

**U F S M**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**O EFEITO DO USO CRÔNICO DE HALOPERIDOL  
ASSOCIADO À DIETA COM ALTO TEOR DE LIPÍDIO NA  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO DE RATOS WISTAR**

**Ilson Dias da Silveira**

**PPGBTOX**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**O EFEITO DO USO CRÔNICO DE HALOPERIDOL  
ASSOCIADO À DIETA COM ALTO TEOR DE LIPÍDIO NA  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO DE RATOS WISTAR**

**por**

**Ilson Dias da Silveira**

**Orientador: João Batista Teixeira da Rocha**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

**MESTRE EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

PPGBTOX

Santa Maria, RS, Brasil

12 de Janeiro de 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado

**O EFEITO DO USO CRÔNICO DE HALOPERIDOL  
ASSOCIADO À DIETA COM ALTO TEOR DE LIPÍDIO NA  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM FÍGADO DE RATOS WISTAR**

ELABORADA POR  
**ILSON DIAS DA SILVEIRA**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
**MESTRE EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha**  
(Presidente/Orientador)

---

**Prof. Dr. Vanderlei Folmer**

---

**Prof. Dra. Liane Nanci Rotta**

---

**Prof. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger**  
(suplente)

Santa Maria, 12 de Janeiro de 2007.

**Aos meus filhos, Mariana e Gabriel:  
Para compensar um pouco a ausência.**

**À minha esposa, Aline:  
Pelo apoio e dedicação.**

**Aos meus pais, Ilson e Ide:  
Pela educação e exemplo de vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Santa Maria, referência em qualidade pela formação acadêmica;

Ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro na realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, pelo alto nível de seus docentes e discentes na produção científica;

Ao meu orientador Professor Doutor João Batista T. da Rocha pela oportunidade proporcionada e pela confiança depositada em mim;

Às colegas Marilise Burger e Roselei Fachinetto e ao bolsista de iniciação científica Daniel Roos, pela ajuda e trabalho realizados juntos;

Aos amigos da Pós-Graduação e do laboratório, sem os quais teria sido impossível este trabalho;

A Tatiane Bernardon, pelo inestimável apoio fora da UFSM;

E para todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Haloperidol.....	01
1.2. Dieta com alto teor lipídico.....	05
1.3. Magnésio .....	07
1.4. Estresse Oxidativo .....	08
1.5. Peroxidação Lipídica.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Justificativa.....	16
2.2. Objetivo geral.....	16
2.3. Objetivos específicos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Drogas .....	18
3.2. Animais e dieta.....	18
3.3. Tratamento com Haloperidol.....	19
3.4. Preparação de tecidos .....	20

3.5. Concentração de Magnésio Intracelular .....	20
3.6. Dosagens Sanguíneas.....	21
3.7. Análises Estatísticas .....	21
4. RESULTADOS .....	22
4.1. Dieta com alto teor de lipídio (DG).....	22
4.1.1. Peso corpóreo .....	22
4.1.2. Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos .....	22
4.2. Haloperidol .....	28
4.2.1. Peso corpóreo .....	28
4.2.2. Níveis de TBARS em tecidos .....	29
4.3. Correlação entre conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular .....	29
4.4. Correlação entre Concentração de Magnésio Intracelular e Peroxidação Lipídica .....	30
4.5. Dosagens sanguíneas .....	30
5. DISCUSSÃO.....	39
5.1. Dieta com alto teor de lipídio.....	39
5.1.1. Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio no peso corpóreo de ratos Wistar .....	39
5.1.2. Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio no estresse oxidativo em tecidos de ratos Wistar .....	40

5.1.3. Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e conteúdo de gordura abdominal em ratos Wistar.....	44
5.2. Haloperidol.....	45
5.2.1. Efeito do haloperidol no peso corpóreo de ratos Wistar.....	45
5.2.2. Efeito do haloperidol no estresse oxidativo em tecidos de ratos Wistar .....	46
5.2.3. Efeito do haloperidol na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal .....	48
5.2.4. Efeito do haloperidol na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e a peroxidação lipídica.....	49
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53



## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **O EFEITO DO USO CRÔNICO DE HALOPERIDOL ASSOCIADO À DIETA COM ALTO TEOR DE LIPÍDIO NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NO FÍGADO DE RATOS WISTAR**

AUTOR: Ilson Dias da Silveira

ORIENTADOR: Profº Dr. João Batista Teixeira da Rocha

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 12 de Janeiro de 2007.

O tipo de dieta e o uso de certos medicamentos podem estar relacionados dentre os fatores responsáveis pela geração de radicais livres. No Brasil, o consumo de maior quantidade de gordura na dieta tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e o haloperidol tem sido o neuroléptico mais usado pela saúde pública brasileira devido ao seu baixo custo quando comparado com outras drogas antipsicóticas. O objetivo deste estudo foi determinar a peroxidação lipídica através da produção de TBARS em tecidos de ratos, como medida de estresse oxidativo, promovido pela ingestão de dieta com alto teor de lipídio associada ao uso crônico de haloperidol, avaliar a correlação entre o conteúdo de gordura abdominal e concentração de magnésio intracelular e a correlação entre a concentração de magnésio intracelular e a produção hepática de TBARS. A dieta com alto teor lipídico promoveu aumento significativo nos níveis de TBARS em fígado de ratos Wistar quando comparado à dieta controle (ANOVA de uma via), sendo que o uso crônico de haloperidol potencializou a produção hepática de TBARS promovido pela

dieta com alto teor lipídico, aumentando em duas vezes os níveis de TBARS quando comparado ao grupo controle (ANOVA de duas vias). A produção de TBARS, promovido pela associação da dieta com alto teor lipídico e o uso crônico de haloperidol, parece estar associada com a concentração intraeritrocitária de magnésio, pois houve uma correlação estatisticamente positiva entre o conteúdo de magnésio intracelular e a produção de TBARS em fígado de ratos . Apoiando trabalhos prévios que relatam uma possível base iônica para o desenvolvimento da síndrome metabólica, neste trabalho ocorreu uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal considerando todos os animais, sendo que o grupo consumindo dieta com alto teor de lipídio e o grupo sob uso crônico de haloperidol, contribuíram, de maneira distinta, para este resultado.

*Palavras - chaves : dieta, espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse oxidativo, haloperidol (HAL), lipídio, magnésio intracelular, peroxidação lipídica (PL), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( TBARS).*

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF LONG TERM HALOPERIDOL USE ASSOCIATED TO HIGH FAT DIET ON THE LIPID PEROXIDATION IN WISTAR RAT LIVER

Author: Iلسon Dias da Silveira

Adviser: João Batista Teixeira da Rocha

There is a growing number of evidences, associating the oxidative stress produced by the reactive species of oxygen, with the aging process at one hand, and with the beginning and development of the vascular complications of several chronic and degenerative diseases at another. The type of diet and the usage of specific medicines may be related among the responsible factors by the generation of free radicals. In Brazil, the consuming of higher amounts of fat on the diet has increased in the last years and haloperidol has been the most used neuroleptic in brazilian public health system due to its low cost when compared with other antipsychotic drugs. The objective of this study was to determine the lipid peroxidation through TBARS production in rats' tissues, as an oxidative stress measure, promoted by the high fat diet associated with the chronic usage of haloperidol, the correlation between the abdominal fat content and the intracellular magnesium concentration as well as the correlation between the intracellular magnesium concentration and the hepatic production of TBARS. The high fat diet has promoted a significant increase on the TBARS levels in Wistar rat livers when compared to the control diet (one way ANOVA ), considering that the chronic usage of haloperidol has increased the

hepatic production of TBARS promoted by high fat diet, raising twice the levels of TBARS when compared to control group ( two way ANOVA). The TBARS production promoted by the association of high fat diet with chronic usage of haloperidol seems to be related with the intra-erythrocyte concentration of magnesium, for there was a statistically positive correlation, between the content of intracellular magnesium and the TBARS production in rats livers . Supporting previous works that report a possible ionic base to the metabolic syndrome development, in this dissertation a negative correlation has occurred, statistically significant, between the intracellular magnesium concentration and the abdominal fat content among all the animals. The group fed by high fat diet as well as the group treated with haloperidol seems to be responsible, by diferent ways, for this result.

Key words : diet, haloperidol (HAL), intracellular magnesium, lipid, lipid peroxidation (PL), oxidative stress, oxygen reactive species (EROs), tiobarbituric acid reactive species (TBARS).

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estrutura molecular do haloperidol .....	01
<b>FIGURA 2.</b> Estrutura molecular do haloperidol decanoato.....	02
<b>FIGURA 3.</b> Ganho de peso corpóreo em ratos alimentados com dieta controle e dieta com alto teor de lipídios .....	24
<b>FIGURA 4.</b> Massa corpórea final dos 4 grupos de animais.....	25
<b>FIGURA 5.</b> Produção de TBARS em fígados de ratos Wistar.....	26
<b>FIGURA 6.</b> Produção de TBARS em rim de ratos Wistar.....	27
<b>FIGURA 7.</b> Peso corpóreo em ratos recebendo dietas e tratamento com haloperidol.....	31
<b>FIGURA 8.</b> Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, considerando todos os animais .....	32
<b>FIGURA 9.</b> Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de roedores alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio (DG) .....	33
<b>FIGURA 10.</b> Correlação negativa, não significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular no grupo de ratos alimentados com dieta controle (DC) .....	34

- FIGURA 11.**Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de ratos alimentados com dieta controle tratados com haloperidol (HM) ..... 35
- FIGURA 12.**Correlação negativa, não significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio tratados com haloperidol (HG) ..... 36
- FIGURA 13.**Correlação positiva, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de magnésio intracelular e a produção de TBARS em tecido hepático no grupo de animais alimentados com dieta gorda tratados com haloperidol (HG) ..... 37
- FIGURA 14.**Comparação da  $\beta$ -oxidação na mitocôndria e nos peroxissomas. 42
- FIGURA 15.**Síntese do óxido nítrico pela enzima Óxido nítrico sintase, ..... 43

## LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1.</b> Formação do piridinium, derivado iônico do HAL adaptado por FANG et al., 2001 .....	04
<b>ESQUEMA 2.</b> Vias metabólicas de HAL pelo CYP3A4, adaptado de FANG et al., 2001 .....	05
<b>ESQUEMA 3.</b> Formação dos principais Eros na mitocôndria celular adaptado de Szeto, H.H. in “Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, Peptide Antioxidants. <i>AAPS Journal</i> . 2006; 8(2): E277-E283” .....	13
<b>ESQUEMA 4.</b> Peroxidação lipídica e formação de dialdeído malônico e outros produtos ( <a href="http://www.biochemsoctrans.org/bst/029/0358/bst0290358a01.gif">http://www.biochemsoctrans.org/bst/029/0358/bst0290358a01.gif</a> ) .....	15
<b>TABELA 1.</b> Composição da dieta .....	19
<b>TABELA 2.</b> Dosagens sanguíneas nos diferentes grupos de ratos, sem variação estatisticamente significativa.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - Enzima Catalase

CuSOD - Enzima Superóxido Dismutase Contendo Cobre

DC - Grupo de Ratos Alimentados Com Dieta Controle (Normolipídica)

DG - Grupo de Ratos Alimentados Com Dieta Contendo Alto Teor de Lipídio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FeSOD - Enzima Superóxido Dismutase Contendo Ferro

GSH - Glutathiona Reduzida

HAL - Haloperidol

HG - Grupo de Ratos Alimentados Com Dieta Contendo Alto Teor de Lipídio + Uso Crônico de Haloperidol

HM - Grupo de Ratos Alimentados Com Dieta Controle + Uso Crônico de Haloperidol

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

MDA - Dialdeído Malônico

MFTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridium

MnSOD - Enzima Superóxido Dismutase Contendo Manganês

NADH - Dinucleotídio de Adenina Reduzida

NO - Óxido Nítrico

OH<sup>•</sup> - Radical Hidroxila

<sup>•</sup>OOL - Radical Peroxil

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Radical Ânion Superóxido

ONOO<sup>-</sup> - Radical Ânion Peroxinitrito

PL - Peroxidação Lipídica

P 450 - Citocromo P 450

SH - Grupamento Tiol



SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Enzima Superóxido Dismutase

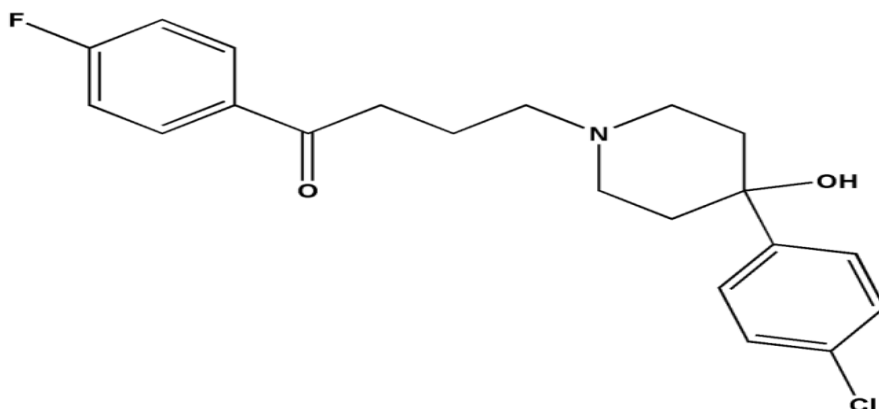
TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TBARS - Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

# 1 INTRODUÇÃO

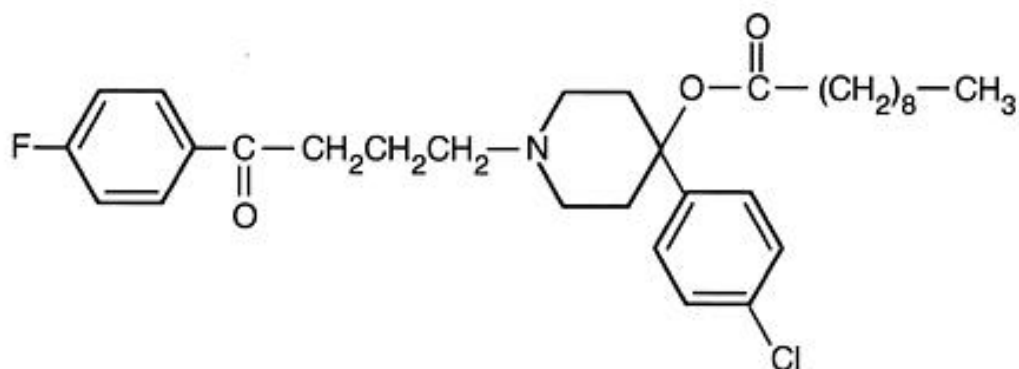
## 1.1. Haloperidol

O Haloperidol (HAL) (Figura 1), é quimicamente classificado como uma butirofenona (SOUDIJN et al., 1967), sendo uma das drogas antipsicóticas mais amplamente utilizada em esquizofrenia e desordens afetivas (WYSOWSKI & BAUM, 1998), possuindo uma ação antagonista específica nos receptores dopaminérgicos D-2 e uma alta afinidade pelos receptores sigma, ambos no sistema nervoso central (SNC) (CREESE et al., 1976; Mc CAN e SU., 1990; BEHL et al. 1995).



**FIGURA 1:** Estrutura molecular do haloperidol.

O Haloperidol decanoato (Figura 2) é o éster do haloperidol com o ácido decanóico, tornando-o um neuroléptico de ação prolongada, uma vez que o éster é gradativamente liberado do tecido muscular, e por meio de hidrólise enzimática, o haloperidol penetra na circulação sanguínea. Tal liberação se faz de forma progressiva, permitindo a obtenção de curvas plasmáticas uniformes sem ocorrência de picos regulares. A administração de uma dose adequada produz efeito terapêutico estável que permanece por 4 semanas (DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS, 2002; COMARTY, 1987).



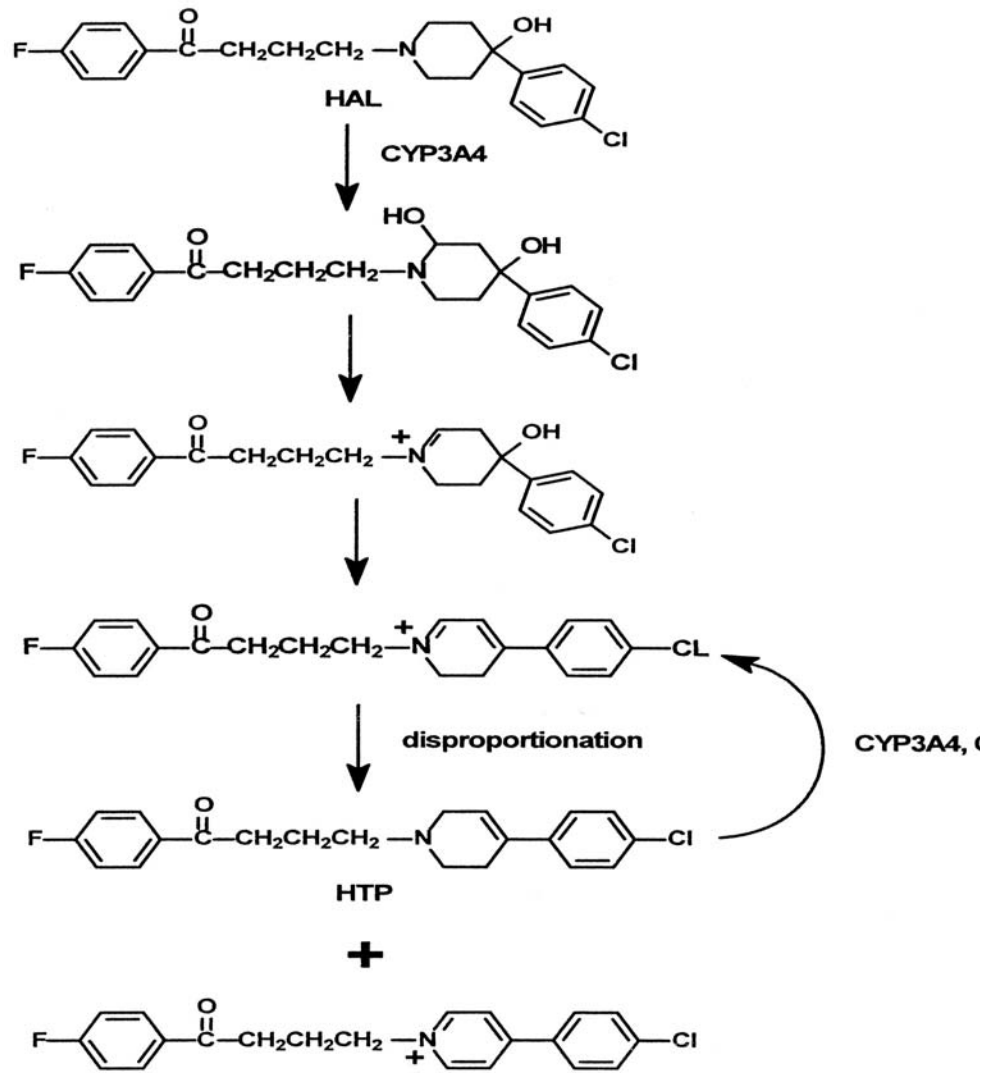
**FIGURA 2:** Estrutura molecular do haloperidol decanoato, cuja ligação éster com o ácido decanóico produz efeito estável, sem ocorrência de picos irregulares na corrente circulatória.

Como a maioria dos neurolépticos típicos, o uso crônico de haloperidol pode promover efeitos colaterais extrapiramidais, agudos e crônicos, tais como discinesia tardia, distonia e síndrome neuroléptica maligna (CALABRESI et al., 1997; ANDREASEN e JORGENSEN, 2000).

Há um grande número de evidências associando os efeitos adversos e tóxicos do haloperidol no Sistema Nervoso Central (SNC) com a produção aumentada de radicais livres (SHIVAKUMAR & RAVINDRANATH, 1993; ANDREASEN et al., 1998; ANDREASEN et al., 2003; FACHINETTO et al., 2005), pois diversos trabalhos associam a neurotoxicidade do haloperidol ao estresse oxidativo promovido em determinadas regiões do cérebro (POST et al., 1998; YOKOYAMA et al., 1998; MITCHELL et al., 2002; POLYDORO et al., 2004; REINKE et al., 2004).

Entretanto, há uma carência de trabalhos sobre a produção hepática de radicais livres na metabolização do haloperidol pelo citocromo P450 (P 450).

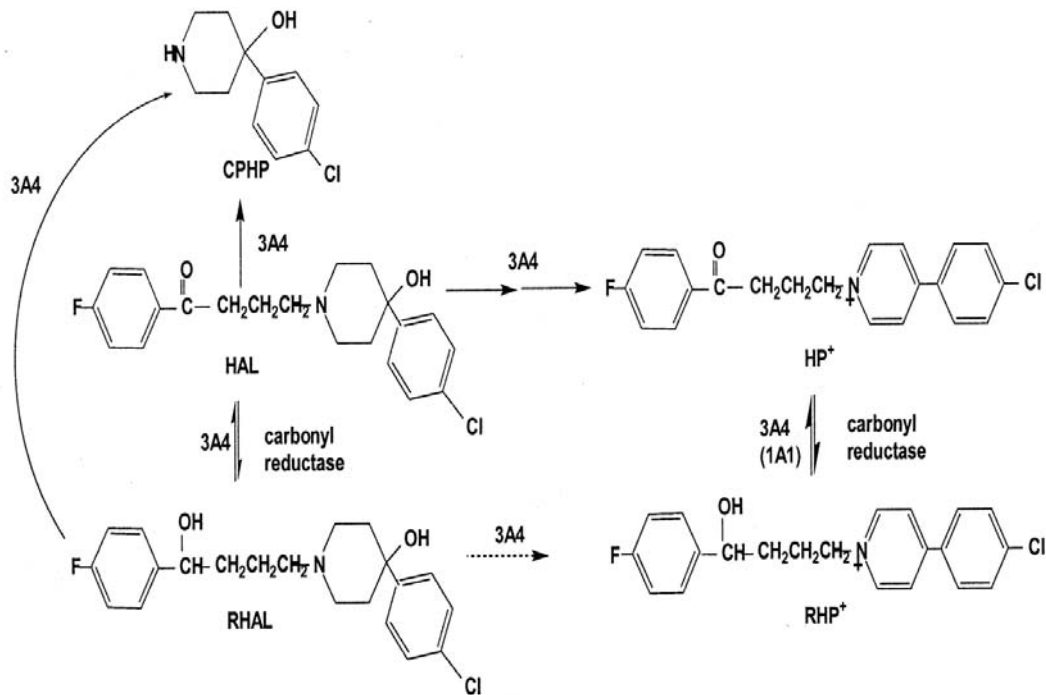
O estresse oxidativo no sistema nervoso central, causado pelo uso de haloperidol, parece estar associado à ação de seus metabólitos, pois Creese et al. (1976) demonstraram que o piridium, quimicamente designado como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridium (MTFP), derivado metabólico iônico do haloperidol (Esquema 1), afeta profundamente o transporte de dopamina, por bloquear os receptores dopaminérgicos e Rollema et al. (1994), mostraram que o piridium é um potente inibidor do complexo I da cadeia respiratória, e pode interferir com o transporte de elétrons em ambos os complexos, I e II, sendo esta uma das razões que levou Yokoyama a sugerir que o aumento de dopamina cerebral poderia resultar numa produção aumentada dos metabólitos tóxicos da dopamina contribuindo para a neurotoxicidade do haloperidol, pois o metabolismo enzimático da dopamina gera peróxido de hidrogênio, o qual poderá produzir o radical hidroxil, uma neurotoxina potente (HALLIWELL, 1992).



**ESQUEMA 1:** Formação do pirídium, derivado iônico do HAL adaptado de FANG et al., 2001.

Fang et al. (2001), demonstraram que CYP3A4 é a mais importante isoenzima do citocromo P450 responsável pela maioria das vias metabólicas do haloperidol (Esquema 2), sendo as reações mais comuns a dealquilação do haloperidol e do haloperidol reduzido, a oxidação reversa do haloperidol e do haloperidol reduzido, aromatização do haloperidol e do haloperidol reduzido e a desidratação dos

produtos do haloperidol com formação de 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridinium (MFTP).



**ESQUEMA 2** : Vias metabólicas do HAL pelo CYP3A4, adaptado de FANG et al., 2001.

## 1.2. Dieta com alto teor lipídico

A concentração normal de gordura na dieta para ratos de laboratório pode ser considerada entre 20 % e 30 % do conteúdo total de macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas) de acordo com a publicação Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 4th.revised edition, 1995. A Dieta com alto teor de lipídio é considerada quando o percentual de gordura está acima destes parâmetros supra citados.

A dieta contendo alto teor de gordura merece uma atenção especial, pois além de promover estresse oxidativo em animais (FOLMER et al., 2003;

FACHINETTO et al., 2005; ZHANG et al., 2005), no Brasil as famílias com maior renda per capita, tendem a consumir um maior teor de gordura e um menor teor de carboidratos, sendo que o consumo de gordura na população brasileira aumentou em 20 % nos últimos 30 anos enquanto o consumo de carboidratos diminuiu 10 % no mesmo período (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2004). Além deste dado, pacientes esquizofrênicos ingerem uma maior quantidade de gordura na dieta do que a população em geral (BROWN et al., 1999).

A dieta com alto teor de lipídio esta fortemente correlacionada com o desenvolvimento de obesidade em modelos animais, pois animais alimentados com este tipo de dieta produzem uma quantidade aumentada de gordura visceral-abdominal, sobretudo de gordura retroperitoneal-perineal, com um conseqüente aumento de peso corpóreo (AXEN et al., 2003).

A ingestão de alta concentração de gordura dietética pode alterar funções fisiológicas e a saúde de mamíferos, sendo por esta razão considerada como fator de risco metabólico para doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, conhecido como síndrome metabólico X, em que a obesidade, resistência à insulina, desenvolvimento de trombose, hipertensão arterial sistêmica, aumento do risco para doença coronariana isquêmica e diminuição da capacidade cognitiva parecem ser os sintomas mais proeminentes (STORLIEN et al., 1991; CASTELLI et al., 1992; KURATKO et al., 1997; AXEN et al., 2003; GREENWOOD and WINOKUR., 2005 e AOKI et al., 2006).

Mais recentemente foi demonstrado que a dieta com alto teor lipídico aumenta a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos à neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinium (CHOI et al., 2005).

De particular importância, a dieta rica em gordura pode ser considerada um fator de risco significativo para o desenvolvimento de demência vascular e Doença de Alzheimer, além de contribuir para o declínio cognitivo no envelhecimento (KALMIJN, 2000) e promover lesões hepáticas em modelos animais (GUANGHUA et al., 2000; CHEN, 2003; MORGAN et al., 2003).

### **1.3. Magnésio**

A recomendação dietética normal de magnésio para adultos tem sido estabelecida entre 300 e 420 mg/dia, conforme revisões do US Institute of Medicine (1997) e German, Austrian and Swiss Nutrition Societies (D-A-CH, 2000).

Conforme VORMANN (2003), a concentração e distribuição de magnésio em adultos saudáveis é de 60-65 % nos ossos, 27 % nos músculos, 6-7 % em outras células, sendo inferior a 1 % a concentração de magnésio no espaço extracelular. Nos eritrócitos a concentração de magnésio é de 2,5 mmol/l e no soro entre 0,7-1,1 mmol/l, sendo que no soro 55 % está na forma livre, 32% ligado à albumina e 13% complexado com citrato, fosfatos e outras moléculas.

A deficiência de magnésio tem sido associada com uma ampla variedade de condições clínicas como diabetes melitus tipo 2, doença cardiovascular e Síndrome X (LOPEZ-RIDAURA et al., 2004; AL-DELAIMY et al., 2004; PAOLISSO & BARBAGALLO, 1997; RESNICK, 1993), sendo que o início, a progressão e as complicações destas doenças podem estar associados com a produção aumentada de radicais livres ou com a diminuição da capacidade antioxidante (RÖSEN et al., 2001). De particular importância, o magnésio pode afetar a suscetibilidade de lipoproteínas para a peroxidação lipídica, promovendo alterações de membrana e dano tecidual (RAYSSIGUIER et al., 1993).



De acordo com BARBAGALLO et al. (1997), níveis suprimidos de magnésio intracelular promovem, diretamente, resistência celular à insulina.

Para PAOLISSO E BARBAGALLO (1997), os estados característicos da resistência à insulina, como diabetes do tipo 2 e hipertensão, podem ser promovidos pela supressão de magnésio intracelular, pois estes autores formularam uma hipótese iônica, na qual, a concentração crônica intracelular alterada de íons, como o magnésio, age como uma via final comum, para regular o metabolismo em geral, e, em particular, a homeostasia da glicose, a sensibilidade à insulina, o tônus vascular periférico e a pressão sanguínea.

BARBAGALLO et al. (1999), demonstraram uma ação direta da glutathione, sobretudo, no estado reduzido, tanto “in vivo”, como “in vitro”, no aumento da concentração de magnésio intracelular e na sensibilidade celular à insulina, resultado apoiado pelo trabalho de LOPEZ-RIDAURA et al. (2004), que estabeleceu uma correlação inversa consistente entre a ingestão de magnésio e o risco de diabetes do tipo 2 em homens e mulheres. Além disso, KEENOY et al. (2000), associam as reservas corpóreas de magnésio com a capacidade antioxidante total do sangue, sendo esta capacidade antioxidante dependente da concentração de albumina e glutathione reduzida.

#### **1.4. Estresse Oxidativo**

Durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (EROs), acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, mantendo a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. Por outro lado, um aumento na produção destas espécies reativas ou uma diminuição das defesas antioxidantes pode levar

ao estresse oxidativo, que está relacionado com a etiologia ou progressão de uma grande variedade de doenças (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MOSKOVITZ et al., 2002).

As principais EROs produzidas durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas são o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (Esquema 3). O principal sítio de formação endógena do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) parece ser a cadeia respiratória mitocondrial, quando o oxigênio consumido não é reduzido de forma tetravalente até  $H_2O$ , através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), também pode ser gerado pela NADH desidrogenase (Complexo I) e pela coenzima Q/complexo III (BOVERIS & CHANCE, 1973; TURRENS & BOVERIS, 1980). A geração de  $O_2^{\cdot-}$ , ao nível do complexo I, pode ser promovida pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, o glutamato e o piruvato (TURRENS & BOVERIS, 1980), e estimulada pela rotenona, um inibidor da transferência de elétrons do complexo I. A coenzima Q também estimula sensivelmente a geração de  $O_2^{\cdot-}$  pela NADH desidrogenase, provavelmente durante a doação de elétrons do ânion semiquinona, que é um radical livre, para o oxigênio molecular (TURRENS, 1997). Em condições fisiológicas, cerca de 2% do oxigênio consumido leva à formação de  $O_2^{\cdot-}$ , proporcionalmente ao volume consumido em nível mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Em condições normais, o  $O_2^{\cdot-}$  ao receber um par de elétrons sofre dismutação, que é a sua transformação em  $H_2O_2$  na matriz mitocondrial pela ação da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD). As enzimas superóxido dismutase (SOD) são específicas para a remoção do radical  $O_2^{\cdot-}$ ,

havendo além da MnSOD mitocondrial, as SOD que contém cobre e zinco (CuZnSOD), encontradas na maioria das células eucarióticas, principalmente no citosol, podendo estar presente também nos peroxissomas, lisossomas, núcleo e no espaço intermembranas na mitocôndria. Há um terceiro tipo de SOD encontrada em vegetais, que é SOD contendo ferro (FeSOD) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O  $H_2O_2$  é reduzido à  $H_2O$  por dois tipos de enzimas : a) pela glutathione peroxidase (GPx), enzima que contém selênio em seu sítio ativo e encontra-se amplamente distribuída em todos os tecidos animais, removendo  $H_2O_2$  acoplado sua redução à  $H_2O$  com a oxidação da glutathione reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pelo NADPH e b) pela catalase (CAT), que catalisa diretamente a decomposição do  $H_2O_2$ . A atividade da CAT está localizada em grande quantidade nos peroxissomas, sendo uma pequena concentração encontrada em mitocôndrias hepáticas, em cloroplastos e no retículo endoplasmático (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Por esta razão, todo sistema biológico que gere  $O_2^{\cdot-}$ , também pode produzir  $H_2O_2$  pela dismutação e pela decomposição do  $O_2^{\cdot-}$  (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982, KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). O  $H_2O_2$  também pode ser formado diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular, sendo este radical livre muito difusível dentro e entre as células *in vivo*, por ser facilmente dissolvido em  $H_2O$  e também muito tóxico à maioria das células (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A produção intracelular do  $OH^{\cdot}$  a partir da reação do  $O_2^{\cdot-}$  com o  $H_2O_2$  (reação de Weber-Weiss postulada em 1934), ou da reação do  $H_2O_2$  com metais de transição como o ferro ou cobre (reação descrita por Fenton em 1894), tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Normalmente, os íons de ferro e cobre

estão impossibilitados de catalisarem reações oxidativas nos organismos vivos, pois estão ligados à transferrina ou à ceruloplasmina, respectivamente. No entanto, durante a injúria celular, o ferro pode ser liberado das proteínas e acelerar o processo de peroxidação pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais alcoxil e peroxil ( $\cdot\text{OOL}$ ) (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

A elevada reatividade do  $\text{OH}\cdot$ , apesar de suas concentrações intracelulares extremamente baixas e de sua reduzida meia-vida, confere uma toxicidade elevada aos organismos aeróbios. Para atingir sua estabilidade, este radical transforma as moléculas circundantes em outros radicais, que, por sua vez, também precisam estabilizar-se. Neste processo, o  $\text{OH}\cdot$  pode atacar os lipídios das membranas celulares, além de danificar proteínas e outras moléculas orgânicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Os radicais  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$  e  $\cdot\text{OOL}$  podem ser neutralizados pelo ácido ascórbico (Vitamina C), sendo que o ascorbato protege biomembranas contra a peroxidação lipídica, através da regeneração da atividade do  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) (ROSE, 1987; RÖSEN et al., 2001).

A GSH, um tripeptídeo contendo tiol (-SH), possui uma alta capacidade doadora de elétrons devido ao seu grupo sulfidril (KIDD, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A GSH é um importante antioxidante de fase aquosa e cofator essencial para várias enzimas antioxidantes, providenciando, também, proteção para a mitocôndria contra os EROs endógenos (KIDD, 1997). Sua alta capacidade doadora de elétrons associada com sua alta concentração celular estabelece a GSH como um grande tampão redox, de ação redutora (KIDD, 1997). De particular importância, a GSH é mais concentrada no fígado, onde as enzimas da fase II do P 450 utilizam-na para converter substâncias lipossolúveis em conjugados de GSH hidrossolúveis, para facilitar sua excreção. Enquanto fornece GSH para suas

necessidades específicas, as células do parênquima hepático exportam GSH para o exterior, onde ela serve como uma fonte sistêmica de  $-SH$ , com alto poder redutor (KIDD, 1997).

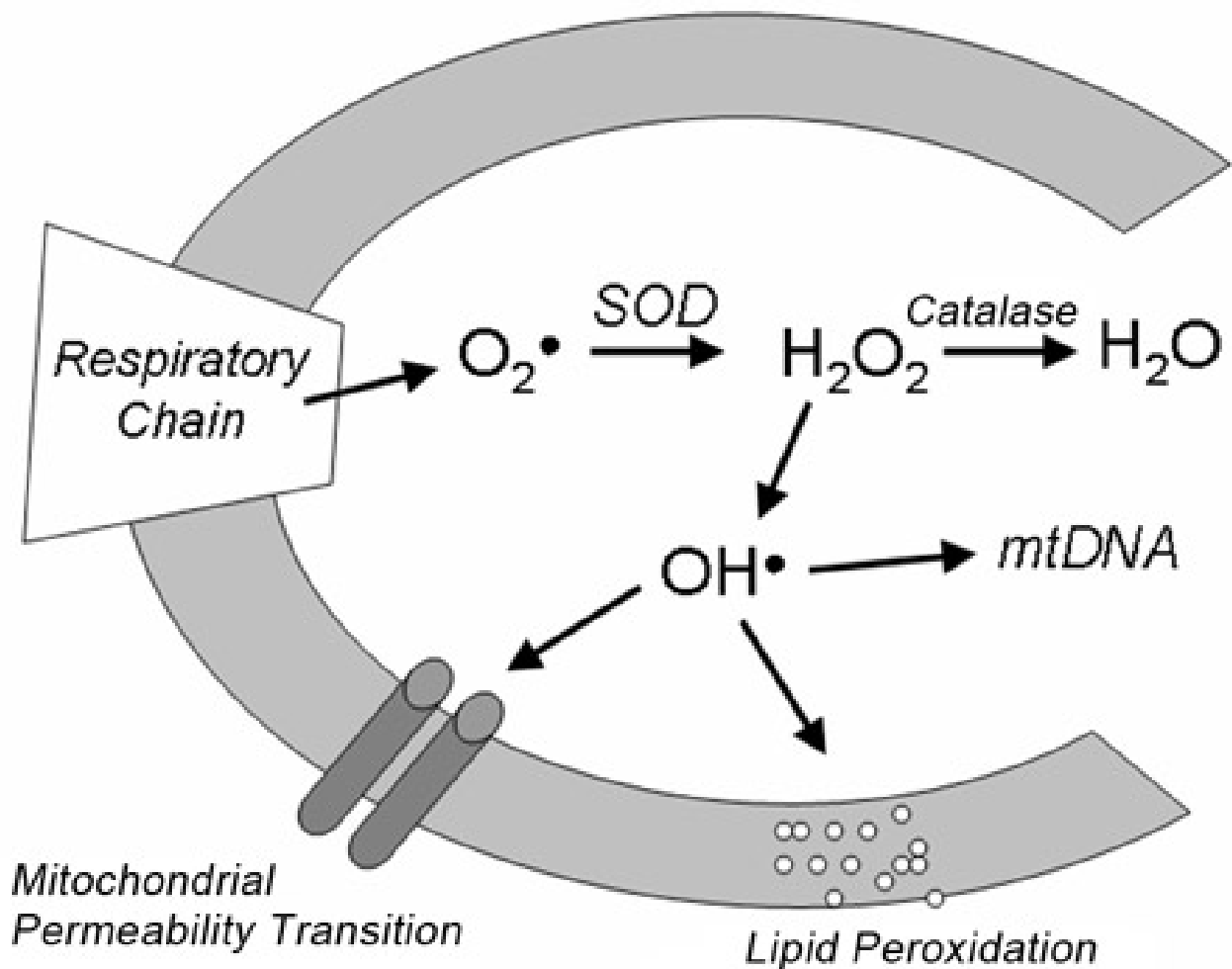
A teoria dos radicais livres, associada ao envelhecimento, proposta por HARMAN (1956) há mais de 50 anos é considerada tão importante quanto a descrição do ciclo do ácido cítrico proposto por KREBS na mesma época.

O dano oxidativo molecular de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, promovidos pela produção mitocondrial de radicais livres, sobretudo por EROs, parece estar envolvido no início e no desenvolvimento de doenças degenerativas relacionadas à idade, limitando a expectativa média de vida das espécies (SASTRE et al., 2003).

A expectativa máxima de vida das espécies, as quais têm um potencial metabólico similar, parece ser inversamente associada com a taxa de geração de EROs, principalmente do ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  e do peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  (SOHAL, 2002). Estes radicais livres, produzidos fisiologicamente pelos processos metabólicos, na cadeia transportadora de elétrons, também podem ser produzidos em várias situações distintas, como em reações catalisadas por oxidases, reações catalisadas por macrófagos e neutrófilos, auto-oxidação de formas reduzidas de flavoproteínas ligadas às desidrogenases (NAD/NADP), liberados das ligações com as proteínas após redução pela cisteína e ou ácido ascórbico, decomposição do ácido peroxinitroso e também por proteínas do P450 (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999; STADTMAN, 2002).

O tipo de dieta, o consumo de álcool, as doenças crônicas como diabetes, hipertensão e síndrome X, exercícios físicos e uso de certos medicamentos são alguns dos principais fatores capazes de influenciar a geração de EROs (JAY et al.,

2006; FOLMER et al., 2002; FOLMER et al., 2003; CEDERBAUM, 2001; SHIVAKUMAR & RAVINDRANATH, 1993). Portanto, conhecer os mecanismos e fatores capazes de aumentar a produção de EROs seria uma maneira de prevenir certas doenças, retardar o envelhecimento e melhorar a qualidade de vida na velhice.



**ESQUEMA 3** : Formação dos principais EROs na mitocôndria celular adaptado de Szeto, H.H. in “ Cell-permeable, Mitochondrial-targeted, Peptide Antioxidants. *AAPS Journal*. 2006; 8(2): E277-E283”.

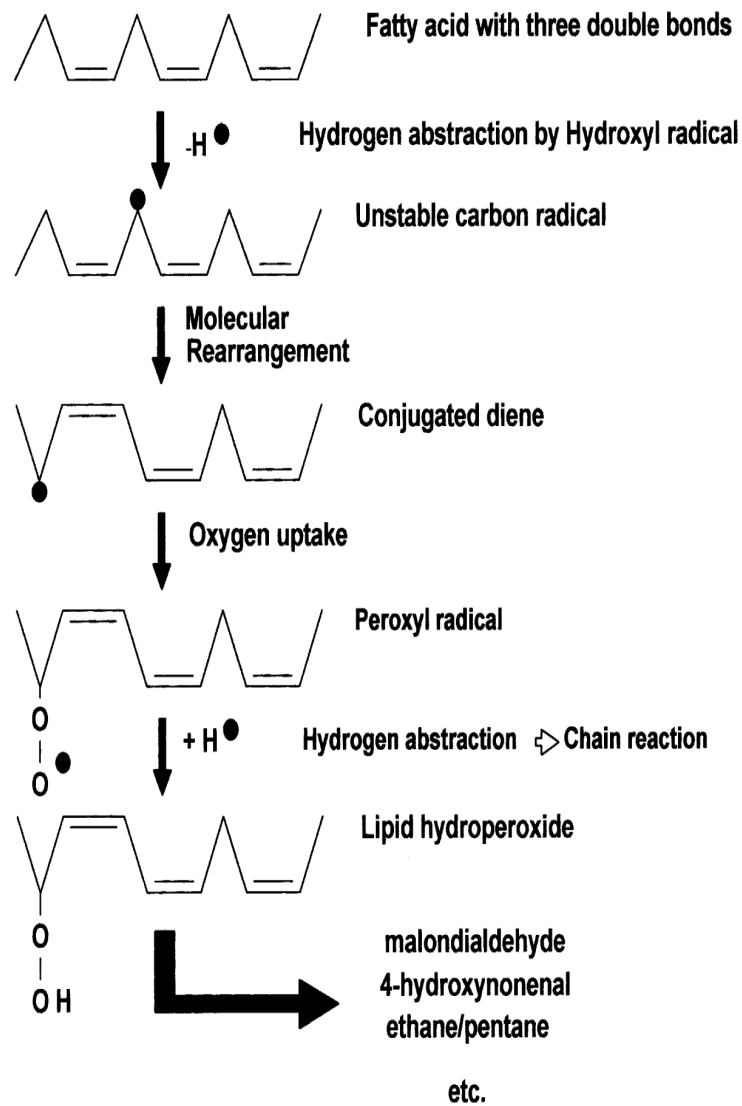
## 1.5. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica (PL) é um processo natural de renovação das membranas celulares. A PL também é essencial para a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, assim como na fagocitose, pinocitose e lise das membranas intracelulares (MEERSON et al., 1982). Entretanto, o estresse oxidativo aumenta este processo e provoca dano severo nas membranas celulares (MEERSON et al., 1982).

O processo de PL envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio, rearranjo das duplas ligações nos lipídios insaturados e a eventual destruição dos lipídios da membrana, produzindo uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres (BUEGE & AUST, 1978; JANERO, 1990). Embora o radical livre inicial produza somente efeitos locais, os radicais posteriores e os produtos de degradação possuem efeitos biológicos distantes do local onde o primeiro foi produzido (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Dentre os produtos liberados está o dialdeído malônico (MDA), cuja quantificação tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo, através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual tem sido usada como uma medida de PL (OHKAWA et al., 1979; JANERO, 1990).

As membranas das células e organelas celulares são mais suscetíveis à PL, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Dependendo do grau de severidade, a PL pode causar desde alterações na permeabilidade da membrana até a perda da função e morte celular (MEERSON et al., 1982).



**ESQUEMA 4** : Peroxidação lipídica e formação de dialdeído malônico e outros produtos (<http://www.biochemsoctrans.org/bst/029/0358/bst0290358a01.gif>).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Justificativa**

A ingestão de dieta contendo alto teor de lipídio representa um modelo interessante de se estudar o desenvolvimento de estresse oxidativo em tecido de animais e as alterações bioquímicas associadas a este processo.

O tratamento com haloperidol tem sido amplamente documentado como uma fonte geradora de radicais livres no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo o estresse oxidativo no SNC associado aos efeitos indesejáveis e tóxicos do neuroléptico.

### **2.2. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o efeito da dieta com alto teor de lipídio e o uso crônico de haloperidol, sobre a peroxidação lipídica (PL) em tecidos, a correlação entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular e a correlação entre a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a concentração de magnésio intracelular em fígado de ratos.

### **2.3. Objetivos específicos**

Considerando os aspectos acima, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos :

- 1) Avaliar o efeito da dieta com alto teor de lipídios sobre:
  - o ganho de peso dos animais durante o experimento;

- o peso final dos animais, após 48 semanas de experimento;
- o índice de PL no fígado e rim;
- a correlação entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular;

2) Avaliar o efeito do uso crônico de haloperidol sobre:

- o ganho de peso dos animais durante o tratamento;
- o peso final dos animais, após 24 semanas de tratamento com o neuroléptico;
- o índice de PL no fígado e rim;
- a correlação entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular

3) Avaliar o efeito da dieta com alto teor de lipídio associada ao uso crônico de haloperidol, durante as últimas 24 semanas de experimento, sobre:

- o ganho de peso dos animais;
- o peso final dos animais;
- o índice de PL no fígado e rim;
- a correlação entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular;
- a correlação entre a produção de TBARS e a concentração de magnésio intracelular no fígado.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Drogas**

O Haloperidol decanoato (Figura 1) foi obtido da Janssen-Cilag Farmacêutica, São Paulo, SP-Brasil; a Ketamina foi obtida da Dopalen/Divisão Vet. Brands/Sespo-Brasil. O Haloperidol e a Ketamina foram injetados intramuscularmente.

### **3.2. Animais e dieta**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 270 e 320 gramas; do biotério da Universidade Federal de Santa Maria. Eles foram mantidos em caixas plásticas, em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 12 horas de ciclo claro/escuro, com luz ligada às 7h. Dieta e água foram dados “ad libitum”.

Os animais foram mantidos e usados de acordo com as recomendações do Comitê sobre uso e cuidados de Animais Experimentais da Escola de Medicina Veterinária e Ciências Animais da Universidade de São Paulo.

Os ratos foram randomicamente divididos em dois grupos, com 16 animais cada, sendo um grupo alimentado com dieta contendo uma concentração normal de lipídios, considerado grupo da dieta controle (DC) e outro grupo alimentado com dieta contendo alta concentração em lipídios, considerado grupo com dieta gordurosa (DG). A composição da dieta é mostrada na Tabela 1.

A dieta foi colocada diariamente antes do ciclo escuro. As dietas foram preparadas semanalmente e estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os ratos receberam ambas as dietas durante 48 semanas e foram mensalmente pesados.

**Tabela 1** – Composição da dieta

Composição da dieta	Dieta hiperlipídica	Dieta normolipídica
	(gorda) (g/Kg)	(normal) (g/Kg)
Proteínas	75,00	76,00
Carboidratos	483,00	765,00
Fibras	35,00	37,00
Ácidos graxos saturados	125,00	8,00
Ácidos graxos insaturados	230,00	62,00
Mistura de sal <sup>1</sup>	48,00	48,00
Resíduo mineral (cinzas)	4,00	4,00
Conteúdo calórico (cal/g)	5,35	3,91

1– A mistura de sal segue a seguinte composição (g /kg): KCl, 96,3; MgSO<sub>4</sub>, 56,7; ZnCl<sub>2</sub>, 0,4; CuCO<sub>4</sub>, 0,7; MnSO<sub>4</sub>, 1,2; farelo de osso, 449,00; sal fino, 152. Os valores foram retirados de Andriquetto (1986).

### 3.3. Tratamento com Haloperidol

O uso de haloperidol (Figura 1) iniciou após 24 semanas de alimentação com as dietas, quando os dois grupos de ratos foram divididos em 4 grupos distintos. Uma parte do grupo com dieta controle (DC) continuou recebendo dieta com concentração normal em gordura e injeção intramuscular de óleo vegetal, considerado grupo com dieta controle (DC) com n= 5 ao final do experimento; outra parte do grupo com dieta controle continuou recebendo dieta com concentração normal em lipídios e injeção intramuscular de haloperidol decanoato, considerado grupo com dieta controle + haloperidol (HM), com n = 5 ao final do experimento.

Uma parte do grupo recebendo dieta com alto teor de lipídio (DG), continuou, recebendo dieta rica em gordura e injeção intramuscular de óleo vegetal, considerado o grupo com dieta gordurosa (DG), com n= 6 ao final do experimento;

outra parte do grupo com dieta hiperlipídica continuou recebendo dieta com alto teor de lipídios e injeção intramuscular de haloperidol decanoato, considerado o grupo com dieta gordurosa + haloperidol (HG), com n= 7 ao final do experimento.

Os grupos tratados com haloperidol receberam a droga neuroléptica de depósito, haloperidol decanoato (Janssen-Cilag Farmacêutica) na dose de 38 mg/Kg, o equivalente de 1 mg/Kg/dia do haloperidol não conjugado. As injeções foram dadas via intramuscular a cada 4 semanas, durante o período de 24 semanas.

### **3.4. Preparação de tecidos**

Após 4 semanas da última dose de haloperidol, todos os ratos receberam 1mg/kg do anestésico ketamina (Dopalen/Divisão Vet. Brands/Sespro-Brasil), e após foram mortos por decapitação.

Os fígados, rins e tecido adiposo abdominal de todos os ratos foram rapidamente removidos. Os fígados e rins foram colocados em gelo e homogeneizados em 7 vol. (g/ml) de 50 mM Tris-HCl + 0,9 % NaCl (pH 7,0). Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi usado para determinação de TBARS, como previamente descrito por OHKAWA et al. (1979) e ROSSATO et al. (2002).

A gordura abdominal, constituída de gordura retroperitonal-perineal, epididimal e mesentérica, foi pesada logo após dissecação dos roedores.

### **3.5. Concentração de Magnésio Intracelular**

Foi coletado 3 ml de sangue, por punção cardíaca, de todos os animais, e colocado em tubos heparinizados, centrifugados a 1800 RPM, durante 8 minutos, sendo desprezado o plasma.

Os eritrócitos foram diluídos 1:100 com solução de cloreto de lantânio P.A. (Merck) para eliminação de interferentes. Foi utilizado padrão Merck de 1000 mg/l de magnésio e como controle foi utilizado soro controle ControlLab®, lote OFH-3N Anvisa/Reblas nº PROFI 001.

As dosagens de magnésio intraeritrocitário, correspondente ao magnésio intracelular, foram realizadas por espectrometria de absorção atômica por chama em espectrômetro Perkin Elmer Atomic Absorption 3110.

### **3.6. Dosagens Sanguíneas**

As dosagens sanguíneas de glicose, colesterol, triglicérides, ALT, magnésio e uréia foram realizadas pelo método cinético-enzimático, com reativos da Labtest® (Lagoa Santa-MG, Brasil) no aparelho de automação em bioquímica Express Plus® (Bayer diagnostics, Sant Louis-MO, USA).

As dosagens de insulina foram realizadas com reativos da Gênese diagnostics (USA) pelo método de radioimunoensaio.

### **3.7. Análises Estatísticas**

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago,IL) de uma e duas vias, seguido de Teste post hoc de Duncan quando apropriados. Os coeficientes de correlações foram determinados por análise de regressão linear. Os valores de F estão presentes no texto somente quando valor de P associado com F forem  $< 0,05$ . A significância foi considerada quando  $P < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Dieta com alto teor de lipídio (DG)**

#### **4.1.1. Peso corpóreo**

Neste trabalho foram analisados duas situações distintas quanto ao peso corpóreo dos roedores: a) ganho de peso entre os 2 grupos alimentados com diferentes tipos de dieta, quanto à composição de lipídios, durante as primeiras 24 semanas de experimento e b) peso corpóreo final de todos os 4 grupos ao final do experimento (após 48 semanas).

A dieta com alto teor de lipídio, não produziu, efeito no ganho de peso corpóreo dos roedores durante as primeiras 24 semanas de tratamento. Análise de variância (ANOVA) de duas vias (duas dietas x sete determinações do peso corpóreo) não demonstrou efeito significativo (Figura 3).

Não houve variação significativa no peso corpóreo final dos animais alimentados com dieta com alto teor lipídico quando comparado com os animais alimentados com dieta controle após 48 semanas de experimento ( $521,43 \pm 64,93$  vs  $500,00 \pm 55,67$ g) (Figura 4).

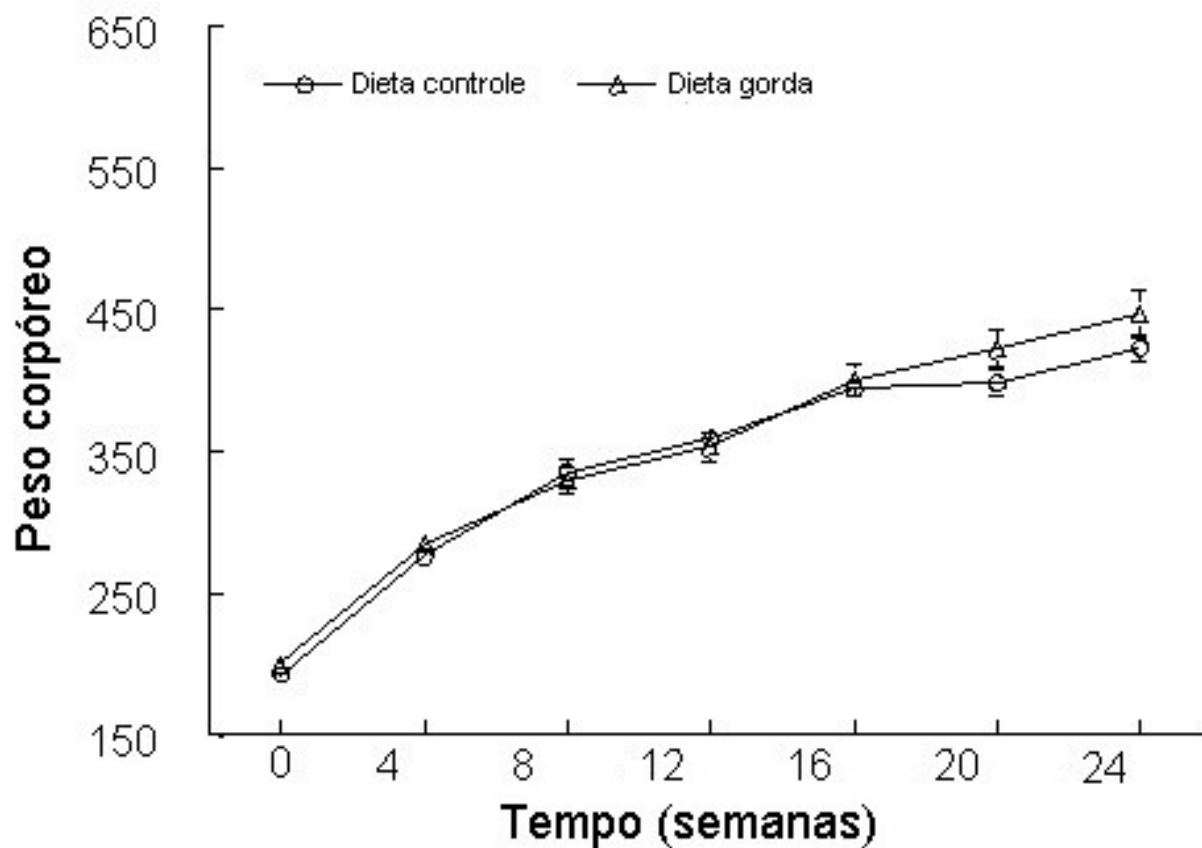
#### **4.1.2 Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos**

Após 48 semanas de experimento, a dieta contendo alto teor de lipídio (DG), promoveu um aumento significativo (ANOVA de uma via,  $P < 0,01$ ) nos níveis de dialdeído malônico (MDA), utilizado como medida de TBARS, no fígado dos ratos do grupo alimentado com dieta hiperlipídica (DG), quando comparado ao grupo de ratos

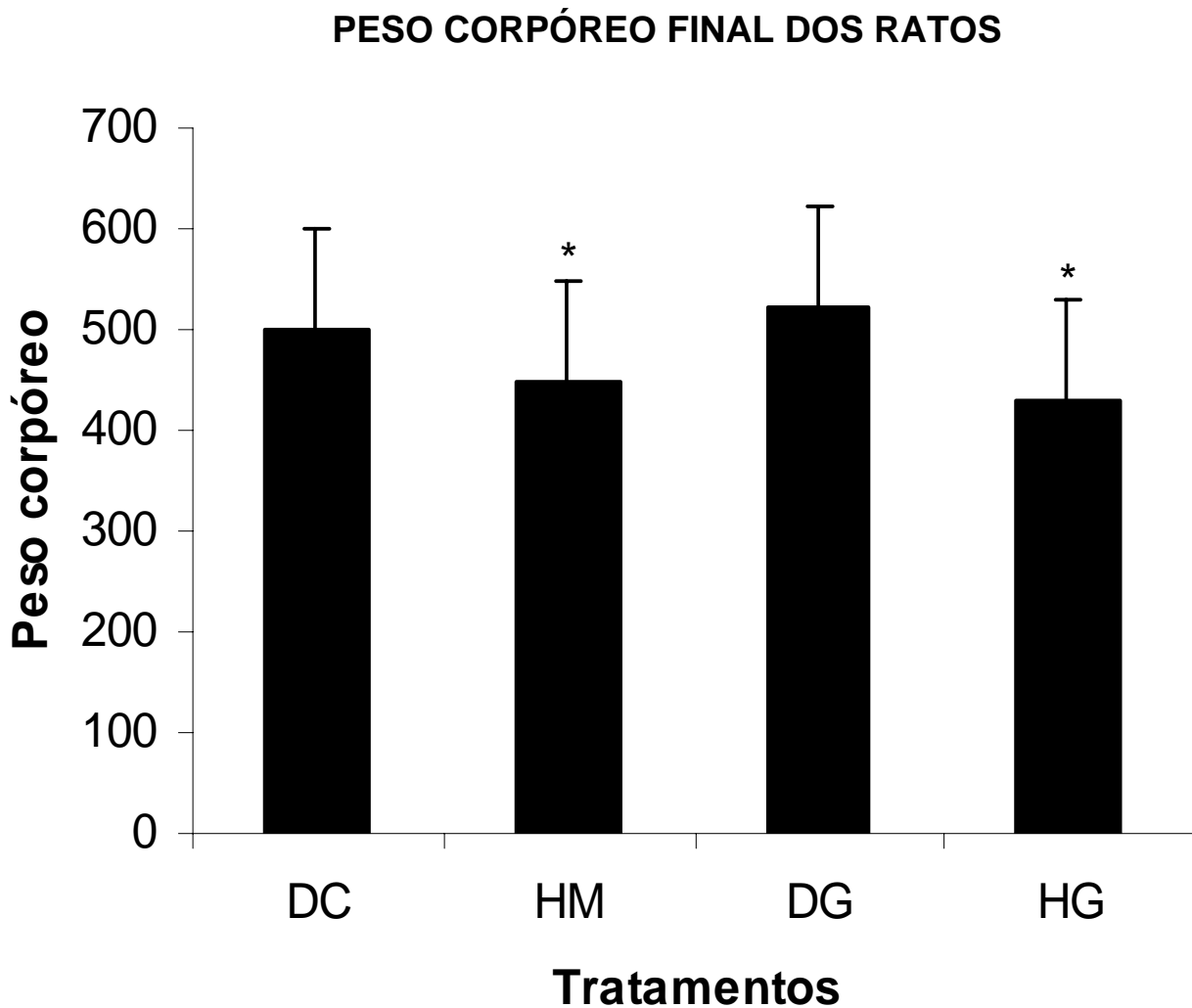
alimentados com dieta controle (DC) ( $49,40 \pm 13,29$  vs  $25,80 \pm 7,35$  nmol MDA/g tecido) (Figura 5).

Não houve variação significativa nos níveis renais de TBARS, promovido pelo uso da dieta com alto teor de lipídio no grupo DG quando comparado com o grupo da dieta controle (DC), após 48 semanas de experimento ( $40,40 \pm 15,47$  vs.  $36,73 \pm 8,14$  nmol MDA/g tecido) (Figura 6).





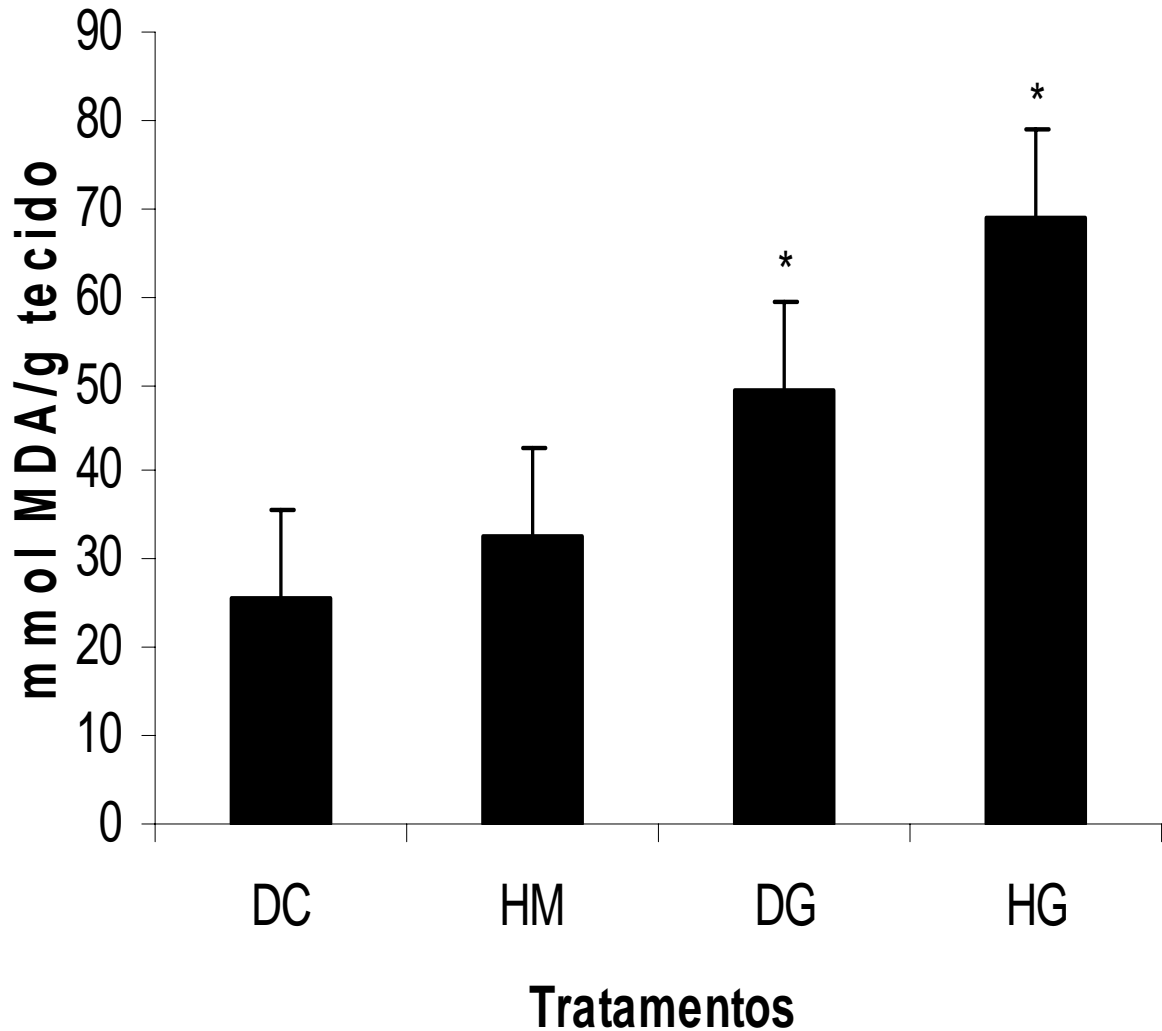
**FIGURA 3** – Peso corpóreo em ratos alimentados com dieta controle e dieta contendo alto teor de lipídio durante 24 semanas. DC x DG, sete determinações do peso corpóreo, ANOVA de 2 vias.



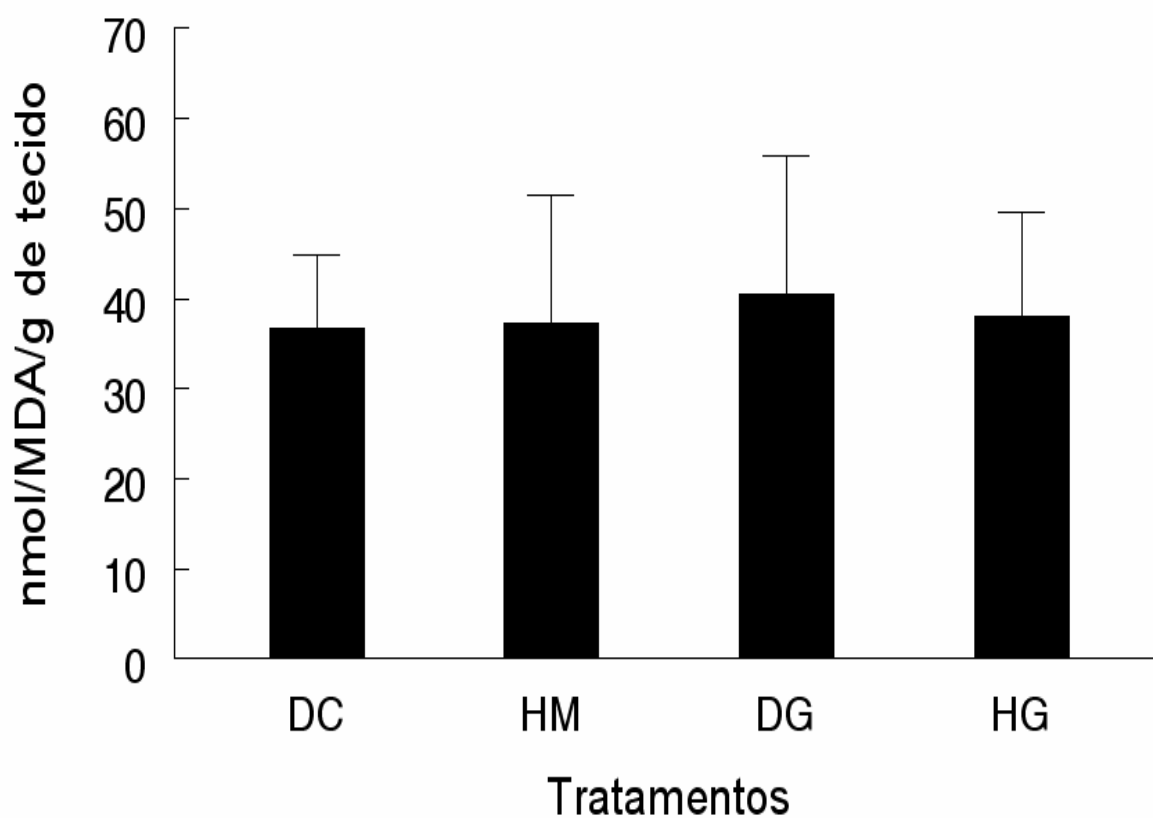
DC = dieta controle; DG = dieta lipídica; HM = haloperidol e HG = haloperidol + dieta hiperlipídica

**FIGURA 4** – Peso corpóreo final dos 4 grupos de animais, após 48 semanas de experimento, alimentados por ambas as dietas, com e sem tratamento com haloperidol. A dieta com alto teor de lipídio (DG) não promoveu variação significativa no peso corpóreo final dos ratos, quando comparado ao grupo controle (DC). ANOVA de uma via, entretanto o uso de haloperidol promoveu uma diminuição significativa no peso final dos roedores de ambos os grupos: a) do grupo controle + haloperidol (HM) quando comparado ao grupo controle (DC) ( $449,4 \pm 42,3$  g x  $500,0 \pm 55,7$  g),  $P < 0,05$  e do grupo recebendo dieta com alto teor de lipídio + haloperidol (HG) quando comparado ao grupo recebendo dieta com alto teor de lipídio (DG) ( $429,33 \pm 67,80$  g x  $521,43 \pm 64,93$  g),  $P < 0,05$ . ANOVA de 2 vias.

## PRODUÇÃO DE TBARS EM FÍGADO DE RATOS WISTAR



**FIGURA 5** – Aumento da produção de TBARS em fígados de ratos Wistar, estatisticamente significativo, promovido por ambos os grupos: a) uso de dieta com alto teor de lipídio (DG) quando comparado com a dieta controle (DC) ( $49,40 \pm 13,29$  vs  $25,80 \pm 7,35$  nmol MDA/g tecido)  $P < 0,01$  e b) uso de dieta com alto teor de lipídio associado ao tratamento com haloperidol (HG) quando comparado com ambos os grupos, b1) dieta controle (DC) ( $68,77 \pm 30,41$  vs.  $25,80 \pm 7,35$  nmol MDA/g tecido)  $P < 0,01$  e b2) dieta controle associado ao uso de haloperidol ( $68,77 \pm 30,41$  vs.  $32,63 \pm 7,48$ ), nmol MDA/g tecido)  $P < 0,05$ . ANOVA de duas vias.



**FIGURA 6** – Produção de TBARS em rins de ratos Wistar. O uso de dieta com alto teor de lipídio, assim como, o uso de haloperidol associado a ambas as dietas, não promoveram variação significativa na produção de TBARS, em tecido renal, entre os 4 grupos distintos de ratos Wistar, após 48 semanas de experimento.

## 4.2. Haloperidol

### 4.2.1. Peso corpóreo

Neste trabalho, ambos os grupos tratados com haloperidol decanoato diminuíram, significativamente, o ganho de peso corpóreo após o início do tratamento, sendo que os ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio começaram a perder peso antes dos ratos do grupo controle quando tratados com haloperidol, evidenciado através de uma interação significativa entre o peso corpóreo e o tratamento com haloperidol [ $F(6,150)=8,50$  e  $P<0,01$ ] (Teste post hoc de Duncan) (Figura 7).

Interessante observar que até a 24<sup>a</sup> semana de experimento, em que havia apenas a influência da dieta sobre os grupos, o ganho de peso ocorreu de maneira homogênea entre os grupos, ocorrendo uma variação, significativamente importante, após o início do tratamento de haloperidol.

O tratamento com haloperidol causou uma redução, estatisticamente significativa, no peso corpóreo dos ratos em ambos os grupos dietéticos após 24 semanas de tratamento com o neuroléptico. De fato, o peso corpóreo dos ratos do grupo controle tratados com haloperidol (HM) foi significativamente menor que o peso corpóreo dos ratos do grupo controle (DC), ao final de experimento, conforme ANOVA duas vias;  $P<0,05$  ( $449,4 \pm 42,3$  g x  $500,0 \pm 55,7$  g), assim como, o peso corpóreo, dos ratos do grupo da dieta com alto teor de lipídios, tratados com haloperidol (HG), foi significativamente menor que o peso corpóreo dos ratos do grupo da dieta com alto teor de lipídios (DG), conforme ANOVA de duas vias;  $P<0,05$  ( $429,33 \pm 67,80$  g x  $521,43 \pm 64,93$  g) (Figura 4).

#### **4.2.2. Níveis de TBARS em tecidos**

O tratamento com haloperidol causou um aumento na produção de TBARS no fígado em ambos os grupos tratados, sendo que, no grupo de ratos alimentados com dieta controle recebendo haloperidol (HM), o aumento de TBARS não foi significativo em relação aos ratos alimentados com dieta controle (DC). Entretanto, houve um aumento, significativamente marcante, dos níveis de TBARS no fígado dos ratos alimentados com dieta gorda e tratados com haloperidol (HG) quando comparado com ambos os grupos: a) de ratos alimentados com dieta controle (DC) ANOVA duas vias;  $P < 0,01$  ( $68,77 \pm 30,41$  vs.  $25,80 \pm 7,35$  nmol MDA/ g tecido) e b) de ratos alimentados com dieta controle tratados com haloperidol (HM) ANOVA duas vias;  $P < 0,05$  ( $68,77 \pm 30,41$  vs.  $32,63 \pm 7,48$  nmol MDA/ g tecido), respectivamente (Figura 5).

O tratamento com haloperidol não promoveu variação significativa, na produção de TBARS em rim, entre os 4 grupos distintos de ratos (Figura 6).

#### **4.3. Correlação entre conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular**

Após 48 semanas de experimento, foi encontrada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular ( $r = - 0,54$ ,  $P < 0,05$ ) considerando todos os animais,  $n = 23$  (Figura 8).

O grupo de roedores alimentado com dieta contendo alto teor de lipídio (DG), apresentou uma correlação negativa, estatisticamente significante, entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal com valores de  $P < 0,05$  e  $r = - 0,83$  (Figura 9).

O grupo controle (DC) apresentou uma correlação negativa, estatisticamente não significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, com valores de  $P= 0,087$  e  $r= -0,82$  (Figura 10).

No grupo de roedores alimentados com dieta controle e tratados com haloperidol (HM), houve uma correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, sendo os valores de  $P= 0,03$  e  $r= - 0,91$  (Figura 11).

O grupo de ratos, alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio e tratados com haloperidol (HG), apresentou uma correlação negativa, não significativa, entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal, sendo os valores de  $P > 0,05$  e  $r = -0,40$  (Figura 12).

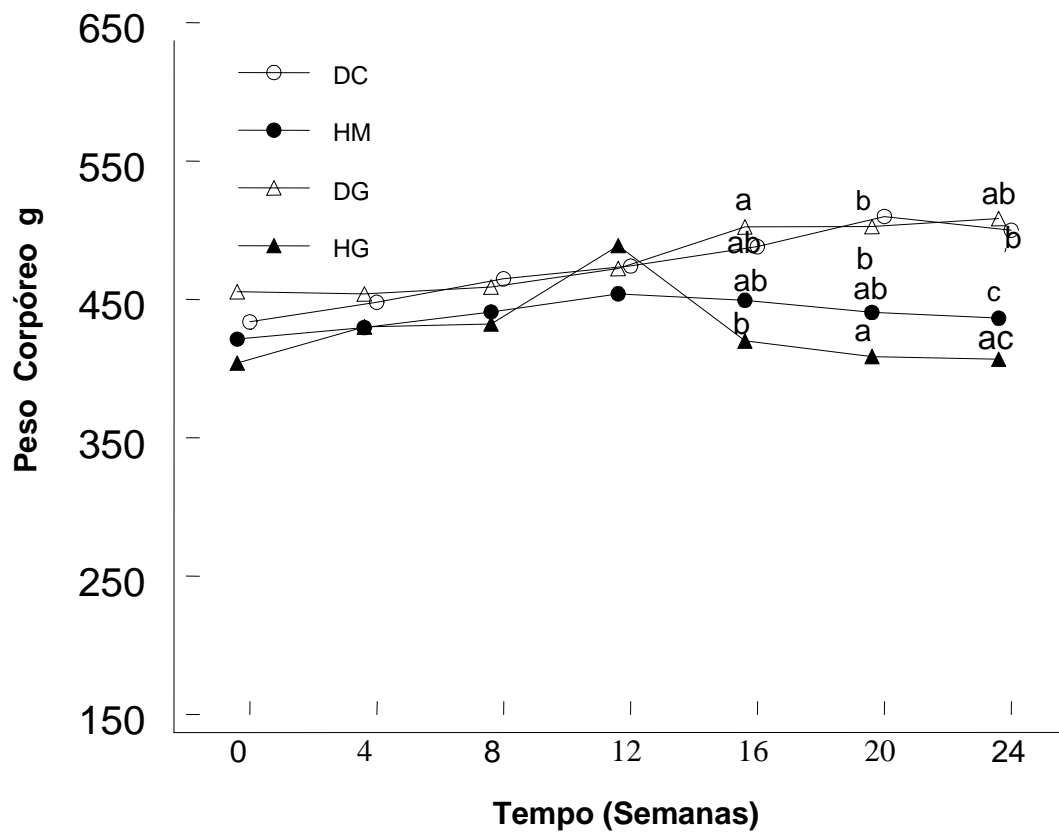
#### **4.4. Correlação entre Concentração de Magnésio Intracelular e Peroxidação Lipídica**

Após 48 semanas de experimento, foi encontrado uma correlação positiva, estatisticamente significante, entre o conteúdo de magnésio intracelular e a produção de TBARS em tecido hepático ( $r = 0,79$ ,  $P < 0,05$ ) no grupo de animais alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio tratados com haloperidol,  $n = 7$  (Figura 13).

#### **4.5. Dosagens sanguíneas**

A dieta ou tratamento com haloperidol não promoveu variação significativa nas dosagens sanguíneas de insulina, glicose, colesterol, triglicérides, ALT, magnésio e uréia entre os grupos de ratos tratados ao final do experimento (Tabela 2).

**RELAÇÃO GANHO DE PESO CORPÓREO  
X  
TRATAMENTO COM HALOPERIDOL DECANOATO**



**FIGURA 7** – Peso corpóreo em ratos recebendo dietas e tratamento com haloperidol. Os símbolos indicam uma diferença significativa entre os grupos dentro do mesmo mês. Interação significativa entre o peso corpóreo e o tratamento com haloperidol  $F(6,150)=8,50$  e  $P<0,05$  (Teste de variável múltipla de Duncan).



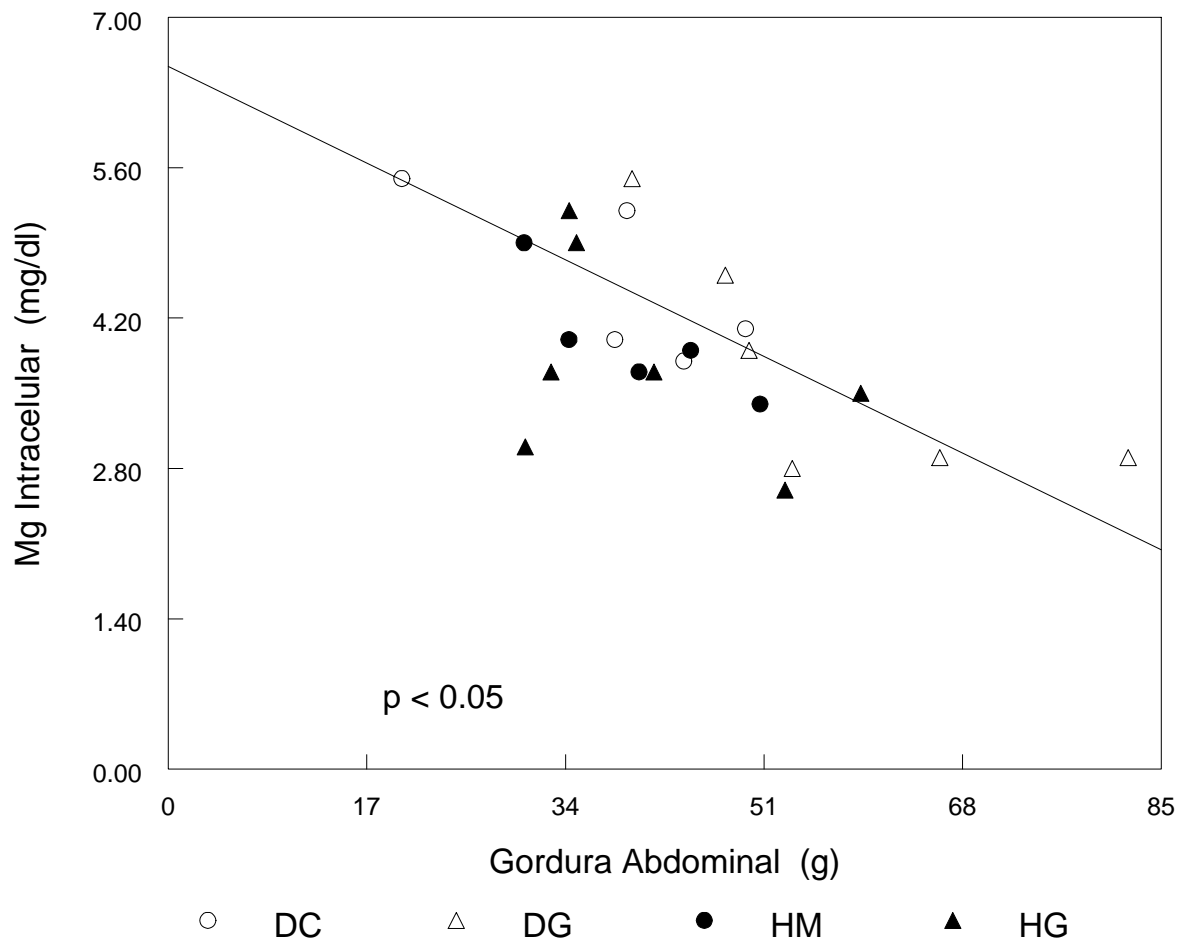
## CORRELAÇÃO ENTRE CONTEÚDO DE GORDURA ABDOMINAL X

### CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO INTRACELULAR

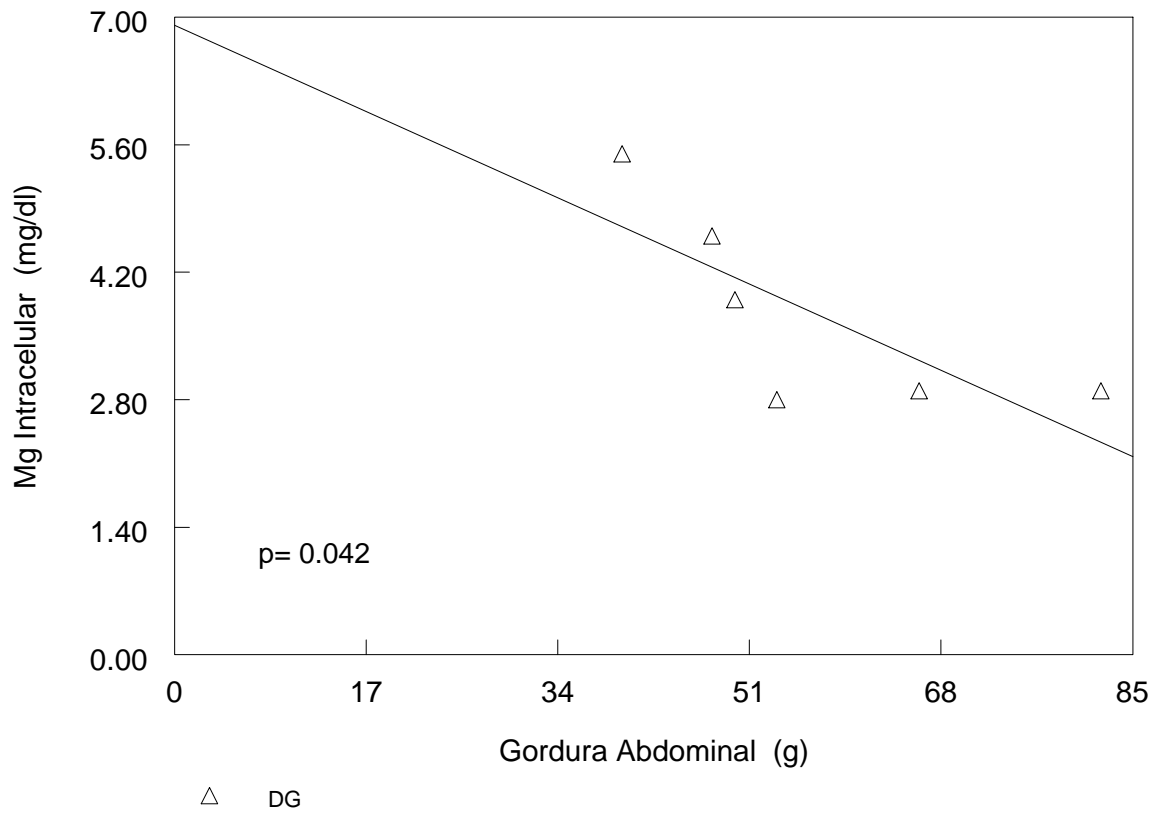
Magnésio intracelular vs. Gordura abdominal (Casewise MD deletion)

Gordura abdominal =  $71.076 - 6.743 * \text{Magnésio Intracelular}$

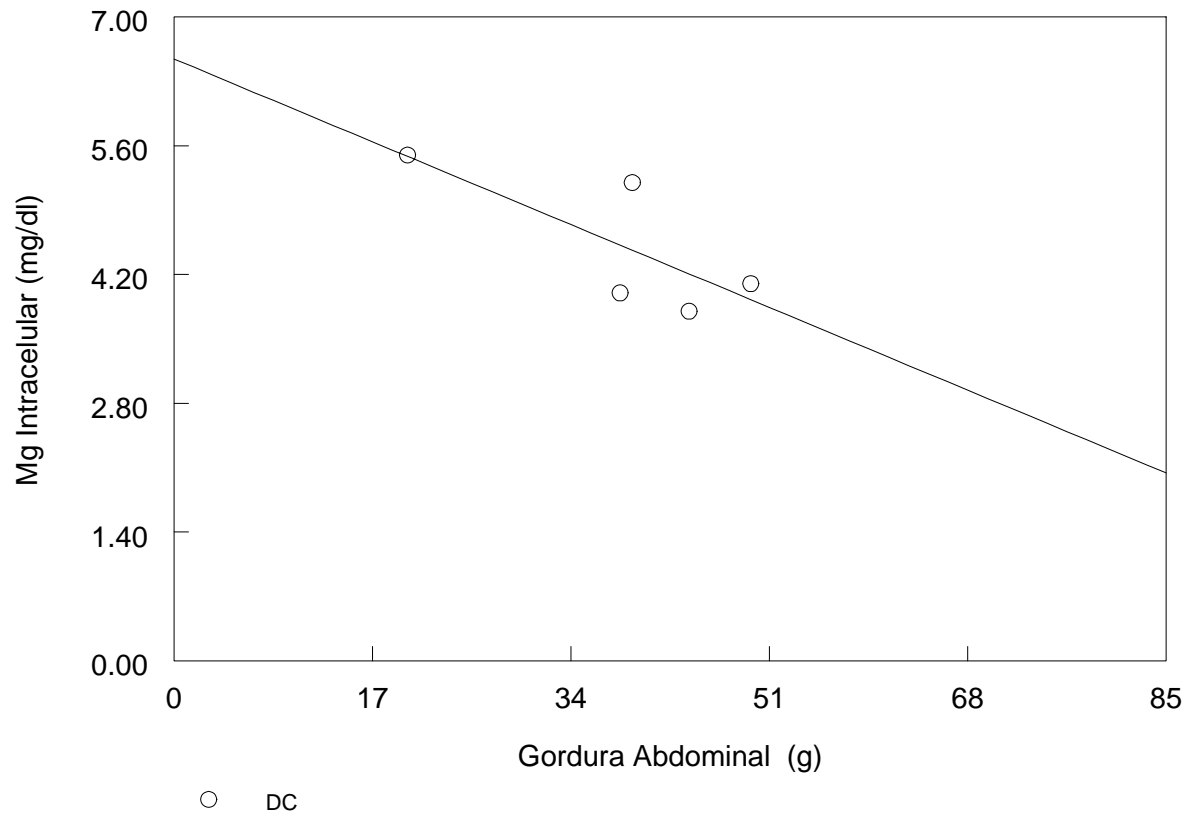
Correlação:  $r = -0,54$



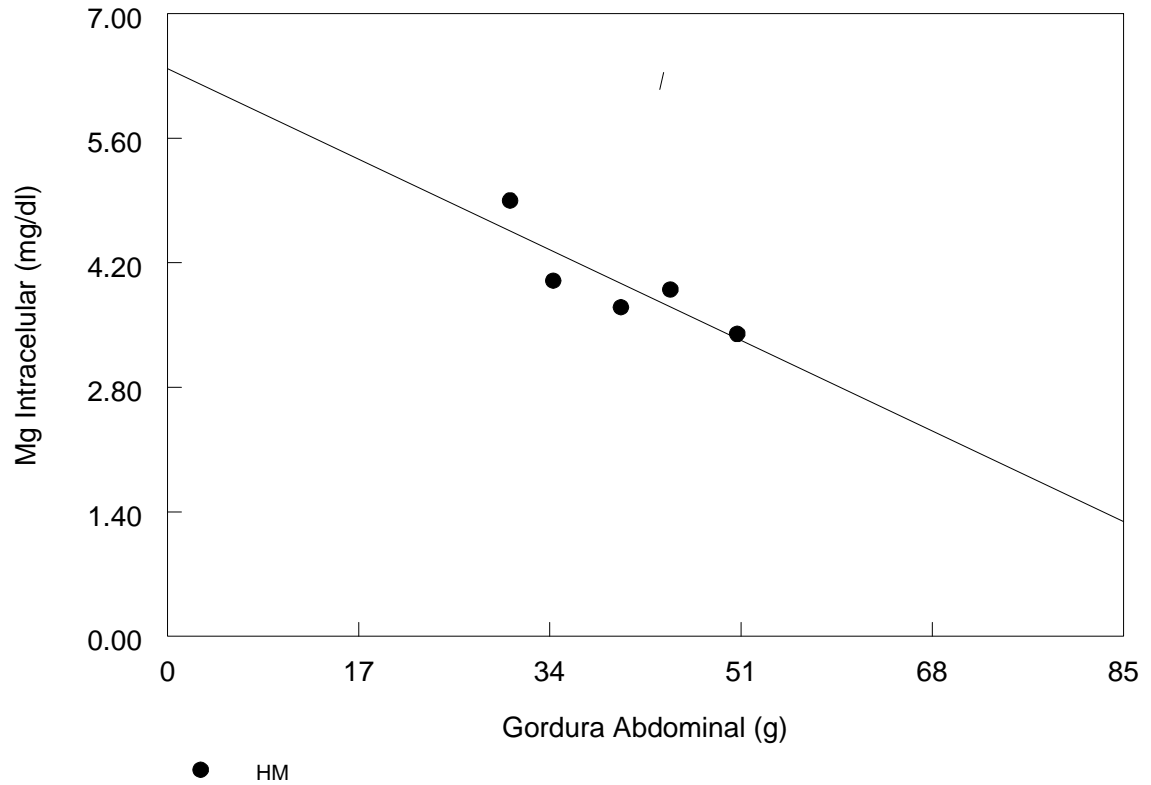
**FIGURA 8** - Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular ( $r = -0,54$ ,  $P < 0,05$ ) considerando todos os animais,  $n = 23$ .



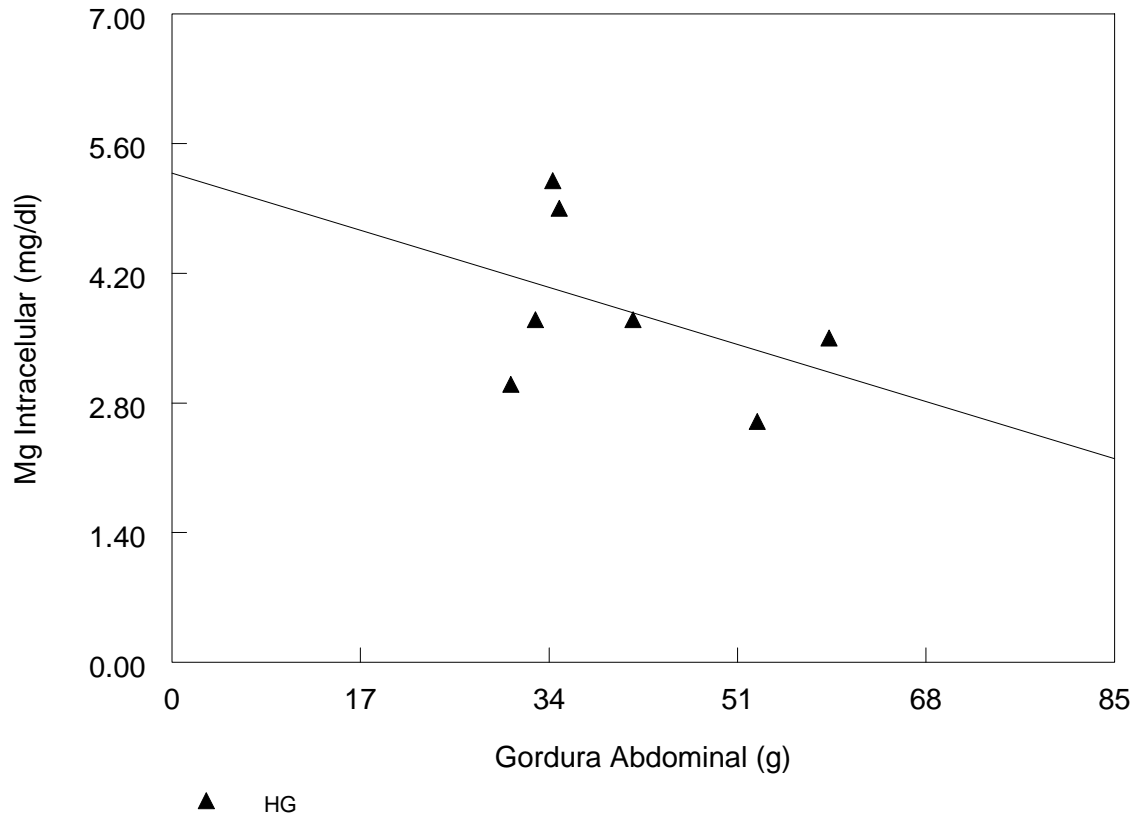
**FIGURA 9** – Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de roedores alimentados com dieta contendo alto teor de lipídios,  $P < 0,05$  e  $r = - 0,83$ ;  $n = 6$ .



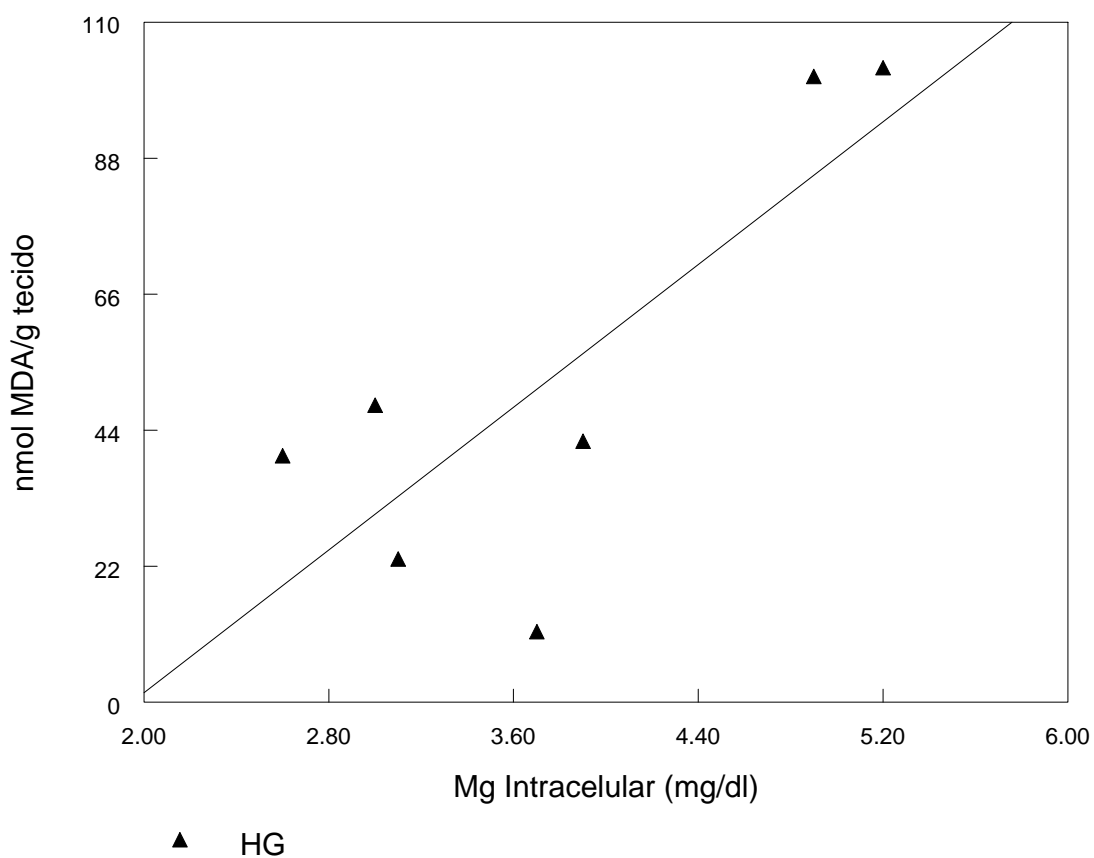
**FIGURA 10** – Correlação negativa, estatisticamente não significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular no grupo de ratos alimentados com dieta controle (DC),  $P > 0,05$  e  $r = -0,82$ ,  $n = 05$ .



**FIGURA 11** - Correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de ratos alimentados com dieta controle tratados com haloperidol (HM),  $P < 0,05$  e  $r = - 0,91$ ;  $n = 5$ .



**FIGURA 12** – Correlação negativa, não significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio tratados com haloperidol (HG),  $P > 0,05$  e  $r = -0,40$ ;  $n = 7$ .



**FIGURA 13** – Correlação positiva, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de magnésio intracelular e a produção de TBARS em tecido hepático ( $r = 0,79$  e  $P < 0,05$ ) no grupo de animais alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio e tratados com haloperidol,  $n = 7$ .

**TABELA 2 –** Dosagens sanguíneas nos diferentes grupos de ratos, sem variação estatisticamente significativa.

<b>GRUPO</b>	<b>Insulina ng/dl</b>	<b>Glicose mg/dl</b>	<b>Colesterol mg/dl</b>	<b>ALT U/l</b>	<b>Triglicérides mg/dl</b>	<b>Magnésio mg/dl</b>	<b>Uréia mg/dl</b>
DC	6,47 ± 1,64	141,40 ± 41,78	105,80 ± 36,60	68,78 ± 21,43	152,20 ± 64,94	2,67 ± 0,36	42,00 ± 10,07
DG	6,00 ± 2,28	134,50 ± 27,57	80,50 ± 17,55	52,81 ± 8,80	90,12 ± 32,25	2,56 ± 0,27	33,00 ± 4,44
HG	4,76 ± 1,73	145,62 ± 54,38	95,75 ± 17,56	46,82 ± 9,40	105,87 ± 49,82	2,71 ± 0,45	34,62 ± 4,62
HM	6,76 ± 2,16	138,85 ± 43,97	105,14 ± 19,60	51,72 ± 10,88	113,42 ± 33,24	2,37 ± 0,24	39,28 ± 6,12

N = 5-7.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1 Dieta com alto teor de lipídio**

#### **5.1.1 Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio no peso corpóreo de ratos Wistar**

O aumento no consumo de carboidratos e ou lipídios, na dieta da população ocidental, nos últimos anos, tem sido associado ao declínio da função cognitiva e à fisiopatologia de diversas alterações metabólicas, responsáveis por diversas manifestações clínicas como a obesidade, o diabetes melitus tipo 2, a hipertensão arterial sistêmica, o câncer e o estado pró-trombótico, além de promover estresse oxidativo em tecidos de mamíferos ( CASTELLI et al., 1992; KALMIJN, 2000; FOLMER et al., 2003; AXEN et al., 2003; IBGE, 2004; ZHANG et al. 2005; GREENWOOD e WINOCUR, 2005; FACHINETTO et al, 2005 e AOKI t al., 2006.)

A dieta contendo alto teor de lipídio (DG) não promoveu variação significativa no ganho de peso dos roedores, quando comparado à dieta considerada controle (DC). Este fato deveu-se a um menor consumo dietético do grupo de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio (DG) quando comparado com o grupo de ratos alimentados com dieta controle (DC), pois aqueles consumiram  $20 \pm 6$  gramas/dia de dieta enquanto estes consumiram  $30 \pm 5$  gramas/dia de dieta. Além disso, a dieta considerada controle, possuía uma concentração normolipídica e alta taxa de carboidrato, o que contribuiu para que o ganho de peso durante o tratamento e o peso final dos animais após o experimento não variassem de maneira significativa.



### **5.1.2. Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio no estresse oxidativo em tecidos de ratos Wistar**

Neste trabalho, a dieta contendo alto teor de lipídio, promoveu estresse oxidativo em tecido hepático de ratos quando comparados com os ratos alimentados com dieta normal, demonstrado pela produção significativamente aumentada de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o que está de acordo com trabalhos anteriores, pois o aumento dos níveis de dialdeído malônico (MDA) em tecidos de roedores tem sido associado à dieta com alta concentração de gordura (DOBRIAN et al., 2001 e FOLMER et al., 2003).

Os níveis aumentados de TBARS, considerados como marcadores da peroxidação lipídica, quantificados em nmol/MDA/g de tecido, encontrados em fígados de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio, podem ter sido produzidos por duas vias distintas de formação de EROs, em que o  $H_2O_2$  e o óxido nítrico (NO) exercem uma função chave neste processo.

Por um lado, de acordo com HASHIMOTO (1996) e citado por NELSON e COX (2000), altas concentrações de lipídios, na dieta de mamíferos, resulta numa síntese aumentada das enzimas da beta oxidação peroxissomal no fígado, o que pode gerar estresse oxidativo, porque nos peroxissomas a flavoproteína desidrogenase que introduz uma dupla ligação no Acil-CoA, passa os elétrons diretamente ao  $O_2$  produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 14), o qual por sua vez, através da reação com o  $O_2^{\cdot-}$  pode produzir o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ).

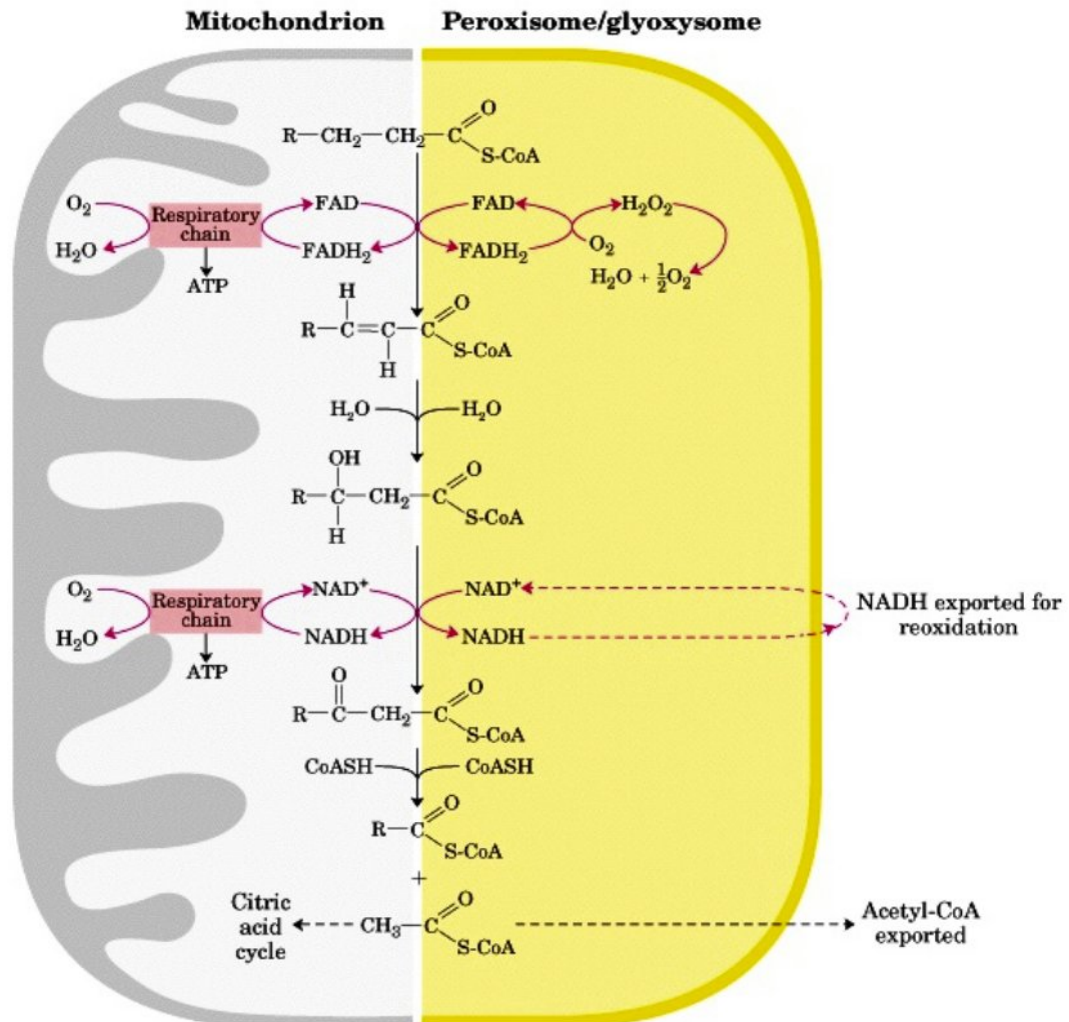
Por outro lado, alimentar ratos com alta concentração de gordura na dieta, pode produzir um aumento na atividade hepática da enzima óxido nítrico sintase, com conseqüente aumento da produção de óxido nítrico (NO), um precursor do peroxinitrito, potente e versátil oxidante, que pode atacar uma ampla variedade de

tecidos biológicos, produzindo peroxidação lipídica (Pryor e Squadrito, 1995 e WAN et al., 1999) (Figura 15).

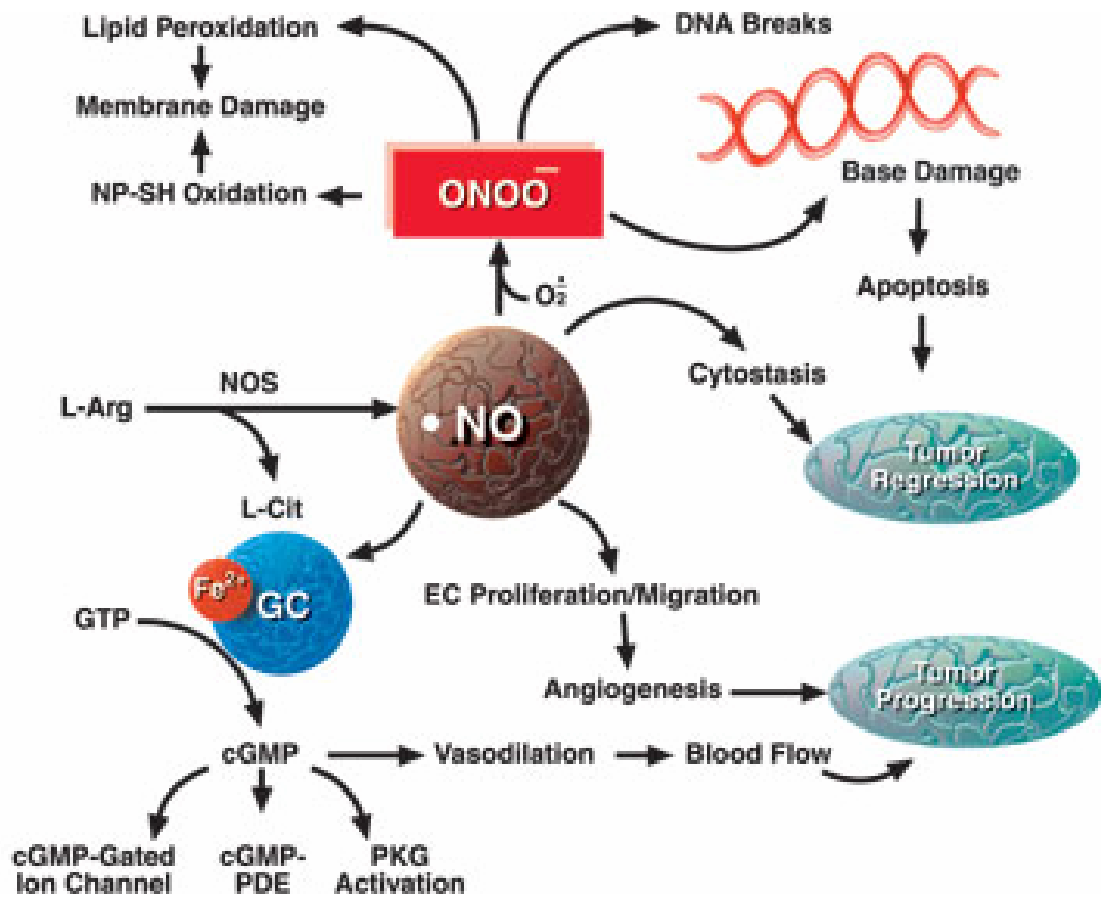
O estresse oxidativo, produzido no fígado de ratos alimentados com dieta contendo altas taxas de lipídios, evidenciado pelo aumento de TBARS, neste estudo, pode ter sido produzido por dois mecanismos distintos, ou seja, por um lado através de uma via metabólica alternativa da beta oxidação (beta oxidação peroxissomal) e por outro lado por ativação enzimática no fígado (da enzima óxido nítrico sintase). De fato, o dialdeído malônico (MDA), produzido como resultado da oxidação de ácidos graxos insaturados, em membranas celulares de sistemas biológicos, pode reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), com produção de TBARS. Esta reação do MDA com TBA produzindo TBARS é usada para detectar e quantificar a peroxidação lipídica e a injúria tecidual peroxidativa (WILBUR et al. 1949; SIDWELL et al., 1954; KENASTON et al., 1955; OHKAWA et al., 1979 e JANERO, 1990).

A dieta contendo alto teor de lipídio não promoveu variação significativa na produção de TBARS, em tecido renal dos roedores após 24 semanas de experimento. A diferença na significância da produção de TBARS, nos tecidos hepático e renal dos roedores, promovido pela dieta contendo alto teor de lipídio, pode ser explicada pela indução diferencial das enzimas oxidativas de ácidos graxos, nos peroxissomas destes tecidos, pois no tecido renal de ratos, as enzimas oxidativas peroxissomais são mais refratárias à beta-oxidação em relação às enzimas peroxissomais hepáticas (SHARMA et al, 1989). Estes dados reforçam o possível envolvimento da beta oxidação peroxissomal de ácidos graxos, contidos na dieta de roedores, na geração aumentada de EROs em fígado de ratos Wistar.

# Peroxisomes



**FIGURA 14** – Comparação da β-oxidação na mitocôndria e nos peroxissomas. No primeiro passo oxidativo, os elétrons no sistema peroxissomal, passam diretamente para o oxigênio, gerando  $H_2O_2$ . A dieta com alto teor de lipídios, estimula a β-oxidação peroxissomal nos hepatócitos, aumentando a produção de  $H_2O_2$  gerado neste processo (Fonte: Lehninger Principles of Biochemistry, 3<sup>rd</sup>., 2000).



**FIGURA 15** – Síntese do óxido nítrico, a partir da L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase, com subsequente produção de peroxinitrito e peroxidação lipídica. (Fonte: [www.dadamo.com/wiki/wiki.pl/Nitric\\_Oxide](http://www.dadamo.com/wiki/wiki.pl/Nitric_Oxide)).

### **5.1.3. Efeito da dieta contendo alto teor de lipídio na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal em ratos Wistar**

A correlação negativa, estatisticamente significativa, entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, observada no final do experimento, considerando todos os animais (Figura 8), foi promovida pelo grupo de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio (DG) e pelo grupo de ratos sob uso crônico de haloperidol (HM), pois de uma análise de correlação individual de cada grupo, foram os únicos que apresentaram uma correlação negativa, estatisticamente significativa, com valores de  $P=0,042$  e  $r= - 0,83$  (Figura 9) e  $P= 0,03$  e  $r = -0,91$ , respectivamente. Esta correlação encontrada no presente estudo, demonstrando que, quanto maior é o conteúdo de gordura abdominal, menor é a concentração de magnésio intracelular, reforça trabalhos prévios que relacionam uma base iônica, na qual a deficiência de magnésio intracelular estabelece uma importância fundamental no mecanismo da Síndrome X, em que a obesidade, sobretudo pelo aumento da gordura abdominal, esta presente junto as outras manifestações clínicas, tais como a hipertensão, a resistência à insulina, o diabetes tipo 2 e as doenças vasculares (RESNICK, 1993). De fato, diversos estudos clínicos e experimentais sugerem uma associação entre a concentração plasmática e intracelular de magnésio com risco aumentado a várias desordens metabólicas (PAOLISSO e BARBAGALLO., 1997; ROSOLOVA et al., 1997; BARBAGALLO et al., 1999; FREEDAMAN et al., 1999; HANS et al., 2002 e LOPEZ-RIDAURA et al., 2004.) O resultado encontrado neste trabalho, na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal, promovido pela dieta contendo alto teor de lipídio, estabelece uma relação importante na promoção da

Síndrome X em ratos, pois alimentar ratos com dieta contendo alto teor de lipídio pode promover a Síndrome X (AXEN et al., 2003).

## **5.2. Haloperidol**

### **5.2.1. Efeito do haloperidol no peso corpóreo de ratos Wistar**

Os resultados mostraram que o uso crônico de haloperidol promoveu uma diminuição significativa no peso corpóreo dos animais quando comparado aos respectivos grupos controles. A perda do ganho de peso promovido pelo uso de haloperidol começou após 12 semanas de tratamento com o neuroléptico (Figura 7), sendo que, a diminuição do peso corpóreo dos animais tratados com haloperidol, em relação aos animais não tratados, continuou significativo até o final do experimento (Figuras 4 e 7).

Este estudo sugere que a perda de peso dos roedores alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio e tratados com haloperidol, pode estar associado ao estresse oxidativo marcante, ocorrido no fígado deste grupo, pois além de ser o único grupo a perder peso, de maneira significativa, durante o tratamento com haloperidol, obteve o menor peso corpóreo associado aos maiores níveis de TBARS no tecido hepático, após 48 semanas de experimento quando comparado aos demais grupos. Além disso, os ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio tiveram uma ingestão menor de alimento quando comparado ao grupo de ratos alimentados com dieta controle. Portanto o uso crônico de haloperidol associado à dieta contendo alto teor de lipídio produz perda de peso corpóreo em roedores, pois a toxicidade do haloperidol, evidenciada pela diminuição do ganho e peso corpóreo final dos animais tratados com o neuroléptico associado à dieta contendo alto teor

de lipídio (HG) promoveu perda de peso, significativamente marcante, quando comparado a animais com dieta normolipídica (DC) e sem uso de haloperidol.

### **5.2.2. Efeito do haloperidol no estresse oxidativo em tecidos de ratos Wistar**

Os resultados deste estudo evidenciaram, claramente, que o uso crônico de haloperidol promoveu uma potencialização na ação da dieta gorda na promoção do estresse oxidativo no fígado de roedores, determinado, pelo aumento marcante dos níveis de TBARS, neste tecido, quando comparado aos grupos DC e HM.

Este trabalho sugere que a metabolização hepática do haloperidol, por um lado, e a beta-oxidação perioxossomal associada à indução enzimática da enzima óxido nítrico síntase hepática, promovidos pela dieta com alto teor de lipídio, por outro lado, são os fatores responsáveis pelo aumento marcado de TBARS no fígado de ratos Wistar.

De fato a metabolização do haloperidol parece ser fonte geradora de radicais livres, pois nas reações de oxidação hepática, o citocromo P450 (P450) funciona como um sistema transportador de elétrons, o qual tem sido mostrado produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais superóxido formado pela redução univalente do oxigênio molecular (WHITE e COON, 1980 e MINAMIYAMA et al., 2004).

Apenas 1% do haloperidol é excretado na urina sem sofrer alteração, o restante é metabolizado no fígado de mamíferos pelas enzimas do citocromo P450 (P450), as quais são responsáveis pelo metabolismo de várias drogas, xenobióticos e substratos endógenos (FORSMAN e LARSSON, 1978; GORROD e FANG, 1993).

Há várias isoformas do P450 envolvidas nos vários tipos de reações na metabolização do haloperidol com formação de diversos intermediários metabólicos (FANG et al., 2001). A isoforma CYP3A4 é a mais importante isoenzima do P450 responsável pela maioria das vias metabólicas do haloperidol em humanos (FANG et al., 2001), enquanto que a CYP3A2 é uma das principais isoenzimas presente nos microsomas de ratos machos (MINAMIYAMA et al., 2004). A CYP3A2 produz mais EROs por quantidade de P450 que qualquer outra isoforma como CYP2C11, CYP2B1 e CYP1A2 (MINAMIYAMA et al., 2004). A CYP3A4 é considerada como isoforma homóloga da CYP3A2 do fígado de rato, e por esta razão é descrita como forma ativa na formação catalisadora de EROs em microsoma hepático humano (PUNTARULO e CEDERBAUM, 1998).

A administração crônica de haloperidol também tem promovido estresse oxidativo em tecido hepático, pela diminuição da glutathiona reduzida (GSH), considerado o principal tampão biológico intracelular devido ao seu grupamento tiol na redução de EROs, com conseqüente diminuição da taxa glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSS) (SHIVAKUMAR e RAVINDRANATH, 1993. e VAIRETTI et al., 1998.). De fato, a depleção de glutathiona reduzida (GSH) aumenta o estresse oxidativo induzido pelo óxido nítrico (NO) no hepatócito de ratos (SINBANDHIT-TRICOT et al., 2003).

Não houve variação significativa na geração de EROs no tecido renal de ratos Wistar promovido pelo uso crônico de haloperidol, pois o tecido renal não participa da metabolização do haloperidol.



### **5.2.3. Efeito do haloperidol na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal**

Os resultados demonstraram que, ambos os grupos tratados com haloperidol, promoveram uma correlação negativa, entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal, sendo que, apenas no grupo alimentado com dieta controle recebendo haloperidol (HM), a correlação foi estatisticamente significativa, com  $r = -0,91$  e  $P < 0,05$ . Estudos prévios demonstram que, o uso de haloperidol, em pacientes esquizofrênicos, pode diminuir os níveis plasmáticos de magnésio e aumentar os níveis intracelulares deste íon divalente (NECHIFOR et al., 2003 e 2004), o que está de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, pois em tese, o fato deste antipsicótico melhorar os níveis intracelulares de magnésio pode ter contribuído, além da toxicidade desta droga, para o menor peso corpóreo encontrado nos grupos de animais tratados (HM e HG). De fato, o efeito do HAL no grupo de roedores alimentados com dieta controle (HM) foi mais significativo ( $P=0,03$ ) dentre as quatro correlações negativas, pois o valor de  $P$  referente a correlação entre a concentração de magnésio intracelular e o conteúdo de gordura abdominal foi o menor de todos.

#### **5.2.4. Efeito do haloperidol na correlação entre a concentração de magnésio intracelular e a peroxidação lipídica**

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram claramente, que o haloperidol associado à dieta com alto teor de lipídio, promoveu uma super produção dos níveis de TBARS, como medida de estresse oxidativo, no fígado de ratos, sendo este aumento da produção de TBARS, correlacionado com a concentração de magnésio intracelular, conforme demonstrado por correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a produção hepática de TBARS e a concentração de magnésio intracelular, no grupo de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio e sob uso crônico de HAL ( $r = 0,79$  e  $P < 0,05$ ) (Figura 13). De fato, a metabolização do HAL pelo P 450, potencializou, o efeito de dieta com alto teor de lipídio, na PL em fígado dos roedores, sendo a produção de EROs, neste grupo (HG), correlacionada, positivamente, com a concentração intracelular de magnésio, pois de acordo com NECHIFOR et al., 2004., o HAL ao aumentar a concentração intraeritrocitária de magnésio promove um efeito maior, havendo uma relação entre o efeito antipsicótico da droga com níveis intracelulares aumentados de magnésio.

Este resultado está de acordo com trabalho prévio, em humanos, demonstrando que o tratamento com haloperidol promoveu, um aumento estatisticamente significativo, de magnésio intraeritocitário, nos pacientes esquizofrênicos sob uso do neuroléptico quando comparado a pacientes sem uso de haloperidol (NECHIFOR et al., 2003 e 2004). Entretanto, em ratos, não há publicações prévias sobre esta correlação entre o uso crônico de haloperidol e a concentração de magnésio intracelular.

O mecanismo pelo qual o haloperidol promoveu um aumento da concentração de magnésio intracelular em humanos não esta esclarecido. Os resultados deste

estudo sugerem que, o aumento significativamente marcante de TBARS em fígado de ratos Wistar, promovido pela alimentação com alto teor de lipídio associado ao uso crônico de HAL deve-se à produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela metabolização do neuroléptico, que ao reagir com  $H_2O_2$  promovido pela beta-oxidação peroxissomal de ácidos graxos no hepatócito, por um lado, e ao reagir com o NO produzido pelo aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase, por outro, produziu os EROs  $OH^{\cdot}$  e  $ONOO^-$ , de potente ação oxidante em sistemas biológicos.

A correlação positiva entre os níveis de TBARS e a concentração de magnésio intracelular no fígado dos ratos do grupo HG, parece ter sido influenciado tanto pelo HAL, que aumenta ambos, os níveis intracelulares de magnésio (NECHIFOR et al, 2003 e 2004.) e a produção de  $O_2^{\cdot-}$  neste tecido, como pela GSH, que é mais concentrada neste tecido, amplamente utilizada pelas enzimas da fase II do P 450, pois a concentração de magnésio intracelular é proporcional aos níveis de GSH (BARBAGALLO et al, 1999).

A produção de TBARS em fígado de ratos Wistar correlacionado com o aumento significativo de magnésio intracelular, promovido pelo uso de haloperidol associado a dieta com alto teor de lipídio, precisa ser melhor investigado, pois o efeito de drogas na geração de estresse oxidativo em tecidos pode se dar de diferentes maneiras, algumas previamente relatadas e outras a serem melhor elucidadas.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nesta dissertação, podemos inferir que :

- o consumo crônico de dieta contendo alto teor de lipídio produz PL em fígado de ratos Wistar, provavelmente, pela ação oxidante de EROs  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$  e  $ONOO^-$ , pois um aumento de gordura na dieta estimula a  $\beta$ -oxidação peroxissomal de ácidos graxos, com a produção aumentada de  $H_2O_2$  (HASHIMOTO, 1996) e também pelo aumento da enzima óxido nítrico síntase hepática, com produção aumentada de NO (WAN et al, 1999), precursor do potente agente oxidante  $ONOO^-$  (PRYOR e SQUADRITO, 1995);

- os dados apresentados, na correlação negativa entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração de magnésio intracelular, promovidos pela dieta com alto teor de lipídio, reforçam trabalhos prévios que apontam o aumento do consumo de gordura na dieta como uma das prováveis causas da Síndrome X, também conhecida como Síndrome Plurimetabólica, Síndrome Dismetabólica ou Síndrome Metabólica, em que a diminuição do magnésio intracelular, citado como uma provável base iônica desta patologia, está associado com as manifestações clínicas desta doença, em que um dos sintomas mais proeminente e patognomônico é a obesidade, sobretudo o aumento de gordura abdominal, a resistência à insulina e a hipertensão arterial sistêmica (PAOLISSO E BARBAGALLO, 1997);

- a toxicidade do haloperidol pode ser observada através do ganho de peso dos ratos, pois o neuroléptico diminuiu o ganho de peso em ambos os grupos de ratos tratados, sendo que o grupo de ratos alimentados com dieta com alto teor de lipídio e tratados com haloperidol ocorreu uma perda acentuada do peso corpóreo em relação aos demais grupos, em apenas 12 semanas de tratamento, mantendo-se até o final de experimento, sugerindo uma associação entre o estresse oxidativo no fígado deste grupo com a perda de peso;

- o tratamento com haloperidol potencializou a ação da dieta com alto teor de lipídio na produção de TBARS no fígado de ratos Wistar, pois enquanto a dieta com alto teor de lipídio produz  $H_2O_2$  e NO, através da  $\beta$ -oxidação peroxissomal e aumento na atividade da óxido nítrico sintase, respectivamente, a metabolização hepática do haloperidol pelo P 450 é fonte geradora de radicais  $O_2^{\cdot-}$  (WHITE e CONN, 1980, MINAMIYAMA, et al., 2004), o qual, além de possuir ação oxidante, reage com  $H_2O_2$  e NO produzido pela dieta com alto teor de lipídio, formando  $OH^{\cdot}$  e  $ONOO^-$ ;

- a correlação positiva entre a produção de TBARS e a concentração de magnésio intracelular, no fígado de ratos alimentados com dieta contendo alto teor de lipídio e uso crônico de haloperidol, reforça nossos argumentos de que o estresse oxidativo ocorreu pelo aumento da produção de EROs, e não pela diminuição da defesa antioxidante, sobretudo da GSH (principal tampão celular antioxidante), pois a concentração intracelular de magnésio é diretamente dependente da concentração de GSH, e fatores que diminuem os níveis de GSH diminuem a concentração de magnésio intracelular com diminuição da capacidade antioxidante (KEENOY et al., 2000 e BARBAGALLO et al., 1999).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DELAIMY, W. K.; RIMM, E.; WILLET, W. C.; STAMPFER, M. J.; HU, F. B. Magnesium intake and risk of coronary heart disease among men. *Journal of American College of Nutrition*. **23**:1:63-70. (2004).
- ANDREASEN, A. O.; FERRANTE, R. J.; BEAL, M. F. JORGENSEN, H.A. Oral dyskinesias and strial lesions in rats after long-term co-treatment with haloperidol and 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*. **87**:639-648. (1998).
- ANDREASEN, A. O.; FERRANTE, R. J.; AAMO, T.O.; BEAL, M.F.; JORGENSEN, H.A. Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. *Neuroscience*. **122**:717-725. (2003).
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERRY, L. MINARDI, I. *Nutrição Animal*, 4ª ed. São Paulo. Editora Nobel. Volume 1, pg. 395. 1986.
- AOKI, R.; IKARUGI, H.; NAEMURA, AAA.; IJIRI, Y.; YAMASHITA, T; YAMAMOTO, J. Endothelial dysfunction precedes atherosclerotic lesions and platelet activation in high fat diet-induced prothrombotic state. *Trombosis Research*. **117**:529-535. (2006).
- AXEN, K. V.; DIKEAKOS, A.; SCLAFANI, A. High dietary fat promotes syndrome X in non obese rats. *The Journal of Nutrition*. **133**:2244-2249. (2003).
- BARBAGALLO, M., GUPTA, R. K., BARDICEF, O., BARDICEF, M., RESNICK, L. M. Altered ionic effects of insulin in hypertension: role of basal ion levels in determining cellular responsiveness. *Journal of Clinical and Endocrinologic Metabolism*. **82**:1761-1765. (1997).
- BARBAGALLO, M., DOMINGUEZ, L. J., TAGLIAMONTE, M. R., RESNICK, L. M., PAOLISSO, G. Effects of Glutathione on red blood cell intracellular magnesium. Relation to glucose metabolism. *American Journal of Hypertension*. **34**:76-82. (1999).
- BEHL, C.; RUPPRECHT, R.; SKUTELLA, T.; HOLSBOER, F. Haloperidol-induced cell death and protection with vitamin E in vitro. *Neuroreport*. **7**:360-364. (1995).
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. **134**:707-716 (1973).
- BROWN, S., BIRTWISTLE, J., ROE, L., THOMPSON, C. The unhealthy lifestyle of people with schizophrenia. *Psychol Med*. **29**, 697-700. (1999).

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **52**:302-309. (1978).
- CALABRESI, P.; DE MURTAS, M.; MERCURI, N. B. Chronic neuroleptic treatment : D-2 dopamine receptor supersensitivity and striatal glutamatergic transmission. *Ann. Neurol.* **31**:363-373. (1997).
- CASTELLI, W. P.; ANDERSON, K.; WILSON, P.W.; LEVY, D. Lipids and risk of coronary heart disease: the Framingham study. *Annals of Epidemiology.* **2**:23-28. (1992).
- CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine.* **31**:12:1524-1526. (2001).
- CHEN, Y. High fat diet induces severe hepatic fibrosis in inducible nitric oxide gene-knockout mice. *Hepatology.* **36**:1:336. (2003).
- CHOI, J., JANG, E., PARK, C., KANG, J. Enhanced susceptibility to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity in high-fat diet-induced obesity. *Free Radic Biol Med.* **38**, 806-816. (2005).
- COMARTY, J. E. and JANICAK, P. G. Depot neuroleptics. *Psychiatric Annals.* **17**:491-496; 1987.
- CREESE, I.; BURT, D.; SNYDER, S. H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science.* **192**:481-483. (1976).
- DICIONÁRIO DE ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS*: DEF 2002/03 – 31. ed. Rio de Janeiro: Ed. de publicações científicas 2002. 594p.
- DOBRIAN, A. D.; DAVIES, M. J.; SCHRIVER, S. D.; LAUTERIO, T. J.; PREWIT, R. L. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension.* **37**:554-560. (2001).
- FACHINETTO, R.; BURGER, M. E.; WAGNER, C.; WONDRACEL, D. C.; BRITO, V.; NOGUEIRA, C. W.; FERREIRA, J.; ROCHA, J. B. T. High fat increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* **81**:3:585-592. (2005).
- FANG, J.; MCKAY, G.; SONG, J.; REMILLRD, A.; LI, X.; MIDHA, K. In vitro characterization of the haloperidol using recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition.* **12**:1638-1643. (2001).

- FOLMER, W.; SOARES, J. C.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **34**:1279-1285. (2002).
- FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; GABRIEL, D.; ROCHA, J. B. T. A high fat-diet inhibits delta aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *Journal of Nutrition*. **133**:2165-2170. (2003).
- FORSMAN, A.; LARSSON, M. Metabolism of haloperidol. *Curr Ther Res*. **24**:567-568. (1978).
- Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. Nova York. 3. ed., 1999
- FREEDMAN, A. M.; MAK, I. T.; STAFFORD, R. E.; DICKENS, B. F.; CASSIDY, M. M.; MUESING, R. A.; WEGLICKI, W. B. Erythrocytes from magnesium-deficient hamsters display an enhanced susceptibility to oxidative stress. *The American Journal of Physiology*. **262**:1371-1375. (1999).
- FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*. **201**:875-880. (1978).
- GORROD, J. W.; FANG, J. On the metabolism of haloperidol. *Xenobiotica*. **23**:495-508. (1993).
- GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G. High fat diet, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiology of Aging*. **265**:542-545. (2005).
- HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hidroxil radicals in the presence of iron salts is a facsible source of hidroxil radicals in vivo. *Biochem. J*. **205**:462-472. (1982).
- HALLIWELL, B. Reactive oxigen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. **59**:1609-1623. (1992).
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radical and iron relation to biology and medicine: some problem and concepts. *Arch. Biochem. Biophys*. **246**:501-514, 1986.
- HALLIWELL, B. Reactive oxigen species in living systems: source, biochemistry, and role in human deseases. *The American Journal of Medicine*. **91**(suppl.3C):14-22. (1991).
- HANS. C.; SIALY, R.; BANSAL, D. D. Magnesium deficiency and diabetes mellitus. *Current Science*. **83**:12-19. (2002).



- HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**:298-300. (1956).
- HASHIMOTO, T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation: enzymology and molecular biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **804**:86-98. (1996).
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003. 16 de dezembro de 2004.
- JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine.* **9**:515-540. (1990).
- JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENGLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radical Biology and Medicine.* **40**:183-192. (2006).
- KALMIJN, S. Fatty acid intake and the risk of dementia and cognitive decline: a review of clinical and epidemiological studies. *J. Nutr. Health Aging.* **4**:202–207. (2000).
- KEENOY, B. M.; MOORKENS, G.; VERTOMMEN, J.; NOE, M.; NÉVE, J.; De LEEUW, I. Magnesium status and parameters of the oxidant-antioxidant balance in patients with chronic fatigue: Effects of supplementation with magnesium. *The Journal of American College of Nutrition.* **3**:19:374-382. (2000).
- KENASTON, C. B.; WILBUR, K. M.; OTTOLENGHI, A.; BERNHEIM, F. Comparison of methods for determining fatty acid oxidation produced by ultraviolet irradiation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **32**:33-35. (1955).
- KIDD, P. M. Glutathione: Systemic protectant against oxidative e free radical damage. *Alt. Med. Rev.* **2**:3:155-176. (1997).
- KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine.* **26**:463-471. (1999).
- KURATKO, C. N. Mitochondrial lipid preoxidation is influenced by dietary factors in early colon carcinogenesis. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **8**:696-701. (1997).
- LOPEZ-RIDAURA, R.; WILLET, W. C.; RIMM, E. B.; LIU, S.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; HU, F. B. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care.* **27**:134-140. (2004).

- MCCAN, D. J.; SU, T. P. Haloperidol competitively inhibits the binding of (+) [H-3]SKF-10, 047 to sigma sites. *European Journal of Pharmacology*. **180**:361-364. (1990).
- MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P.; BELKINA, L. M.; ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res. Cardiol*. **77**:465-485. (1982).
- MINAMIYAMA, Y.; TAKEMURA, S.; TOYOKUNI, S.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; HIROHASHI, K.; YOSHIKAWA, T.; OKADA, S. *Free Radical Biology & Medicine*. **37**:5:703-712. (2004).
- MITCHELL, I. J.; COOPER, A. C.; GRIFFITHS, M. R.; COOPER, A. J. Acute administration of haloperidol induces apoptosis of neurones in the striatum and substantia nigra in the rat. *Neuroscience*. **109**:1:89-99. (2002).
- MORGAN, K.; MAO, L.; FRENCH, S.; MORGAN, T. R. Fatty liver histologic features of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) develop in male mice fed a nutritionally complete high fat diet. *Hepatology*. **38**:1:501. (2003).
- MOSKOVITZ, J.; YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys*. **397**:354-359. (2002).
- NECHIFOR, M.; VAIDEANU, C.; PALAMARU, I.; BORZA C. The influence of haloperidol on erythrocyte magnesium and plasma electrolytes in schizophrenic patients. *European Neuropsychopharmacology*. **13**:4:284-285. (2003).
- NECHIFOR, M.; VAIDEANU, C; PALAMARU, I; BORZA, C; MINDRECI, I. The influence of some antipsychotics on erythrocyte magnesium and plasma magnesium, calcium, cooper and zinc in patients with paranoid schizophrenia. *Journal of The Americam College of Nutrition*. **23**:5:549S-551S. (2004).
- NELSON, D. L.; FOX, M. M. *Lehninger-Principles of Biochemistry*. Worth publishers 3. ed., 2000.
- Nutrient requirements of laboratory animals Subcommittee on laboratory animal nutrition. Committee on animal nutrition. Board on agriculture. National Research Council. *National Academy of Sciences*. 20-21. (1995).
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. **95**:351-358. (1979).
- PAOLISSO, G.; BARBAGALLO, M. Hypertension, diabetes mellitus and insulin resistance. The role of intracellular magnesium. *The American Journal of Hypertension*. **10**:346-355. (1997).

- POLYDORO, M.; SCHRÖDER, N.; LIMA, M. N. M.; CALDANA, F.; LARANJA, D. C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J.; MOREIRA, J. C. F.; DAL-PIZZOL, F. Haloperidol-and clozapine-induced oxidative stress in the rat brain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **78**:751-756. (2004).
- POST, A.; HOLSBOER, F.; BEHL, C. Induction of NF-kB activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: Suppression of NF-kB and neuroprotection by antioxidants. *The Journal of Neuroscience*. **18**:20:8236-8246. (1998).
- PRYOR, W. A. e SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite :a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. **268**:L699-L722. (1995).
- PUNTARULO, S.; CEDERBAUM, A. I.; Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radical Biology & Medicine*. **24**:1324-1330. (1998).
- RAYSSIGUIER, Y.; GUEUX, E.; BUSSIÉRE, L.; DURLACH, J.; MAZUR, A. Dietary magnesium affects susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *Journal of American College of Nutrition*. **12**:2:133-137. (1993).
- REINKE, A.; MARTINS, M. R.; LIMA, M. S.; MOREIRA, J. C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Haloperidol and clozapine, but not olanzepine, induces oxidative stress in rat brain. *Neuroscience Letters*. **372**:157-160. (2004).
- RESNICK, L. M. Ionic basis of hypertension, insulin resistance, vascular disease, and related disorders. The mechanism of "syndrome-X". *The American Journal of Hypertension*. **6**:123S-134S. (1993).
- ROSE, R.C. Solubility of properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. *Biochem. Biophys. Acta*. **924**:254-256. (1987).
- RÖSEN, P.; NAWROTH, P. P.; KING, G.; MÖLLER, W.; TRITSCHLER, H. J.; PACKER, L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, The American Diabetes Association and The German Diabetes Society. *Diabetes Metabolism Research and Review*. **17**:189-212. (2001).
- ROSOLOVA, A.; MAYER, O.; MAYER, O.; REAVEN, G. Effect of variation plasma magnesium concentration on resistance to insulin-mediated glucose disposal in non diabetic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **82**:11:3783-3785. (1997).

- SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; VIÑA, J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology and Medicine*. **35**:1:1-8. (2003).
- SHARMA, R. K.; LAKE, B. G.; MAKOWSKY, R.; BRADSHAW, T.; EARNSHAW, D.; DALE, J. W.; GIBSON, G. G. Differential induction of peroxisomal and microsomal fatty-acid-oxidising enzymes by peroxisome proliferators in rat liver and kidney. *European Journal of Biochemistry*. **189**:69-78. (1989).
- SIDWELL, C. G.; SALWIN, H.; BENCA, M.; MITCHELL, J. H. The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **31**:603-606. (1954).
- SINBANDHIT-TRICOT, S.; CILLARD, J.; CHEVANNE, M.; MOREL, I.; CILLARD, P.; SERGENT, O. Glutathione depletion increases nitric oxide-induced oxidative stress in primary rat hepatocyte cultures: involvement of low-molecular-weight iron. *Free Radical Biology & Medicine*. **34**:10:1283-1294. (2003).
- SHIVAKUMAR, B. R. RAVINDRANATH, V. Oxidative stress and thiol modification induced by chronic administration of haloperidol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*. **3**:1137-1141. (1993).
- SIMMONS, R. Developmental origins of diabetes: The role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. "in press". 2006.
- SOHAL, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine*. **33**:1:37-44. (2002).
- SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. **273**:59-63. (1996).
- SOUDEIJN, W.; VAN WIJNGAARDEN, I.; ALLEWIJN, F. Distribution, excretion and metabolism of neuroleptics of the butyrophenone type: part I. Excretion and metabolism of haloperidol and nine related butyrophenone-derivatives in the Wistar rat. *European Journal of Pharmacology*. **1**:47-57. (1967).
- SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.* **63**:381-389. (1988).
- STADTMAN, R. R. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*. **33**:5:597-604. (2002).
- STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* **6**:34:205-228. (1995).

- STORLIEN, L. H.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J.; PASCOE, W. S.; KHOURI, S. KRAEGEN, L. H. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and w-3 fatty acids on muscle phospholipid. *Diabetes*. **40**:280-289. (1991).
- TURRENS, J. F. Superoxide production by mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* **17**:3-8. (1997).
- TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**:421-421. (1980).
- VAIRETTI, M.; FELETTI, F.; BATTAGLIA, A.; PAMPARANA, F.; CANÔNICO, P. L.; RICHELMI, P.; BERTÉ, F. Haloperidol-induced changes in glutathione and energy metabolism: effect of nicergoline. *European Journal of Pharmacology*. **367**:67-72. (1999).
- VORMANN, J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. **24**:27-37. (2003).
- WAN, G.; OHNOMI, S.; KATO, N. Increased hepatic activity of inducible nitric oxide synthase in rats fed on a high-fat diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **64**:3:555-561. (2000).
- WARD, N. C., HODGSON, J. M., PUDDEY, I. B., MORI, T. A., BEILIN, L. J., CROFT, K. D. Oxidative stress in human hypertension: Association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radical Biology and Medicine*. **36**:2:226-232. (2004).
- WEINDRUCH, R., SOHAL, R. S. Caloric intake and aging. *The New England Journal of Medicine*. **337**:986-994. (1997).
- WILBUR, K. M.; BERNHEIM, F.; SHAPIRO, O. W.; The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. *Archives of Biochemistry and Biophysic*. **24**:305-313. (1949).
- WHITE, R. E. e COON, M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu. Rev. Biochem.* **49**:315-356. (1980).
- WYSOWSKI, D. K.; BAUM, C. Antipsychotic drug use in the United States 1976-1985. *Arch. Gen. Psychiatry*. **46**:929-932. (1998).

YOKOYAMA, H.; KASAI, N.; UEDA, Y.; NIWA, R.; KONAKA, R.; MORI, N.; TSUCHIHASHI.; MATSUE, T. OHYA-NISHIGUSHI.; KAMADA, H. In vivo analysis of hydrogen peroxide and lipid radicals in the striatum of rats under long-term administration of a neuroleptic. *Free Radical and Biology Medicine*. **26**:1056-1060. (1998).

ZHANG, X.; DONG, F.; REN, J.; DRISCOL, M.J.; CULVER. B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology*. **191**:2:318-325. (2005).