oportunidades

943. Desafios

944. Soluções

945. Inovações

946. Tendências

947. Perspectivas

948. Conclusões

949. Referências

950. Anexos

951. Bibliografia

952. Índice

953. Glossário

954. Siglas

955. Abreviações

956. Símbolos

957. Unidades

958. Fórmulas

959. Tabelas

960. Figuras

961. Gráficos

962. Diagramas

963. Fluxogramas

964. Mapas

965. Fotografias

966. Vídeos

967. Áudios

968. Softwares

969. Hardware

970. Redes

971. Segurança

972. Privacidade

973. Ética

974. Legislação

975. Normas

976. Padrões

977. Certificações

978. Licenças

979. Direitos

980. Obrigações

981. Responsabilidades

982. Riscos

983. Oportunidades

984. Desafios

985. Soluções

986. Inovações

987. Tendências

988. Perspectivas

989. Conclusões

990. Referências

991. Anexos

992. Bibliografia

993. Índice

994. Glossário

995. Siglas

996. Abreviações

997. Símbolos

998. Unidades

999. Fórmulas

1000. Tabelas

1001. Figuras

1002. Gráficos

1003. Diagramas

1004. Fluxogramas

1005. Mapas

1006. Fotografias

1007. Vídeos

1008. Áudios

1009. Softwares

1010. Hardware

1011. Redes

1012. Segurança

1013. Privacidade

1014. Ética

1015. Legislação

1016. Normas

1017. Padrões

1018. Certificações

1019. Licenças

1020. Direitos

1021. Obrigações

1022. Responsabilidades

1023. Riscos

1024. Oportunidades

1025. Desafios

1026. Soluções

1027. Inovações

1028. Tendências

1029. Perspectivas

1030. Conclusões

1031. Referências

1032. Anexos

1033. Bibliografia

1034. Índice

1035. Glossário

1036. Siglas

1037. Abreviações

1038. Símbolos

1039. Unidades

1040. Fórmulas

1041. Tabelas

1042. Figuras

1043. Gráficos

1044. Diagramas

1045. Fluxogramas

1046. Mapas

1047. Fotografias

1048. Vídeos

1049. Áudios

1050. Softwares

1051. Hardware

1052. Redes

1053. Segurança

1054. Privacidade

1055. Ética

1056. Legislação

1057. Normas

1058. Padrões

1059. Certificações

1060. Licenças

1061. Direitos

1062. Obrigações

1063. Responsabilidades

1064. Riscos

1065. Oportunidades

1066. Desafios

1067. Soluções

1068. Inovações

1069. Tendências

1070. Perspectivas

1071. Conclusões

1072. Referências

1073. Anexos

1074. Bibliografia

1075. Índice

1076. Glossário

1077. Siglas

1078. Abreviações

1079. Símbolos

1080. Unidades

1081. Fórmulas

1082. Tabelas

1083. Figuras

1084. Gráficos

1085. Diagramas

1086. Fluxogramas

1087. Mapas

1088. Fotografias

1089. Vídeos

1090. Áudios

1091. Softwares

1092. Hardware

1093. Redes

1094. Segurança

1095. Privacidade

1096. Ética

1097. Legislação

1098. Normas

1099. Padrões

1100. Certificações

1101. Licenças

1102. Direitos

<



## 4.1 DISCUSSÃO

### 4.1.1. Avaliação do dano oxidativo no hipocampo após choque eletroconvulsivo agudo e crônico

Nossos resultados demonstram que após o ECS há uma modulação das atividades da CAT e da SOD no sistema nervoso central (SNC) e isso é acompanhado de uma diminuição dos parâmetros de dano oxidativo no hipocampo até 30 dias após o ECS.

Havia a expectativa de que a liberação de neurotransmissores excitatórios poderia induzir estresse oxidativo no SNC, da mesma forma que foi demonstrado nos modelos animais de epilepsia (Dal-Pizzol et al., 2000). Entretanto, em ambos modelos agudo e crônico de ECS há uma redução dos parâmetros de dano oxidativo (avaliados pela metodologia TBARS e carbonil) no hipocampo imediatamente e tardiamente após uma convulsão induzida por ECS. No ECS agudo, a redução dos parâmetros oxidativos 30 dias após o ECS pode refletir o aumento da atividade das enzimas antioxidantes observado. Essa adaptação, entretanto, poderia não explicar a redução nos parâmetros de dano oxidativo imediatamente após um único ECS, uma vez que neste momento não atividade da CAT ou SOD. Nós supomos que o ECS agudo pode aumentar defesas antioxidantes não enzimáticas, dessa forma protegendo o hipocampo de dano oxidativo durante a atividade convulsiva. No ECS crônico, um aumento da CAT e SOD é evidente imediatamente após a última sessão de ECS, demonstrando adaptação do SNC.

Por outro lado, pode-se supor que receptores NMDA e a excitotoxicidade demonstrada após convulsões em outros modelos animais não possuem um papel importante no ECS. Não há relatos na literatura que descrevam atividade glutamatérgica

durante ECS agudo ou crônico. Geralmente, crises epiléticas parecem induzir um aumento agudo no dano oxidativo no SNC secundário à excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (Schulz et al., 1995; Ben-Ari, 1995; Ueda et al., 1997). Os efeitos crônicos de convulsões nos parâmetros de dano oxidativo são menos estudados (Dal-Pizzol et al., 2000). No modelo da pilocarpina para epilepsia de lobo temporal foi demonstrada uma redução nos níveis de TBARS 7 dias e 75 dias após a crise convulsiva (Dal-Pizzol et al., 2000). Por outro lado, no modelo do ácido kainico, os níveis de TBARS não são diferentes do controle 7 dias e 75 dias após a convulsão (Dal-Pizzol et al., 2000). Essas diferenças podem estar relacionadas com a perda neuronal e o hipometabolismo observado em animais epiléticos crônicos (Scorza et al., 1998). Após ECT, alguns estudos relatam um aumento no fluxo sanguíneo, enquanto outros uma diminuição (Conca et al., 2003; Mervaala et al., 2001; Fabbri et al., 2003; Vangu et al., 2003; Awata et al., 2002). Adicionalmente, parece não haver diferença no metabolismo cerebral de glicose após o ECT (Volkow et al., 1988). Dessa forma, parece que a redução dos parâmetros de estresse oxidativo é secundário ao hipometabolismo cerebral, como demonstrado nos animais epiléticos crônicos.

O dano oxidativo agudo nos modelos da pilocarpina e do ácido kainico parece ser, ao menos em parte, relacionado aos efeitos crônicos da administração dos fármacos (Klamt et al., 2001). A diferença nos parâmetros de dano oxidativo pode explicar os diferentes prognósticos após ECS ou modelos da pilocarpina ou ácido kainico. No modelo da pilocarpina, todos os animais invariavelmente desenvolvem convulsões espontâneas recorrentes e no modelo do ácido kainico cerca de 50 % dos animais apresentam convulsões espontâneas recorrentes (Dal-Pizzol et al., 2000). Nas convulsões induzidas por ECS, inclusive no protocolo crônico, não se observam convulsões espontâneas recorrentes em nenhum animal. Parece que há mecanismos diferentes envolvidos nos efeitos do ECS

no SNC, quando comparados a outros modelos de convulsões animais. Supõe-se que essas diferenças podem explicar o valor terapêutico do ECT em contraste aos prejudiciais efeitos de convulsões em situações clínicas (estado epiléptico).

Nossos resultados demonstram que após o ECS há um aumento na atividade das enzimas antioxidantes e não foi demonstrado dano oxidativo no hipocampo. Esses achados nos ajudam a compreender as diferenças entre ECS e outros modelos animais de convulsões, e sugerem que o dano oxidativo não participa dos efeitos adversos após ECT (amnésia retrógrada).

#### 4.1.2. Estudo do dano oxidativo em hipocampo, córtex, estriado e cerebelo após choque eletroconvulsivo agudo e crônico.

Nos demonstramos que após o CEC há ocorrência de dano oxidativo em biomoléculas dependente da estrutura cerebral. Hipocampo, estriado e cerebelo parecem possuir mecanismos antioxidantes suficientes para evitar dano oxidativo. Em contraste, a ocorrência de dano oxidativo no córtex, sugere que esta estrutura é mais suscetível ao estresse oxidativo após o CEC.

Nos supúnhamos que após o CEC, ocorreria liberação de neurotransmissores excitatórios que poderiam induzir estresse oxidativo no SNC (Dal-Pizzol et al 2000). Adicionalmente, os achados de Erakovic e colaboradores (2000) demonstraram uma diminuição na atividade da superóxido dismutase e na glutatona peroxidase no córtex frontal, cerebelo e hipocampo após CEC, o que é compatível com a ocorrência de estresse oxidativo. Essas observações não são apoiadas pelos nossos achados. Em ambos CEC agudo e crônico, de uma maneira geral, há uma diminuição nos parâmetros de dano

oxidativo no hipocampo, cerebelo e estriado precocemente e tardiamente após a convulsão induzida pelo CEC. Nos podemos supor que receptores NMDA e a excitotoxicidade demonstrada após convulsões em outros modelos animais não possuem um papel importante no CEC, pelo menos nessas estruturas estudadas. Não há relatos na literatura que descrevem atividade glutamatérgica durante CEC agudo ou crônico. Geralmente, estados epiléticos parecem induzir um aumento agudo no dano oxidativo no SNC secundário à excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (Bem-Ari 1995; Shulz et al 1995; Ueda et al 1997). Os efeitos crônicos de convulsões no estresse oxidativo são menos estudados (Dal-Pizol et al 2000). No modelo da pilocarpina para epilepsia do lobo temporal foi demonstrada uma redução nos níveis de TBARS 7 e 75 dias após a crise epilética (Dal-Pizol et al 2000). Por outro lado, no modelo do ácido kainico os níveis de TBARS não diferem do controle 7 e 75 dias após a crise convulsiva (Dal-Pizol et al 2000). Essas diferenças podem estar relacionadas com a perda neuronal e o hipometabolismo observado nos animais epiléticos crônicos (Scorza et al 1998). Após o ECT alguns estudos relatam um aumento no fluxo sanguíneo, enquanto outros uma diminuição (Awata et al 2002; Conca et al 2003; Fabbri et al 2003; Mervaala et al 2001; Vangu et al 2003). Adicionalmente, parece que não há diferença no metabolismo cerebral da glicose após ECT (Volkow et al 1988). Dessa forma, parece que a redução nos parâmetros de dano oxidativo é secundária ao hipometabolismo cerebral como demonstrado nos animais epiléticos crônicos.

Os parâmetros oxidativos corticais lembram os efeitos agudos da pilocarpina ou do ácido kainico nos modelos de epilepsia. O dano oxidativo agudo nos modelos da pilocarpina do ácido kainico parecem ser, pelo menos em parte, resultado dos efeitos crônicos da administração dos fármacos (Dal-Pizol 2000). Nos demonstramos que em

períodos tardios como 30 dias pos CEC agudo ou crônico foi possível detectar peroxidação de lipídios no córtex. Nos não pudemos desenvolver uma explicação específica para essas diferenças. Nos supomos que a heterogeneidade das regiões corticais pode, em parte, responder pelos resultados observados. Estudos futuros deverão investigar esses eventos.

#### 4.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWATA, S.; KONNO, M.; KAWASHIMA, R.; SUZUKI, K.; SATO, T.; MATSUOKA, H.; FUKUDA, H.; SATO, M. Changes in regional cerebral blood flow abnormalities in late-life depression following response to electroconvulsive therapy. *Psychiatry Clin Neurosci.*v.56, p.31-40, 2002.

BEN-ARI, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* v.12, p.375-403,1995.

CONCA, A.; PRAPOTNIK, M.; PESCHINA, W.; KONIG, P. Simultaneous pattern of rCBF and rCMRGlucose in continuation ECT: case reports. *Psychiatry Res.*v.124, 191-198, 2003.

DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M.S.; MOREIRA, J.C.; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience Letters.*v. 291, p. 179–182, 2000.

ERAKOVIC, V., ZUPAM, G., VARLJEN, J., RADOSEVIC, S., SIMONIC, A. Electroconvulsive shock in rats: changes in superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity. *Mol Brain Res* 76: 266-274, 2000.

FABBRI, F.; HENRY, M.E.; RENSCHAW, P.F.; NADGIR, S.; EHRENBERG, B.L.; FRANCESCHINI, M.A.; FANTINI, S. Bilateral near-infrared monitoring of the cerebral concentration and oxygen-saturation of hemoglobin during right unilateral electroconvulsive therapy. *Brain Res.* v. 992, p193-204, 2003.

KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; FROTA, M.L.C.JR; WALZ, R.; ANDRADES, M.E.; SILVA, E.G.; BRENTANI, R.; IZQUIERDO, I.; MOREIRA, J.C.F. Imbalance of antioxidant defence in mice lacking cellular prion protein. *Free Radical Biology & Medicine.* v.30, p. 1137–1144, 2001.

MERVAALA, E.; KONONEN, M.; FOHR, J.; HUSSO-SAASTAMOINEN, M.; VALKONEN-KORHONEN, M.; KUIKKA, J.T.; VIINAMAKI, H.; TAMMI, A.K.;

TIIHONEN, J.; PARTANEN, J.; LEHTONEN, J. SPECT and neuropsychological performance in severe depression treated with ECT. *J Affect Disord.* v.66, p. 47-58, 2001.

SCORZA, F.A.; SANABRIA, E.R.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E.. Glucose utilization during interictal intervals in an epilepsy model induced by pilocarpine: a qualitative study. *Epilepsia.* v.39, p.1041-1045, 1998.

SHULZ, J.N.; HENSHAW, D.R.; SIWEK, D.; JENKINS, B.G; FERRANTE, R.J.; CIPOLLONI, P.B.; KOWALL, N.W.; ROSEN, B.R.; Beal, M.F. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem.* v.64, p. 2239-2247, 1995.

UEDA, Y.; YOKOYAMA, H.; NIWA, R.; KONAKA, R.; OHYA-NISHIGUCHI, H.; KAMADA, H. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rat. *Epilepsy Res.* 26 (1997) 329-333.

VANGU, M.D.; ESSER, J.D.; BOYD, I.H.; BERK, M. Effects of electroconvulsive therapy on regional cerebral blood flow measured by 99mtechnetium HMPAO SPECT. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v. 27, p. 15-19, 2003.

VOLKOW, N.D.; BELLAR, S.; MULLANI, N.; JOULD, L.; DEWEY, S. Effects of Electroconvulsive Therapy on Brain Glucose Metabolism: A Preliminary Study. *Convuls Ther.* v.4, p.199-205, 1988.