

ANA AUGUSTA VARRIANO

*O impacto da exposição perinatal ao Lítio  
sobre emocionalidade e depressão em ratos*

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação  
de Mestrado, apresentada à de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para  
obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da  
Farmacêutica Ana Augusta Varriano.*

*Campinas, 19 de julho de 2002.*

*Nancy Airoidi Teixeira*  
Profª. Dra. Nancy Airoidi Teixeira  
- Orientadora -

ANA AUGUSTA VARRIANO

*O impacto da exposição perinatal ao Lítio  
sobre emocionalidade e depressão em ratos*

*Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, UNICAMP, para obtenção do  
título de Mestre em Farmacologia*

*Orientadora: Profa. Dra. Nancy Airolði Teixeira*

*Campinas*

2002

UNIDADE Be  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
V436a  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 50657  
PROC 16.837102  
C \_\_\_\_\_ D<sup>x</sup> \_\_\_\_\_  
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 07/09/02  
Nº CPD \_\_\_\_\_

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

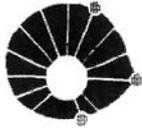
CM00172645-3

BIB ID 255 949

V436i Varriano, Ana Augusta  
O impacto da exposição perinatal do lítio sobre emocionalidade e  
depressão em ratos / Ana Augusta Varriano. Campinas, SP : [s.n.],  
2002.

Orientador : Nancy Airoidi Teixeira  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Comportamento. 2. Gravidez. 3. Lactação. 4. Teratogênese.  
5. Doenças Mentais. I. Nancy Airoidi Teixeira. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

Orientador:

Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

---

Membros:

1. Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

*Nancy Airoidi Teixeira*

2. Profa. Dra. Vilma Aparecida da Silva

*Vilma Aparecida da Silva*

3. Profa. Dra. Cláudia Regina Cavaglieri

*Cláudia Regina Cavaglieri*

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/07/2002

---

*“De tudo, ficarão três coisas: a certeza de que estamos sempre começando; a certeza de que precisamos continuar, a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Portanto, devemos fazer das interrupções um novo caminho; da queda, um passo da dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte; da procura, um encontro”.*

*Fernando Pessoa*

*À Deus;*

*Aos meus queridos pais, Sebastião  
e Neide, pelo amor, e eterno  
incentivo. Obrigado por serem  
exatamente como são;*

*Aos meus irmãos, Marcos, Márcia  
e Andressa, pelo companheirismo  
e apoio de todos os momentos.*

*Ao meu marido Wagner, por  
cada dia que passamos juntos; e  
Ana Clara, minha filha, cuja  
ternura trouxe conforto em  
momentos difíceis. Amo vocês.*

## *Agradecimentos*

*À minha orientadora Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira, meu especial agradecimento. Obrigada pela sua amizade sincera, colaboração e apoio, preciosos ensinamentos e experiências. Jamais vou esquecer.*

*Aos amigos do Laboratório de Psicofarmacologia e companheiros de jornada - Marcelo, Fernanda, Negão, Cris, Jaqueline, e meu irmão Marcos - pelo respeito, companheirismo e troca de experiências que me fizeram sentir a alegria de estar vivendo um pouco mais.*

*Ao Sr. Miguel Borges da Silva, pelo zelo, especial cuidado e amor com os animais do Biotério.*

*Aos secretários da Pós-Graduação - Wanderlei da Cunha Claro e Luiz Eduardo Odoni - pela paciência, respeito e agradável convivência.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.*

*Meras palavras jamais agradecerão aos animais pelo valioso auxílio; a eles ficam aqui minha eterna gratidão.*

*Ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, funcionários e professores, muito obrigado.*

*À minha família, cujo incentivo, confiança, paciência e amizade verdadeiras, deram-me forças para crescer nesta jornada e superar todos os momentos difíceis.*

## SUMÁRIO

*Lista de Abreviaturas*

*Lista de Figuras*

*Reagentes e Procedência*

*Resumo*

<i>1. Introdução.....</i>	<i>36</i>
<i>1.1 Lítio e transtorno afetivo bipolar.....</i>	<i>37</i>
<i>1.2 Transtorno afetivo bipolar e estresse pré-natal e no puerpério.....</i>	<i>39</i>
<i>1.3 Efeitos tóxicos do Lítio.....</i>	<i>41</i>
<i>1.4 Lítio e teratogênese estrutural.....</i>	<i>43</i>
<i>1.5 Lítio e teratogênese comportamental.....</i>	<i>45</i>
<i>2. Objetivo.....</i>	<i>48</i>
<i>3. Materiais e Métodos.....</i>	<i>50</i>

3.1	<i>Anímaís.....</i>	51
3.2	<i>Avaliações comportamentais nos ratos em idade adulta</i> <i>.....</i>	55
3.2.1	<i>Exploração e emocionalidade - Teste do campo</i> <i>Aberto.....</i>	55
3.2.2	<i>Ansiedade - Labirinto em cruz elevado.....</i>	57
3.2.3	<i>Depressão- Indução do desamparo Aprendizido.....</i>	58
3.2.4	<i>Aprendizagem - Esquiva ativa sinalizada.....</i>	62
3.2.5	<i>Aprendizagem e Memória - Esquiva passiva.....</i>	64
3.3	<i>Análise Estatística.....</i>	67
4.	<i>Resultados.....</i>	68
4.1	<i>Exploração e emocionalidade - Teste do campo</i> <i>Aberto.....</i>	69
4.2	<i>Ansiedade - Labirinto em cruz elevado.....</i>	69
4.3	<i>Depressão- Indução do desamparo aprendizido.....</i>	76

4.4	<i>Aprendizagem - Esquiva ativa sinalizada.....</i>	84
4.5	<i>Aprendizagem e Memória - Esquiva passiva.....</i>	84
5.	<i>Discussão.....</i>	87
6.	<i>Conclusão.....</i>	98
7.	<i>Abstract .....</i>	100
8.	<i>Referências Bibliográficas.....</i>	102

*Lista de Abreviaturas*

CORT.....	Corticosterona
E.....	Estressados
HPA.....	Hipotálamo-pituitário-adrenal
Li+.....	Lítio
NE.....	Não estressados
SNC.....	Sistema nervoso central

*Lista de Figuras*

<b>Figura 1:</b>	Organograma dos grupos experimentais.....	54
<b>Figura 2A:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de centro, no teste de campo aberto, dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	70
<b>Figura 2B:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de centro, no teste de campo aberto, dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .....	70
<b>Figura 3A:</b>	Efeitos sobre a determinação da ambulação, no teste de campo aberto, dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	71
<b>Figura 3B:</b>	Efeitos sobre a determinação da ambulação, no teste de campo aberto, dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .....	71
<b>Figura 4A:</b>	Efeitos sobre a determinação do levantamento, no teste de campo aberto, dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	72
<b>Figura 4B:</b>	Efeitos sobre a determinação do levantamento, no teste de campo aberto, dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .....	72
<b>Figura 5A:</b>	Efeitos sobre a determinação do nº de bolos fecais, no teste de campo aberto, dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	73
<b>Figura 5B:</b>	Efeitos sobre a determinação do nº de bolos fecais, no teste de campo aberto, dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .....	73

---

<b>Figura 6A:</b>	Efeito sobre a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao total, no teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	74
<b>Figura 6B:</b>	Efeito sobre a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao total, no teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .	74
<b>Figura 7A:</b>	Efeito sobre o número de entradas nos braços fechados, no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos <i>C-B x Sal</i> .....	75
<b>Figura 7B:</b>	Efeito sobre o número de entradas nos braços fechados, no teste do labirinto em cruz elevado dos grupos <i>Sal, LiPós, LiPré e Li</i> .....	75
<b>Figura 8:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido dos grupos <i>NE/C-B x E/C-B</i> .....	77
<b>Figura 9:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido dos grupos <i>NE/Sal x E/Sal</i> .....	78
<b>Figura 10A:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos <i>NE/C-B x NE/Sal</i> .....	80
<b>Figura 10B:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos <i>E/C-B x E/Sal</i> .....	80
<b>Figura 11A:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido do grupo <i>Sal</i> .....	81
<b>Figura 11B:</b>	Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido do grupo <i>LiPós</i> .....	81

**Figura 11C:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido do grupo *LiPré* ..... 81

**Figura 11D:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido do grupo *Li*..... 81

**Figura 12A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos *NE/Sal*, *NE/LiPós*, *NE/LiPré* e *NE/Li*..... 82

**Figura 12B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos *E/Sal*, *E/LiPós*, *E/LiPré* e *E/Li*..... 82

**Figura 13A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos *NE/Sal*, *NE/LiPós*, *NE/LiPré* e *NE/Li*..... 83

**Figura 13B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiava ativa não sinalizada dos grupos *E/Sal*, *E/LiPós*, *E/LiPré* e *E/Li*..... 83

**Figura 14A:** Efeitos sobre a determinação do número de esquivas no teste da esquiava ativa sinalizada dos grupos *C-B x Sal*..... 85

**Figura 14B:** Efeitos sobre determinação do tempo de latência de fuga no teste de esquiava ativa sinalizada dos grupos *C-B x Sal*..... 85

**Figura 15A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência na caixa branca no teste da esquiava passiva dos grupos *C-B x Sal*..... 86

**Figura 15B:** Efeitos sobre a determinação da porcentagem de aprendizagem no teste da esquiava passiva dos grupos *C-B x Sal*..... 86

*Reagentes e Procedência*

Cloreto de Lítio (LiCl)..... Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

Cloreto de Sódio (NaCl)..... Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

## *Resumo*

Sais de lítio ( $\text{Li}^+$ ) são freqüentemente usados na psiquiatria no tratamento da mania e na prevenção das crises recorrentes do transtorno bipolar. Recentes dados indicam que a descontinuidade do tratamento com  $\text{Li}^+$  resulta em alta taxa de relapso do transtorno bipolar durante a gravidez e período puerperal, portanto algumas pacientes são orientadas a não abandonar o tratamento. Neste trabalho investigamos o impacto da exposição perinatal ao cloreto de lítio ( $\text{LiCl}$ ), em doses equivalentes às profiláticas utilizadas na clínica, sobre a susceptibilidade à depressão comportamental e ansiedade nos descendentes de ratos em idade adulta.

Ratas Wistar foram tratadas com solução de  $\text{LiCl}$  10 mM ou  $\text{NaCl}$ , na mesma concentração, como única fonte de água de bebida durante toda a gravidez. Após o nascimento foi aplicada a adoção cruzada da metade das ninhadas, formando-se os seguintes grupos experimentais (N= 10 ninhadas/grupo): a) **Sal** -  $\text{NaCl}$  durante a gravidez e lactação; b) **LiPós** -  $\text{Li}^+$  somente durante a lactação; c) **LiPré** -  $\text{Li}^+$  somente durante a gravidez; d) **Li** -  $\text{Li}^+$  durante a gravidez e lactação. Somente as fêmeas em idade adulta, sendo sempre um animal de cada ninhada por grupo, foram submetidas aos testes do campo aberto, labirinto em cruz elevado e desamparo aprendido.

Os testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado não encontraram diferenças significativas na atividade exploratória e comportamento emocional entre os grupos. O

tratamento perinatal com  $\text{Li}^+$  também não alterou a latência de escape nos animais desamparados.

Os resultados encontrados sugerem que o tratamento perinatal com  $\text{Li}^+$  não alterou a intensidade de depressão comportamental ou ansiedade, induzida na idade adulta.

*Introdução*

### *1.1. Lítio e transtorno afetivo bipolar*

O Lítio ( $\text{Li}^+$ ) é a droga mais eficaz para o tratamento dos episódios de mania e, quando usado cronicamente, é indicado na prevenção de crises de depressão ou mania, em pacientes com transtorno afetivo bipolar (JANICAK & WATANABE, 1998).

O transtorno afetivo bipolar afeta cerca de 1% da população (ROBINS, et al., 1984). Caracteriza-se por dois ou mais episódios de alteração do humor consistindo, em algumas ocasiões, de uma elevação patológica do humor com aumento da energia e da atividade (mania ou hipomania) e em outras, de um rebaixamento patológico do humor com redução da energia e da atividade (depressão).

Também conhecido anteriormente como psicose maníaco-depressiva, este transtorno representa um sério problema de saúde pública, uma vez que seus sintomas chegam a causar sofrimento clinicamente significativo, além de prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo. O suicídio “completado” representa risco significativo, principalmente quando associado a episódios depressivos. Cerca de 25 a 50% dos pacientes com transtorno bipolar tentam o suicídio, pelo menos uma vez. As mulheres fazem tentativas de suicídio com uma frequência duas a três vezes maior que os homens.

O  $\text{Li}^+$  demonstra, em seu uso crônico, um alto potencial redutor sobre o risco de suicídio (BALDESSARINI, TONDO, HENNEN, 1999; BALDESSARINI et al., 2002; NIERENBERG, GRAY, GRANDIN, 2001, GOMEZ, 2001). Provavelmente, essa ação “anti-suicídio” está relacionada à sua propriedade serotoninérgica de antiagressividade,

e pode ser independente de sua eficácia em evitar a ocorrência de novos episódios da doença. Como a descontinuidade ao tratamento, principalmente abruptamente, causa morbidade precoce e comportamento suicida (SUPPES et al., 1991; FAEDDA et al., 1993), deve-se indicar por longo prazo, ou até mesmo indefinidamente, o tratamento destes pacientes com sais de  $\text{Li}^+$ , muitas vezes garantindo uma vida produtiva com relativamente poucos efeitos colaterais (ANANTH, DJENDEREDJIAN, KAUR, 1990).

No entanto, pequenos incrementos nos níveis séricos desta droga para além da faixa terapêutica podem desencadear efeitos tóxicos ascendentes, ou seja, de leves a graves. Por esta razão, as concentrações plasmáticas consideradas terapêuticas devem permanecer entre 0,4 a 1,2 mEq/L, sendo que níveis mais altos (1,2 mEq/L) são recomendados na fase maníaca aguda. Doses de manutenção e profiláticas devem ser mantidas entre 0,4 a 0,8 mEq/L, devendo ser ajustadas individualmente de modo a garantir eficácia com menor risco de efeitos colaterais (CÁLIL, 1997).

Embora os sais de  $\text{Li}^+$  continuem sendo o tratamento de escolha para o transtorno bipolar, nem todos os pacientes respondem bem ao tratamento e alguns não toleram seus efeitos colaterais. Outros agentes terapêuticos têm tomado importante posição como alternativa ou complemento ao tratamento. Entre eles, os anticonvulsivantes (tais como a carbamazepina, o valproato e divalproato de sódio, lamotrigina e gabapentina) e os antipsicóticos (haloperidol, risperidona e olanzapina). Quaisquer desses agentes descritos podem ser associados ao  $\text{Li}^+$ , freqüentemente permitindo doses menores e mais bem toleradas. Existe também base científica de que a terapia combinada aumente as

possibilidades de tratamento para os pacientes refratários à monoterapia com  $\text{Li}^+$  (BEERS & BERKOW, 2000; STAHL, 2000).

## *1.2. Transtorno afetivo bipolar e estresse pré-natal e no puerpério*

A gravidez e o parto são eventos estressantes que podem por si só contribuir para o surgimento ou recorrência de desordens afetivas. São períodos de grandes transformações na mulher, não somente fisiológicas, mas também em seu psiquismo e em seu papel sócio-familiar. Quando acompanhados por outros eventos adversos, o risco é maior. Fatores sociais - como relacionamento conjugal pobre, situação econômica precária e falta de suporte familiar - aumentam o risco (KENDELL, CHALMERS, PLATZ, 1987; DA-SILVA et al, 1998). Do mesmo modo, mulheres com transtornos psiquiátricos provavelmente experimentam estresse psicológico adicional, devido à preocupação sobre recorrência, especialmente se a medicação for descontinuada para proteger o feto dos possíveis efeitos tóxicos associados com a exposição à medicação. Dados recentes sugerem risco de recorrência em cerca de 50% das pacientes bipolares grávidas, após seis meses de retirada do  $\text{Li}^+$  (VIGUERA & COHEN, 1998; VIGUERA et al, 2000).

Particularmente, o período puerperal é reconhecido como um momento crítico e de alto risco emocional; por isso, as chances da mulher adoecer emocionalmente nessa fase de sua vida são maiores do que em outras épocas. Mulheres com transtorno bipolar têm

maior risco de admissão psiquiátrica no puerpério do que aquelas com história de esquizofrenia ou depressão. Estimativas do risco de recorrência durante o pós-parto nas pacientes bipolares variam de 20 a 70% (KENDELL et al, 1987; DEAN, WILLIAMS, BROCKINGTON, 1989; BROCKINGTON, OATES, ROSE, 1990; GOODNICK et al., 2000; VIGUERA et al, 2000). Os transtornos psíquicos em fase puerperal são responsáveis pela redução na qualidade do relacionamento mãe-filho e pela facilitação de situações de negligência, abuso e maus-tratos em crianças.

Os episódios maníacos e depressivos durante a gravidez e período puerperal podem trazer profundas marcas no comportamento e desenvolvimento dos seus descendentes, fazendo crescer o número de pessoas com prejuízos evidentes do estado cognitivo-afetivo, dificuldades de relacionamento interpessoal e até mesmo condutas anti-sociais ou atos de delinquência (COGILL et al., 1986; COHN & TRONICK, 1989; ZUCKERMAN et al, 1990). Desta forma, o  $\text{Li}^+$  pode ser indicado na profilaxia para pacientes bipolares na gravidez e no puerpério, por ser bastante efetivo na prevenção de episódios recorrentes e redução da morbidade materna.

Entretanto, certas drogas quando administradas às mães durante o período gestacional e pós-natal podem influenciar a formação comportamental dos seus descendentes. Pouco é conhecido sobre a possibilidade do  $\text{Li}^+$  causar anormalidades comportamentais a longo prazo em crianças de mães que se beneficiaram desta terapia durante a gravidez e puerpério; e este assunto requer mais estudos para elucidar se os riscos ao feto, decorrentes da administração de  $\text{Li}^+$ , sobrepor-se-iam ao risco da doença não tratada.

### *1.3. Efeitos tóxicos do Lítio<sup>+</sup> durante a gravidez e lactação*

Desde que o transtorno afetivo bipolar ocorre predominantemente em mulheres em seus anos reprodutivos e agrava-se com a idade (LLEWELLYN, STOWE, STRADER, 1998; IQBAL et al., 2001), a decisão de prescrever sais de Li<sup>+</sup> a estas pacientes deve levar em consideração a possibilidade de ocorrência de gravidez durante a vigência do tratamento.

Li<sup>+</sup> cruza a placenta estando presente no feto em concentração equivalente aquela encontrada no sangue materno (WEINSTEIN & GOLDFIELD, 1969; SCHOU & AMDISEN, 1975; THORNBURG, BINDER, FABER, 1979) e passa da circulação materna para o leite em cerca de 10 a 50% das concentrações séricas (WEINSTEIN & GOLDFIELD, 1969; SCHOU & AMDISEN, 1973; 1975); portanto, existe a possibilidade desta droga afetar adversamente o feto ou lactente. Uma alternativa para evitar os efeitos negativos sobre a gestação seria suspender sua administração assim que a paciente confirmasse a gravidez. Entretanto, a interrupção principalmente quando abruptamente, pode expor a paciente a futuros episódios maníaco-depressivos, cujas conseqüências negativas poderiam exceder os riscos envolvidos para os descendentes. Portanto, pacientes grávidas muitas vezes são orientadas a continuar o tratamento.

As alterações fisiológicas da gravidez interferem nos níveis séricos de Li<sup>+</sup>, que não sendo freqüentemente monitorados, podem expor a gestante ao risco de intoxicação ou ineficácia do tratamento. Por exemplo, o *clearance* renal do Li<sup>+</sup> aumenta durante a

gravidez, quando podem ser necessárias doses mais altas no final da gestação. Estes níveis se revertem imediatamente após o parto podendo atingir níveis tóxicos (LINDEN & RICH, 1983). Dietas hipossódicas e uso de natriuréticos pela paciente também podem contribuir para a intoxicação materna e neonatal, pois diminuem o *clearance* renal. O uso de  $\text{Li}^+$  na gestação foi associado ao bócio neonatal, hipotonia, letargia e cianose, efeitos estes reversíveis após a suspensão do  $\text{Li}^+$ . Do mesmo modo, crianças amamentadas por mães recebendo sais de  $\text{Li}^+$  podem não apresentar efeito aparente ou exibir os mesmos sinais tóxicos descritos em recém-nascidos.

Embora SCHOU & WEINSTEIN (1980) relataram que a medicação não venha ser contra-indicação ao aleitamento materno (alegando que a criança já foi exposta a concentrações maiores de  $\text{Li}^+$  na vida uterina, além dos benefícios imunológicos, nutricionais e emocionais que o leite materno proporciona), a maioria dos autores recomenda que mães recebendo  $\text{Li}^+$  não devam amamentar (ROBINSON & STEWART, 1986; BEERS & BERKOW, 2000; ERNST & GOLDBERG, 2002).

Os sinais da intoxicação pré-natal e pós-natal aos sais de  $\text{Li}^+$  são reversíveis com a suspensão da droga. No entanto, existe a possibilidade do  $\text{Li}^+$  causar alterações morfológicas ou estar implicado em permanentes dificuldades comportamentais e cognitivas em seus descendentes em idade adulta.

#### *1.4. Lítio<sup>+</sup> e teratogênese estrutural*

Certas drogas podem causar danos estruturais ao embrião quando administradas às mães em doses terapêuticas; a capacidade do recém nascido de metabolizar ou excretar uma droga é menor que no organismo adulto, levando à persistência de níveis farmacologicamente significativos durante largos períodos após o parto (KRUGER, BRAUNIG, YOUNG, 1996).

A maioria das drogas suspeitas de serem teratogênicas no homem são teratógenos menores, isto é, aumentam a frequência de anormalidades congênitas em duas a três vezes (LEWIS, 1985; ALTSHULER, 1997). Entretanto, a teratogeneicidade de uma droga no homem é difícil de ser estabelecida com segurança. Muito se sabe de teratógenos em animais; porém, há uma margem de diferença quanto à susceptibilidade a estas drogas entre as espécies e em diferentes linhagens da mesma espécie. Diferenças enzimáticas determinadas geneticamente, marcando diferenças nas rotas de biotransformação de uma mesma droga, parecem ser os maiores determinantes da teratogeneicidade para um indivíduo, porém não para outro. Os animais também apresentam diferenças na permeabilidade placentária, diferindo quanto à velocidade e alcance de drogas no feto. Nos animais e no homem a etapa da gravidez em que ocorre a exposição também determina o modelo de deformação produzido (LEWIS, 1985).

A possibilidade da terapia com  $\text{Li}^+$  causar malformações congênitas no homem tem sido investigada desde a década de setenta, a partir de estudos de registros médicos de crianças cujas mães receberam  $\text{Li}^+$  durante pelo menos o primeiro trimestre de gestação

(*International Register of Lithium Babies*). Estes estudos revelaram um risco substancial de malformações cardiovasculares, particularmente *anomalia de Ebstein* (SCHOU et al., 1973; NORA, NORA, TOEWS, 1974; WEINSTEIN, 1976). Porém, apresentaram falhas quanto a coleta de dados, não levando em consideração fatores genéticos, possível interação com outras drogas, a idade da paciente, ou complicações ocorridas durante a gravidez que poderiam estar relacionadas às malformações encontradas, superestimando assim os resultados. Estudos epidemiológicos mais recentes indicam que o risco teratogênico do  $\text{Li}^+$  durante o primeiro trimestre de gravidez é mais baixo do que previamente sugerido (KALLEN & TANDBERG, 1983; KALLEN, 1988; SIPEK, 1989; EDMONDS & OAKLEY, 1990; ZALSTEIN et al., 1990; JACOBSON et al., 1992).

Vários estudos experimentais foram realizados ainda para investigar o potencial teratogênico do  $\text{Li}^+$  (WEINSTEIN & GOLDFIELD, 1975; JOHNSON, 1991; WEINER, 1991). Nestas condições, a toxicidade do  $\text{Li}^+$  como morte embrionária ou anormalidades fetais foram demonstradas. No entanto, nenhum destes estudos sugeriu que o  $\text{Li}^+$  tenha provavelmente um alto potencial teratogênico em humanos em doses terapêuticas, uma vez que os efeitos adversos encontrados ocorreram somente com doses de  $\text{Li}^+$  bem acima das usadas clinicamente. Mesmo em altas doses, em nenhum momento foram observadas anormalidades cardiovasculares, características da possível exposição pré-natal do  $\text{Li}^+$  em humanos.

Considerando que estudos epidemiológicos mais recentes (KALLEN & TANDBERG, 1983; KALLEN, 1988; SIPEK, 1989; EDMONDS & OAKLEY, 1990; ZALSTEIN et al., 1990; JACOBSON et al., 1992) indicam que a maioria das mulheres

grávidas tratadas com  $\text{Li}^+$  tem crianças normais e que altas taxas de recidiva do transtorno afetivo bipolar durante a gravidez e período puerperal estão relacionadas à descontinuidade do tratamento, muitas vezes estas pacientes são aconselhadas a continuar o tratamento durante o período gestacional. Porém, a decisão de prescrever sais de  $\text{Li}^+$  nestas situações ainda representa um grande desafio para a área médica e apontam para a necessidade de continuar os estudos que visam elucidar seus efeitos sobre o neurodesenvolvimento.

### *1.5. Lítio e teratogênese comportamental*

Certas drogas quando administradas durante o período gestacional podem influenciar o comportamento das gerações descendentes, independente da produção de alterações morfológicas (VORHEES, BRUNNER, BUTCHER, 1979). Existe a possibilidade de que o  $\text{Li}^+$  poderia estar incluído neste grupo.

A teratogênese comportamental é um tema difícil de se investigar; variações no tempo de exposição à droga durante a gravidez, dose utilizada, via de administração e tipos de testes comportamentais empregados, contribuem para dificultar a interpretação dos resultados (LEWIS, 1985).

A base bioquímica da teratogênese comportamental é bastante direta; interferência com a síntese e liberação dos neurotransmissores e sobre a organização das conexões interneuronais dentro do SNC (LEWIS, 1985). No homem, o desenvolvimento do cérebro compreende toda a gravidez e o começo da vida neonatal (DOBBING & SANDS, 1979;

RODIER, 1980; LEWIS, 1985); portanto, sua vulnerabilidade a estas drogas deve estar estendida do mesmo modo.

Alguns estudos têm fornecido evidências de que o  $\text{Li}^+$  possa ser um teratôgeno comportamental, mesmo nas doses consideradas terapêuticas. SECHZER et al. (1986) demonstraram que a exposição de ratas ao  $\text{Li}^+$  antes, durante a gestação e durante a lactação, reduziu o peso ao nascer e alterou a percepção dos descendentes. A neurotoxicidade ligada ao desenvolvimento dos sais de  $\text{Li}^+$  foi também determinada em camundongos amamentados por mães que ingeriram  $\text{LiCl}$  (1 mEq) durante a gravidez e lactação, e a toxicidade observada mostrou ser dependente do tempo de exposição ao  $\text{Li}^+$  e com a variável sexo (sendo particularmente evidentes nas fêmeas em desenvolvimento).

GLOCKNER, SCHWARZ, JAHNE (1993) observaram um aumento da sensibilidade ao estresse de descendentes de ratas fêmeas de linhagens resistentes ao estresse (*Uje:WIST*), tratadas com  $\text{Li}^+$  no período pré-natal, na concentração de 20 mM na água de beber (resultando em níveis séricos equivalentes a 1mmol  $\text{Li}^+/\text{L}$ ). Este efeito somente ocorreu quando estes animais eram expostos a exposição intensa ao estresse (estresse de confinamento durante as duas últimas semanas de gestação), não ocorrendo no grupo não estressado. Mudanças similares induzidas pelo estresse (aumento do tempo gestacional e diminuição da massa corpórea dos recém-nascidos) somente foram observadas no grupo não tratado se a exposição ao estresse de confinamento fosse estendida por mais quatro semanas antes do cruzamento (GLOCKNER & KARGE, 1991).

Em nosso laboratório (TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a) observamos que o tratamento crônico das ratas com  $\text{Li}^+$  (10 mM, na água de beber) no período pré e pós-natal

reduziu a data de abertura do olho e o ganho de peso na prole, quando comparado com a prole estressada por restrição de água. O primeiro efeito não dependeu do tempo de tratamento; o segundo apareceu somente como resultado do tratamento pós-natal (isto é, nos grupos *Li* e *LiPós*), mostrando haver interação  $Li^+$ - estresse agravando o atraso no desenvolvimento produzido pelo estresse. Em outro estudo (GUILHERME, VARRIANO, TEIXEIRA, 2001) observamos um déficit de aprendizagem em tarefa de esQUIVA passiva e prejuízo na evolução ponderal, para os descendentes de mãe tratadas com  $Li^+$  durante a gravidez e lactação.

Neste experimento também optamos por fornecer  $Li^+$  na concentração de 10 mM, na água de beber, durante o período pré-natal e pós-natal, para reduzir a variação do nível sérico de  $Li^+$  e, até certo ponto, do nível de estresse para os animais. TEIXEIRA et al. (1995a), através da dosagem de  $Li^+$  nas mães, verificaram que este procedimento foi capaz de fornecer níveis séricos em torno de 0,5 mEq/L, portanto dentro da faixa profilática usada na clínica (0,4 a 0,8 mEq/L). A escolha desta dose é importante, visto que a probabilidade da mulher engravidar durante a terapia crônica é maior do que durante o tratamento agudo. Investigamos se o  $Li^+$ , quando administrado no período pré e pós-natal, provocou comportamentos anormais nas gerações descendentes em idade adulta que indicariam maior susceptibilidade à depressão comportamental e ansiedade.

---

*Objetivo*

*Objetivo*

Este trabalho investigou o impacto da exposição perinatal ao cloreto de lítio (LiCl), em dose equivalente à profilática utilizada na clínica, sobre a reatividade emocional e a susceptibilidade à depressão comportamental e ansiedade, nos descendentes em idade adulta.

Utilizamos os modelos do campo aberto, labirinto em cruz elevado e desamparo aprendido.

*Materiais e Métodos*

O procedimento experimental está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo recebido aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-IB-UNICAMP).

### *3.1. Animais*

Foram utilizadas ratas nulíparas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) em idade adulta (cerca de 3 meses), pesando aproximadamente 200 gramas, fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP.

As fêmeas foram isoladas em gaiolas individuais no Biotério do Laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia. Foram mantidos ciclos de 12 h/claro e 12 h/escuro e os animais tiveram acesso à ração e água *ad libitum*, sob temperatura ambiente de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após três dias de adaptação, as fêmeas foram cruzadas com adultos machos de mesma espécie e idade, na proporção de 1:1, durante três dias. Após este período, as fêmeas foram separadas dos machos e randomicamente divididas em dois primeiros grupos; o primeiro foi tratado com solução de LiCl 10 mM (grupo *Li*), como única fonte de água de bebida, durante toda a prenhez e lactação (proporcionando níveis de  $\text{Li}^+$  equivalentes aqueles usados profilaticamente na clínica); o segundo recebeu nas mesmas condições solução de NaCl 10mM, servindo como controle (grupo *Sal*).

Após o nascimento, a prole foi contada e examinada com relação às malformações externas. As ninhadas foram reduzidas a oito filhotes, sempre quatro machos e quatro fêmeas, a fim de providenciar uma composição padrão para todas as ninhadas. Também no primeiro dia de vida pós-natal, procedeu-se a adoção-cruzada em metade das ninhadas dos dois primeiros grupos iniciais; ou seja, metade das ninhadas do grupo *Sal* foi adotada por mães do grupo *Li*, e vice-versa. Assim, em nenhum momento trocamos as soluções das mães. Após a adoção cruzada, seguiu-se o tratamento até o desmame (22 dias após o nascimento). Formaram-se os seguintes grupos experimentais (*figura 1*): a) 10 ninhadas tratadas com NaCl 10 mM durante a gestação e lactação, e que serviram como controle do tratamento (grupo *Sal*); b) 10 ninhadas tratadas com NaCl 10 mM durante a gestação e que receberam  $\text{Li}^+$  durante a lactação (grupo *LiPós*); c) 10 ninhadas tratadas com  $\text{Li}^+$  durante a gestação e que receberam NaCl 10 mM durante a lactação (grupo *LiPrê*); d) 10 ninhadas tratadas com  $\text{Li}^+$  durante a gestação e lactação (grupo *Li*).

Para um controle da possível interferência do estresse imposto pela forma de administração das soluções (solução salina, na concentração de 10mM, como única fonte de líquido) sobre o desenvolvimento neurocomportamental e cognitivo dos descendentes em idade adulta, acrescentamos um grupo de animais nascidos de fêmeas que receberam água *ad libitum* durante a gravidez e lactação (grupo controle branco – *C-B*). Este grupo foi fornecido diretamente pelo Biotério Central da UNICAMP, e foi comparado ao grupo *Sal*.

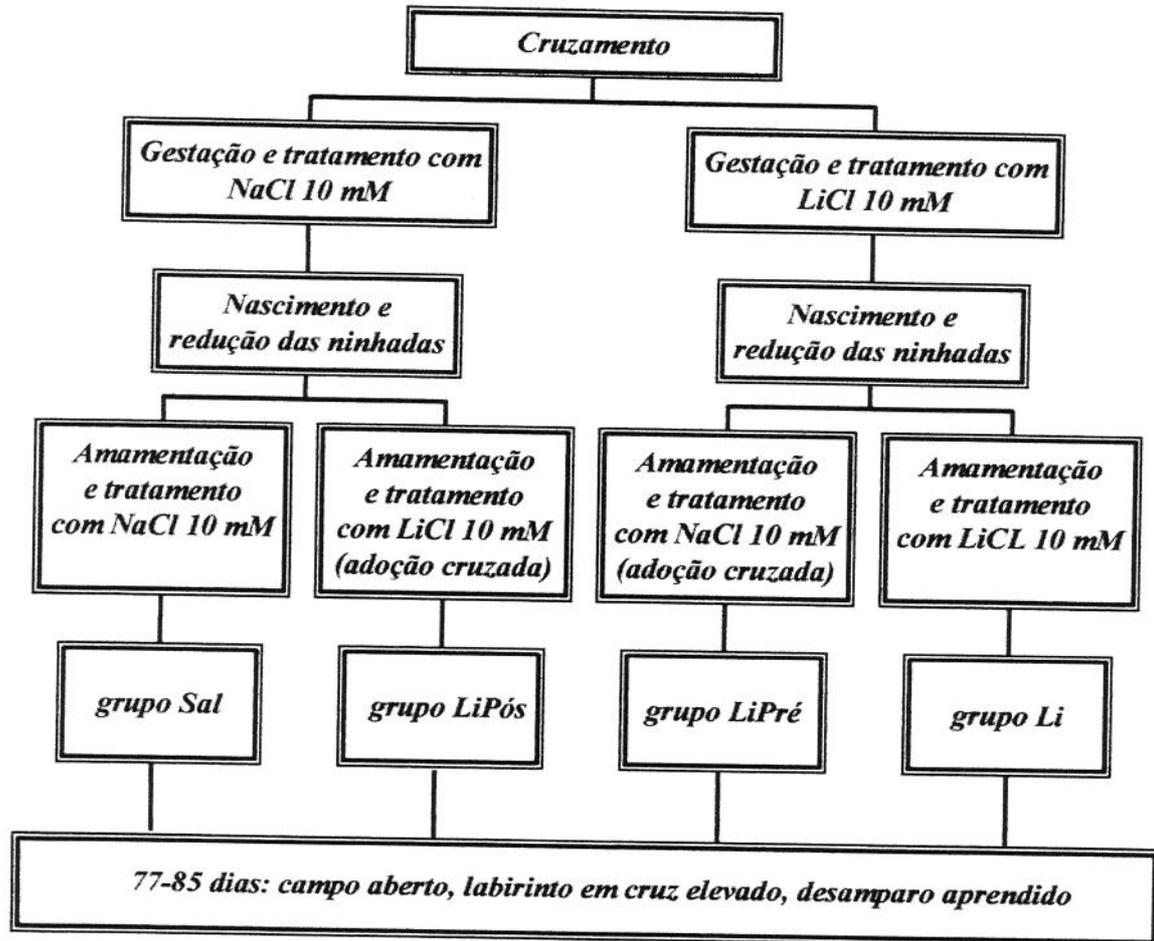
As avaliações dos descendentes em idade adulta (77-85 dias), quanto às características exploratórias e susceptibilidade à depressão comportamental e ansiedade, foram realizadas com todos os grupos de animais. Foram utilizados os testes de campo

aberto, labirinto em cruz elevado e desamparo aprendido. Os animais foram isolados em gaiolas de polipropileno por três dias antes de serem testados. Os testes foram realizados no período da tarde. A fim de prevenir os efeitos da ninhada (ABBEY & HOWARD, 1973), foi sorteado apenas um filhote fêmea por ninhada, para os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Para o teste de indução do desamparo aprendido, duas fêmeas de cada ninhada na idade adulta foram sorteadas.

Somente as fêmeas foram reservadas para os testes em estudo, uma vez que: *a)* o estresse pré-natal aumenta a susceptibilidade de ratas fêmeas à depressão comportamental (ALONSO, NAVARRO, RODRIGUES, 1994); *b)* ansiedade e depressão são mais comuns em mulheres do que homens (MARI & JORGE, 1997); *c)* os efeitos do Li<sup>+</sup>sobre o desenvolvimento são mais pronunciados em ratas fêmeas (MESSIHA, 1993). Uma vez que o ciclo estral não modifica a depressão comportamental (ALONSO et al, 1991), a sua determinação foi omitida para evitar manipulações experimentais que pudessem afetar o comportamento dos animais.

Para verificarmos se a forma de administração (solução salina 10 mM) é estressante aos animais, além dos testes comportamentais aplicados aos grupos tratados (campo aberto, labirinto-em-cruz elevado e desamparo aprendido) acrescentamos mais dois testes onde analisamos possíveis alterações da solução salina sobre a aprendizagem e memória (esquiva passiva e esquiva ativa sinalizada). Este procedimento permitiu verificar se as alterações observadas são similares àquelas apresentadas em roedores nascidos de mães submetidas a várias formas de estresse, permitindo-nos concluir se a solução salina dada cronicamente à mãe seria estressante à mãe e seus descendentes.

Figura 1: Organograma dos Grupos Experimentais:



*grupo C-B: campo aberto, labirinto em cruz elevado, desamparo aprendido, esquiava ativa sinalizada e esquiava passiva*

### *3.2. Avaliações comportamentais nos ratos em idade adulta*

#### *3.2.1. Exploração e emocionalidade - Teste do campo aberto*

O teste do campo aberto (*open-field test*) consiste no modelo animal mais simples para teste de ansiedade e medo, e caracteriza-se por expor ratos ou camundongos em um novo ambiente (arena), onde são analisadas medidas de exploração (locomoção, *sniffing*, levantamento) e indicadores de medo (*freezing*, defecação, *grooming*, urinação). Neste ambiente confrontam-se dois padrões de respostas ambíguas que caracterizam a atividade exploratória: impulsividade - necessidade de familiarizar-se com o território estranho, e ansiedade - desejo de escapar do desconhecido e imprevisível.

#### Equipamento:

O teste de campo aberto foi efetuado conforme descrito por MEISEL, DOHANICH, WARD (1979). O aparelho de campo aberto consiste de um círculo de madeira de 85 cm de diâmetro, totalmente cercado de um parapeito também de madeira, com altura de 32 cm. O aparelho todo é pintado na cor bege. Há no fundo desta arena, desenhado em linhas negras, 3 círculos concêntricos interceptados por 9 segmentos de retas radiais, ficando portanto o chão do aparelho subdividido em 19 regiões de áreas

iguais. Circundando este sistema, há uma estrutura metálica a uma altura de 110 cm do piso de aparelho. Este sistema suporta duas lâmpadas de 110 watts cada e um cortinado de tule circular, de forma que o observador não possa ser visto pelo animal, no interior do campo aberto. Ao lado do aparelho é colocado um circulador de ar com o intuito de produzir um ruído de fundo constante (abafador de ruídos externos à sala de teste), manter a temperatura da sala onde está o aparelho e distribuir homogeneamente qualquer odor exalado no local.

Procedimento Experimental:

O teste de campo aberto consistiu na exposição individual do animal à arena por 3 minutos e iniciou-se com a colocação do sujeito experimental no centro da arena, com as luzes acesas e o circulador de ar ligado. O cortinado de tule foi então fechado e registraram-se o número de espaços invadidos com as quatro patas (ambulação) e a movimentação vertical (levantamento), avaliada pelo número de vezes que o animal apoiou-se apenas nas patas traseiras. Registraram-se também o tempo que o animal demora a deixar o centro da arena (tempo de centro) e o número de bolos fecais emitidos até o final da sessão.

No intervalo entre o teste de cada animal, a arena foi completamente limpa com gaze e álcool a 70° GL, a fim de evitar que qualquer pista odorífera pudesse interferir no comportamento do animal a ser testado posteriormente.

### *3.2.2. Ansiedade - Labirinto em cruz elevado*

O labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*) tem sido validado para a quantificação do comportamento de ansiedade animal, permitindo a detecção de respostas emocionais a substâncias ansiogênicas e ansiolíticas (PELLOW et al., 1985; HOGG, 1996), e a estímulos estressantes externos (HEINRICHS et al., 1992; LIEBSCH et al., 1995). Tem sido usado também como um estressor emocional suave, uma vez que o animal é exposto a um novo ambiente. O teste é baseado na criação de um conflito entre o desejo exploratório do animal e seu medo inato de áreas expostas e abertas.

#### Equipamento:

O labirinto em cruz elevado foi construído de acordo com as especificações reportadas por PELLOW et al (1985) e consiste de um equipamento elevado a 50 cm do solo, composto por dois braços abertos (50 x 10 cm) dispostos perpendicularmente a dois braços fechados por paredes laterais desprovidos de teto (50 x 10 x 40 cm) formando um ângulo de 90 graus. Cada animal é submetido a apenas uma sessão experimental no labirinto.

Procedimento Experimental:

Os animais foram colocados no centro aberto do labirinto (10 x 10 cm) com a cabeça direcionada para um dos braços fechados. O tempo de duração do teste era de 5 minutos. Registrou-se o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados e o tempo de permanência nos braços abertos.

Os índices de ansiedade foram determinados através da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos/total e do número de entradas nos braços abertos/total, enquanto que o número de entradas nos braços fechados refletiu a atividade geral do animal (CRUZ, FREI, GRAEFF, 1994).

No intervalo entre o teste de cada animal, o labirinto foi completamente limpo com álcool a 70° GL para retirar possíveis odores emitidos pelo animal anterior. O equipamento foi mantido no interior de uma sala iluminada artificialmente por luz branca e apresentando ruído de fundo (ar condicionado ligado).

*3.2.3. Depressão - Indução do desamparo aprendido*

Os modelos animais de depressão são freqüentemente utilizados pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de drogas antidepressivas. No entanto, nas últimas três décadas, uma porcentagem importante dos modelos animais tem sido utilizada em laboratórios, simulando a depressão experimentalmente para investigação da sua

fisiopatologia. As características comuns destes modelos são que os testes ou drogas utilizados induzem no animal sintomatologia semelhante à depressão, e que as anormalidades comportamentais apresentadas são revertidas por drogas antidepressivas (WILLNER, 1990).

O modelo do desamparo aprendido, originalmente descrito por SELIGMAN e colaboradores (OVERMEIER & SELIGMAN, 1967; SELIGMAN & MAIER, 1967), consiste no modelo de depressão mais utilizado rotineiramente em indústrias farmacêuticas para o *screening* de drogas antidepressivas. Este modelo tem revelado que a variável “controlabilidade” exerce importante efeito modulatório sobre as respostas comportamentais e fisiológicas do organismo produzidas por estímulos aversivos. Por exemplo, quando ratos e outros animais são apresentados frente a um estressor controlável, eles rapidamente aprendem que é possível escapar ou esquivar-se do agente agressor. Porém, se lhes é apresentado previamente um estímulo aversivo incontrolável, exibirão um déficit de resposta de escape quando expostos posteriormente a um estímulo controlável (SELIGMAN & MAIER, 1967, WILLNER, 1990). Este déficit é referido como “efeito do desamparo aprendido”.

Os animais desamparados apresentam alguns déficits que lembram sintomas dos distúrbios depressivos em seres humanos, resultantes da exposição ao regime incontrolável: *motivacional* - visto pela redução da motivação do organismo em persistir nas tentativas de fuga; *cognitivo* - demonstrado pela dificuldade de reconhecer a possibilidade de controle

sobre o ambiente e, *emocional* - caracterizado por fenômenos com alterações fisiológicas como perda de peso e formação de úlceras gástricas.

Equipamentos: caixa de choques inescapáveis e caixa de teste de fuga.

Os choques inescapáveis foram ministrados em uma caixa de 25x19,5x19,5 cm, tendo a parede frontal de acrílico transparente e as restantes de alumínio, com tampa ao teto. O piso desta é composto de barras de cobre de 0,3 cm de diâmetro distando 1,2 cm entre si, através das quais os choques elétricos foram ministrados, com mecanismo “*scrambler*” (embaralhamento), por meio do gerador de choques de 1 via não programável, marca *ALBARSCH*.

Utilizou-se do programa controlador de choques descrito por HERMINI et al. (1994) para a execução automática dos choques. O programa está gravado em disquete e é acessado através do microcomputador XT 2002 da *Microtec*, que por sua vez está acoplado ao gerador de choques (*ALBARSCH*). O programa foi baseado na latência média de 199 animais sem nenhum tratamento que tinham a possibilidade de fuga na caixa de alternância. A duração dos choques é, portanto, variável de 0,58 para 18,18 segundos e o intervalo entre os choques, randômico, variando entre 5 e 25 segundos.

A *shuttle box* utilizada no teste de fuga corresponde a uma caixa de 50 x 25 x 30 cm em alumínio, com tampa e parede frontal de acrílico transparente, modelo “vai-e-vem”. O piso é composto por barras de cobre de 0,3 cm de diâmetro, distando 1 cm entre si, através

das quais os choques elétricos são ministrados, com mecanismo “*scrambler*” por meio de um gerador de choques programável (*ALBARSCH*).

A caixa é dividida em dois compartimentos iguais separados por uma placa de alumínio, onde há um orifício de 7,5 cm de altura, por 6,0 cm de largura, localizado no centro à 8 cm acima do piso em barras, permitindo a locomoção do animal de um compartimento ao outro da caixa. Cada compartimento possui duas fotocélulas, distando 6 cm entre si, as quais são sensíveis (por interrupção do feixe de luz) ao movimento do animal entre os compartimentos; assim, registrando sua presença no compartimento em que se localizar, num dado momento do teste. É necessária a travessia de um compartimento interno para outro para ser registrada uma resposta. Foi definida como resposta de fuga a travessia do animal de um compartimento para o outro durante a apresentação do choque. Essa resposta de fuga tem como consequência a interrupção do choque.

O tempo máximo de duração por choque é de 30 segundos, sendo que, se o animal não cruzar os compartimentos o choque continuará. O cronômetro, uma vez alcançado o valor de 30 segundos, volta ao zero e inicia um novo ciclo. Toda vez que o animal atravessar para o outro lado, o choque irá cessar registrando sua latência. O intervalo entre o cruzamento do animal e o início do próximo choque é em torno de 5 a 25 segundos.

Procedimento Experimental:

No modelo do desamparo aprendido, os animais foram inicialmente confinados na caixa de choques e separados em dois subgrupos:

*Estressados (E):* Um rato por sessão foi colocado na caixa de choques. Após um minuto de adaptação, os animais foram expostos a 60 choques de 1,0 mA (sessão de treino). O tempo de duração da sessão foi de 20 minutos e os animais viam-se impossibilitados de escapar destes choques (grupo inescapável);

*Não estressados (NE):* animais que permaneceram apenas confinados na caixa de choques.

Após 24 horas da sessão de treino, todos os animais foram submetidos a uma sessão de teste de fuga em uma caixa de alternância. Após 3 minutos de adaptação, foram expostos a 30 choques de 1,0 mA, sendo a duração de cada choque variável de acordo com a permanência do animal em cada compartimento. A latência foi registrada em 6 blocos de tentativas. O tempo médio desta sessão foi de 14 minutos.

*3.2.5. Aprendizagem - Teste da esquiava ativa sinalizada*

O teste da esquiava ativa sinalizada consiste em uma situação experimental na qual um animal emite uma resposta instrumental em resposta a um estímulo condicionado. Nesta condição o estímulo condicionado (som de uma campainha) é apresentado antes do

estímulo não condicionado (choque nas patas), gerando uma resposta condicionada (*esquiva*) durante a vigência do estímulo condicionado evitando a liberação do choque. O animal passa a reagir ao estímulo condicionado como se ele fosse o próprio estímulo incondicionado (BRANDÃO, 2000). No entanto, se a resposta ocorre depois que o choque já tiver começado, ela o termina e a resposta passa a ser chamada de *fuga*.

Equipamento:

A *shuttle box* utilizada corresponde a uma caixa de alumínio medindo 50 x 29 x 29 cm, com tampa e parede frontal de acrílico transparente modelo “vai e vem”. O piso é composto por barras de latão de 0,3cm de diâmetro, distando 1,0cm entre si, através das quais os choques elétricos são ministrados com mecanismo *scrambler*. A caixa é dividida em dois compartimentos iguais, separados por uma barreira de madeira de 3,0cm de altura acima das barras de latão.

Cada compartimento possui 2 fotocélulas, distando 6,0cm uma da outra, que são sensíveis (por interrupção de feixe de luz) ao movimento do sujeito experimental entre os compartimentos. Desse modo, é possível registrar o tempo de travessia do animal de um compartimento para o outro, além de registrar também sua presença no compartimento em que o mesmo se localiza num dado momento da sessão. Essas informações são dirigidas automaticamente ao aparelho de comando programável (*ALBARSCH*) que libera os choques na intensidade de 0,6 mA.

Imediatamente antes de cada choque é acionada uma campainha, com duração de 5 segundos, frequência de 1,5 KHz e volume de 6db. Se o animal cruza o obstáculo antes do início do choque, ele termina o estímulo condicionado e evita a apresentação do choque (resposta de *esquiva*).

#### Procedimento Experimental:

Cada animal foi colocado na caixa de alternância. Após três minutos de adaptação, foi emitido o som de uma campainha com duração de 5 segundos. A seguir, iniciou-se a sessão de 30 choques. Cada choque emitido na intensidade de 0,6 mA era sempre precedido do som da campainha.

A latência de fuga/esquiva foi registrada em 6 blocos de tentativas. O tempo médio desta sessão foi de 14 minutos. Registrou-se também o número de respostas de esquivas, isto é, quantas vezes o animal salta antes da apresentação do estímulo não condicionado (choque). Neste caso, a contagem foi feita somente a partir do segundo bloco de tentativas (do 2° ao 6° bloco), pois permitimos que o animal se adaptasse ao som da campainha.

#### *3.2.4. Aprendizagem e Memória - Teste da esquiva passiva*

Na esquiwa passiva o animal é colocado primeiramente em um ambiente iluminado (aversivo), sendo posteriormente condicionado a penetrar em um ambiente escuro (agradável) para ser reforçado. A seguir aplica-se um estímulo aversivo (choque nas patas) e o animal aprende a não ir mais ao compartimento em busca do reforço (esquiwa passiva).

Equipamento:

A *shuttle box* utilizada corresponde a uma caixa de madeira medindo 51 x 22 x 28 cm. A caixa é dividida em duas câmaras iguais por uma parede divisória com uma passagem medial (9cm de altura x 6,5 cm de largura); esta passagem é fechada por uma porta em guilhotina.

A primeira câmara é revestida completamente de material impermeável branco (fórmica), aberta superiormente e com as seguintes dimensões: 30 x 24 x e 24 cm. É iluminada por uma lâmpada de 60 watts, situada aproximadamente à 40 cm de altura do piso.

A outra câmara, pintada completamente de cor preta, possui uma tampa para impedir a entrada de luminosidade em seu interior. Esta caixa tem as mesmas dimensões da câmara clara. Seu piso consiste em barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro com um intervalo de 1,5 cm entre uma barra e outra. Estas barras são ligadas a uma fonte geradora de choques. Escolhemos a intensidade de 1,0 mA e duração de 1segundo com intervalos de 0,5 segundos entre os choques. O disparo e término dos choques são controlados pelo experimentador.

Procedimento Experimental:

*1. Treino:*

O animal foi colocado na câmara clara, por 10 segundos, com a porta divisória que dá passagem para a câmara escura fechada. Decorrido esse tempo abriu-se a porta e cronometrou-se o tempo que o animal leva para entrar com as quatro patas na câmara escura (*latência de treino*, em segundos).

Tão logo o animal entrasse na câmara escura, a porta foi novamente fechada e a fonte de choque acionada durante 5 segundos, liberando choques de intensidade programada de 1,0mA/s. Após um intervalo de 5 segundos, repetiu-se essa sessão de choques por mais 2 vezes.

*2. Teste:*

Esta sessão é realizada 24 horas após a sessão anterior (treino). O animal foi colocado novamente na câmara clara e após 10 segundos, a porta que dá passagem à câmara escura foi aberta. Cronometrou-se o tempo que o animal leva para entrar com as quatro patas na câmara escura (*latência de teste*, em segundos). Durante o teste o animal nunca recebe choque. A porcentagem de aprendizagem foi calculada através da seguinte fórmula:  $\text{Aprendizagem (\%)} = (\text{tempo na câmara clara}/180) \times 100$

Onde, o denominador de valor igual a 180 corresponde ao tempo final do teste (180 segundos).

### 3.3. *Análise Estatística*

As medidas comportamentais foram avaliadas através do software estatístico *GraphPad Instat*. Efetuaram-se as análises paramétricas e não paramétricas:

1) análise não paramétrica: os resultados foram expressos como mediana. Na comparação entre os tratamentos efetuamos a análise de variância de Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunn's para comparações múltiplas. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados significantes. Para comparar o grupo **Sal** em relação ao grupo não tratado (**C-B**) utilizamos o teste de Mann-Whitney;

2) análise paramétrica: os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Na comparação entre os tratamentos utilizamos ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados significantes. Para comparar o grupo **Sal** em relação ao grupo não tratado (**C-B**) utilizamos o teste t-Student. .

*Resultados*

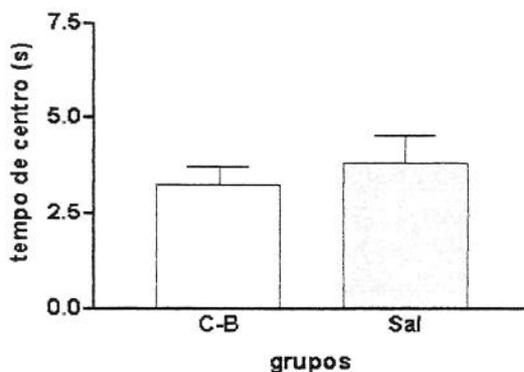
#### *4.1. Exploração e emocionalidade - Teste do campo aberto*

Ratas cronicamente estressadas com solução de NaCl 10 mM durante o pré-natal e pós-natal (*Sal*) não diferiram daquelas do controle branco (*C-B*) em relação ao tempo de permanência no centro do campo aberto ( $p > 0,05$ ; teste t-Student - *figura 2A*). Entretanto, o teste de Mann-Whitney revelou redução significativa na ambulação ( $p < 0,01$ ; *figura 3A*), levantamento ( $p < 0,01$ ; *figura 4A*) e defecação ( $p < 0,05$ ; *figura 5A*). Quando os grupos submetidos ao tratamento com  $\text{Li}^+$  (*LiPós*, *LiPré* e *Li*) foram comparados com o grupo *Sal*, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em quaisquer das medidas analisadas no teste de campo aberto (*figuras 2B a 5B*).

#### *4.2. Ansiedade - Labirinto em cruz elevado*

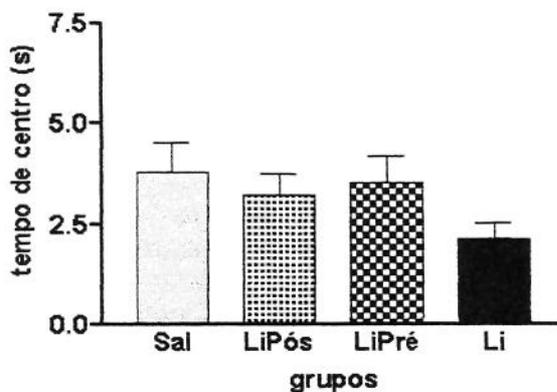
No labirinto em cruz elevado, não houve diferenças entre os grupos nos índices de ansiedade (tempo gasto nos braços abertos/total e número de entradas nos braços abertos/total - *figura 6A e 6B*) e na atividade locomotora (número de entradas nos braços fechados - *figura 7A e 7B*).

Figura 2A

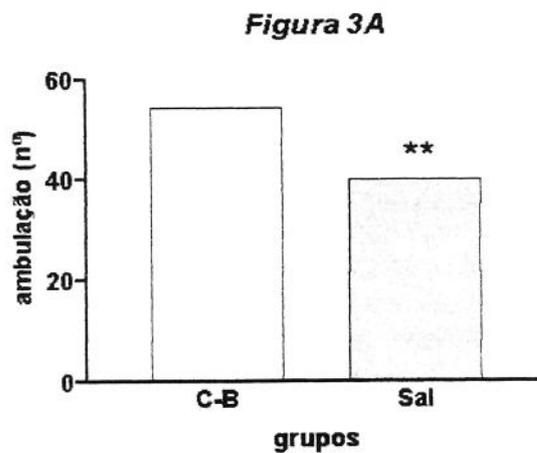


**Figura 2A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de centro, no teste de campo aberto, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (*C-B*) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Não houve diferenças na comparação entre o grupo *C-B* x *Sal* (teste t-Student).

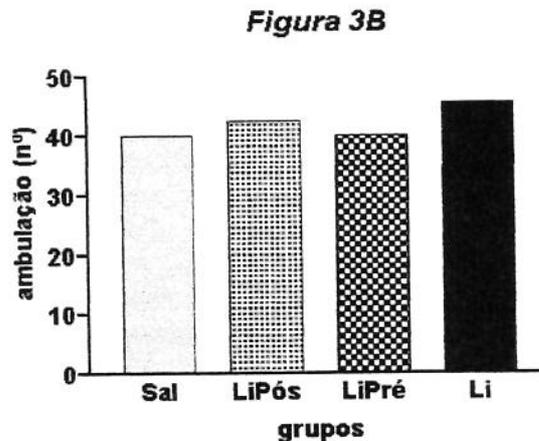
Figura 2B



**Figura 2B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de centro, no teste de campo aberto, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls não encontraram diferenças para os grupos tratados com  $\text{Li}^+$  (*LiPós*, *LiPré*, *Li*) em relação ao grupo *Sal*.

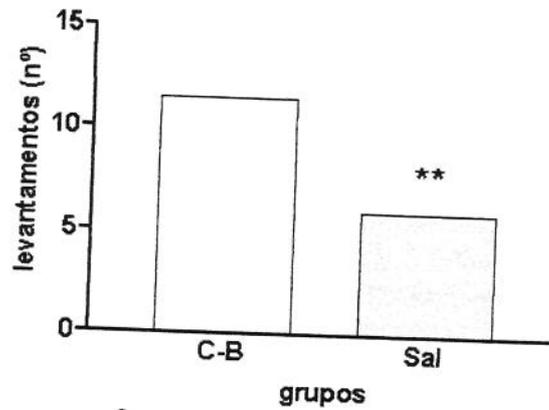


**Figura 3A:** Efeitos sobre a determinação da ambulação, no teste de campo aberto, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como mediana para 10 animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$  na comparação entre o grupo **C-B** x **Sal** (teste de Mann-Whitney).



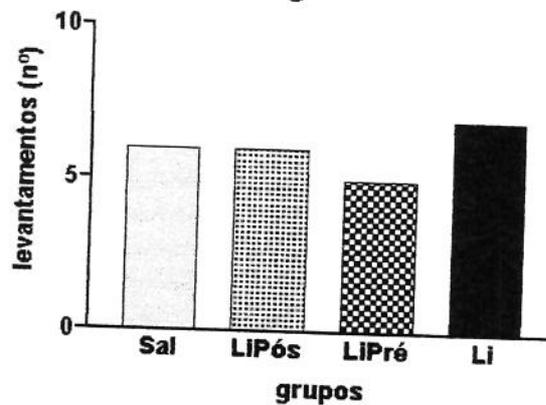
**Figura 3B:** Efeitos sobre a determinação da ambulação, no teste de campo aberto, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante a gravidez e lactação (**Li**). Os valores estão expressos como mediana para 10 animais por grupo. Kruskal-Wallis e Dunn's não encontraram diferenças para os grupos tratados com  $\text{Li}^+$  (**LiPós**, **LiPré**, **Li**) em relação ao grupo **Sal**.

Figura 4A

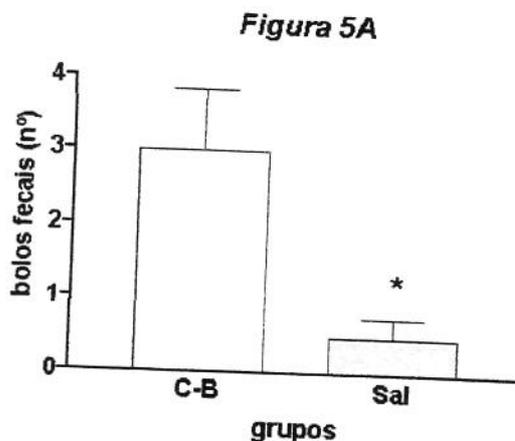


**Figura 4A:** Efeitos sobre a determinação do levantamento, no teste de campo aberto, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (C-B) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (Sal). Os valores estão expressos como mediana para 10 animais por grupo. \*\*  $p < 0,01$  na comparação entre o grupo C-B x Sal (teste de Mann-Whitney).

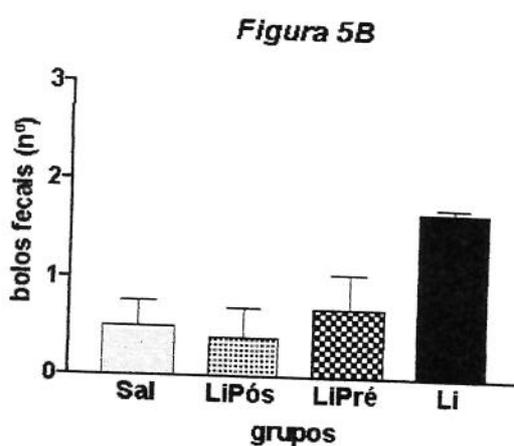
Figura 4B



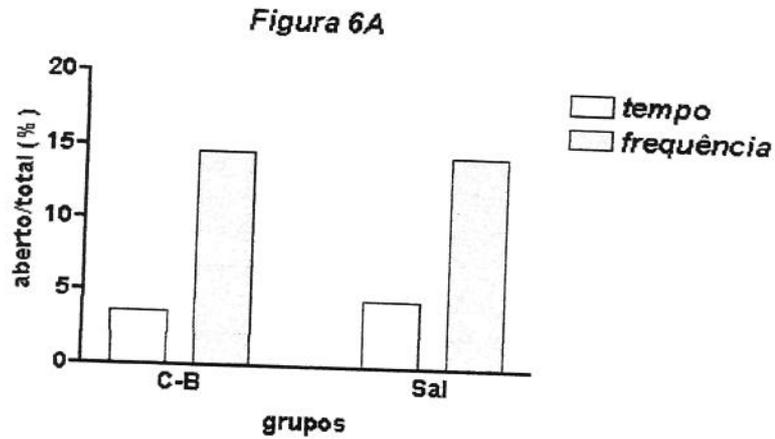
**Figura 4B:** Efeitos sobre a determinação do levantamento, no teste de campo aberto, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (Sal) ou LiCl 10 mM durante a lactação (LiPós), durante a gravidez (LiPré) e durante a gravidez e lactação (Li). Os valores estão expressos como mediana para 10 animais por grupo. Kruskal-Wallis e Dunn's não encontraram diferenças para os grupos tratados com  $\text{Li}^+$  (LiPós, LiPré, Li) em relação ao grupo Sal.



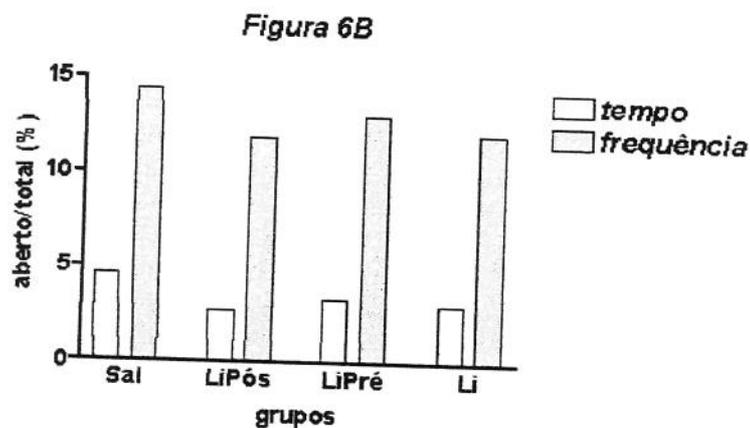
**Figura 5A:** Efeitos sobre a determinação do nº de bolos fecais, no teste de campo aberto, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  na comparação entre o grupo **C-B** x **Sal** (teste de Mann-Whitney).



**Figura 5B:** Efeitos sobre a determinação do nº de bolos fecais, no teste de campo aberto, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante a gravidez e lactação (**Li**). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Kruskal-Wallis e Dunn's não encontraram diferenças para os grupos tratados com  $\text{Li}^+$  (**LiPós**, **LiPré**, **Li**) em relação ao grupo **Sal**.

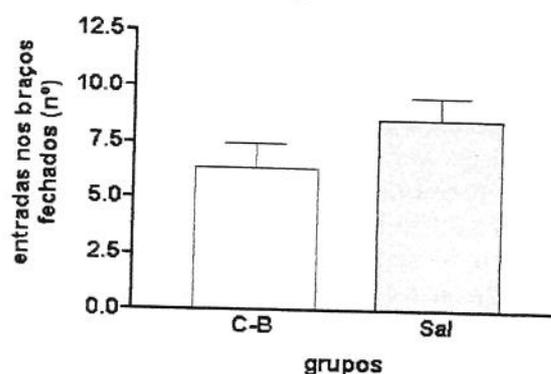


**Figura 6A:** Efeito sobre a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao total, no teste do labirinto em cruz elevado, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como média para 10 animais por grupo. Não houve diferenças na comparação entre os grupos **C-B** x **Sal** (teste t-Student).



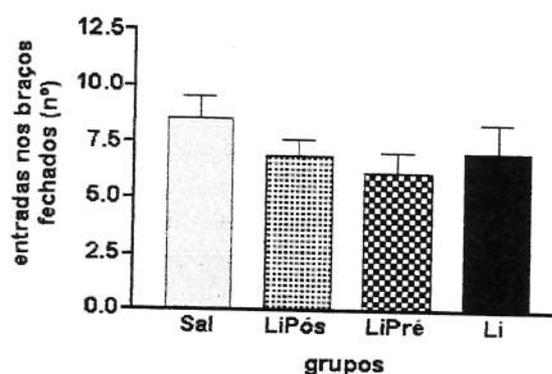
**Figura 6B:** Efeito sobre a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao total, no teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante a gravidez e lactação (**Li**). Os valores estão expressos como média para 10 animais por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls não encontraram diferenças para os grupos tratados com Li<sup>+</sup> (**LiPós**, **LiPré**, **Li**) em relação ao grupo **Sal**.

Figura 7A



**Figura 7A:** Efeito sobre o número de entradas nos braços fechados, no teste do labirinto em cruz elevado, de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Não houve diferenças na comparação entre os grupos **C-B** x **Sal** (teste t-Student).

Figura 7B



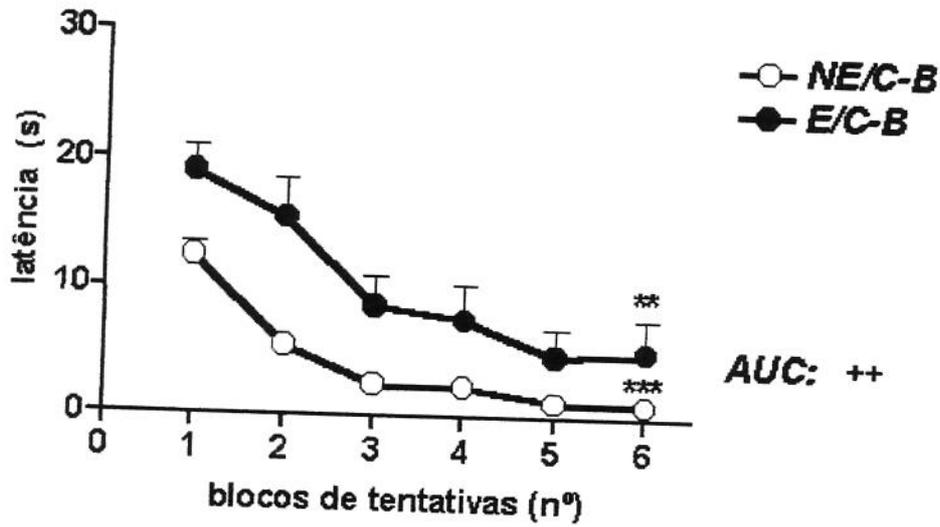
**Figura 7B:** Efeito sobre o número de entradas nos braços fechados, no teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante a gravidez e lactação (**Li**). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls não encontraram diferenças para os grupos tratados com  $\text{Li}^+$  (**LiPós**, **LiPré**, **Li**) em relação ao grupo **Sal**.

### 4.3. Depressão - Indução do desamparo aprendido

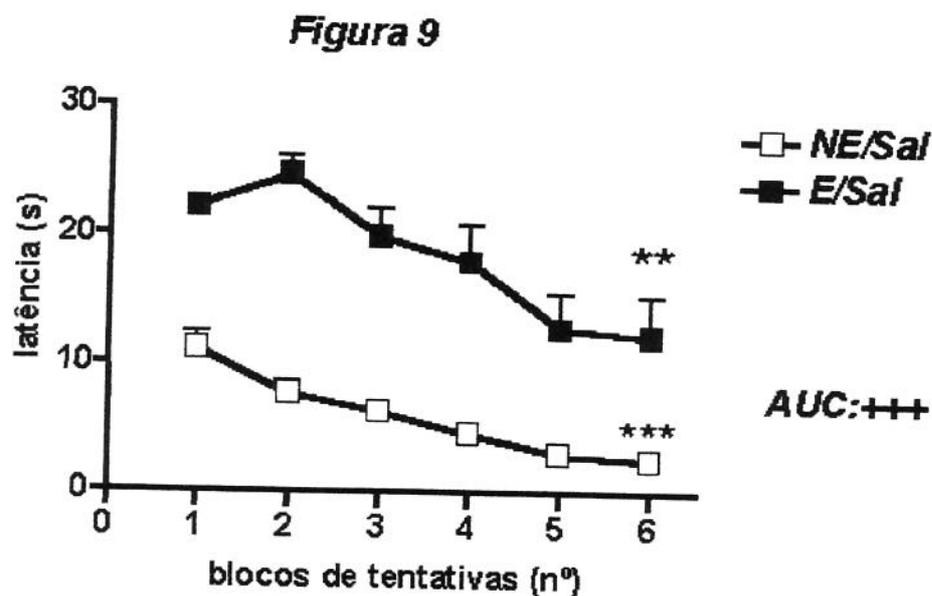
No teste de indução do desamparo aprendido, observou-se o desempenho da fuga do grupo **C-B** (*figura 8*) e verificou-se que animais confinados (*NE/C-B*) e animais submetidos previamente ao choque (*E/C-B*) aprenderam a tarefa de fuga. Tal aprendizado manifestou-se pela redução das latências do início (1º bloco) ao término do teste (6º bloco; t-pareado  $NE/C-B=p<0,001$ ;  $E/C-B=p<0,01$ ). Verificou-se também que o subgrupo *E/C-B* apresentou latências maiores que o subgrupo *NE/C-B*, confirmando a indução do desamparo ( $p<0,01$ , teste t-Student realizado na área trapezoidal sob o par de curvas (*AUC*):  $E \times NE$ ).

Na *figura 9* observou-se o desempenho de fuga do grupo **Sal** e verificou-se que ambos os subgrupos *NE/Sal* e *E/Sal* aprenderam a tarefa de fuga, apresentando redução nas latências (1º x 6º bloco) no decorrer da sessão (t-pareado  $NE/Sal=p<0,001$ ;  $E/Sal=p<0,01$ ). O subgrupo *E/Sal* apresentou latências maiores que o subgrupo *NE/Sal*, demonstrando a indução do desamparo (*AUC*:  $p<0,001$ , teste t-Student).

Figura 8



**Figura 8:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido de ratos *E* (submetidos aos choques inescapáveis) e *NE* (controles), e que ingeriram água *ad libitum* durante a gravidez e lactação (*C-B*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por subgrupo. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (teste t pareado; 1º x 6º bloco); AUC: ++ $p < 0,01$  em relação ao respectivo grupo *NE* (teste t-Student realizado na área trapezoidal sob o par de curvas *E* x *NE*).

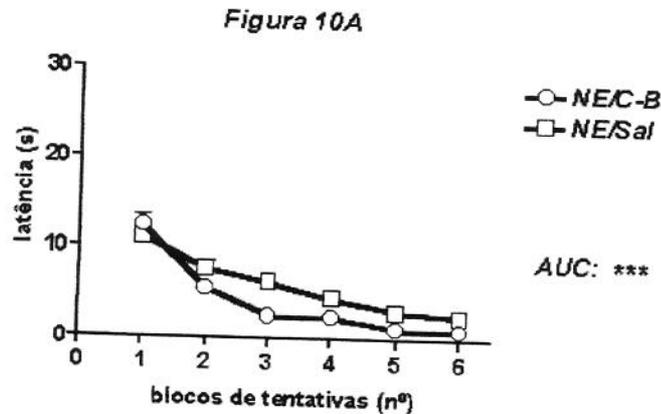


**Figura 9.** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido de ratos *E* (submetidos aos choques inescapáveis) e *NE* (controles) que ingeriram NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por subgrupo \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  (teste-t pareado; 1º x 6º bloco); AUC: +++  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo *NE* (teste t-Student realizado na área trapezoidal sob o par de curvas *E* x *NE*).

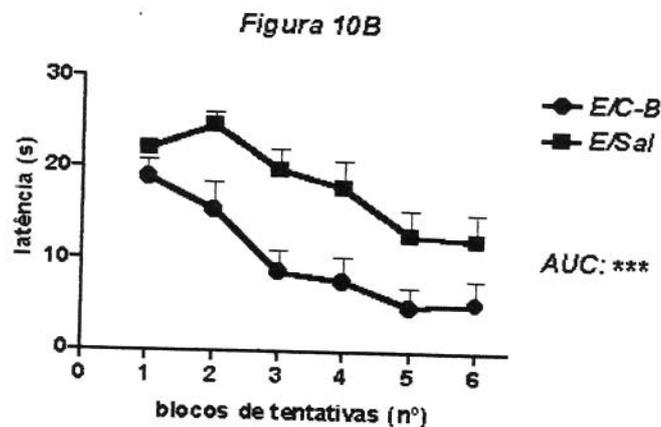
Na *figura 10A* observou-se o desempenho de fuga dos subgrupos *NE/C-B x NE/Sal*, e verificou-se que o subgrupo *NE/Sal* apresentou maior latência para fuga ( $p < 0,001$ - teste t-Student realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas *NE/C-B x NE/Sal*), o que demonstra menor desempenho em tarefa que envolva estímulo não condicionado. Também na comparação entre os grupos *E/C-B x E/Sal* (*figura 10B*), verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ; teste t-Student realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas *E/C-B x E/Sal*), demonstrando que o subgrupo *E/Sal* apresenta maior indução de desamparo.

Observou-se o desempenho de fuga dos grupos *Sal* (*figura 11A*), *LiPós* (*figura 11B*), *LiPré* (*figura 11C*) e *Li* (*figura 11D*). Os subgrupos de animais submetidos aos choques inescapáveis (*E*) apresentaram latências maiores que seu respectivo controle não estressado (*NE*), demonstrando a indução de desamparo (*AUC*:  $p < 0,001$ , teste t-Student). ANOVA e Student-Newman-Keuls não encontraram diferenças estatisticamente significantes para os grupos tratados com  $Li^+$  (*LiPós*, *LiPré*, *Li*) submetidos previamente ao choque incontrolável em relação ao grupo *E/Sal*. (*figura 12B*).

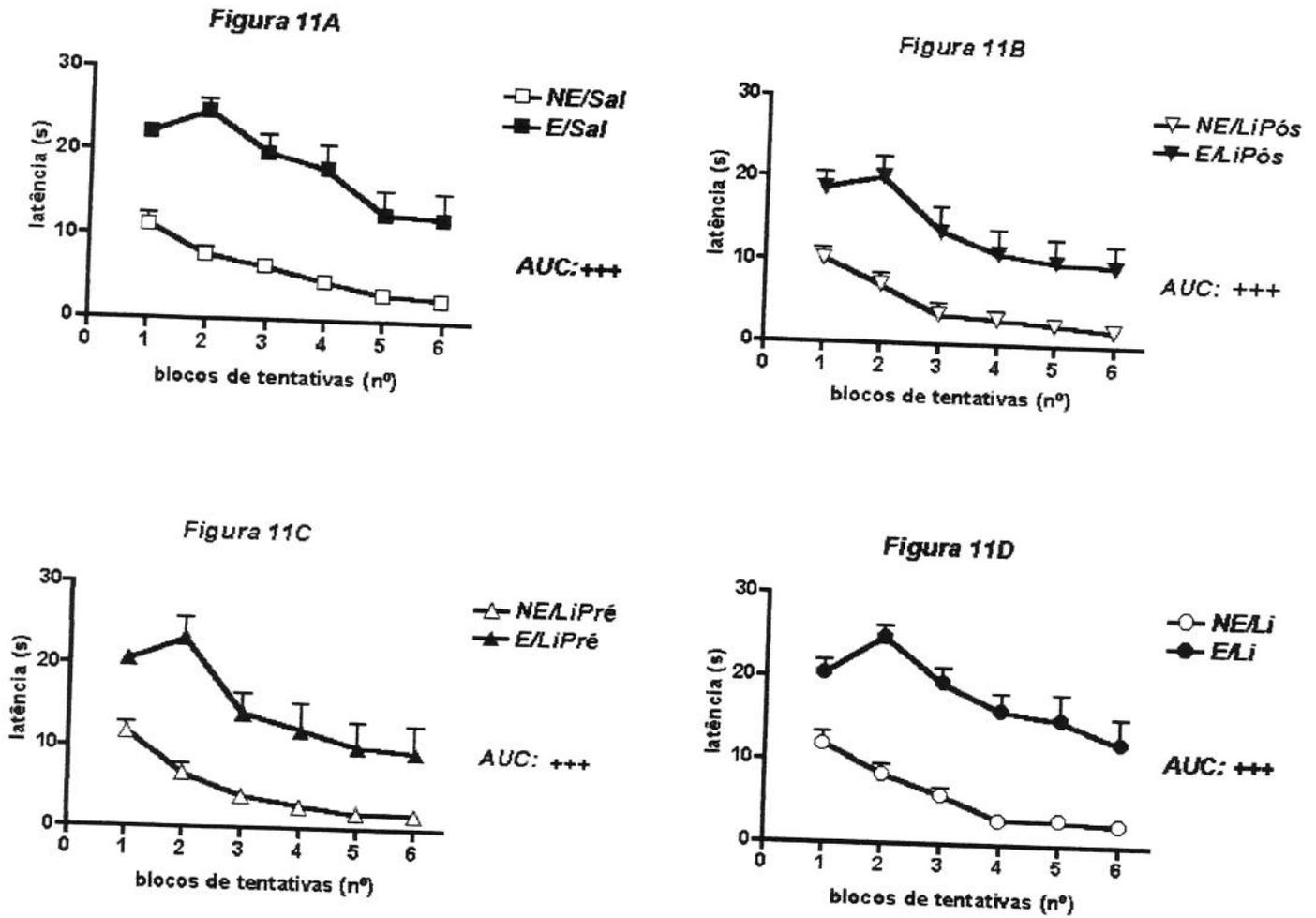
Na *figura 13A* observamos que os animais não submetidos aos choques inescapáveis e tratados com salina (*NE/Sal*) ou com  $Li^+$  (*NE/LiPós*, *NE/LiPré*, *NE/Li*) aprenderam a tarefa de fuga. Isto pode ser demonstrado através de uma redução no tempo de latência no decorrer da sessão (1° x 6° bloco; t-pareado:  $p < 0,001$ ). Do mesmo modo, os animais tratados com salina ou  $Li^+$  nas diferentes condições e submetidos a sessão de incontrolabilidade (*E/Sal*, *E/LiPós*, *E/LiPré* e *E/Li*) aprenderam a tarefa de fuga (*figura 13B*; t-pareado: 1° x 6° bloco =:  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ).



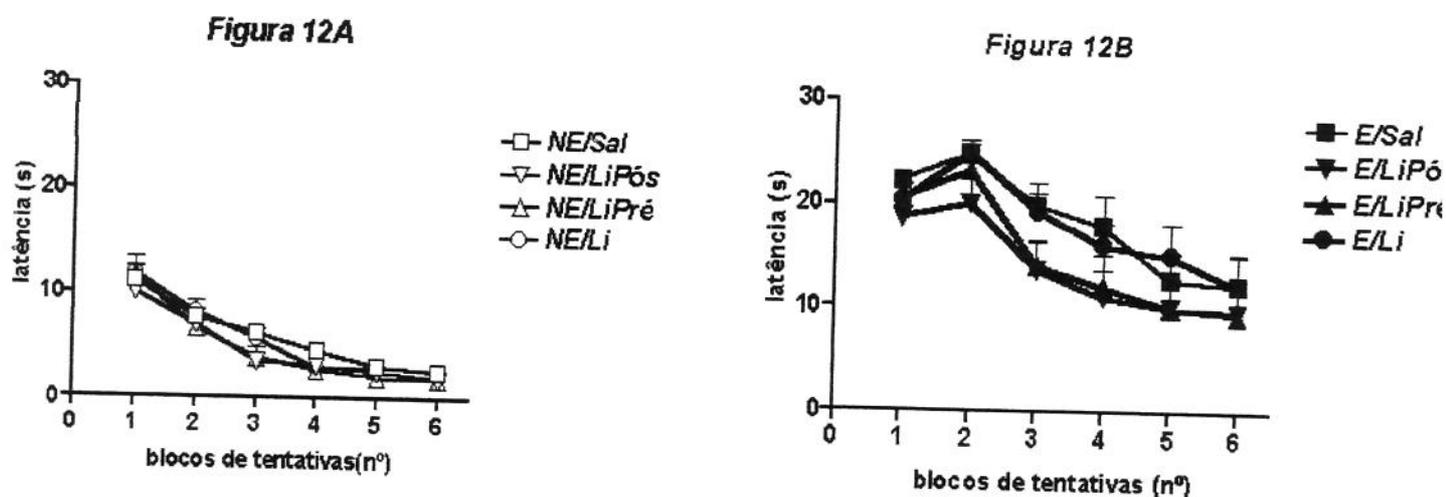
**Figura 10A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiwa ativa não sinalizada de ratas *NE* (não submetidas aos choques inescapáveis) que ingeriram água *ad libitum* (*C-B*) ou NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo.  $AUC^{***} p < 0,001$  em relação ao respectivo subgrupo *NE/C-B* (teste t-Student)



**Figura 10B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiwa ativa não sinalizada de ratas *E* (submetidas aos choques inescapáveis) que ingeriram água *ad libitum* (*C-B*) ou NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo.  $AUC: *** p < 0,001$  em relação ao respectivo subgrupo *E/C-B* (teste t-Student).

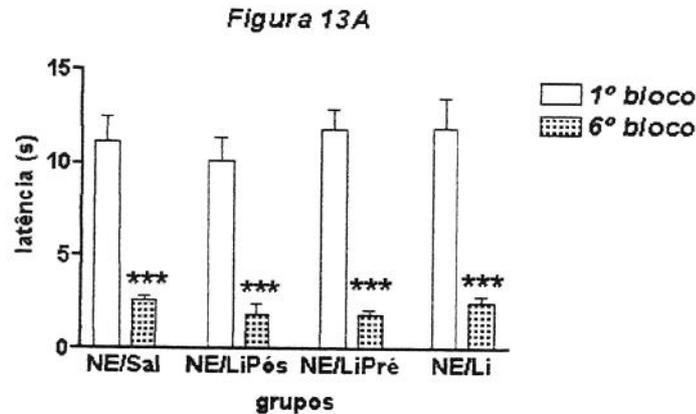


**Figuras 11A a 11D.** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga no teste da indução do desamparo aprendido de ratos *E* (submetidos aos choques inescapáveis) e *NE* (controles) tratados com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. AUC: \*\*\*  $p < 0,001$  (teste t-Student realizado na área trapezoidal sob o par de curvas *NE* x *E*).

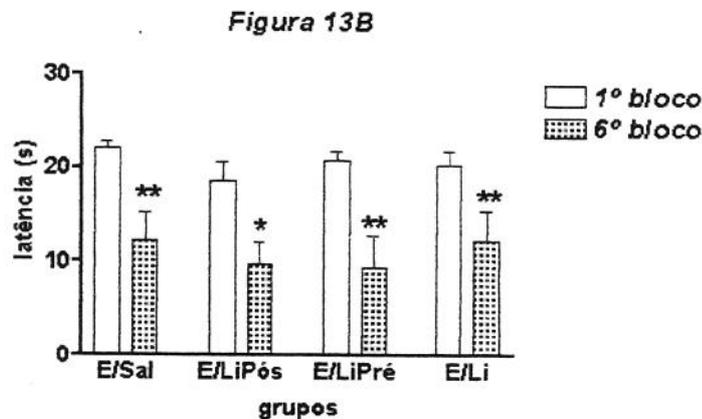


**Figura 12A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiwa ativa não sinalizada de ratas *NE* (não submetidas aos choques inescapáveis) tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças para os grupos não estressados e tratados com  $\text{Li}^+$  (*NE/LiPós*, *NE/LiPré*, *NE/Li*) em relação ao grupo *NE/Sal* (ANOVA e Student-Newman-Keuls realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas).

**Figura 12B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiwa ativa não sinalizada de ratas *E* (submetidas aos choques inescapáveis) tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Não foram encontradas diferenças para os grupos estressados e tratados com  $\text{Li}^+$  (*E/LiPós*, *E/LiPré*, *E/Li*) em relação ao grupo *E/Sal* (ANOVA e Student-Newman-Keuls realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas).



**Figura 13A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiva ativa não sinalizada de ratas *NE* (não submetidas aos choques inescapáveis) tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  (teste-t pareado; 1º x 6º bloco).



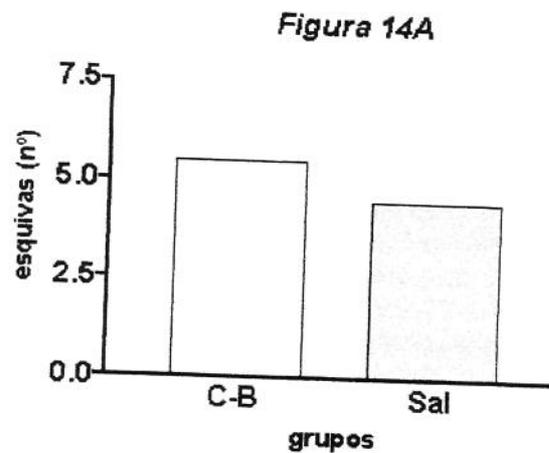
**Figura 13B:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência de fuga em caixa de esquiva ativa não sinalizada de ratas *E* (submetidas aos choques inescapáveis) tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*) ou LiCl 10 mM durante a lactação (*LiPós*), durante a gravidez (*LiPré*) e durante a gravidez e lactação (*Li*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  (teste-t pareado; 1º x 6º bloco)

#### 4.4. Aprendizagem - Teste da esquiua ativa sinalizada

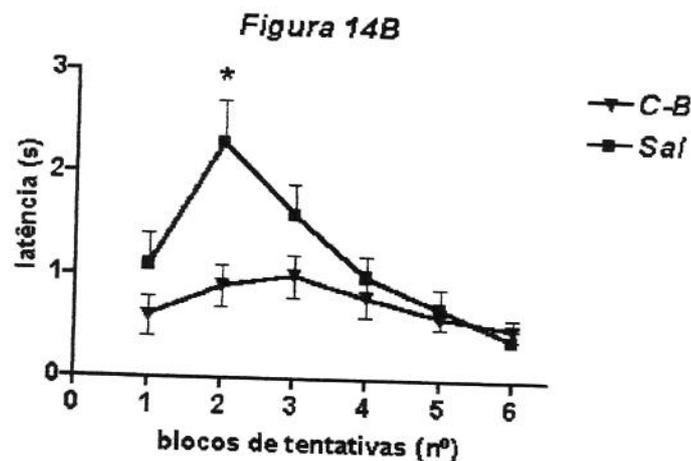
O teste da esquiua ativa sinalizada não mostrou diferença quanto a resposta de esquiua realizada em 5 blocos de tentativas ( $p > 0,05$ ; teste de Mann-Whitney - *figura 14A*) e no desempenho de fuga dos grupos **C-B** x **Sal** ( $p > 0,05$ ; teste t-Student realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas - *figura 14B*). Apesar de aprenderem a tarefa de fuga, o grupo **C-B** apresentou um retardo de aprendizagem, representado por uma maior latência de fuga no 2º bloco de tentativas ( $p < 0,05$ ; teste t não pareado - *figura 14B*).

#### 4.5. Aprendizagem e Memória - Teste da esquiua passiva

No teste da esquiua passiva o grupo **Sal** apresentou menor latência no lado claro da caixa de esquiua no dia teste em relação ao grupo **C-B** ( $p < 0,01$ ; teste t-Student - *figura 15A*). A porcentagem de aprendizagem, portanto diferiu ( $p < 0,05$ ; teste t-Student - *figura 15B*). Embora tenha havido retenção da aprendizagem para ambos dos grupos (treino x teste, t-pareado: **C-B** =  $p < 0,001$ ; **Sal** =  $p < 0,05$ ; *figura 15A*), a menor latência apresentada pelo grupo **Sal** revela um baixo controle de impulso ou a necessidade de um estímulo (visualizar o lado escuro da caixa de esquiua) por parte deste grupo para evocar a aprendizagem adquirida.

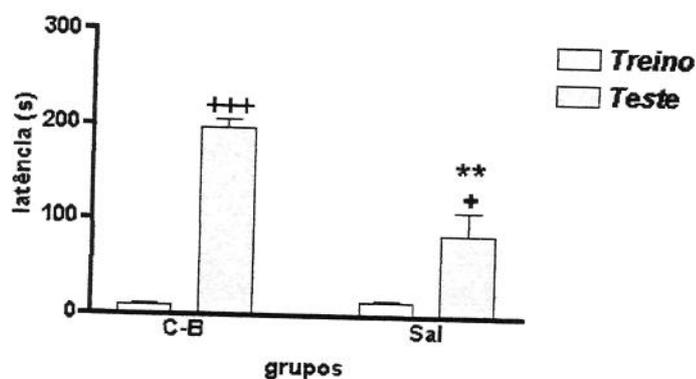


**Figura 14A:** Efeitos sobre a determinação do número de esquivas no teste da esquiva ativa sinalizada de ratas que ingeriram água *ad libitum* (*C-B*) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. Não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos *C-B* x *Sal* (teste de Mann-Whitney).



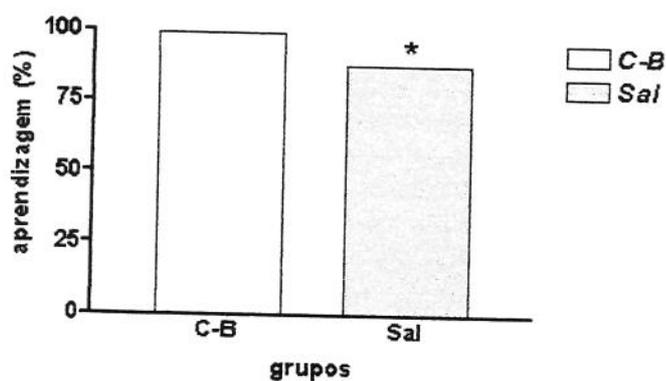
**Figura 14B:** Efeitos sobre determinação do tempo de latência de fuga no teste de esquiva ativa sinalizada de ratas que ingeriram água *ad libitum* (*C-B*) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (*Sal*). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo *C-B* (teste t-Student).

Figura 15A



**Figura 15A:** Efeitos sobre a determinação do tempo de latência na caixa branca no teste da esQUIVA passiva de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para 10 animais por grupo nos dias treino e teste.  $**p < 0,01$  entre os grupos **C-B** x **Sal** no dia do teste (teste t-Student);  $+p < 0,05$  e  $+++p < 0,001$  (treino x teste, teste-t pareado).

Figura 15B



**Figura 15B:** Efeitos sobre a determinação da porcentagem de aprendizagem no teste da esQUIVA passiva de ratas que ingeriram água *ad libitum* (**C-B**) e ratas tratadas com NaCl 10 mM durante a gravidez e lactação (**Sal**). Os valores estão expressos como média para 10 animais por grupo no dia teste.  $*p < 0,05$  entre os grupos **C-B** x **Sal** no dia do teste (teste t-Student).

---

*Discussão*

*Discussão*

Vários estudos demonstram que o estresse pré-natal pode resultar em importantes conseqüências morfológicas, comportamentais e fisiológicas em humanos (STOTT, 1973; JONES & TAUSCHER, 1978; KNIPSCHILD et al., 1981; SCHELL, 1981; MEIER, 1985) e roedores (WARD, 1972; MEISEL et al, 1979; WEINSTOCK, FRIDE, HERTZBERG, 1988; SECOLI & TEIXEIRA, 1998). O efeito do estresse pré-natal sobre o comportamento emocional dos descendentes na vida adulta é freqüentemente observado somente sob condições ambientais aversivas, onde se verifica uma redução na habilidade do organismo em lidar com situações estressantes e que pode ser expressa como uma supressão da atividade exploratória (FRIDE et al., 1986; WEINSTOCK et al, 1988; WAKSHLAK & WEINSTOCK, 1989; POLTYREV et al., 1996).

O estresse pré-natal tem sido implicado como um importante determinante no desenvolvimento da resposta de *estresse* do organismo, envolvendo mudanças em muitos componentes do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), incluindo o sistema serotoninérgico (KING et al., 1991; MEERLO et al., 2001), catecolaminérgico (PACAK et al., 1995) e glicocorticóides (MEANEY et al., 1993). Tais alterações podem resultar em aumento na emocionalidade e depressão (WAKSHLAK & WEINSTOCK, 1989, 2001; SECOLI & TEIXEIRA, 1998; ALONSO et al, 1994). Doenças psiquiátricas, desnutrição e consumo de drogas durante a gravidez devem representar um desafio similar, devido a profundas adaptações fisiológicas ocorrendo na mãe, com repercussões negativas sobre seus descendentes (SHOEMAKER, COYLE, BLOOM, 1974; JOFFE, 1978; SILVA, et al, 1981; SWAAB & MIRMIRAN, 1984; LEHOTZKY et al., 1988; HAMMEN et al., 1990;

WEISSMAN & CALDECOTT-HAZARD, 1995; RUBIO et al., 1995; WARD et al., 2002; SCHNEIDER et al, 2002; VATHY, 2002).

Poucos trabalhos têm estabelecido as conseqüências comportamentais da exposição pré-natal ao  $\text{Li}^+$  (SECHZER et al, 1986; GLOCKNER et al, 1993; MESSIHA, 1993; TEIXEIRA, et al, 1995a; GUILHERME, VARRIANO, TEIXEIRA, 2001). Neste trabalho, nós investigamos a possibilidade deste metal influenciar o comportamento de ansiedade e precipitar o estado de depressão, na vida adulta, em ratas expostas ao  $\text{Li}^+$  durante a vida uterina e lactação. Para isso escolhemos os modelos do campo aberto, labirinto em cruz elevado e desamparo aprendido.

A administração de  $\text{Li}^+$  foi providenciada na água de beber, de modo a fornecer níveis séricos de  $\text{Li}^+$  dentro da faixa considerada profilática para pacientes (TEIXEIRA et al, 1995a). A escolha desta dose é importante, uma vez que a probabilidade das pacientes engravidarem durante o tratamento crônico é mais alta do que durante o tratamento agudo (quando a paciente é normalmente hospitalizada). Em termos toxicológicos, esta dose pode ser considerada baixa, mas farmacologicamente ativa, uma vez que provou ser eficiente em bloquear os efeitos comportamentais em um modelo animal de depressão e não causou toxicidade às mães (FARIA & TEIXEIRA, 1993; TEIXEIRA et al.; 1995b).

Mesmo em doses profiláticas, existe a possibilidade do  $\text{Li}^+$  causar efeitos adversos nos descendentes em desenvolvimento ou na idade adulta. Duas hipóteses são normalmente sugeridas para explicar os efeitos do tratamento pré e pós-natal do  $\text{Li}^+$  sobre o desenvolvimento: efeitos diretos provocados pelo  $\text{Li}^+$  sobre os descendentes e efeitos deste tratamento sobre as mães e que afetam a prole. No primeiro caso, há a possibilidade de que

o  $\text{Li}^+$  administrado às mães, nas doses consideradas não tóxicas, deva alcançar níveis tóxicos em seus descendentes. Vários fatores, tais como idade, sexo, via de administração e linhagem, podem influenciar a toxicidade deste metal (PETERSEN, 1980; TEIXEIRA & KARNIOL, 1982, 1985; EL-KASSEN & SINCA, 1983; MESSIHA, 1993). Como esta droga atravessa a barreira hematoencefálica e há uma diminuição da capacidade renal da prole amamentada em eliminar  $\text{Li}^+$  (KERSTEN, 1981), seu acúmulo no cérebro em desenvolvimento deve aumentar a sensibilidade aos efeitos tóxicos desta droga. Observações anteriores de que o  $\text{Li}^+$  é menos tóxico em ratas adultas (TEIXEIRA & KARNIOL, 1985) não descartam a possibilidade de que os descendentes sejam expostos a níveis tóxicos que não têm efeito sobre as mães. No segundo caso, existe a possibilidade do  $\text{Li}^+$  afetar o sistema neuro-hormonal materno e que tais hormônios, transportados do sangue materno para a placenta, possam alcançar o hipocampo fetal ou do neonato e causar alterações permanentes na reatividade do eixo HPA. Isto pode resultar em mudanças no comportamento, particularmente sob condições estressantes.

Procuramos também determinar se os possíveis efeitos do  $\text{Li}^+$  sobre o comportamento emocional de seus descendentes seriam dependentes da fase do desenvolvimento em que eram expostos; deste modo, utilizamos diversos grupos experimentais submetidos a diferentes períodos de tratamento (pré-natal, lactação e ambos). Achamos que este procedimento era necessário, uma vez que viria a ajudar no gerenciamento clínico de pacientes bipolares grávidas, fornecendo subsídios que orientem na escolha do tempo de tratamento.

Sendo a solução de LiCl 10 mM a única fonte de líquido dada aos animais e, portanto possivelmente estressante, utilizamos como controle dos grupos tratados um grupo que recebeu solução salina na mesma molaridade que os grupos tratados com Li<sup>+</sup> (grupo *Sal*). Este grupo foi comparado com um grupo que recebeu água *ad libitum* (grupo *C-B*). Além dos testes aplicados aos grupos tratados (campo aberto, labirinto em cruz elevado e desamparo aprendido) acrescentamos mais dois testes onde analisamos possíveis alterações da solução salina sobre a aprendizagem e memória (esquiva passiva e esquiva ativa sinalizada). Este procedimento permitiu verificar se as alterações observadas no grupo *Sal* seriam similares àquelas apresentadas em roedores nascidos de mães submetidas a várias formas de estresse, permitindo-nos concluir se a solução salina dada cronicamente à mãe seria estressante a seus descendentes.

Nossos resultados observados no grupo *Sal* foram similares aqueles encontrados em roedores nascidos de mães estressadas submetidas a diferentes tipos de estresse, de intensidade e duração variáveis (SECOLI & TEIXEIRA, 1998; POLTYREV, et al., 1996; MEISEL et al., 1979; WEINSTOCK et al., 1988; FRIDE & WEINSTOCK, 1998). Pode-se concluir que a solução salina foi de fato estressante às mães e a prole. Desta forma, alguns cuidados devem ser tomados quando analisamos os efeitos do Li<sup>+</sup> na prole de ratos; portanto devemos comparar os grupos tratados com o grupo *Sal*, já que a forma de administração de Li<sup>+</sup> também altera o comportamento.

O campo aberto e o labirinto em cruz elevado são modelos validados para determinação do comportamento de ansiedade animal. A exposição do sujeito experimental

a estes novos ambientes representa um conflito entre exploração e medo ao desconhecido; a maior emocionalidade apresentada por animais estressados pré-natalmente pode ser expressa como uma supressão de diferentes tipos de comportamento verificada nestes modelos (THOMPSON, 1957; WAKSHLAK & WEINSTOCK, 1989; POLTYREV et al., 1996).

A liberação de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) é inibida por vários peptídeos endógenos, incluindo neuropeptídeo Y (HEILIG et al, 1994), opióides (PLOTSKY, 1986), complexo GABA/Benzodiazepínico (DAVIS, RAINNIE, CASSEL, 1994) e corticosterona (CORT), atuando sobre receptores no sistema límbico e hipotálamo (REUL & DEKLOET, 1985). A supressão da exploração em animais estressados prenatalmente sugere maiores níveis de CRH e glicocorticóides quando comparados a animais não estressados no período pré-natal. Isto se deve a uma deficiência em um ou mais destes sistemas. Esta hipótese é consistente com a observação que ratos estressados no período pré-natal têm menor número de receptores para glicocorticóides (HENRY et al., 1994) e sítios de ligação para benzodiazepínicos no hipocampo (FRIDE et al., 1985). É possível que hormônios liberados pela mãe estressada prejudiquem o desenvolvimento do hipocampo de seus descendentes. Como este está envolvido nas respostas adaptativas frente a situações aversivas, o aumento da reatividade do eixo HPA pelo estresse pré-natal resulta em aumento da emocionalidade e supressão da atividade exploratória sob condições estressantes na vida adulta.

Os resultados no teste de campo aberto demonstraram uma redução no comportamento de ambulação ( $p < 0,01$ ; *figura 3A*) e levantamento ( $p < 0,01$ ; *figura 4A*) para

animais estressados por administração crônica de NaCl 10 mM (*Sal*), quando comparados ao controle (*C-B*), sugerindo que o grupo *Sal* é mais emocional do que o controle.

Ambulação e número de levantamentos são aumentados por estimulação de receptores opióides. Estes receptores são diferencialmente influenciados por ambientes estressantes e estão diminuídos por estresse pré-natal (KESHET & WEINSTOCK, 1995). Menos frequentemente, a emissão de bolos fecais é estudada no campo aberto; de um modo geral maior defecação sugere maior emocionalidade. Como ratas fêmeas exibem menor defecação que ratos machos (BLIZZARD, LIPPMAN, CHEN, 1975), muitos autores preferem omitir esta determinação no campo aberto (WAKSHLAK & WEINSTOCK, 1990). Talvez isso se deva porque a maioria desses animais não produz bolos fecais durante o teste. Assim, embora tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significantes para o grupo *Sal* em relação ao *C-B* (figura 5A), sugerindo menor emocionalidade para o primeiro (menor defecação), apenas significou que o pequeno número de fêmeas que defecou no grupo *C-B* superestimou os resultados. Portanto, o índice de defecação deve ser um indicador impreciso para avaliação de resposta emocional para ratas fêmeas.

O labirinto em cruz é um modelo mais sensível para determinar a ansiedade e baseia-se na aversão natural dos roedores por espaços abertos (PELLOW et al, 1985; PELLOW & FILE, 1986); em comparação ao teste de campo aberto que tradicionalmente mede uma resposta emocional mais geral. Quando o grupo *Sal* foi testado no labirinto em cruz elevado, não foi detectado aumento na ansiedade, característica da resposta de *estresse* (figura 6A). Os resultados decorrentes da resposta de *estresse* sobre o desenvolvimento físico e comportamental dos descendentes em desenvolvimento ou na idade adulta são

dependentes de inúmeras variáveis, tais como, idade, tipo de estresse, sua frequência e intensidade de duração (WEINSTOCK et al., 1988) e método de determinação (POLTYREV et al, 1996). Assim, existe a possibilidade de que o tratamento com salina tenha um efeito mais geral sobre o comportamento emocional (como demonstram os resultados para o teste do campo aberto), sem alteração no comportamento de ansiedade do animal. Uma vez que diferentes sistemas neuronais comandam o comportamento afetivo e a atividade, estes poderiam ser diferentemente afetados pelo estresse pré-natal.

Pelo fato do eixo HPA ser o efector da reação geral de adaptação desencadeada pelo estresse, sugeriu-se a possibilidade de que a depressão possa ser uma resposta anormal ao estresse, principalmente se crônico (GRAEFF, 1990). Em nosso estudo da depressão comportamental, o estresse aplicado aos descendentes em idade adulta foi produzido por uma situação aversiva incontrolável: o desamparo aprendido (SELIGMAN & MAIER, 1967; TEIXEIRA et al.; 1995b).

Na comparação entre os grupos desamparados *E/C-B* x *E/Sal* (figura 10B), observamos maior indução de desamparo para o subgrupo *E/Sal* ( $p < 0,001$ - teste t realizado na área trapezoidal sob cada par de curvas *E/C-B* x *E/Sal*). Nossos resultados suportam a hipótese de que o estresse pré-natal deve diminuir o limiar de vulnerabilidade ao estresse, com conseqüências a longo prazo, resultando em depressão (KALIN, 1989). Desde que o desamparo aprendido tem sido colocado como um modelo animal de depressão, exibindo mudanças no peso, sono, libido e funcionamento cognitivo que são similares àquelas observadas em depressão humana e que respondem a agentes farmacológicos idênticos (WILLNER, 1990), nossos resultados confirmam a hipótese de WORKEL et al. (1997) de

que, embora a responsividade do eixo HPA seja programada pelo genótipo, ela pode ser modulada por experiências no início do desenvolvimento conduzindo a mudanças a longo prazo na responsividade ao estresse e que podem revelar doença mental latente.

Desde que a interação  $Li^+$  - estresse tem sido observada em alguns trabalhos (GLOCKNER et al., 1993; TEIXEIRA, et al., 1995a), nós investigamos a possibilidade de que este metal pudesse precipitar o estado de depressão na vida adulta e utilizamos o modelo do desamparo aprendido.

As latências de fuga de todos os subgrupos tratados e não submetidos aos choques inescapáveis nas patas (*subgrupos NE*) foram comparadas (*figuras 12A*) para avaliar se houve qualquer possível interferência dos tratamentos no desempenho de escape. ANOVA e Student-Newman-Keuls não encontraram diferenças significantes nas áreas trapezoidais sob as curvas (*AUC*). Esta análise revelou que não houve diferenças na latência de fuga de qualquer dos grupos não estressados (*NE*), indicando que não houve interferência do tratamento com a habilidade para escapar do choque. A análise estatística entre o 1° e 6° blocos revelou que todos os grupos aprenderam a tarefa de fuga na presença do estímulo não condicionado, no decorrer da sessão ( $p < 0,001$ ; teste-t pareado - *figura 13A*).

No teste do desamparo aprendido (*figuras 11A a 11D*), observou-se que os animais submetidos previamente aos choques incontroláveis (*subgrupos E* - curvas superiores) apresentaram um menor desempenho na resposta de fuga quando comparados aos respectivos *subgrupos NE* (curvas inferiores), uma vez que a análise estatística realizada na área trapezoidal sob car par de curvas *NEXE* (*AUC*) revelou diferenças significantes. Nossos resultados confirmam aqueles obtidos por SELIGMAN (1975), mostrando que no

rato não se evidencia ausência, mas sim uma aprendizagem mais lenta por parte dos animais submetidos previamente aos choques incontroláveis (*figura 13B*; teste t-pareado, 1ºx 6º bloco). Entretanto, os tratamentos com  $\text{Li}^+$  durante a gravidez e amamentação não tornaram os animais mais susceptíveis à indução do desamparo, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo *E/Sal* (*figura 12B*).

Desnutrição, drogas e estresse pré-natal têm sido implicados na produção de alterações cognitivas em seus descendentes (SHOEMAKER et al., 1974; RUBIO et al., 1995). Para os estudos da influência da solução salina sobre a aprendizagem, utilizamos os testes de fuga (esquiva ativa não sinalizada), esquiva ativa sinalizada e esquiva passiva. O tratamento com salina causou interferência na habilidade de escapar ao choque, evocada através de uma maior latência de fuga envolvendo estímulo não condicionado (*figura 10A* -  $p < 0,001$ , em relação ao subgrupo *NE/C-B*). No teste de esquiva ativa sinalizada (*figura 14B*), o grupo *Sal* apresentou maior latência de fuga no 2º bloco de tentativas ( $p < 0,05$ ; teste t não pareado), demonstrando retardo na aprendizagem associativa (envolvendo associação de estímulos: condicionado e não condicionado).

No teste da esquiva passiva o grupo *Sal* apresentou menor latência no lado claro da caixa de esquiva no dia teste em relação ao grupo *C-B* (*figura 15A*,  $p < 0,01$  entre os grupos *C-B* x *Sal* no dia do teste). Embora tenha havido retenção da aprendizagem para ambos os grupos (*figura 15A*; teste t-pareado, treino x teste: *C-B*= $p < 0,001$ ; *Sal*= $p < 0,05$ ), a menor latência apresentada pelo grupo *Sal* revela um baixo controle de impulso ou a necessidade de um estímulo (visualizar o lado escuro da caixa de esquiva) por parte deste grupo para evocar a memória.

Nossos resultados apontam evidências que sugerem que a administração de salina demonstrou ser estressante às mães e à prole, alterando a exploração, reduzindo o limiar de indução de desamparo e causando prejuízo na aprendizagem/memória em tarefa de fuga e esquiva.

No entanto, não houve efeito específico do  $\text{Li}^+$  sobre o comportamento emocional e de desamparo. Estes resultados são encorajadores, pois suportam a utilização do  $\text{Li}^+$  como tratamento profilático do transtorno bipolar naquelas pacientes que apresentam grande potencial de recorrência; portanto onde é maior o risco de suicídio ou de maus-tratos sobre seus descendentes.

---

*Conclusão*

*Conclusão*

Este trabalho permite concluir que:

1) O tratamento perinatal com solução de NaCl 10 mM: :

- alterou a exploração dos descendentes testados na arena do campo aberto;
- reduziu o limiar de indução de desamparo e prejudicou a tarefa de fuga e esquiva;

2) O tratamento perinatal com  $\text{Li}^+$ , nas doses profiláticas:

- não alterou a exploração e emocionalidade dos descendentes testados na arena do campo aberto;
- não alterou a resposta de ansiedade dos descendentes expostos ao labirinto em cruz elevado;
- não alterou a indução do desamparo.

A administração de salina foi estressante às mães e a prole; porém o tratamento perinatal com  $\text{Li}^+$ , nas doses profiláticas, não alterou a resposta comportamental testada na prole em idade adulta, através dos modelos de emocionalidade, depressão e ansiedade.

---

*Abstract*

*ABSTRACT*

Lithium salts ( $\text{Li}^+$ ) are frequently used in psychiatry for treatment and prophylaxis of bipolar disorders. Because discontinuation of  $\text{Li}^+$  may pose an unacceptable risk of recurrence of bipolar illness during pregnancy or puerperium, some patients are oriented to continue their  $\text{Li}^+$  therapy. In this work we investigated the impact of perinatal lithium ( $\text{Li}^+$ ) treatment within the prophylactic range used clinically. Rats' offspring susceptibility to behavioral depression and anxiety was verified at adult age.

Female Wistar rats drank either  $\text{LiCl}$  10 mM *ad libitum* or  $\text{NaCl}$  10 mM as the only source of liquid during the prenatal period. Following birth, pups were cross-fostered to form four experimental groups (N = 10 litters each): a) **Sal** - saline during prenatal and lactating periods; b) **LiPós** -  $\text{Li}^+$  during the lactating period only; c) **LiPré** -  $\text{Li}^+$  during the prenatal period only; d) **Li** -  $\text{Li}^+$  during the prenatal and lactating periods. At 77-85 days old, only one female rat per litter/group, was submitted to either the open field, plus-maze or learned helplessness models.

Open-field and plus-maze tests didn't show differences on locomotor activity and anxiety-related behavior among the groups.  $\text{Li}^+$  treatments also didn't produced significant differences in the escape latency in learned helpless rats.

The data suggest that perinatal lithium treatment didn't alter the intensity of behavioral depression or anxiety, induced at adult age.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABBEY, H. & HOWARD, E. – *Dev. Psychobiol.* 6:329-35; 1973.
- ALONSO, S.J.; CASTELLANO, M.A.; AFONSO, D.; RODRÍGUEZ, M. – Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol. Behav.* 49(1):69-72; 1991.
- ALONSO, S.J.; NAVARRO, E.; RODRIGUES, M. – Permanent dopaminergic alterations in the n.accumbens after prenatal stress. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, 49 (2):353-8; 1994.-
- ALTSHULER, L.L.; COHEN, L.; SZUBA, M.P.; BURT, V.K.; GITLIN, M.; MINTZ, J. - Pharmacologic management of psychiatric illness during pregnancy: dilemmas and guidelines. *Am. J. Psychiatry*, May;154(5):718-9, 1997.
- ANANTH, J.; DJENDEREDJIAN, A.H.; KAUR, A. – Intermittent lithium therapy in a bipolar patient. *Can. J. Psychiatry*, May, 35(4):344-5; 1990.
- BALDESSARINI, R.J.; TONDO, L.; HENNEN, J. - Effects of lithium treatment and its discontinuation on suicidal behavior in bipolar maniac-depressive disorders. *J. Clin. Psychiatry*, 60 Suppl 2:77-84; discussion 111-6; 1999.
- BALDESSARINI, R.J.; TONDO, L; HENNEN, J.; VIGUERA, A.C. - Is lithium still worth using? An update of selected recent research. *Harv. Rev. Psychiatry*, Mar-Apr; 10(2):59-75; 2002.
- BEERS, M.J. & BERKOW, R., ed. – manual Merk. 17º ed. – São Paulo, 2000; 2701 p.
- BLIZZARD, D.A.; LIPPMAN, H.R.; CHEN, J.J. – Sex differences in open-field behavior in the rat: the inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.*, 14:601-8; 1975.

- BRANDÃO, M.L.- Aprendizagem e Memória. *Psicobiologia*, capítulo 6, 2000; 197p.
- BROCKINGTON, I.F.; OATES, M.; ROSE, G. – Prepartum psychosis. *J. Affect. Disord.*, 19:31-5; 1990.
- CALIL, H.M. - Transtorno Afetivo Bipolar. In: \_\_\_\_\_, eds. *Atualização Terapêutica*, 18° ed; 1997.
- CHAUDRON, L.H.; JEFFERSON, J.W.; WILLIAM, S.- Mood stabilizers during breastfeeding: a review. *J. Clin. Psychiatry, Feb;61(2):79-90*; 2000.
- COGILL, S.R., CAPLAN, H.L.; ALEXANDRA, H.; ROBSON, K.M.; KUMAR, R. – Impact of maternal depression on cognitive development of young children. *Br. Med. J.*, 292:1165-7; 1986.
- COHN, J.F. & TRONICK, E. – Specificity of infants' response to mothers' affective behavior. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, 28:242-8; 1989.
- CRUZ, A.P.M; FREI, F.; GRAEFF, F.G. – Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 171; 1994.
- DA-SILVA, V.A.; MORAES-SANTOS, A.R.; CARVALHO, M.S.; MARTINS, M.L., TEIXEIRA, N.A.- Prenatal and postnatal depression among low income Brazilian women. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Jun;31(6):799-804; 1998.
- DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSEL, M. – Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trendy in Neuroscience*, 17:208-14; 1994.
- DEAN, C.; WILLIAMS, R.J.; BROCKINGTON, I.F. – Is puerperal psychosis the same as bipolar maniac-depressive disorder? A familiar study. *Psychol. Med.*, 19:637-47; 1989.

- DOBBING, J. & SANDS, J. – Annotation on comparative aspects of the brain growth-spurt. *Early Human Development*, 3: 79-83; 1979.
- EDMONDS, L.D. & OAKLEY, G.P. - Ebstein's anomaly and maternal lithium exposure during pregnancy. *Teratology*, 41:551-2; 1990.
- EL-KASSEN, M. & SINCA, M.S. – Strain dependent rate of lithium elimination associated with toxic effects of lethal doses of lithium chloride in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 19:257-61; 1983.
- ERNST, C.L. & GOLDBERG, J.F.- The reproductive safety profile of mood stabilizers, atypical antipsychotics and broad-spectrum psychotropics. *J. Clin. Psychiatry*, 63 Suppl 4:42-55; 2002.
- FAEDDA G.L.; TONDO, L.; BALDESSARINI, R.J.; SUPPES, T.; TOHEN, M. – Outcome after rapid discontinuation of lithium treatment in bipolar mood disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, 50:448-55; 1993.
- FARIA, M.S. & TEIXEIRA, N.A. – Reversal of learned helplessness by chronic lithium treatment at a prophylactic level. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, 26:1201-12; 1993.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; FELDON, J.; HALEVY, G.; WEINSTOCK, M. – Effect of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiology and Behavior*, 37:681-87; 1986.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; GAVISH, M.; WEINSTOCK, M. – Prenatal stress impairs maternal behavior in a conflict situation and reduces hippocampal benzodiazepine receptor. *Life Sciences*, 36:2103-9; 1985.

- FRIDE, E. & WEINSTOCK, M. – Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. *Life Sciences*, 42: 1059-65; 1988.
- GLOCKNER, R. & KARGE, E. – Influence of chronic stress before and/or during gestation on pregnancy outcome of young and old *Uje:WIST* rats. *J. Exp. Anim. Sci.*, 34:93-8; 1991.
- GLOCKNER, R.; SCHWARZ, S.; JAHNE, F. – Enhanced effect of chronic stress on pregnancy outcome in *Uje:WIST* rats by prenatal treatment with lithium. *Exp. Toxic. Pathol.*, 45:35-7; 1993.
- GOMEZ, G.E. - Lithium treatment present and future. *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.*, Aug; 39(8):31-7; 2001.
- GOODNICK, P.J.; CHAUDRY, T.; ARTADI, J.; ARCEY, S. - Women's issues in mood disorders. *Expert. Opin. Pharmacother.*, Jul;1(5):903-16; 2000.
- GRAEFF, F.G; - Drogas psicotrópicas e seu modo de ação, E.P.V., São Paulo, 41-57; 1990.
- GUILHERME, C.G.; VARRIANO, A. A.; AIROLDI, N.A. – Estudo do comportamento da prole de ratas tratadas com lítio. In: *XVI REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL*, Caxambu, 2001 (Abstract, p.161)
- HAMMEN, C.; BURGE, D.; BURNEY, E.; ADRIAN, C. – Longitudinal study of diagnoses in children of women with unipolar and bipolar affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47:1112-7; 1990.

- HEILIG, M.; KOOB, G.F.; ECKMAN, R.; BRITTON, K.T. – Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends in Neuroscience*, 17:80-5; 1994.
- HEINRICH, S.C., PICH, E.M., MICZEK, K.A., BRITTON, K.T., KOOB, G.F. - Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Research*, 581:190-7; 1992.
- HENRY, C.; KABBAJ, M., SIMON, H., LE MOAL, M.; MACCARI, S. – Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 6:341-5; 1994.
- HERMINI, A. H.; TELXEIRA, N.A.; MENDES, V.E.; PEREIRA, D.G. – Development of a software to control depression experiments through “The Learned Helplessness Model”. In: *WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING*, Rio de Janeiro, outubro de 1994.
- HOGG, S. – A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54:21-30; 1996.
- IQBAL, M.M.; GUNDLAPALLI, S.P.; RYAN, W.G.; RYALS, T.; PASSMAN, T.E. - Effects of antimanic mood-stabilizing drugs on fetuses, neonates, and nursing infants. *South. Med. J.*, Mar;94(3):304-22; 2001.
- JACOBSON, S.J.; JONES, K.; JOHNSON, K; CEOLIN, L.; KAUR, P.; SAHN, D.; DONNENFELD, A.E.; RIEDER, M.; SANTELLI, R.; SMYTHE, J., et al. - Prospective multicenter study of pregnancy outcome after lithium exposure during first trimester. *Lancet*, 339:530-3; 1992.

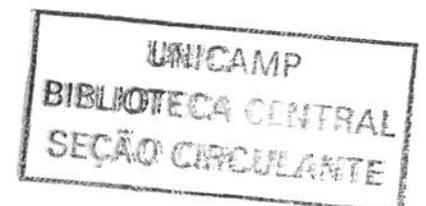
- JANICAK, P.G. & WATANABE, M.D.- Estabilizadores do Humor. In: MARCOLIN, M.A, ed. *Interações Farmacológicas com Drogas Psiquiátricas*. Cap.4; 1998.
- JOFFE, J.M. – Hormonal mediation of the effects of prenatal stress on offspring behavior. In G. Gottlieb (Ed.), *Studies on the Development Of Behavior and the Nervous System: Early Influences*, Vol. 4, Acad. Press, New York, pp. 108-144; 1978.
- JOHNSON, E.M.J. - A summary review and human perspective for developmental toxicity evaluations on lithium in laboratory animals. In: SCHRAUZER, G.N. & KLIPPEL, K.F., eds. *Lithium in Biology and Medicine: New Applications and Developments*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft, 81-100; 1991.
- JONES, F.N. & TAUSCHER, J. – residence under an airport landing pattern as a factor in teratism. *Arch. Environ. Health*, 33:10-2; 1978.
- KALIN, N.H. – The HPA system and neuroendocrine models of depression. In: KOOB, G.F.; ERLERS, C.L.; KUPFER, D.J., eds. *Animal Models of Depression*, pp 57-73, Birkhauser, Boston; 1989.
- KALLEN, B. - Comments on teratogen update: lithium. *Teratology*, 38:597; 1988.
- KALLEN, B. & TANDBERG, A. - Lithium and pregnancy: a cohort study on maniac-depressive women. *Acta Psychiatr. Scand.*, 68:134-9; 1983.
- KENDELL, R.E.; CHALMERS, J.C.; PLATZ, C. – Epidemiology of puerperal psychoses. *Br. J. Psychiatry*, 150:662-73; 1987.
- KERSTEN, L. – Toxicity and renal elimination of lithium in rats of different ages. *Archives of Toxicology*, 47:135-44; 1981.

- KESHET, G.I. & WEINSTOCK, M. – Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 50:413-9; 1995.
- KING, J.A.; DAVILA-GARCIA, M.; AZMITIA, E.C.; STRAND, F.L. – Differential effects of prenatal and postnatal ACTH or nicotine exposure on 5-HT high affinity uptake in the neonatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9:281-6; 1991.
- KNIPSCHILD, P.; MEIER, H.; SALLE, H. – Aircraft noise and birth weight. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 48:131-6; 1981.
- KRUGER, S.; BRAUNIG, P.; YOUNG, L.T. - Biological treatment of rapid-cycling bipolar disorder. *Pharmacopsychiatry*, 29(5):167-75; 1996.
- LEHOTZKY, K.; SZEBERENYL, J.M.; UNGVARY, G.; KISS, A. – Behavioral effects of prenatal methoxy-ethyl-mercury chloride exposure in rat pups. *Neurotoxicology and Teratology*, 10:471-4; 1988.
- LEWIS, P.J. - Efectos adversos de las drogas sobre el feto. *Farmacología Clínica en Obstetricia*. Cap.5; 1985.
- LIEBSCH, G., LANDGRAF, R., GERSTBERGER, R., PROBST, J. CH., WOTJAC, C.T., ENGELMANN, M., HOLSBOER, F., MONTKOWSKI, A. – Chronic infusion of a CRH<sub>1</sub> receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regulatory Peptides*, 59:229-3;1995.
- LINDEN, S. & RICH, C.L. – The use of lithium during pregnancy and lactation. *J. Clin. Psychiatry*, 44:358-61; 1983.

- LLEWELLYN, A; STOWE, Z.N.; STRADER, J.R. - The use of lithium and management of women with bipolar disorder during pregnancy and lactation. *J Clin Psychiatry*, 59 Suppl 6:57-64; discussion 65; 1998.
- MARI, J.J. & JORGE, M.R. - Transtornos Psiquiátricos na Clínica Geral. In: \_\_\_\_\_, eds. *Atualização Terapêutica*, 18° ed; 1997.
- MEANEY, M.J.; BHATNAGAR, S.; DIORIO, J.; LAROCQUE, S.; FRANCIS, D.; O'DONNELL, D.; SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMITHE, J.; VIAU, V. - Molecular basis for the development of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13(4):321-47; 1993.
- MEERLO, P.; HORVATH, K.M.; LUITEN, P.G.; ANGELUCCI, L.; CATALANI, A.; KOOLHAAS, J.M. - Increased maternal corticosterone levels in rats: effects on brain 5-HT1A receptors and behavioral coping with stress in adult offspring. *Behav. Neurosci.*, Oct;115(5):1111-7; 2001.
- MEIER, A. - Child psychiatric sequelae of maternal war stress. *Acta Psychiatr. Scand.*, 72:505-11; 1985.
- MEISEL, R.L.; DOHANICH, G.D.; WARD, I. - Effects of prenatal stress of avoidance acquisition on open field performance and lordotic behavior in male rats. *Psychol. Behav.*, 22:527-31; 1979.
- MESSIHA, F.S. - Maternally-mediated developmental lithium toxicity in the mouse. *Gen. Pharmac.*, 24(1):9-15; 1993.
- NIERENBERG, A.A.; GRAY, S.M.; GRANDIN, L.D. - Mood disorders and suicide. *J. Clin. Psychiatry*, 62 Suppl 25:27-30; 2001.

- NORA, J.J.; NORA, A.H.; TOEWS, W.H. - Lithium, Ebstein's anomaly and other congenital heart defects. *Lancet*, 1:594-5; 1974.
- OVERMEIER, J.B.; SELIGMAN, M.E.P. – Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J.Comp. Physiol.*, 63:28-33; 1967.
- PACAK, K., PALKVITZ, M., KVETNANSKY, R.; YADID, G.; KOPIN, I.J.; GOLDSTEIN, D.S. – Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 771:115-30; 1995.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. - Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, 14:149-67; 1985.
- PELLOW, S. & FILE, S.E.- Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17:721-25; 1986.
- PETERSEN, K.D. – Effects of age and route of administration on LD 50 of lithium chloride in the rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 47:351-4; 1980.
- PLOTSKY, P.M. – Opioid inhibition of immunoreactive corticotrophin-releasing factor secretion into the hypophyseal-portal circulation of rats. *Regulatory Peptides*, 16:235-42; 1986.
- POLTYREV, T.; KESHET, G.I.; KAY, G.; WEINSTOCK, M. – Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Developmental Psychobiology*, 29(5):453-62; 1996.

- REUL, J.M.H.M.; DEKLOET, R.E. – Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117:2505-10; 1985.
- ROBINS, L.N.; HELZER, J.E.; WEISSMAN, M.M.; ORVASCHEL, H.; GRUENBERG, E.; BURKE, J.D. Jr; REGIER, D.A.- Lifetime prevalence of specific psychiatric disorders in three sites. *Arch. Gen. Psychiatry*, 41:949-58; 1984.
- ROBINSON, G.E.; STEWART, D.E. - Postpartum psychiatric disorders. *CMAJ, Jan 1;134(1):31-7*; 1986.
- RODIER, P.M. – Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 22: 525-45; 1980.
- RUBIO, P.; RODRIGUEZ, F.F.; MUNOZ, R.M.; ARIZNAVARRETA, C.; MARTIN-CALDERON, J.L.; NAVARRO, M. – Long-term behavioral effects of perinatal exposure to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats: possible role of pituitary-adrenal axis. *Life Sciences*, 56(23/24):2169-76; 1995.
- SCHELL, L.M. – Environmental noise and human prenatal growth. *Am. J. Physiol. Anthropol.*, 56:63-70; 1981.
- SCHNEIDER, M.L.; MOORE, C.F.; KRAEMER, G.W.; ROBERTS, A.D.; DEJESUS, O.T. - The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinology*, Jan-Feb;27(1-2):285-98; 2002.
- SCHOU, M. & AMDISEN, A. – Lithium and pregnancy: III. Lithium ingestion by children breast-fed by women on lithium treatment. *Br. Med. J.*, 2:138, 1973.



- SCHOU, M. & AMDISEN, A. – Lithium and the placenta (letter). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 122:541; 1975.
- SCHOU, M.; GOLDFIELD, M.D.; WEINSTEIN, M.R.; VILLENEUVE, A. - Lithium and Pregnancy, I: report from the Register of Lithium Babies. *BMJ*, 2:135-136, 1973.
- SCHOU, M. & WEINSTEIN, M. R. – Problems of lithium maintenance treatment during pregnancy, delivery, and lactation. *Agressologie 21(A):7-9*; 1980.
- SECHZER, J.A.; LIEBERMAN, K.W.; ALEXANDER, G.J.; WEIDMAN, D.; STOKES, P.E. – Aberrant parenting and delayed offspring development in rats exposed to lithium. *Biol. Psychiatry, nov*; 21(13):1258-66; 1986.
- SECOLI, S.R. & TEIXEIRA, N.A. – Chronic prenatal stress affects development and behavior depression in rats. – *Stress*, 2(4):273-80; 1998.
- SELIGMAN, M.E.P. – In: Freeman, W.H. (Ed.), *Helplessness. On depression, development and death*. San Francisco and London; 1975.
- SELIGMAN, M.P.E. & MAIER, S.F. – Failure to escape to traumatic shock. *Journal of Experimental Psychology*, 74:1-9; 1967.
- SHOEMAKER, W.J.; COYLE, J.; BLOOM, F.E. – Perinatal undernutrition: effect on neurotransmitters, transmitter synthetic enzymes and the number of synaptic connections. *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, 5:100; 1974.
- SILVA, V.A.; LARANJEIRA, R.R.; DOLNIKOFF, M.; GRINFELD, H.; MASUR, J. - Alcohol consumption during pregnancy and newborn outcome: a study in Brazil. *Neurobehav. Toxicol. Teratol., Summer*;3(2):169-72; 1981.
- SIPEK, A. – Lithium and Ebstein's anomaly. *Cor. Vasa*, 31:149-56; 1989.

- STAHL, S.M. – Essencial Psychopharmacology: Neuroscientífica Basis and Practical Applications. 2º ed. 601p; 2000.
- STOTT, D.N. – Follow-up study from birth of the effects of prenatal stress. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 15:770-87; 1973.
- SUPPES, T.; BALDESSARINI, R.J.; FAEDDA, G.L.; TOHEN, M. – Risk of recurrence following discontinuation of lithium treatment in bipolar disorder. *Arc. Gen. Psychiatry*, 47:1082-8; 1991.
- SWAAB, D.F. & MIRMIRAN, M. – Possible mechanisms underlying the teratogenic effects of medicines on the developing brain. In J. Yanai (Ed.), *Neurobehavioural Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 55-71; 1984
- TEIXEIRA, N.A. & KARNIOL, I.G. – Dissociation of toxic and behavioral effects of lithium on rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18(3):349-54; 1985.
- TEIXEIRA, N.A. & KARNIOL, I.G. – The influence of age and sex on weight variation in rats treated chronically with lithium chloride. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 51:1-5; 1982.
- TEIXEIRA, N.A.; LOPES, R.C.M.; SECOLI, S.R. - Developmental toxicity of lithium treatment at prophylactic levels. *Braz. J. Med. and Biol. Res.*, 28(2):230-9; 1995a.
- TEIXEIRA, N.A.; PEREIRA, D.G.; HERMINI, A.H. – Chronic but not acute Li<sup>+</sup> treatment prevents behavioral depression in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28:1003-7; 1995b.

- THOMPSON, W.R. – Influence of prenatal maternal anxiety or emotionality in young rats. *Science*, 15:698-9; 1957.
- THORNBURG, K.L., BINDER, N.D., FABER, J.J. – Distribution of ionic sulfate, lithium, and bromide across the sheep placenta. *Am. J. Physiol.*, 236(1):C58-65; 1979.
- VATHY, I. - Prenatal opiate exposure: long-term CNS consequences in the stress system of the offspring. *Psychoneuroendocrinology*, Jan-Feb; 27(1-2):273-83; 2002.
- VIGUERA, A.C & COHEN, L.S. - The course and management of bipolar disorder during pregnancy. *Psychopharmacol Bull.*, 34(3):339-46; 1998.
- VIGUERA, AC; NONACS, R; COHEN, LS; TONDO, L; MURRAY, A; BALDESSARINI, RJ. - Risk of recurrence of bipolar disorder in pregnant and nonpregnant women after discontinuing lithium maintenance. *Am J Psychiatry*, Feb; 157(2):179-84; 2000.
- VORHEES, C.V.; BRUNNER, R.L.; BUTCHER, R.E. - Psychotropic drugs as behavioural teratogens. *Science*, 205:1220-5; 1979.
- WAKSHLAK, A. & WEINSTOCK, M. – Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. *Physiology & Behavior*, 48:289-92; 1989.
- WARD, I. – Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behaviour of males. *Science*, 175:82-8; 1972.

- WARD, O.B.; WARD, I.L.; DENNING, J.H.; HENDRICKS, S.E.; FRENCH, J.A -  
Hormonal mechanisms underlying aberrant sexual differentiation in male rats  
prenatally exposed to alcohol, stress, or both. *Arch. Sex. Behav.*, Feb;31(1):9-16;  
2002.
- WEINER, M.L. - Overview of Lithium toxicology. In: SCHRAUZER, G.N. & KLIPPEL,  
K.F., eds. *Lithium in Biology and Medicine: New Applications and Developments*,  
81-100; 1991.
- WEINSTEIN, M.R. - The International Register of Lithium Babies. *Drug Information J.*,  
10: 94-100; 1976.
- WEINSTEIN, M.R. & GOLDFIELD, M.D. - Administration of Lithium during pregnancy.  
In: Johnson FN, ed. *Lithium Research and Therapy*, 237-264; 1975.
- WEINSTEIN, M.R. & GOLDFIELD, M.D. - Lithium carbonate treatment during  
pregnancy (report of a case). *Dis. Nerv. Syst.*, 30:828-32; 1969.
- WEINSTOCK, M. - Alterations induced by gestational stress in brain morphology and  
behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.*, Dec;65(5):427-51; 2001.
- WEINSTOCK, M.; FRIDE, E.; HERTZBERG, R. - Prenatal stress effects on functional  
development of the offspring. *Progress in Brain Research*, 73:319-31; 1988.
- WEISSMAN, A.D. & CALDECOTT-HAZARD, S. - Developmental neurotoxicity to  
methamphetamines. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*,  
22:372-74; 1995.
- WILLNER, P - Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 45:425-  
55;1990.

- WORKEL, J.O.; OITZL, M.S.; LEDEBOER, A.; KLOET, R.E. – The brown Norway rat displays enhanced stress-induced ACTH reactivity at day 18 after 24h maternal deprivation at day 3. *Dev Brain. Res.* 103:199-203; 1997.
- ZALSTEIN, E.; XOREN, G.; EINARSON, T.; FREEDOM, R.M. – A case-control study on the association between first trimester exposure to lithium and Ebstein's anomaly. *Am. J. Cardiol*, 65:817-8; 1990.
- ZUCKERMAN, B.; BAUCHNER, H.; PARKER, S.; CABRAL, H. – Maternal depressive symptoms during pregnancy, and newborn irritability. *J. Dev. Behav. Pediatr.*, 11:190-4, 1990.