

Márcia Cristina Guimarães Guilherme

*Estudo do comportamento da prole de
ratas tratadas com lítio*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica – Márcia Cristina Guimarães Guilherme.

Campinas, 31 de janeiro de 2003.

Nancy Airolde Teixeira

Profa. Dra. Nancy Airolde Teixeira
- Orientadora -

Campinas, 2002

Márcia Cristina Guimarães Guilherme

*Estudo do comportamento da prole de
ratas tratadas com lítio*

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

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

Campinas, 2002

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G945e Guilherme, Marcia Cristina Guimarães
Estudo do comportamento da prole de ratas tratadas com lítio /
Márcia Cristina Guimarães Guilherme. Campinas, SP : [s.n.],
2002.

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

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

UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	UNICAMP
	G945e
V	EX
TOMBO BCI	54391
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/06/03
Nº CPD	

CM00184822-2

BIB ID 293806



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

Membros:

Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira

Profa. Dra. Vilma Aparecida Cavaglieri

Profa. Dra. Silvia Regina Secoli

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências

Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/03

*"Não basta ensinar ao homem uma especialidade,
porque se tornará assim uma máquina utilizável
e não uma personalidade.*

*É necessário que adquira um sentimento,
um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido,
daquilo que é belo,
do que é moralmente correto."*

Albert Einstein

À Deus, por ter iluminado e guiado meus passos até o final de mais

uma jornada;

*aos meus pais, Edgar e Marisa, meu porto seguro, porque eles são o
que são, com uma beleza encantadora que estou sempre a perguntar-me se*

dela há em mim;

às minhas queridas, Renata e Maria Eugênia, mais que

companheiras e amigas - minhas irmãs;

ao meu amor e marido, Luciano, meu grande incentivador, por tornar

tudo isto mais valioso.

Com amor, gratidão e um sorriso

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Em especial, quero agradecer:

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Nancy Airolti Teixeira pela sabedoria, compreensão única, dedicação e carinho aos seus alunos/filhos. Meu sincero agradecimento.

À minha companheira de jornada e amiga Aninha, pela cumplicidade e apoio neste caminho. Seguindo sempre juntas, lado a lado, alcançamos nosso objetivo.

Às professoras Dra. Vilma, Dra. Silvia, Dra. Elenice e Dra. Luciane pelas contribuições e sugestões.

Aos amigos do Laboratório de Psicofarmacologia - Jaqueline, Cristian, Marcelo e Fernanda - pelo respeito, troca de experiências e amizade.

Aos animais pelo auxílio imprescindível, a eles, minha eterna gratidão.

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

Aos professores, funcionários e amigos do departamento de Farmacologia da Unicamp, em especial ao Wanderlei da Cunha Claro e Luiz Eduardo Odoni, pela convivência e contribuição indispensável.

Ao FAPESP, pelo apoio financeiro.

À minha querida e, sempre amiga, Farina pela confiança e credibilidade.

Às minhas madrinhas amadas Maria Erci, Magali, Ada, Ana Maria, Sandra e Rosângela pelo amor e sentido que dão à minha vida.

À minha família: Antônio, Zilda, João, Cleonice, Ricardo, Esmeralda, Alexandre, Daniel, Cintia, Gabriela e Gabriel pelo carinho e agradável convivência.

A minha segunda família: Luiz, Madalena, Isael (em memória), Heide, Wladimir, Márcia, Wanderson, Wlady, Andréa, Juliana, Viviane, Maria Luíza e Ana Clara. A eles todo o meu afeto.

Sumário

<i>Lista de abreviaturas</i>	XXIII
------------------------------------	-------

<i>Lista de figuras</i>	XXV
-------------------------------	-----

<i>Lista de anexos</i>	XXXI
------------------------------	------

<i>Reagentes e procedência</i>	XXXIII
--------------------------------------	--------

<i>Resumo</i>	XXXV
---------------------	------

1. Introdução

1.1 <i>Transtorno afetivo bipolar</i>	37
---	----

1.2 <i>Tratamento do transtorno afetivo bipolar</i>	38
---	----

1.3 <i>Transtorno afetivo bipolar e gravidez</i>	40
--	----

1.4 <i>Toxicidade do lítio no período puerperal</i>	43
---	----

1.5 <i>Risco versus benefício do lítio no período puerperal</i>	46
---	----

1.6	<i>Aprendizagem e memória</i>	50
2.	<i>Objetivo</i>	54
3.	<i>Materiais e Métodos</i>	
3.1	<i>Ética experimental</i>	57
3.2	<i>Animais</i>	57
3.3	<i>Testes comportamentais</i>	
3.3.1	<i>Teste de campo aberto</i>	60
3.3.2	<i>Teste de fuga</i>	62
3.3.3	<i>Teste de esquiva ativa sinalizada</i>	64
3.3.4	<i>Teste de esquiva passiva</i>	66
3.4	<i>Análise estatística</i>	69
4.	<i>Resultados</i>	
4.1	<i>Teste de campo aberto</i>	72

4.2	<i>Teste de fuga</i>	76
4.3	<i>Teste de esquiva ativa sinalizada</i>	82
4.4	<i>Teste de esquiva passiva</i>	92
5.	<i>Discussão</i>	96
6.	<i>Conclusão</i>	105
7.	<i>Abstract</i>	107
8.	<i>Referências bibliográficas</i>	109
9.	<i>Anexos</i>	118

Lista de abreviaturas

Li ⁺	Lítio
SNC	Sistema Nervoso Central
ECT	Eletroconvulsoterapia
CA	Campo Aberto
EANS	Esquiva Ativa Não Sinalizada
EAS	Esquiva Ativa Sinalizada
EP	Esquiva Passiva
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
Grupo Sal	Grupo Salina
Grupo LiPré	Grupo Lítio Pré-Natal
Grupo LiPós	Grupo Lítio Pós-Natal
Grupo Li	Grupo Lítio

Lista de figuras

Figura 1A: Teste de campo aberto: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de centro	73
Figura 1B: Teste de campo aberto: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre a ambulação	74
Figura 1C: Teste de campo aberto: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o levantamento	75
Figura 2A: Teste de fuga: efeitos do tratamento com salina sobre o tempo de latência de fuga do grupo Sal (1°x6° bloco)	77
Figura 2B: Teste de fuga: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo LiPós (1°x6° bloco)	77
Figura 2C: Teste de fuga: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo LiPré (1°x6° bloco)	77
Figura 2D: Teste de fuga: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo Li (1°x6° bloco)	77
Figura 2E: Teste de fuga: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal, LiPós, LiPré e Li (1°x6° bloco)	79

Figura 2F: Teste de fuga: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (AUC em blocos)	80
Figura 2G: Teste de fuga: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (AUC em curvas)	81
Figura 3A: Teste de esquia ativa sinalizada: efeitos do tratamento com salina sobre o tempo de latência de fuga do grupo Sal (1º dia - 1ºx6º bloco; 1ºx2º dia - AUC)	84
Figura 3B: Teste de esquia ativa sinalizada: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo LiPós (1º dia - 1ºx6º bloco; 1ºx2º dia - AUC)	84
Figura 3C: Teste de esquia ativa sinalizada: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo LiPré (1º dia - 1ºx6º bloco; 1ºx2º dia - AUC)	84
Figura 3D: Teste de esquia ativa sinalizada: efeitos do tratamento com lítio sobre o tempo de latência de fuga do grupo Li (1º dia - 1ºx6º bloco; 1ºx2º dia - AUC)	84
Figura 3E: Teste de esquia ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (1º dia - 1ºx6º bloco)	86

Figura 3F: Teste de esquiva ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (1ºx2º dia - AUC)	87
Figura 3G: Teste de esquiva ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (1º dia – AUC em blocos)	88
Figura 3H: Teste de esquiva ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (1º dia – AUC em curvas)	89
Figura 3I: Teste de esquiva ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (2º dia – AUC em blocos)	90
Figura 3J: Teste de esquiva ativa sinalizada: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência de fuga dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (2º dia – AUC em curvas)	91
Figura 4A: Teste de esquiva passiva: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre o tempo de latência na caixa branca dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li (treino x teste)	93
Figura 4B: Teste de esquiva passiva: efeitos dos tratamentos com lítio e salina sobre a % de aprendizagem dos grupos Sal , LiPós , LiPré e Li	95

Lista de anexos

<i>Anexo 1:</i> Organograma de aprendizagem/memória	119
<i>Anexo 2:</i> Protocolo nº 311-1 da Comissão de Ética Experimental Animal – IB, UNICAMP	120
<i>Anexo 3:</i> Esquema experimental	121
<i>Anexo 4a:</i> Aparelho do teste de campo aberto	123
<i>Anexo 4b:</i> Arena do campo aberto com animal no centro	123
<i>Anexo 5:</i> Aparelho do teste de fuga	124
<i>Anexo 6:</i> Aparelho do teste de esquiva ativa sinalizada	125
<i>Anexo 7:</i> Aparelho do teste de esquiva passiva	126

Reagentes e procedência

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

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

Resumo

O lítio (Li^+) é comumente utilizado como agente estabilizador do humor no tratamento e profilaxia de pacientes com transtorno afetivo bipolar. Estudos recentes indicam que pacientes bipolares grávidas não devem ser orientadas a interromper o tratamento, pois a descontinuidade da administração do Li^+ pode levar à recorrência da doença e, conseqüentemente, ao aumento da taxa de suicídio. No entanto, o tratamento com Li^+ pode alterar o desenvolvimento comportamental das gerações descendentes na idade adulta, quando administrado durante o período puerperal. Investigamos o impacto da exposição perinatal ao cloreto de lítio sobre a exploração/emocionalidade, aprendizagem e memória nos descendentes de ratas em idade adulta. Ratas Wistar foram tratadas com solução de cloreto de lítio 10 mM ou cloreto de sódio, na mesma concentração, como única fonte de água durante todo o período perinatal. Após o nascimento, foi aplicada a adoção cruzada da metade das ninhadas, formando os seguintes grupos experimentais (N = 10 ninhadas/grupo): 1) **Sal** - Na^+ durante a gravidez e lactação; 2) **LiPós** - Na^+ durante a gravidez e Li^+ durante a lactação; 3) **LiPré** - Li^+ durante a gravidez e Na^+ durante a lactação; 4) **Li** - Li^+ durante a gravidez e lactação. Os resultados encontrados sugerem que o tratamento pré e pós-natal com Li^+ ocasiona um prejuízo da atenção/aquisição da aprendizagem em descendentes fêmeas na idade adulta.

Introdução

1.1 Transtorno afetivo bipolar

O transtorno afetivo bipolar consiste em alterações patogênicas do pensamento, do humor e do comportamento, originando desde dificuldades de adaptação social e sofrimento até reações incapacitantes que podem levar a morte. Também conhecido anteriormente como psicose maníaco-depressiva, esta patologia apresenta extremos opostos de um espectro afetivo, caracterizados por mania e depressão. A mania é um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado, expansivo ou irritável enquanto a depressão leva a um humor deprimido e a diminuição do interesse ou prazer em todas as atividades (STAHAL, 2000).

Qualificado por dois ou mais episódios de oscilação anormal do estado de humor, o transtorno afetivo bipolar é debilitante e afeta aproximadamente 1% da população. Desta forma, representa um sério problema de saúde pública, pois gera prejuízo no desempenho social ou ocupacional do indivíduo, com risco significativo de suicídio, principalmente quando associado a episódios depressivos. Cerca de 25 a 50% dos pacientes bipolares tentam o suicídio, pelo menos uma vez, e 15% realmente o cometem (SUPPES, DENNEHY, 2002). A frequência desta doença é similar para os gêneros porém, o índice de suicídio nas mulheres é duas a três vezes maior do que nos homens (PARRY, NEWTON 2001).

A evolução longitudinal da doença bipolar é caracterizada por freqüentes episódios recorrentes de depressão e mania que podem ocorrer simultaneamente, dando origem ao estado de humor misto. Além disto, o transtorno bipolar pode transformar-se em ciclagem rápida, com pelo menos quatro oscilações de humor entre mania e depressão, em um período de 12 meses, piorando o prognóstico da doença (STAHL, 2000).

As flutuações do humor se tornam mais freqüentes, mais graves e menos reativas aos medicamentos à medida que o tempo passa, principalmente se o tratamento for insuficiente ou inadequado (STAHL, 2000). Por isso, a estabilização dos transtornos bipolares é cada vez mais importante, não somente para o retorno dos pacientes ao bem-estar, como também para evitar a evolução crônica e caótica da doença a longo prazo.

1.2 Tratamento do transtorno afetivo bipolar

O estabilizador de humor lítio é o fármaco de escolha para o tratamento do transtorno bipolar, não apenas porque trata episódios agudos de mania, mas também por ser uma droga psicotrópica com efeito profilático comprovado na prevenção de futuros episódios da doença (JANICAK, WATANABE, 1998).

As formas farmacêuticas atualmente utilizadas são sólidas na forma e comprimidos ou cápsulas de carbonato de lítio e soluções líquidas de citrato

de lítio. Para os pacientes agudamente maníacos são preferidos os limites de 0,9 a 1,2 mEq por litro. Para uso a longo prazo, valores menores (0,4 a 0,8mEq/L) são considerados mais adequados e seguros, prevenindo o transtorno bipolar recorrente (CALIL, 1997). É necessária a individualização das doses de manutenção e profiláticas para se obter uma relação risco/benefício favorável, uma vez que o aumento das concentrações séricas de lítio desencadeia efeitos colaterais ascendentes.

O lítio possui uma margem de segurança pequena, na qual valores acima de 1,2mEq/L são relacionados à intoxicação. Desta forma, é essencial a freqüente monitoração da concentração plasmática dos níveis de lítio (JANICAK, WATANABE, 1998).

O uso crônico de lítio, em concentrações terapêuticas, melhora a qualidade de vida do paciente com, relativamente, poucos efeitos colaterais; este íon não é sedativo, depressor ou euforizante, diferente de outros agentes psicotrópicos. Além disso, o Li^+ demonstra um alto potencial redutor sobre o risco de suicídio (NIERENBERG, GRAY, GRANDIN, 2001; BALDESSARINI et al., 2002).

A descontinuidade do tratamento, principalmente de forma abrupta, pode contribuir para o excesso de recidivas precoces da doença ou para o desenvolvimento de ciclagem rápida levando a um aumento da morbidade e comportamento suicida (SUPPES et al., 1991; FAEDDA et al., 1993).

Assim, o lítio deve ser continuado por, no mínimo, vários meses após a recuperação plena do paciente, sendo possivelmente necessária a prorrogação indefinida do tratamento de manutenção (GOODWIN, JAMISON, 1990; TOHEN, WATERNAUX, TSUANG, 1990). A decisão clínica de prolongar o tratamento baseia-se no balanceamento entre a frequência e a gravidade dos episódios pregressos do transtorno bipolar, a idade e a aderência estimada do paciente ao tratamento (BALDESSARINI, FAEDDA, SUPPES, 1995).

As alternativas ou adjuntos mais bem sucedidos para o lítio, até o momento, são os anticonvulsivantes carbamazepina e ácido valpróico (ou seu sal sódico) que evidenciam atividade antimaníaca e estabilizadora do humor (SMALL, 1990). Esses agentes se tornam uma opção de tratamento para pacientes refratários à monoterapia com Li^+ (BEERS, BERKOW, 2000; STAHL, 2000).

Por fim, o tratamento bem sucedido do transtorno bipolar proporciona ao paciente o engajamento social, ocupacional e, principalmente, o retorno sadio ao ambiente familiar, com possibilidades reais de formação de família e geração de filhos.

1.3 Transtorno afetivo bipolar e gravidez

A gravidez e o parto são momentos de transformações fisiológicas, emocionais e sócio-familiares extremamente importantes para a vida da mulher. O

período puerperal é reconhecidamente uma fase crítica e de alto risco emocional, havendo um grande aumento de estresse e da ansiedade (MCGRATH, BUIST, NORMAN, 1999). Por isto, o transtorno afetivo bipolar pode manifestar-se pela primeira vez neste período ou, como parece ser mais freqüente, apresentar-se como agravamento ou recaída de episódios pregressos.

São cada vez mais claras e inequívocas as pesquisas sobre os efeitos danosos desta enfermidade manifestada durante a gravidez. A gestante bipolar apresenta uma acentuada diminuição dos cuidados pessoais, um abandono do pré-natal e do acompanhamento médico da impulsividade. Não raramente, ocorre o aumento do consumo de álcool e de outros psicotrópicos, além de aumentar drasticamente as chances da paciente cometer suicídio.

Estudos sugerem um relacionamento causal entre a manifestação de transtornos psicológicos maternos desde a gestação, e alterações no desenvolvimento físico e comportamental dos descendentes.

CHUNG et al. (2001) mostraram que as mulheres que tiveram sintomas depressivos acentuados durante o terceiro trimestre, apresentaram maior incidência de complicações obstétricas no parto. Observaram ainda que, as crianças dessas mães deprimidas eram também mais sujeitas às admissões em unidades de cuidados intensivos de recém nascidos.

A ocorrência de ambas formas de crises (maníacas e depressivas), durante a gestação, pode acarretar no aumento do número de filhos com prejuízo do estado cognitivo-afetivo, dificuldades de relacionamento interpessoal e até mesmo

condutas anti-sociais ou atos de delinquência (COHN, TRONICK, 1989; ZUCKERMAN et al., 1990).

Durante o pós parto, estima-se que as pacientes bipolares possuam risco de recorrência entre 20 a 70% (GOODNICK et al., 2000; VIGUERA et al., 2000). Estas mulheres podem desenvolver um quadro com sintomas psicóticos e, assim, comprometer profundamente seu relacionamento com o bebê. Os transtornos psíquicos da mãe podem levar a negligência física ou emocional, abuso e maus-tratos, muitas vezes, acarretando prejuízo irreversível ao neonato. O grau dessa negligência é diretamente proporcional à gravidade das condições psíquicas maternas.

A gravidez não só afeta o curso do transtorno bipolar, como também influi sobre a opção terapêutica escolhida. O objetivo principal do tratamento psiquiátrico da gestante é controlar a enfermidade sem ocasionar riscos ao feto. Para isto, obstetras e psiquiatras avaliam cuidadosamente qual o agente terapêutico mais seguro, o ajuste da dose necessária e do número de administrações diárias, a fim de assegurar o melhor resultado possível para a mãe e o bebê.

Os agentes anticonvulsivantes carbamazepina e ácido valpróico, administrados durante a gravidez, se mostram extremamente teratogênicos; apresentam atraso no desenvolvimento fetal, hipoplasia das unhas, defeitos craniofaciais menores e, sobretudo, estão associados ao risco de espinha bífida irreversível, o qual pode superar 1 por 100. Desta forma, o tratamento de

gestantes bipolares com estes agentes consiste em uma alternativa irracional (SCHOU, 1990).

O lítio, portanto, parece ser a terapia disponível mais adequada para pacientes bipolares na gravidez e no puerpério, quando necessária a prevenção de episódios recorrentes e redução da morbidade/mortalidade materna.

1.4 Toxicidade do lítio no período puerperal

Alguns medicamentos não são indicados durante a gravidez e amamentação, outros são indiferentes e, outros ainda, são extremamente indispensáveis. Com frequência, a medicação psicotrópica é necessária para o tratamento de transtornos emocionais durante o período puerperal. Porém, a possibilidade de efeitos tóxicos no feto deve ser avaliada cuidadosamente. O uso do estabilizador de humor lítio, neste período, vem sendo extensamente estudado, visto que a probabilidade da mulher engravidar durante a terapia crônica é maior do que durante o tratamento agudo.

O lítio atravessa a placenta facilmente, estando presente no feto em concentração praticamente equivalente àquela encontrada no sangue materno (LINDEN, RICH, 1983). Portanto, o feto é atingido diretamente por esta droga. Desta maneira, evitar a toxicidade da mãe é essencial para evitar a toxicidade fetal.

Mesmo assim, o uso de lítio em concentrações terapêuticas, na gestação, pode estar associado ao bócio neonatal, depressão do SNC, hipotonia e sopro cardíaco. Contudo, todas essas condições são revertidas com o tempo (LINDEN, RICH, 1983; PACKER, 1992).

Foi observado, também, que o uso de lítio no primeiro trimestre da gestação pode estar associado a um aumento da incidência de anomalias cardiovasculares do neonato, em especial a má formação de Ebstein (valva tricúspide mal formada, usualmente com um defeito septal) (KÄLLÉN, TANDBERG, 1983). Esta preocupação é provavelmente superestimada, pois baseia-se em relatos de protocolos do lítio que não consideravam fatores genéticos, interações com outras drogas, a idade da paciente ou complicações ocorridas durante a gravidez. Além disso, as doses de lítio utilizadas nestes estudos eram bem acima das usadas na clínica atualmente.

Estudos epidemiológicos, mais bem controlados, indicam que o risco de má formação cardiovascular fetal é muito menor que o que se pensava a princípio (COHEN et al., 1994; COHEN et al., 1995; ALTSHULER et al., 1996). Em particular, o risco basal de anomalia de Ebstein de cerca de 1 por 20.000 nascimentos vivos pode aumentar várias vezes, mas, provavelmente, não supera a 1 por 5.000. Outro fator relevante é que este defeito é detectável, em útero, por meio de ultra sonografia e, com frequência, é passível de correção cirúrgica.

No leite, o lítio tem sido encontrado em concentração entre 10 e 50% da concentração sérica materna (SCHOU, 1990). Os benefícios físicos e emocionais advindos da amamentação são notoriamente conhecidos para o recém nascido e para a mãe.

Porém, em se tratando de mãe sob a terapia a base de lítio, o aleitamento materno passa a ser um período de exposição adicional do lactente ao lítio, não sendo recomendado pela maioria dos autores (ROBINSON, STEWART, 1986; BEERS, BERKOW, 2000; ERNST, GOLDBERG, 2002). Esta exposição pode implicar em toxicidade neonatal, visualizada por letargia, hipotonia, taquicardia, cianose, e tremor crônico (PACKER, 1992).

A simples suspensão da amamentação reduz os níveis elevados de lítio no neonato e reverte este quadro rapidamente. Contudo, são desconhecidas as conseqüências neurotóxicas a longo prazo. Ainda são necessários maiores estudos avaliando um possível prejuízo no desenvolvimento comportamental temporário ou permanente do recém nascido, que aparecerá muito depois da droga cessar sua atividade.

Devido às alterações fisiológicas da gravidez, as doses de lítio devem ser cuidadosamente reajustadas com monitorização dos níveis plasmáticos mais freqüentes, a fim de evitar intoxicação ou ineficácia do tratamento. A excreção do lítio é feita quase que totalmente pelos rins.

Durante a gravidez, a filtração glomerular tem sua atividade aumentada, sendo necessário elevar as doses de Li^+ até o final da gestação (JACOBSON et al., 1992). A terapia deve ser descontinuada 2 a 3 dias antes da data esperada para o parto, objetivando diminuir as concentrações de lítio no organismo materno e no recém nascido. Esta providência previne o acúmulo de lítio causado por alterações no balanço eletrolítico durante o parto. O tratamento deve ser reintroduzido, imediatamente após o parto, para prevenir uma recorrência da doença bipolar neste período. Porém, durante a diurese pós parto, pode-se prever a retenção potencialmente tóxica de lítio pela mãe, sendo necessária a redução apropriada da dose (JACOBSON et al., 1992).

As pacientes também devem ser orientadas com relação a restrições dietéticas, exercícios ou uso de medicamentos que possam, de alguma maneira, alterar a ingestão ou excreção de sódio, uma vez que a reabsorção proximal de sódio e lítio nos rins é semelhante. Logo, nas situações em que há depleção de sódio, existe um aumento de retenção de lítio e possibilidade de intoxicação (JANICAK, WATANABE, 1998).

1.5 Risco versus benefício do lítio no período puerperal

Ao se pesar o risco *versus* o benefício do uso de lítio na gestação, é importante avaliar os prejuízos do distúrbio maníaco-depressivo não tratado e as

consequências do tratamento sobre o feto, considerando-se as propriedades teratogênicas estruturais dessa droga.

Cabe ressaltar a importância dos estudos referentes as possíveis alterações fisiológicas e comportamentais desta droga sobre os descendentes. O conhecimento que estes estudos adicionam permite avaliar de forma mais abrangente os riscos inerentes ao tratamento materno.

Uma primeira alternativa para evitar os efeitos deletérios do lítio sobre o feto seria considerar medidas conservadoras, como a de adiar a intervenção até que os sintomas apareçam, ou fazer uso de eletroconvulsoterapia (ECT).

Outra alternativa seria a suspensão da administração mediante a confirmação da gravidez. No entanto, a interrupção, principalmente de forma abrupta, pode expor a paciente a episódios maníaco-depressivos; dados recentes sugerem risco de recorrência em cerca de 50% das pacientes bipolares grávidas, após seis meses de retirada do lítio (VIGUEIRA, COHEN, 1998; VIGUEIRA et al., 2000).

A situação desafiadora na clínica encontra-se em mulheres com transtorno bipolar muito severo, com ciclagem rápida e episódios mistos, nas quais as medidas conservadoras são inviáveis e a interrupção da terapia com lítio inapropriada.

Nestes casos, as consequências negativas do transtorno afetivo bipolar poderiam exceder à toxicidade nos descendentes, uma vez que, a vida da mãe e

do feto poderiam estar comprometidas com aumento do risco de suicídio (COHEN et al., 1994). Por esse motivo, estas pacientes, muitas vezes, são orientadas a continuar o tratamento durante o período gestacional.

Esta orientação vem de encontro a estudos epidemiológicos recentes, os quais indicam que, a maioria das mulheres grávidas tratadas com lítio geram crianças livres de má formação congênita. (EDMONDS, OAKLEY, 1990; ZALSTEIN et al., 1990; JACOBSON et al., 1992).

Porém, este íon quando administrado durante o período puerperal, mesmo em doses terapêuticas, poderia influenciar o comportamento das gerações descendentes, independentemente da produção de alterações morfológicas. Tais estudos são, atualmente, escassos e foram realizados, em sua totalidade, utilizando animais de laboratório, devido as questões éticas e metodológicas implícitas aos estudos humanos.

Dentre os poucos estudos existentes (SECHZER et al., 1986; GLOCKNER, SCHWARZ, JAHNE, 1993; MESSIHA, 1993; TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a; VARRIANO, GUILHERME, TEIXEIRA, 2001) alguns demonstraram que a exposição de ratas ao Li^+ antes e durante a gestação e lactação, reduziu o peso ao nascer dos descendentes (SECHZER et al. 1986).

Foi observado, também, que o tratamento crônico das ratas com lítio (10mM, na água de beber que fornece níveis séricos equivalentes aos profiláticos

utilizados na clínica), no período pré e pós natal, reduziu a data de abertura do olho e o ganho de peso da prole (TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a).

Outro estudo (VARRIANO, GUILHERME, TEIXEIRA, 2001) demonstrou que o tratamento perinatal com lítio, nas doses profiláticas, não alterou a resposta comportamental, testada na prole em idade adulta, por meio dos testes de emocionalidade, depressão e ansiedade.

A neurotoxicidade dos sais de lítio ligada ao desenvolvimento foi, também, determinada em camundongos, amamentados por mães que ingeriram LiCl, durante o período puerperal (1mEq sérico). A toxicidade, observada por alterações no peso dos principais órgãos, mostrou ser dependente do tempo de exposição ao Li^+ e da variável sexo, sendo particularmente evidente nas fêmeas em desenvolvimento (MESSIHA, 1993).

GLOCKNER, SCHWARZ, JAHNE (1993) observaram que o tratamento com lítio, antes e durante a gravidez (20mM, na água de beber, nível sérico de 1mmol Li^+ /L), provocou um aumento da sensibilidade ao estresse nos descendentes de ratas de linhagens resistentes ao estresse (*Uje:WIST*). Este efeito foi evidenciado somente quando estes animais eram expostos ao estresse intenso durante as duas últimas semanas de gestação.

A teratogenia comportamental é um tema difícil de se investigar, pois variações no tempo de exposição à droga, dose utilizada, via e número de administrações contribuem para dificultar a interpretação dos resultados. Trata-se,

entretanto, de tema de suma importância, considerando-se o grande número de pacientes nas condições de risco.

Diante do exposto, nos interessou neste estudo, investigar o impacto do tratamento perinatal com lítio sobre o desenvolvimento cognitivo de aprendizagem e memória em proles de ratas.

1.6 Aprendizagem e Memória

Uma abordagem genérica sobre os tipos de aprendizagem, será aqui feita, para fundamentar a compreensão dos testes experimentais escolhidos.

O estabelecimento da memória e aprendizagem tem sido extensivamente estudado. Para o entendimento destes conceitos são definidos três fatores básicos: a aquisição, o armazenamento ou retenção e a evocação de informações. Uma das definições atuais de aprendizagem corresponde à aquisição de novos conhecimentos do meio e, como resultado desta experiência, ocorre a modificação do comportamento. A memória seria a retenção deste conhecimento que pode ser armazenado por curto ou longo prazo. Estes processos, em conjunto, conferem ao indivíduo os requisitos mínimos para sua adaptação ao meio em que vive.

Além disto, os mecanismos cerebrais da memória e aprendizagem estão intimamente associados aos processos neuronais responsáveis pela atenção, percepção, motivação e outros processos neuropsicológicos (BRANDÃO, 2000).

Desta forma, perturbações em qualquer um destes processos tendem a afetar, diretamente, a aprendizagem e a memória.

Teoricamente, podemos distinguir duas categorias de memórias: memória declarativa e não-declarativa ou de procedimento (Anexo 1). As memórias declarativas têm um caráter pouco palpável. São facilmente formadas e facilmente esquecidas, podendo resultar de pequenas modificações em sinapses que estão amplamente distribuídas em todo o cérebro (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002). Estas características tornam este tipo de memória difícil de ser estudada. Entretanto, as memórias de procedimentos são mais fáceis de serem investigadas pois, além de serem particularmente robustas, podem se formar ao longo de vias reflexas simples que ligam sensações a movimentos. O aprendizado de procedimentos envolve a aprendizagem de uma resposta motora (procedimento) em reação a um estímulo sensorial. Usualmente é dividido em dois tipos: aprendizado não-associativo e aprendizado associativo (Anexo 1).

O aprendizado não-associativo descreve a alteração no comportamento, em resposta a um único tipo de estímulo positivo ou negativo, como ocorre na sensitização. Conhecida, também, por pseudocondicionamento, a sensitização é um processo no qual o animal aprende a fortalecer seus reflexos defensivos, intensificando a resposta apreendida, acerca das propriedades de um reforço (BRANDÃO, 2000). Para avaliar este tipo de aprendizado, utilizamos o teste de fuga (TF), onde o animal recebe um estímulo aversivo (choque) e, como

consequência, desenvolve comportamentos defensivos (fuga). A aprendizagem da tarefa é configurada por meio da intensificação da resposta do sujeito experimental, observada por meio da diminuição da latência de fuga.

O aprendizado associativo, por sua vez, baseia-se na associação entre estímulos e envolve respostas mais complexas na execução da tarefa. Normalmente, subdivide-se em dois tipos: condicionamento clássico e condicionamento operante ou instrumental (Anexo 1).

O condicionamento clássico, também conhecido por condicionamento pavloviano (do fisiólogo *Ivan P. Pavlov*), ocorre quando um estímulo condicionado é apresentado antes de um estímulo incondicionado, gerando uma resposta condicionada. O animal passa a reagir ao estímulo condicionado como se fosse o próprio estímulo incondicionado (BRANDÃO, 2000). A resposta condicionada é o elemento aprendido durante a execução do experimento, representado pelo teste de esquiva ativa sinalizada (**EAS**).

O condicionamento operante ou instrumental baseia-se na probabilidade de ocorrência futura de uma resposta, quando ela é seguida de um estímulo significativo. O sujeito experimental aprende que um comportamento particular está associado a uma determinada consequência, ou seja, aprende a associar uma resposta com punição ou recompensa. Neste tipo de condicionamento os circuitos neurais envolvidos são considerados mais complexos que aqueles envolvidos no condicionamento clássico (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002).

Para a avaliação do condicionamento operante ou instrumental foi utilizado o teste de esquiva passiva (**EP**).

As bases neurais do aprendizado/memória são complexas porque envolvem diferentes estruturas do encéfalo que, acredita-se, estão envolvidas em cada tipo de memória (CAHILL, MACGAUGH, WEINBERGER, 2001). São inúmeros os fatores que podem comprometer o desenvolvimento destas estruturas cerebrais no feto, durante o período pré-natal. Vários estudos demonstram que a desnutrição (JAISWAL et al., 1999), estresse (MEEK, BURDA, PASTER, 2000), consumo de drogas como cocaína (MORROW, ELSWORTH, ROTH, 2002; INMAN-WOOD et al., 2000), etanol (MATTSON, SCHOENFELD, RILEY, 2001; ARONSON, HAGBERG, 1998), morfina (SLAMBEROVA et al., 2001) e nicotina (NARAYANAN et al., 2002) causam alterações da atividade cognitiva de aprendizagem/memória nos descendentes expostos prenatalmente.

Assim, investigamos se o lítio poderia fazer parte desta lista, com efeitos diretos sobre o feto e/ou causando adaptações fisiológicas na mãe, com repercussões negativas sobre a prole.

Objetivo

Avaliar o comportamento cognitivo de aprendizagem e memória, na idade adulta, de fêmeas descendentes de ratas tratadas com solução de LiCl 10mM durante o período pré, pós-natal ou ambos.

Material e Método

3.1. Ética experimental

O procedimento 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), protocolo nº311-1 (Anexo 2).

3.2. Animais

Foram utilizadas ratas nulíparas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando aproximadamente 200 gramas, fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Psicofarmacologia no departamento de Farmacologia à temperatura ambiente de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de 12h/claro e 12h/escuro tendo acesso a ração e água *ad libitum*.

As fêmeas foram isoladas em gaiolas individuais de polipropileno durante três dias para adaptação. A seguir, foram cruzadas com adultos machos de mesma espécie e idade, na proporção de 1:1, também durante três dias (Anexo 3).

Após este período, as fêmeas foram separadas dos machos e aleatoriamente divididas em dois grupos; o primeiro grupo, usado como controle, foi tratado com NaCl 10mM *ad libitum* durante toda a prenhez e lactação (**Sal**); o segundo, recebeu solução de LiCl 10 mM nas mesmas condições (**Li**) (Anexo 3). Tal procedimento fornece níveis séricos em torno de 0,5mEq/L, portanto dentro da faixa profilática utilizada na clínica (TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a).

No primeiro dia de vida pós-natal, fez-se a contagem das proles e o exame macroscópico para detecção de possíveis má formações estruturais externas. As ninhadas foram reduzidas a oito filhotes, sempre quatro machos e quatro fêmeas, sendo que, posteriormente, apenas as fêmeas foram utilizadas para estudo.

Em seguida realizou-se a adoção-cruzada das ninhadas. Neste procedimento metade das ninhadas do primeiro grupo (**Sal**) foi adotada por mães do segundo grupo (**Li**) resultando na formação do terceiro grupo (**LiPós**). Da mesma maneira, metade das ninhadas do grupo **Li** foi adotada por mães do grupo **Sal** formando, finalmente, o quarto grupo (**LiPré**). Em nenhum momento as soluções das mães foram trocadas. (Anexo - figura 3)

Após a adoção cruzada, seguiu-se o tratamento com as soluções de NaCl e LiCl até o desmame, realizado 22 dias após o nascimento dos filhotes. Deste modo, os seguintes grupos experimentais foram formados:

- a) **Sal**: 10 ninhadas expostas ao NaCl 10 mM durante toda a gestação e lactação;

- b) **LiPós**: 10 ninhadas expostas ao NaCl 10 mM durante a gestação e que receberam LiCl 10 mM durante a lactação;
- c) **LiPré**: 10 ninhadas expostas ao LiCl 10 mM durante a gestação e que receberam NaCl 10 mM durante a lactação;
- d) **Li**: 10 ninhadas expostas ao LiCl 10 mM durante toda a gestação e lactação.

Todos os grupos experimentais foram analisados na idade adulta, entre 77 e 85 dias. As avaliações comportamentais e cognitivas (emocionalidade/exploração, aprendizagem e memória) foram feitas através dos testes de campo aberto (**CA**), fuga (**TF**), esquiva ativa sinalizada (**EAS**) e esquiva passiva (**EP**). (Anexo 3)

Para evitar os efeitos da ninhada (ABBEY, HOWARD, 1973) foi sorteado apenas um filhote fêmea, por ninhada, para todos os testes desenvolvidos. Antes de cada teste, os animais foram isolados em gaiolas individuais por três dias e a avaliação foi feita sempre no período da tarde.

3.3 Testes comportamentais

Para a avaliação do desempenho cognitivo de aprendizagem e memória, na prole de ratos, foram utilizados os testes comportamentais de campo aberto (**CA**), fuga (**TF**), esquiva ativa sinalizada (**EAS**) e esquiva passiva (**EP**).

3.3.1. Teste de campo aberto

O teste do campo aberto (*open-field test*) consiste no teste animal mais simples para teste de exploração e emocionalidade. Caracteriza-se por expor ratos ou camundongos a um novo ambiente (arena) onde são analisadas medidas de exploração e indicadores de medo. Neste ambiente confrontam-se dois padrões de respostas ambíguas: a impulsividade, caracterizada pela necessidade de familiarizar-se com o território estranho e a ansiedade, configurada pelo desejo de escapar do desconhecido e imprevisível.

Equipamento

O teste de campo aberto (**CA**) 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 (Anexo 4a).

O aparelho todo é pintado na cor bege. Há no fundo desta arena, desenhado em linhas negras, 3 círculos concêntricos interceptados por 9 seguimentos de retas radiais ficando, portanto, o chão do aparelho subdividido em 19 regiões de áreas iguais (Anexo 4b). Circundando este sistema, há uma estrutura metálica a uma altura de 110 cm do piso do aparelho. Este sistema suporta duas lâmpadas de 110 watts cada e um cortinado de tule circular, de

Ao lado do aparelho é colocado um circulador de ar com o intuito de produzir um ruído de fundo constante que abafe possíveis ruídos externos à sala de teste, manter a temperatura do local e distribuir homogeneamente qualquer odor exalado.

Procedimento Experimental

O teste de campo aberto consistiu na colocação do animal no centro da arena, por 3 minutos, com as luzes acesas e o circulador de ar ligado (Anexo 4b). O cortinado de tule foi então fechado e registram-se:

1. a **ambulação**: avaliou-se a exploração horizontal, por meio da contagem do número de quadrantes invadidos pelo animal, com as quatro patas;
2. o **levantamento**: avaliou-se a exploração vertical do animal, por meio da contagem do número de vezes que este apoiou-se apenas nas patas traseiras e cheirou o ar;
3. o **tempo de centro**: avaliou-se o tempo que o animal leva para deixar o centro da arena em segundos.

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

3.3.2. Teste de fuga

O teste de fuga (TF) é utilizado para analisar a aprendizagem não associativa. Avalia-se a alteração do comportamento do animal a partir de um único estímulo incondicionado, representado por choques nas patas. A partir deste estímulo nocivo, o animal desenvolve comportamentos defensivos (fuga), o que configura a aprendizagem da tarefa.

Equipamento

O teste de fuga foi aplicado conforme descrito classicamente na literatura (VARRIANO et al., 2001; SECOLI, TEIXEIRA, 1998; TEIXEIRA, PEREIRA, HERMINI, 1995b). A caixa de choques do tipo “vai e vem” (*shuttle box*) utilizada corresponde a uma caixa de alumínio medindo 50 x 29 x 29 cm, com tampa e parede frontal de acrílico transparente. Internamente, a caixa é dividida em dois compartimentos iguais, separados por uma parede de alumínio onde há um orifício retangular (4,5 cm de altura e 6,0 cm de largura) localizado 8,0 cm acima do piso da caixa, o que permite a locomoção do animal de um compartimento para o outro (Anexo 5).

O piso é composto por barras de latão de 0,3 cm de diâmetro, distantes 1,0 cm entre si, por meio das quais os choques elétricos são ministrados usando mecanismo *scrambler*.

Cada compartimento possui duas fotocélulas, distando 6,0 cm uma da outra, que são sensíveis, por interrupção do feixe de luz, ao movimento do sujeito experimental. Desse modo, é possível registrar o tempo de travessia do animal de um compartimento para o outro, além da sua presença em um dado compartimento, a cada momento da sessão. É necessária a travessia do animal de um compartimento interno para outro para ser registrada uma resposta. Essas informações são dirigidas automaticamente ao aparelho de comando programável (ALBARSCH) que libera os choques na intensidade de 1,0mA.

Procedimento experimental

A sessão se iniciou com a colocação do animal em um dos compartimentos da caixa de choque. O aparelho gerador de choques foi programado para ministrar o primeiro choque após ter decorrido 3 minutos do início da sessão, a fim de que o animal pudesse se adaptar às condições da caixa e explorá-la.

Decorrido este tempo, um primeiro choque foi deflagrado através das barras de latão no assoalho da caixa. Os próximos choques foram ministrados sempre no compartimento em que se encontrava o animal, até um total de 30 choques. 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. O intervalo entre os choques foi randômico, variando entre 5 a 25 seg.

A resposta exigida do animal para o término do choque foi a travessia dos compartimentos. Registrou-se o tempo desde o início até o término de cada choque (latência de fuga). A latência foi registrada em 6 blocos de 5 tentativas e o tempo médio desta sessão foi de 14 minutos.

3.3.3 Teste de esQUIVA ativa sinalizada

O teste de esQUIVA ativa sinalizada (**EAS**) é utilizado para analisar a aprendizagem associativa por meio de um condicionamento clássico. Este teste envolve a associação entre um estímulo que evoca uma resposta mensurável e um segundo estímulo que, normalmente não evoca esta resposta. O primeiro tipo de estímulo é o choque nas patas, chamado de estímulo incondicionado porque leva à uma resposta que não necessita de treino ou condicionamento, ou seja, a fuga do choque. O segundo tipo de estímulo é o som de uma campainha, chamado de estímulo condicionado porque este requer condicionamento para produzir a mesma resposta do animal (fuga). Neste teste, o estímulo condicionado (som) é apresentado antes do estímulo não condicionado (choque nas patas). Se o animal atravessar a barreira entre os compartimentos durante a vigência do som da campainha, a liberação do choque é evitada.

Equipamento

O teste de esquivas ativa sinalizada foi realizado conforme descrito na literatura (RADWANSKA et al., 2002). 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, teste “vai e vem”. O piso é composto por barras de latão de 0,3 cm de diâmetro, distando 1.0 cm entre si, por meio das quais os choques elétricos são ministrados com mecanismo *scrambler* (Anexo 6).

A caixa é dividida em dois compartimentos iguais, separados por uma barreira de madeira de 3,0 cm de altura acima das barras de latão.

Cada compartimento possui 2 fotocélulas, distando 6,0 cm uma da outra, que são sensíveis, por interrupção de feixe de luz, ao movimento do sujeito experimental. Desse modo, é possível registrar o tempo de travessia do animal de um compartimento para o outro e registrar também sua presença no compartimento em que o mesmo se localizar 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, uma campainha com duração de 5 segundos, frequência de 1,5 KHz e volume de 6db é acionada.

Procedimento experimental

A sessão se iniciou com a colocação do animal em um dos compartimentos da caixa de choque. Após 3 minutos de exploração e adaptação, uma campainha

foi emitida. Imediatamente a seguir, o primeiro choque foi deflagrado através das barras de latão; os choques foram ministrados sempre no compartimento em que se encontrava o animal, até um total de 30 choques. O som da campainha sempre precedia os choques com intervalos randômicos, variando entre 5 a 25 segundos.

As latências de fuga foram registradas em 6 blocos de 5 tentativas. O tempo médio desta sessão foi de 14 minutos.

No dia seguinte, 24 horas após a primeira exposição ao teste de EAS, os animais foram submetidos a mais uma sessão de teste para a avaliação da retenção e evocação das informações apreendidas no dia anterior.

3.3.4. Teste de esquiva passiva

O teste de esquiva passiva (EP) é utilizado para analisar a aprendizagem associativa por meio de um condicionamento operante. Este aprendizado associa uma resposta condicionada com a prevenção de um estímulo nocivo.

O animal deve demonstrar sua aprendizagem de maneira passiva, por meio da permanência em um ambiente hostil (resposta condicionada) evitando, assim, a liberação de choque nas patas (estímulo nocivo).

O teste de EP é um teste comportamental extremamente sensível; o sujeito experimental deve, não somente, apresentar íntegras as áreas cerebrais envolvidas na aprendizagem, retenção e evocação da memória mas também ter

pleno controle da atenção, concentração e atividade motora. A acuidade deste teste possibilita a detecção de alterações comportamentais sutis decorrentes de transtornos relacionados às funções cognitivas como o déficit de atenção, hiperatividade e impulsividade.

Equipamento

O teste de esquiva passiva (EP) foi efetuado conforme descrito por ZARRINDAST et al. (2002). A *shuttle box* utilizada corresponde a uma caixa de madeira medindo 51 x 22 x 28 cm, sendo dividida em duas câmaras de mesmo tamanho, separadas por uma parede divisória onde há uma passagem medial medindo 4,5 cm de altura e 6,0 cm de largura; esta passagem é fechada por uma porta em guilhotina e permite a locomoção do animal de um compartimento para o outro (Anexo7).

A primeira câmara, de dimensões 30 x 24 x 24 cm, é revestida completamente de material impermeável branco (fórmica) e aberta superiormente. É iluminada por uma lâmpada de 60 watts, situada aproximadamente à 40cm de altura do piso, fornecendo uma intensidade luminosa correspondente a 157 *foot candles* ou 1.689 *lux*. O piso é facilmente removido para a limpeza.

A outra câmara é de mesma dimensão porém pintada completamente de cor preta. Também possui uma abertura superior que permanece fechada, durante todo o experimento, para impedir a entrada de luminosidade. Seu piso consiste de barras de aço inoxidável de 3 mm de diâmetro com intervalos de 1,5 cm entre uma barra e outra. Estas barras são ligadas a uma fonte geradora de choques de

intensidade e duração variáveis. O disparo e término dos choques são controlados pelo experimentador.

Em nossos experimentos, padronizaram-se choques de intensidade 1,0 mA, com duração de 1 segundo, e intervalos de 0.5 segundos entre os choques.

Procedimento Experimental

1. Treino:

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

Assim que o animal entrou na câmara escura, a porta foi novamente fechada e a fonte de choques 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.

Logo após, o animal foi retirado da caixa escura e recolocado em sua gaiola no biotério. Antes da passagem do animal pelo aparelho, o piso da câmara clara e as barras da câmara escura foram limpos com papel toalha umedecido em álcool 70%, para a remoção das fezes e urina deixados pelo animal precedente.

2. Teste:

Esta sessão foi realizada 24 horas após a sessão anterior. O animal foi colocado novamente na câmara clara e, após 10 segundos, a porta em guilhotina foi aberta. Cronometrou-se o tempo que o animal levou para entrar com as quatro patas na câmara escura (latência de teste, em segundos). Durante o teste o animal nunca recebeu choques. A porcentagem de aprendizagem foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Aprendizagem (\%)} = \frac{\text{tempo na câmara clara}}{180} \times 100 ;$$

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

3.4 Análise estatística

As análises comportamentais foram avaliadas por meio do *software* estatístico *GraphPad Instat*. Efetuaram-se:

- 1) análises não paramétricas: 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.

- 2) análises paramétricas: 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. Na comparação das variáveis de um mesmo grupo em tempos diferentes, utilizamos o Test – t pareado.

Os valores de probabilidade (p) foram considerados:

- a) não significantes: se maiores que 0,05;
- b) significantes: se menores que 0,05;
- c) muito significantes: se menores que 0,001 e
- d) extremamente significantes: se menores que 0,0001.

Resultados

4.1 Teste de campo aberto

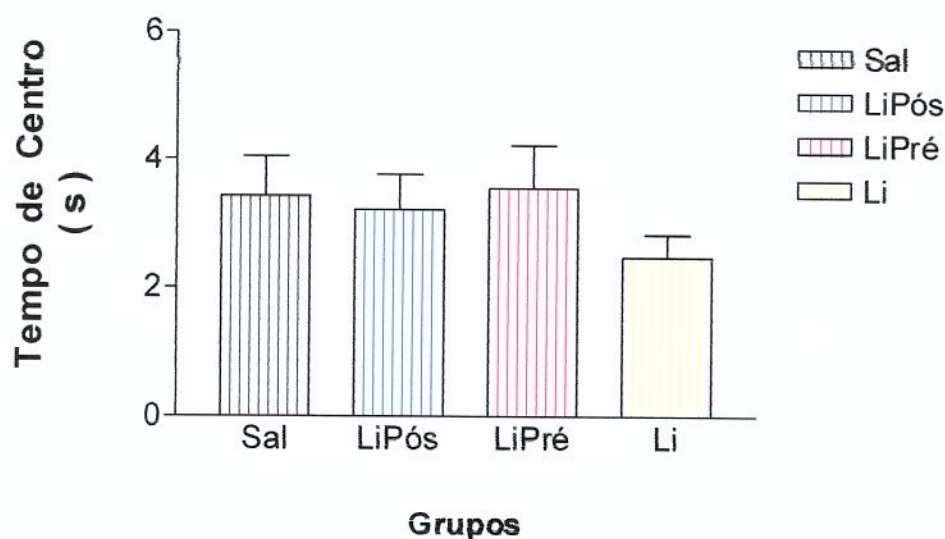
O teste de campo aberto (**CA**) analisou medidas de exploração e emocionalidade em ratas na idade adulta.

Os grupos submetidos ao tratamento pré e pós natal com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) foram comparados ao grupo controle, tratado durante toda a prenhez e lactação com NaCl (**Sal**). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em quaisquer das medidas analisadas: tempo de centro, ambulação e levantamento.

Os resultados revelaram comportamento emocional e de exploração semelhante entre os grupos analisados (Figuras 1A, 1B e 1C).

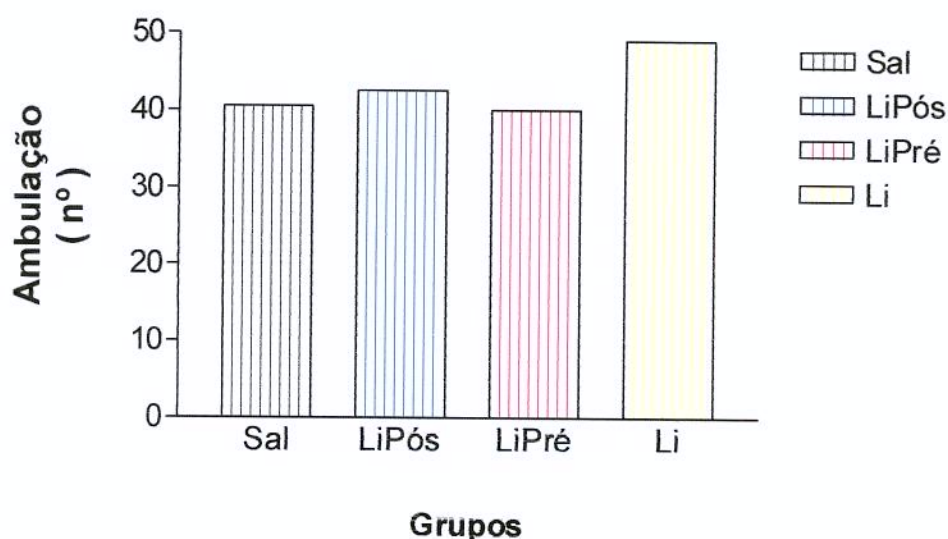
Figura 1A: Tempo de centro (em segundos) no teste de campo aberto,

segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



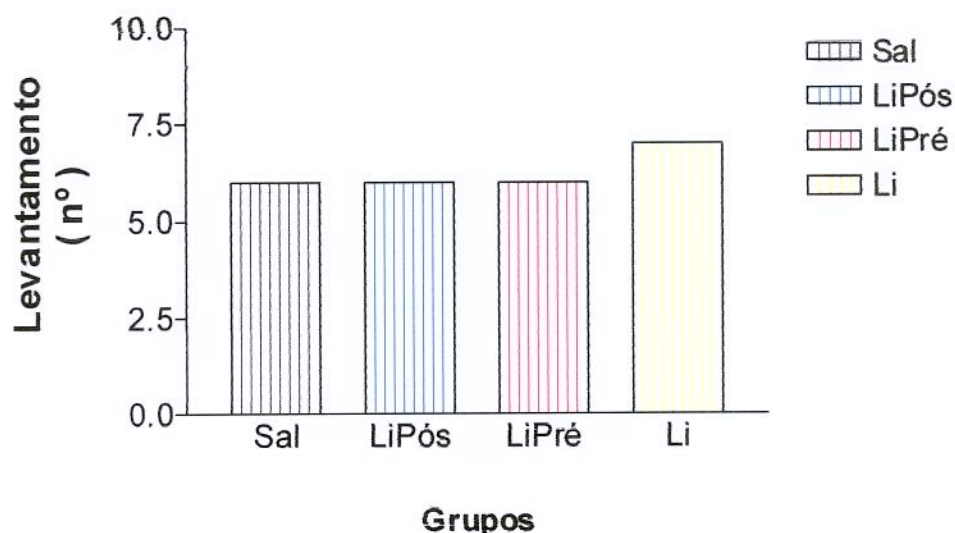
Por meio da figura 1A, pode-se observar que o tempo de centro do grupo tratado com NaCl 10 Mm durante toda prenhez e lactação (**Sal**) foi de 3,4 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de tempo de centro, respectivamente de 3,2; 3,5 e 2,5 segundos. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M. para 10 fêmeas por grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os grupos tratados com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) em relação ao grupo **Sal** (ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p=0,5302$).

Figura 1B: Número de ambulação no teste de campo aberto, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 1B, o número de ambulações do grupo tratado com NaCl 10 mM durante toda prenhez e lactação (**Sal**) foi 40,5. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de ambulação, respectivamente de 42,5; 40,0 e 49,0. Os valores são representados pela mediana de 10 fêmeas por grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os grupos tratados com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) em relação ao grupo **Sal** (Kruskal-Wallis e teste de Dunn's, $p=0,1303$).

Figura 1C: Número de levantamento no teste de campo aberto, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Pode-se observar, na figura 1C, que o número de levantamentos do grupo tratado com NaCl 10 Mm durante toda prenhez e lactação (**Sal**) foi 6,0. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de levantamento, respectivamente de 6,0; 6,0 e 7,0 segundos. Os valores são expressos como mediana de 10 fêmeas por grupo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os grupos tratados com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) em relação ao grupo **Sal** (Kruskal-Wallis e teste de Dunn's, $p=0,5525$).

4.2 Teste de fuga

O teste de Fuga (TF) analisou a resposta de fuga subsequente a um estímulo não condicionado.

Os grupos submetidos ao tratamento pré e pós natal com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) e o grupo **Sal** demonstraram a retenção de uma aprendizagem não associativa de curto prazo (Test-t pareado, 1° x 6° bloco: **Sal**, **LiPós** e **LiPré**: *** $p < 0,0001$ e **Li**: *** $p = 0,0003$; figura 2E).

Os resultados revelaram um desempenho de aprendizagem semelhante entre os grupos estudados; não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na execução da tarefa (ANOVA e Student-Newman-Keuls, AUC, $p = 0,0747$; figuras 2F e 2G).

Figuras 2A, 2B, 2C e 2D: Curvas da latência de fuga (em segundos), no

teste de fuga, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.

Figura 2A

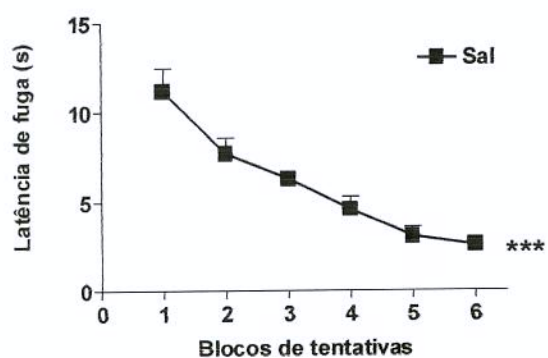


Figura 2B

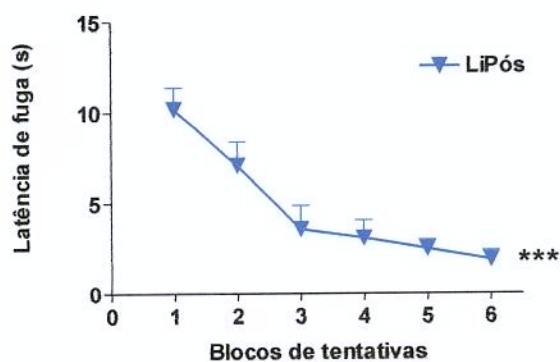


Figura 2C

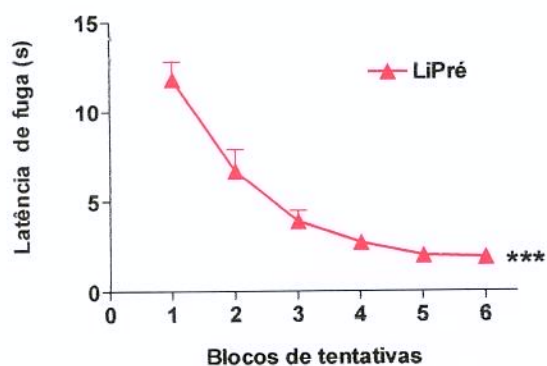
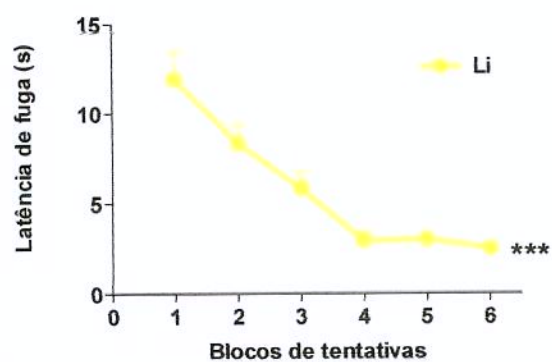


Figura 2D

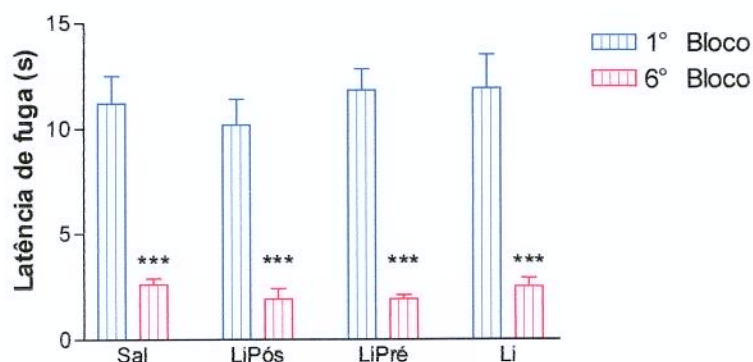


Por meio das figuras 2A, 2B, 2C e 2D, pode-se observar as curvas representativas da latência de fuga, no teste de fuga, dos grupos tratados com NaCl 10mM durante a prenhez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante toda gravidez e lactação (**Li**).

Cada bloco representa a média $\pm$ E.P.M de 5 tentativas para 10 fêmeas por grupo. (Test-t pareado, 1° x 6° bloco; **Sal**, **LiPós** e **LiPré**: ***p< 0,0001 e **Li**: ***p=0,0003).

Figura 2E: Latência de fuga (em segundos), no teste de fuga, segundo os

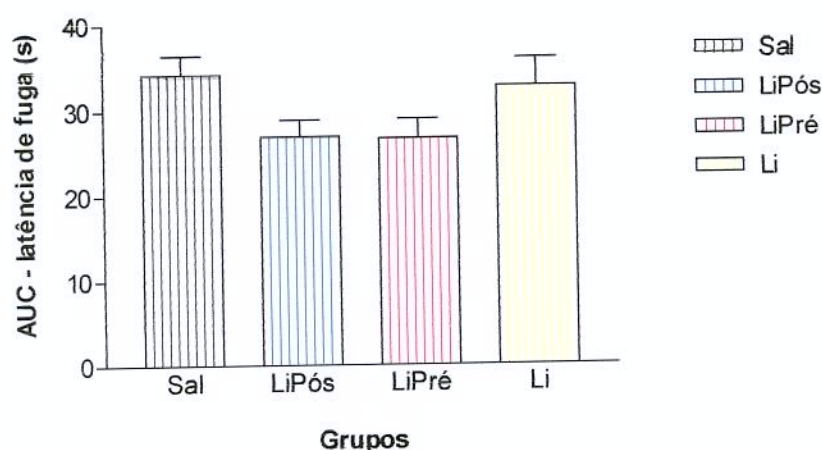
grupos de animais. Campinas, 2002.



Através da figura 2E, visualiza-se que o grupo tratado com NaCl 10 mM durante toda prenhez e lactação (**Sal**) apresentou latência de fuga de 11,2 segundos, no 1° bloco, e 2,6 segundos no 6° bloco. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de latência no 1° e 6° bloco, respectivamente de: **LiPós** - 10,2 e 1,9; **LiPré** - 11,8 e 1,9; e **Li** - 11,9 e 2,5 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. Ocorreu uma redução da latência no decorrer da sessão; test-t pareado encontrou diferença estatisticamente significativa entre o primeiro e o sexto bloco de cada grupo analisado (**Sal**, **LiPós** e **LiPré**: *** $p < 0,0001$ e **Li**: *** $p = 0,0003$). Os resultados revelaram a retenção da aprendizagem não associativa e de curto prazo para todos os animais.

Figura 2F: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no teste

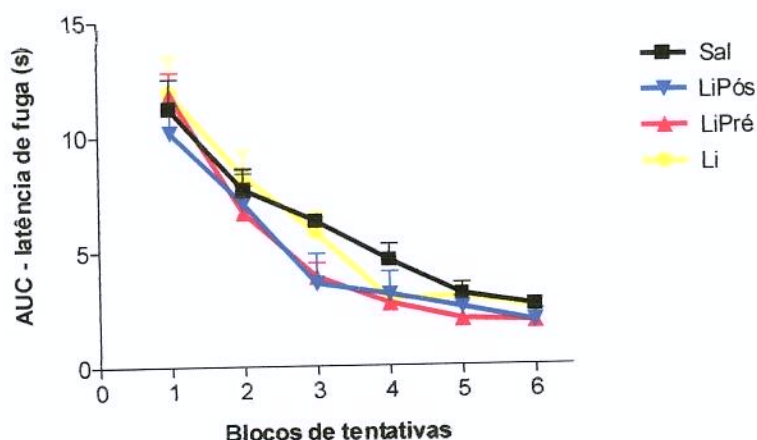
de fuga, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 2F, a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 34,3 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 26,9; 26,7 e 32,8 segundos. Cada bloco representa a média $\pm$ E.P.M de 5 tentativas para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,0747$). Os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa e de curto prazo entre os grupos analisados.

Figura 2G: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no teste

de fuga, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Por meio da figura 2G, pode-se observar que a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 34,3 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 26,9; 26,7 e 32,8 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,0747$). Os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa e de curto prazo entre os grupos analisados.

4.3 Teste de esquiva ativa sinalizada

O teste de esquiva ativa sinalizada (**EAS**) analisou a resposta de fuga subsequente a um estímulo condicionado.

Os grupos submetidos ao tratamento pré e pós natal com LiCl (**LiPós**, **LiPré** e **Li**) e o grupo **Sal**, tratado com NaCl durante toda a prenhez e lactação, demonstraram a retenção de uma aprendizagem associativa de curto prazo (Test – t pareado, 1° x 6° bloco; **Sal**: *p=0,0269; **LiPós**: *p=0,0159; **LiPré**: *p=0,0348 e **Li**: **p=0,0018; figura 3E).

Todos os grupos conseguiram armazenar e evocar as informações apreendidas no dia anterior (Test – t pareado, 1° x 2° dia, AUC; **Sal**: +++p=0,0004, **LiPós**: ++p=0,0026, **LiPré**: +p=0,0197 e **Li**: +++p=0,0004; figura 3F). Não houve diferença estatisticamente significativa na execução das tarefas no primeiro dia (ANOVA e Student-Newman-Keuls, AUC, p=0,8298; figuras 3G e 3H) e no segundo dia (ANOVA e Student-Newman-Keuls, AUC, p=0,6402; figuras 3I e 3J) entre os grupos analisados.

O grupo tratado com LiCl, durante a prenhez e lactação (**Li**), aprendeu a tarefa de fuga, demonstrado através de uma redução da latência no decorrer da sessão no primeiro dia de teste (Test-t pareado, 1° x 6° bloco, **p=0,0018; figura 3E).

No entanto, estes animais parecem ter uma dificuldade adicional em entender a tarefa de esquiva, necessitando de uma maior exposição ao teste comportamental. O grupo controle (**Sal**) e os animais expostos ao LiCl em apenas um período perinatal (**LiPós** e **LiPré**) iniciaram a aprendizagem da tarefa no segundo bloco de tentativas. O grupo **Li** apresentou um retardo na aprendizagem, caracterizado pelo aparecimento do pico da curva somente no terceiro bloco de tentativas (figura 3D).

Figuras 3A, 3B, 3C e 3D: Curvas da latência de fuga (em segundos), no

1º e 2º dia do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.

Figura 3A

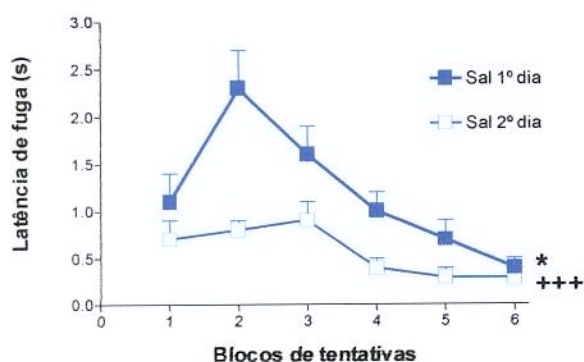


Figura 3B

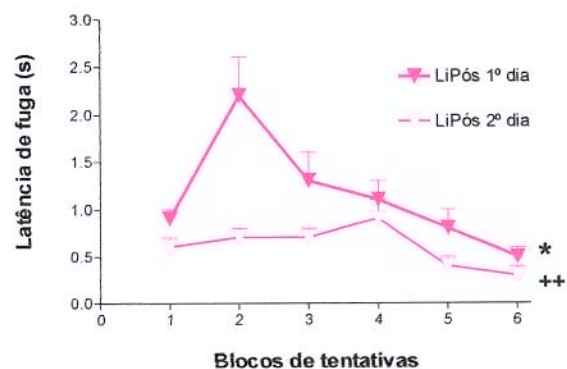


Figura 3C

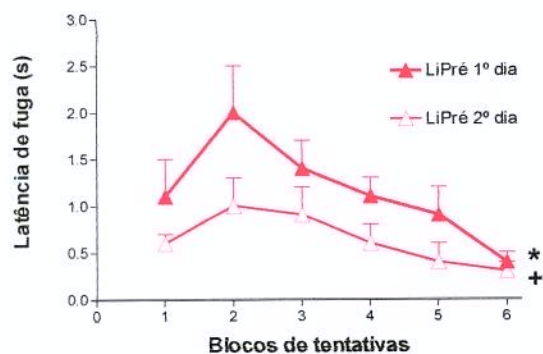
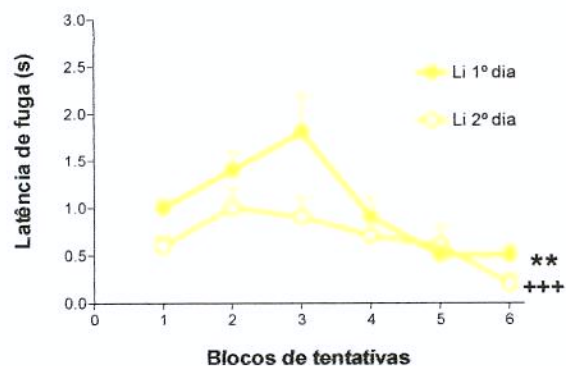


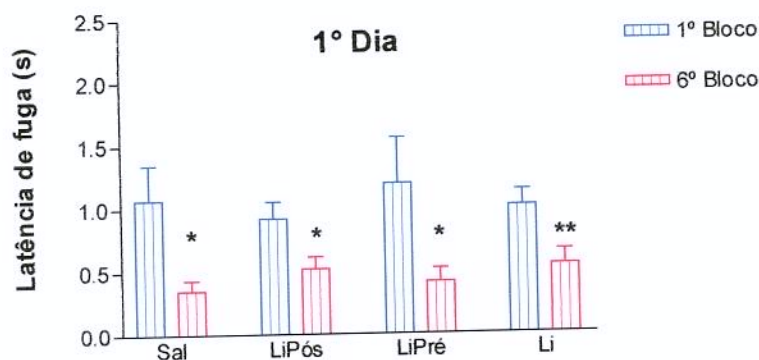
Figura 3D



Através das figuras 3A, 3B, 3C e 3D, é possível visualizar as curvas representativas da latência de fuga dos animais, no primeiro e segundo dia do teste de esquiva ativa sinalizada. Foram analisados os grupos tratados com NaCl 10mM, durante a prenhez e lactação (**Sal**), ou LiCl 10 mM, durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante toda gravidez e lactação (**Li**). Cada bloco representa a média $\pm$ E.P.M de 5 tentativas para 10 fêmeas por grupo. (Test – t pareado, 1° x 6° bloco, 1° dia; **Sal**: *p=0,0269; **LiPós**: *p=0,0159; **LiPré**: *p=0,0348 e **Li**: **p=0,0018). (Test – t pareado, AUC, 1° x 2° dia; **Sal**: ***p=0,0004; **LiPós**: **p=0,0026; **LiPré**: +p=0,0197 e **Li**: ***p=0,0004).

Figura 3E: Latência de fuga (em segundos), no 1º dia do teste de esQUIVA

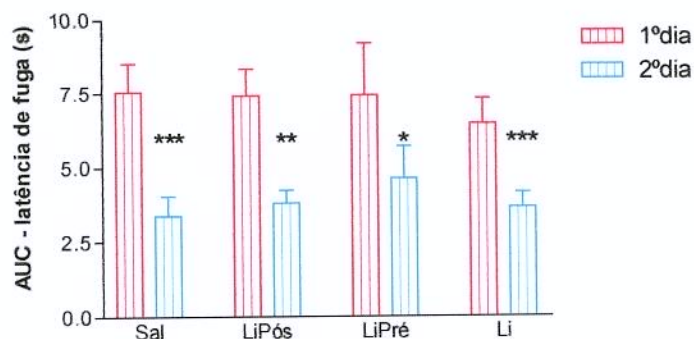
ativa sinalizada, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 3E, o grupo tratado com NaCl 10 mM durante toda prenhez e lactação (**Sal**) apresentou latência de fuga de 1,1 segundos, no 1º bloco, e 0,4 segundos no 6º bloco. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de latência no 1º e 6º bloco, respectivamente de: **LiPós** - 0,9 e 0,5; **LiPré** - 1,2 e 0,4; e **Li** - 1,0 e 0,5 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. Ocorreu uma redução da latência no decorrer da sessão; test-t pareado encontrou diferença estatisticamente significativa entre o primeiro e o sexto bloco de cada grupo analisado (**Sal**: * $p=0,0269$; **LiPós**: * $p=0,0159$; **LiPré**: * $p=0,0348$ e **Li**: ** $p=0,0018$). No primeiro dia, os resultados revelaram a retenção da aprendizagem não associativa e de curto prazo de todos os grupos estudados.

Figura 3F: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no 1º e 2º

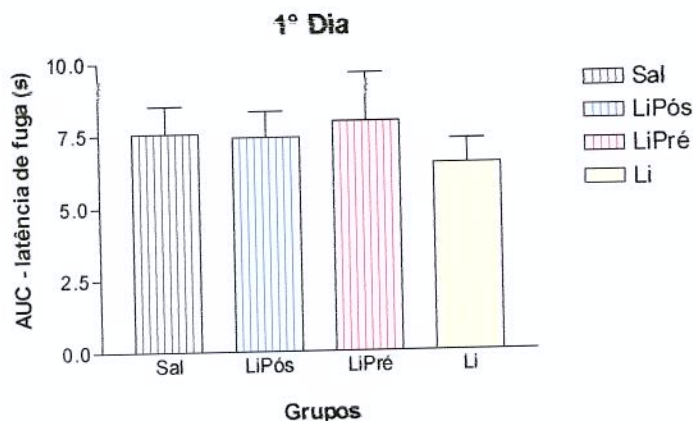
dia do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Por meio da figura 3F, pode-se observar que a latência de fuga, no teste de esquiva ativa sinalizada, do grupo tratado com NaCl 10mM durante a prenhez e lactação (**Sal**) foi de 7,5 segundos, no 1º dia, e 3,4 segundos no 6º bloco. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de latência no 1º e 6º bloco, respectivamente de: **LiPós** – 7,4 e 3,8; **LiPré** – 7,4 e 4,6; e **Li** – 6,5 e 3,6 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. Ocorreu uma redução da latência no decorrer da sessão; test-t pareado, realizado na área sob a curva (AUC), revelou diferença estatisticamente significativa entre o primeiro e o segundo dia de cada grupo (**Sal**: *** $p=0,0004$; **LiPós**: ** $p=0,0026$; **LiPré**: * $p=0,0197$ e **Li**: *** $p=0,0004$). Todos os animais analisados revelaram um desempenho eficaz na retenção e evocação das informações adquiridas no primeiro dia de exposição ao teste.

Figura 3G: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no 1º dia

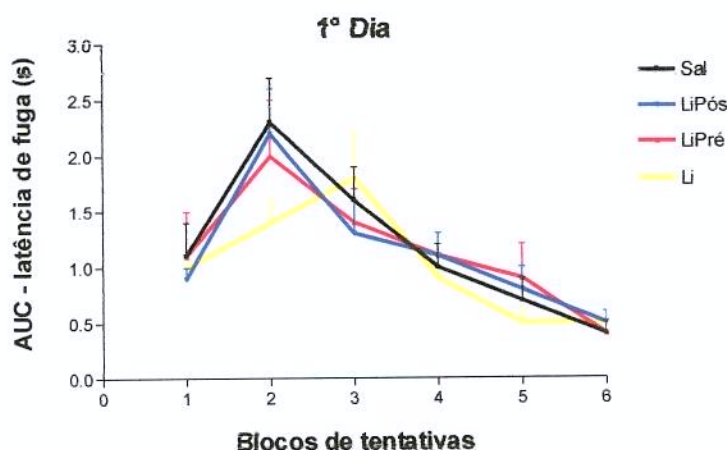
do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 3G, a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 7,5 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 7,4; 7,9 e 6,5 segundos. Cada bloco representa a média $\pm$ E.P.M de 5 tentativas para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,8298$). No primeiro dia de exposição ao teste, os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa e de curto prazo entre os grupos analisados.

Figura 3H: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no 1º dia

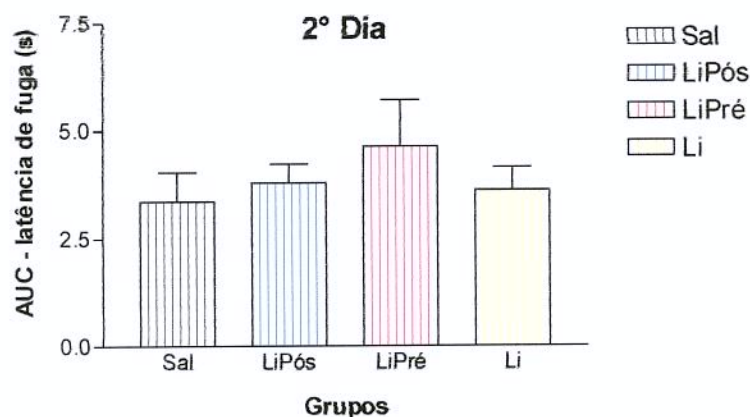
do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Por meio da figura 3H, pode-se observar que a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 7,5 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 7,4; 7,9 e 6,5 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,8298$). No primeiro dia de exposição ao teste, os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa de curto prazo entre os grupos analisados.

Figura 3I: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no 2º dia

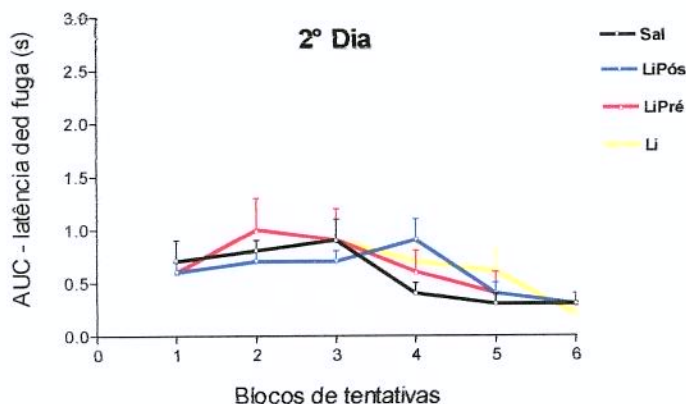
do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 3I, a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 3,4 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 3,8; 4,6 e 3,6 segundos. Cada bloco representa a média $\pm$ E.P.M de 5 tentativas para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,6402$). No segundo dia de exposição ao teste, os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa e de curto prazo entre os grupos analisados.

Figura 3J: Área sob a curva da latência de fuga (em segundos), no 2º dia

do teste de EAS, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Por meio da figura 3J, pode-se observar que a área sob a curva (AUC) da latência de fuga do grupo tratado com NaCl 10 Mm, durante toda prenhez e lactação (**Sal**), foi de 3,38 segundos. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de AUC, respectivamente de 3,8; 4,6 e 3,6 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo. ANOVA e Student-Newman-Keuls, realizado na área sob cada curva (AUC), não revelaram diferenças significantes para os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** em relação ao grupo controle **Sal** ($p=0,6402$). No segundo dia de exposição ao teste, os resultados revelaram um desempenho semelhante na aprendizagem não associativa e de curto prazo entre os grupos analisados.

4.4 Teste de esquiva passiva

O teste de esquiva passiva (**EP**) analisou a aprendizagem de novas informações e a capacidade do animal em controlar a atenção e a atividade motora. Avaliou-se a resposta comportamental dos grupos tratados com NaCl 10mM durante a prenhez e lactação (**Sal**) ou LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante toda a gravidez e lactação (**Li**).

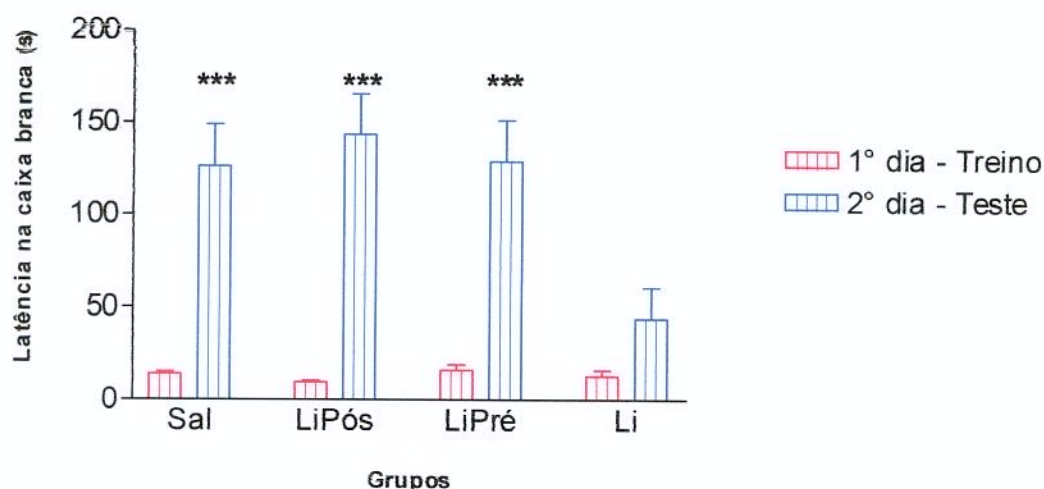
No dia treino, os grupos **LiPós**, **LiPré** e **Li** não apresentaram diferença significativa entre o tempo no lado claro da caixa de esquiva em relação ao grupo **Sal** (ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p=0,3093$; figura 4A).

Os grupos **Sal**, **LiPós** e **LiPré** demonstraram um desempenho eficaz na aprendizagem associativa (Teste-t pareado, treino x teste; **Sal**: *** $p=0,0009$; **LiPós**: *** $p=0,0002$, **LiPré**: *** $p=0,0006$; figura 4A).

O grupo **Li** revelou menor latência no lado claro da caixa de esquiva no dia teste (Test-t pareado, treino x teste, $p=0,1080$; figura 4A). Também apresentou diferença de aprendizagem em relação ao grupo **Sal** (ANOVA e Student-Newman-Keuls, ** $p=0,0075$; figura 4B). Esses resultados revelaram uma alteração comportamental possivelmente relacionada a uma desatenção, baixo controle de impulso e/ou hiperatividade dos animais.

Figura 4A: Latência na caixa branca (em segundos), no 1º e 2º dia do

teste de esquiva passiva, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



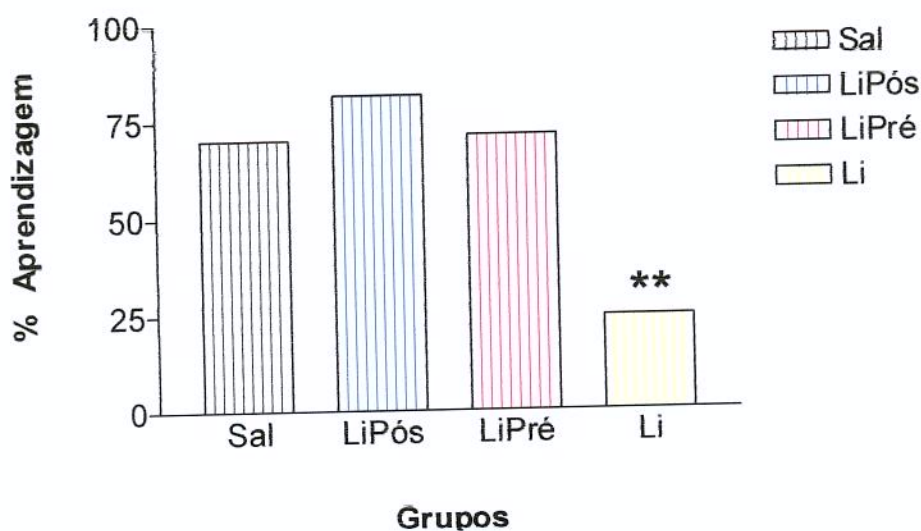
Por meio da figura 4A, pode-se observar que a latência na caixa branca, no teste de esquiva passiva, do grupo tratado com NaCl 10mM, durante a prenhez e lactação (**Sal**), foi de 13,9 segundos, no dia treino, e 126,3 segundos no dia teste. Os grupos tratados com LiCl 10 mM durante a lactação (**LiPós**), durante a prenhez (**LiPré**) e durante toda a prenhez e lactação (**Li**) obtiveram valores de latência no dia treino e teste, respectivamente de: **LiPós** – 9,5 e 143,5; **LiPré** – 16,0 e 128,8; e **Li** – 12,9 e 43,9 segundos. Os valores são expressos como média $\pm$ E.P.M para 10 fêmeas por grupo nos dias treino e teste.

No dia treino, todos grupos analisados manifestaram comportamento de exploração e fuga semelhante (ANOVA e Student-Newman-Keuls, $p=0,3093$). Test-t pareado revelou diferença entre os dias treino e teste dos grupos **Sal** ($***p=0,0009$), **LiPós** ($***p=0,0002$) e **LiPré** ($***p=0,0006$) o que demonstra um desempenho eficaz na aprendizagem associativa desses animais.

O grupo **Li** não apresentou retenção de aprendizagem na tarefa de esquiva passiva (Test-t pareado, treino x teste, $p=0,1080$).

Figura 4B: Determinação da aprendizagem (em porcentagem), do teste

de esquiva passiva, segundo os grupos de animais. Campinas, 2002.



Conforme observado na figura 4B, a porcentagem de aprendizagem, no teste da esquiva passiva, do grupo tratado com NaCl 10mM, durante a prenhez e lactação (**Sal**), foi de 70,1%. Os grupos tratados com LiCl 10 mM, durante a lactação (**LiPós**), durante a gravidez (**LiPré**) e durante toda a gravidez e lactação (**Li**) obtiveram valores de aprendizagem, respectivamente de: 81,6; 71,4 e 24,4. Os valores estão expressos como média para 10 fêmeas por grupo no dia teste. O grupo **Li** apresentou diferença estatisticamente significativa da porcentagem de aprendizagem em relação ao grupo **Sal** (ANOVA e Student-Newman-Keuls, $**p=0,0075$).

Discussão

A necessidade do tratamento psiquiátrico em pacientes bipolares grávidas decorre da avaliação dos efeitos da ansiedade e da depressão sobre a evolução da gravidez, do parto, do futuro desempenho materno e, principalmente, da qualidade psíquica da criança que vai nascer. É essencial, também, considerar os riscos do uso de lítio durante a gravidez, que podem incluir os efeitos teratogênicos, o efeito tóxico neonatal direto, e o potencial para seqüelas neuro-comportamentais. Este último foi objeto do presente estudo, investigando a possibilidade do lítio, quando administrado durante toda a gravidez e/ou lactação, alterar o comportamento cognitivo de ambos, aprendizagem e memória, nas gerações descendentes de crias de ratos, em idade adulta.

O lítio foi administrado na água de beber dos animais, fornecendo níveis séricos na mãe de 0,5mEq/L, dentro da faixa profilática utilizada na clínica (TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a). A escolha deste tratamento é fundamentada na maior probabilidade das pacientes engravidarem, durante o tratamento crônico, do que durante o tratamento agudo.

Este nível sérico é considerado baixo em termos toxicológicos porém, farmacologicamente ativo, uma vez que provou ser eficiente em bloquear os efeitos comportamentais em um teste animal de depressão e não causou toxicidade às mães (FARIA, TEIXEIRA, 1993; TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a).

No entanto, mesmo em níveis profiláticos, o uso de lítio durante a gravidez e/ou lactação pode comprometer o desenvolvimento intra-uterino e pós-natal dos descendentes expostos (GLOCKNER, SCHWARZ, JAHNE, 1993; MESSIHA,

1993; TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995a; VARRIANO, GUILHERME & TEIXEIRA, 2001). Normalmente, são conhecidas duas hipóteses para explicar os efeitos deletérios do tratamento com lítio sobre o desenvolvimento: efeitos diretos provocados pelo Li^+ sobre os descendentes e efeitos deste tratamento sobre as mães que, conseqüentemente, afetam a prole. Em ambos os casos, a droga pode atingir níveis tóxicos para o feto resultando, dentre outras alterações, em mudança de comportamento cognitivo de aprendizagem/memória.

Quatro grupos experimentais foram submetidos a diferentes períodos de tratamento: pré-natal, lactação e ambos. Assim, foi possível certificar se os possíveis efeitos do lítio, sobre o comportamento dos descendentes, estavam relacionados com a fase do desenvolvimento em que foram expostos. Este procedimento foi necessário, uma vez que pode vir a ajudar no gerenciamento clínico de pacientes bipolares grávidas, fornecendo subsídios que orientem na escolha do tempo de tratamento.

O primeiro teste utilizado para a avaliação do desenvolvimento cognitivo de aprendizagem e memória foi o teste de fuga (TF), um modelo validado para a determinação de aprendizagem não associativa. Este teste possibilitou averiguar a capacidade do animal de armazenar as informações adquiridas, apenas a curto prazo, visto que o comportamento é analisado em apenas uma etapa. Os resultados revelaram que, além de todos os grupos analisados terem aprendido a tarefa, também o fizeram de forma similar (Figuras 2E, 2F e 2G). Desmembrando

o conceito aprendizagem, pôde-se constatar que todos os animais, expostos aos tratamentos com lítio, desempenharam com êxito a tarefa de aquisição, retenção e evocação de informações a curto prazo..

O aprendizado associativo, por sua vez, foi avaliado por meio de dois tipos de condicionamentos: clássico e instrumental ou operante. O condicionamento clássico, representado pelo teste de esquiva ativa sinalizada (**EAS**), foi analisado em duas etapas. Desta forma, foi possível avaliar a armazenagem de informações a curto e longo prazo. Na primeira etapa (1º dia de teste), os animais submetidos ao tratamento perinatal com LiCl aprenderam, de forma semelhante, a tarefa associativa de curto prazo (Figuras 3E, 3G e 3H). Na segunda etapa (24 horas após a primeira exposição), todos os animais conseguiram evocar as informações aprendidas no dia anterior (Figura 3F), sem apresentar diferenças estatisticamente significantes na execução da tarefa, em relação ao grupo controle (Figuras 3I e 3J). Este teste revela uma integridade da capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações, de longo prazo, de todos os grupos analisados.

No entanto, os animais tratados com lítio, durante toda gravidez e lactação (Grupo **Li**), parecem ter uma dificuldade adicional para entender a tarefa de esquiva associativa, mais complexa que a anterior, proposta no teste de **TF**. Este grupo necessitou de um bloco de tentativas a mais em relação aos demais grupos para iniciar a aprendizagem.

Este retardo no entendimento do teste experimental não nos indicou uma deficiência na aprendizagem, uma vez que os animais desempenharam a tarefa

com êxito (Test-t pareado, 1° x 6° bloco, **p=0,0018; figura 3E). Porém, é visível que este grupo apresentou uma alteração comportamental, não sendo possível até este momento, associar a um processo neuropsicológico específico que poderia estar interferindo na aprendizagem/memória.

O condicionamento instrumental ou operante envolve circuitos neurais considerados mais complexos que aqueles envolvidos no condicionamento clássico (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002). Ao contrário da **EAS**, na **EP** o animal deve demonstrar sua aprendizagem, inibindo os instintos fisiológicos de sua espécie, permanecendo no compartimento aversivo da caixa de esQUIVA para prevenir a liberação de choque nas patas. Esta característica confere uma sensibilidade complementar a este teste comportamental, sendo extremamente relevante para nossa pesquisa. Possibilitou detectar alterações sutis em processos neuropsicológicos como atenção, controle de impulsividade e atividade motora, fonte de questionamento do teste de esQUIVA ativa sinalizada (**EAS**).

No teste de esQUIVA passiva (**EP**), os animais tratados durante toda prenhez e lactação com LiCl (Grupo **Li**), revelaram menor latência no lado claro da caixa de esQUIVA (test-t pareado, treino x teste, p=0,1080; Figura 4A) e apresentou diferença de aprendizagem em relação ao grupo **Sal** (ANOVA e Student-Newman-Keuls, **p=0,0075; Figura 4B). Essa diferença de aprendizagem não foi associada a uma alteração nos mecanismos de aquisição, retenção e evocação de informações, uma vez que este mesmo grupo aprende com tranquilidade as tarefas impostas nos teste de **TF** e **EAS** (Figuras 2E, 3E e 3F). Os resultados

levam a pensar que, a exposição ao lítio durante toda a gravidez e lactação, possivelmente, estaria relacionada a uma incapacidade parcial ou total de fixar a atenção, a um déficit no controle de impulso e/ou hiperatividade desses animais, que comprometeriam a aquisição de informações.

As áreas cerebrais mediadoras dos processos de atenção e concentração são, supostamente, as projeções noradrenérgicas pré-frontais e a via dopaminérgica mesocortical (STAHL, 2002). O estado de alerta, em geral, é considerado uma condição que cursa com o aumento de dopamina e noradrenalina nestas vias. Uma vez que KOVACS, HERNADI (2002) observaram que o lítio antagoniza a ação da noradrenalina nos neurônios pré-frontais de ratos, sugere-se que o possível déficit de atenção encontrado seja reflexo da deficiência de noradrenalina nesta via.

O transtorno do déficit de atenção (ADHD, da sigla em inglês para *Attention Deficit / Hyperkinetic Disorder*) está comumente associado a três comportamentos: desatenção, hiperatividade e impulsividade. Portanto, nenhuma discussão sobre o déficit de atenção poderia ser completa sem mencionar a hiperatividade e o controle de impulso.

Assim, o teste de campo aberto (CA) foi utilizado para analisar a atividade motora e a impulsividade dos animais, por meio de medidas de exploração e emocionalidade. Neste experimento, o sujeito experimental foi exposto a um novo ambiente o que gerou um conflito entre exploração e medo do desconhecido. Mais do que isto, este teste se mostrou fundamental para o presente estudo, a medida

que, possibilitou detectar alterações na capacidade de movimentação do animal. A integridade de movimentos é essencial para a execução dos demais testes pois, qualquer deficiência na locomoção levaria a interpretações errôneas dos resultados.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas medidas analisadas: tempo de centro, ambulação e levantamento (Figuras 1A, 1B e 1C).

No entanto, pôde-se observar um relativo aumento do número de ambulação e levantamento, dos animais submetidos ao tratamento pré e pós natal com LiCl (Grupos *Li*), demonstrando um comportamento hiperativo em relação ao animais do grupo controle (Figuras 1B e 1C). Além disto, nota-se uma diminuição do tempo de centro revelando, mais uma vez, uma dificuldade de controle de impulso desses animais (Figura 1A).

Embora hiperatividade motora e/ou impulsividade e desatenção sejam controladas pela dopamina, outras diferentes vias estão envolvidas. A hiperatividade é, também, mediada pela atividade dopaminérgica, porém na via nigroestriatal. A impulsividade pode ser inibida pela ação do glutamato sobre o córtex passando pelo estriado. O aumento da dopamina nesta via, com estimulantes, pode aumentar o comportamento motor e impulsividade (STAHL, 2002). Desde que o lítio pode aumentar a sensibilidade dos receptores de dopamina no estriado de cérebro de ratos (KAMEDA et al., 2001), o aumento da

atividade desta via poderia justificar os resultados de possível hiperatividade encontrados nos animais do grupo *Li* (Figuras 1A, 1B e 1C).

Os inúmeros estudos neste campo têm mostrado que muitas, e provavelmente todas, as regiões do SNC contêm neurônios com as propriedades necessárias para a atividade mnêmica (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002). Os traços de memória para diferentes tipos de aprendizagem não estão localizados em uma única estrutura cerebral, mas distribuídos em diferentes partes do SNC (CAHILL, MCGAUGH, WEINBERGER, 2001).

O hipocampo é uma estrutura essencial para o complexo funcionamento dos processos neurais de aprendizagem, memória e atenção. No entanto, um vasto conjunto de outras estruturas são acionadas para o perfeito funcionamento mnêmico. São elas: o córtex frontal e o córtex parietal posterior que recebem informações sensoriais do tálamo e das áreas de associação corticais, informações motoras dos gânglios da base e colículo superior, informações límbicas do giro do cíngulo e amígdala. Além disso, todas estas áreas recebem aferência da formação reticular que regula o nível de ativação de cada uma delas (BRANDÃO, 2000).

Desta forma, são inúmeros os fatores que podem comprometer o desenvolvimento destas estruturas cerebrais no feto, durante o período perinatal. Somente a análise direta do cérebro *pari passu*, estudos bioquímicos e imunocitoquímicos poderiam mapear os circuitos neurais envolvidos com a aprendizagem, memória e atenção, nos testes comportamentais utilizados. Estes

estudos adicionais seriam promissores, e extremamente relevantes, para direcionar conclusões mais precisas sobre o papel do lítio no desenvolvimento cognitivo.

Considerando os resultados obtidos no teste de esQUIVA passiva (**EP**), este estudo aponta evidências que sugerem que a administração de LiCl, durante toda gravidez e lactação, ocasionou um prejuízo da atenção/aquisição de informações. Porém, não alterou os sistemas de retenção e evocação da memória, demonstrando êxito na execução das tarefas propostas nos testes comportamentais de fuga (**TF**) e esQUIVA ativa sinalizada (**EAS**).

Assim como a maioria dos autores (ROBINSON, STEWART, 1986; BEERS, BERKOW, 2000; ERNST, GOLDBERG, 2002), os resultados revelam contra indicação de aleitamento materno quando o feto foi previamente exposto ao LiCL, durante a gravidez, e a mãe continua sob tratamento durante a lactação. No entanto, trata-se de uma resolução animadora que suporta uma possível utilização de Li⁺ durante a gravidez, uma vez que os resultados se mostram negativos apenas para o grupo exposto ao LiCl durante todo o período perinatal.

Finalmente, sob o ponto de vista de aprendizagem e memória, o presente estudo apresenta uma indicação de que a segurança do feto e o bem estar psiquiátrico materno estariam garantidos com o tratamento profilático do transtorno bipolar durante a gravidez ou lactação.

Conclusão

Este trabalho permite concluir que:

O tratamento perinatal com Li^+ , nas doses profiláticas:

- ocasionou um prejuízo da atenção/aquisição de informações, em fêmeas na idade adulta, quando administrado durante toda a gravidez e lactação.
- Não alterou os sistemas de retenção e evocação de memória.

Abstract

Bipolar disorder, a distinct, lifelong mental illness that affects million people in the world, is associated with a high incidence of comorbidity, and ends with completed suicide in 10% to 15% of diagnosed individuals. Lithium salt (Li^+) is a mood-stabilizing drug that is frequently used for treatment and prophylaxis of this illness. Because several controlled studies have shown that lithium discontinuation was associated with recurrence during pregnancy or puerperium, some patients are oriented to continue lithium therapy. The purpose of our study is to investigate the impact of lithium chloride neonatal exhibition in emotionality/exploratory and memory/learning behavior at adult age. Female Wistar rats were treated with either LiCl 10 mM or NaCl 10 mM *ad libitum* as the only source of fluid during the prenatal and lactating periods. 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** - LiCl during lactating period only; c) **LiPré** – LiCl during prenatal period only; d) **Li** – LiCl during prenatal and lactating periods. The results found learning percentage difference (**Li** = 24,4% x **Sal** = 70,1%; ANOVA e Student-Newman-Keuls, $^{**}p=0,0075$). These data suggests that prenatal and postnatal lithium treatment damages attention/acquisition performances, induced in rats at adult age.

Referências Bibliográficas

- ABBEY, H.; HOWARD, E. – *Dev. Psychobiol.* 6:329-35;1973.
- 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*, 153:592-606, 1996.
- ARONSON, M.; HAGBERG, B. Neuropsychological disorders in children exposed to alcohol during pregnancy: a follow-up study of 24 children to alcoholic mothers in Goteborg, Sweden. *Alcohol Cli. Exp. Res.*, 22(2):321-4, April 1998.
- BALDESSARINI, R.J.; FAEDDA, G.L.; SUPPES, T. Treatment response in pediatric, adult, and geriatric bipolar disorder patients. In, *Bipolar disorder through the Life-Cycle*. New York, 1995.
- BALDESSARINI, R.J.; TONDO, L; HENNEN, J.; VIGUEIRA A. C. Is lithium still worth using? An update of selected recent research. *Harv. Rev. Psychiatry*, 10(2):59-75, Mar-Apr 2002.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. *Neurosciências: desvendando o sistema nervoso*. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- BEERS, M.J.; BERKOW, R. São Paulo: Manual Merk 17º ed., 2000; 2701p.
- BRANDÃO, M.L. *Psicofisiologia*. São Paulo: Atheneu, 2000.
- CAHILL, L.; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N.M. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci.*, 24(10):578-81, Oct 2001

- CALIL, H.M. – Transtorno Afetivo Bipolar. In: _____, eds. *Atualização Terapêutica*, 18° ed.; 1997.
- CHUNG, T.K.; LAU, T.K.; YIP, A.S.; CHIU, H.F.; LEE, D.T. Antepartum depressive symptomatology is associated with ad neonatal outcomes. *Psychosom. Med.*, 63(5):830-4, Sep-Oct 2001.
- COHEN, L.S.; FRIEDMAN, J.M.; JEFFERSON, J.W.; JOHNSON, E.M.; WEINER, M.L. A reevaluation of risk of in utero exposure to lithium. *JAMA*, 271:146-150, 1994.
- COHEN, L.S.; SICHEL, D.A.; ROBERTSON, L.M.; HECKSCHER, E.; ROSENBAUM, J.F. Postpartum prophylaxis for women with bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry*, 152:1641-1645, 1995.
- COHN, J.F.; TRONICK, E. Specificity of infants's response to mothers's affective behavior. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, 28:242-8, 1989.
- EDMONDS, L.D.; OAKLEY, G.P. Ebstein's anomaly and maternal lithium exposure during pregnancy. *Teratology*, 41:551-2, 1990.
- 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 afetr rapid discontinuation of lithium treatment in bipolar mood disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, 50:448-55, 1993.

- FARIA, M.S.; TEIXEIRA, N.A. Reversal learned helplessness by chronic lithium treatment at a prophylactic level. *Braslian Journal of Medical and Biological Research*, 26:1201-12, 1993.
- 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.
- GOODWIN, F.K.; JAMISON, K.R. *Manic-Depressive Illness*. Oxford University Press, New York, 1990.
- GOODNICK, P.J.; CHAUDRY, T.; ARTADI, J.; ARCEY, S. Women's issues in mood disorders. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 1(5):903-16, 2000.
- INMAN-WOOD, S.L.; WILLIAMS, M.T.; MORFORD, L.L.; VORHEES, C.V. Effects of prenatal cocaine on Morris and Barnes maze tests of spatial learning and memory in the offspring of C57BL/6J mice. *Neurotoxicol. Teratol.*, 22(4):547-57, Jul-Aug 2000.
- JACOBSON, S.I.; JONES, K.; JOHNSON, K. et al. Prospective multicenter study of pregnancy outcome after lithium exposure during first trimester. *Lancet*, 339(8792):530-3, 1992.
- JAISWAL, A.K.; UPADHYAY, S.N.; SATYAN, K.S.; BHATTACHARYA, S.K. Comparative effects of prenatal and posnatal undernutrition on learning and memory in rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 37(1):17-22, Jan 1999.

- JANICAK, P.G.; WATANABE, M.D. Estabilizadores do humor. In: MARCOLIN, M.A. *Interações farmacológicas com drogas psiquiátricas*. São Paulo: Medsi, 1998. p. 109-127.
- KÄLLÉN, B.; TANDBERG, A. Lithium and pregnancy: a cohort study on manic-depressive women. *Acta Psychiatr. Scand.*, 68:134-139, 1983.
- KAMEDA, K.; MIURA, J.; SUZUKI, K.; KUSUMI, I.; TANAKA, T.; KOYAMA, T. Effects of lithium on dopamine D2 receptor expression in the rat brain striatum. *J Neural Transm.*, 108(3): 321-34, 2001.
- KOVACS, P.; HERNADI, I. Iontophoresis of lithium antagonizes noradrenergic action on prefrontal neurons of rat. *Brain Res.*, 23;947(1):150-6, Aug 2002.
- LINDEN, S.; RICH, C.L. The use of lithium during pregnancy and lactation. *J. Clin. Psychiatry*, 44:358-61, 1983.
- MARK, F. B.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Sistemas de memória. Mecanismos moleculares do aprendizado e da memória. *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. 2002; 2ª ed, p.740-806.
- MATTSON, S.N.; SCHOENFELD, A.M.; RILEY, E.P. Teratogenic effects of alcohol on brain and behavior. *Alcohol Res. Health*, 25(3):185-91, 2001.
- MCGRATH, C.; BUIST A.; NORMAN T.R. Treatment of anxiety during pregnancy: effects of psychotropic drug treatment in developing fetus. *Drug Saf*, 20:2,171-86, Feb 1999.

- MEEK, L.R.; BURDA, K.M.; PASTER, E. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol. Behav.*, 71(5):543-9, Dec 2000.
- 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. *Physiol. Behav.*, 22:527-31;1979.
- MESSIHA, F.S. Maternally-mediated developmental lithium toxicity in the mouse. *Gen. Pharmac.*, 24(1):9-15, 1993.
- MORROW, B.A.; ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Prenatal cocaine exposure disrupts non-spatial, short-term memory in adolescent and adult male rats. *Behav. Brain Res.*, 129(1-2):217-23, Feb 1, 2002.
- NARAYANAN, U.; BIRRU, S.; VAGLENOVA, J.; BREESE, C.R. Nicotinic receptor expression following nicotine exposure via maternal milk. *Neuroreport*, 24;13(7):961-3, May 2002.
- NIERENBERG, A.A.; GRAY, S.M.; GRANDIN, L.D. Mood disorders and suicide. *J. Clin. Psychiatry*, 62 Suppl. 25:27-30, 2001.
- PARRY B.L.; NEWTON R.P. Chronobiological basis of female-specific mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 25(5Suppl):S102-8, Nov 2001.
- PACKER, S. Family planning for women with bipolar disorder. *Hosp. And Com. Psychiatry*, 43(05): 479-482, 1992.
- RADWANSKA, K.; NOKOLAE, E.; KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. Differential response of two subdivisions of lateral amygdala to aversive conditioning as

revealed by c-Fos and P-ERK mapping. *Neuroreport*, 13(17):2241-6, Dec 3, 2002

- ROBINSON, G.E.; STEWART, D.E. Postpartum psychiatric disorders. *CMAJ*, 134(1):31-7, Jan 1, 1986.
- SCHOU, M. Lithium treatment during pregnancy, delivery and lactation: an update. *Review, Journal Clin. Psychiatry*, 51(10):410-3, Oct 1990.
- SECHZER, J.A.; LIEBERMAN, K.W.; ALEXANDER, G.J.; WEIDMAN, D.; STOKES, P.E. Aberrating parenting and delayed offspring development in rats exposed to lithium. *Biol. Psychiatry*, 2113: 1258-66, Nov 1986.
- SECOLI, S.R; TEIXEIRA, N.A. Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. *Stress*, 2(4):273-280, 1998.
- SLAMBEROVA, R.; SCHINDLER, C.J.; POMETLOVA, M.; URKUTI, C.; PUROW-SOKOL, J.A.; VATHY, I. Prenatal morphine exposure differentially alters learning and memory in male and female rats. *Physiol. Behav.*, 73(1-2):93-103, May 2001.
- SMALL, J.G. Anticonvulsants in affective disorders. *Psychopharmacol, Bull.*, 26:25-36, 1990.
- STAHL, S.M. *Psicofarmacologia*. São Paulo: Medsi, 2002.
- 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.

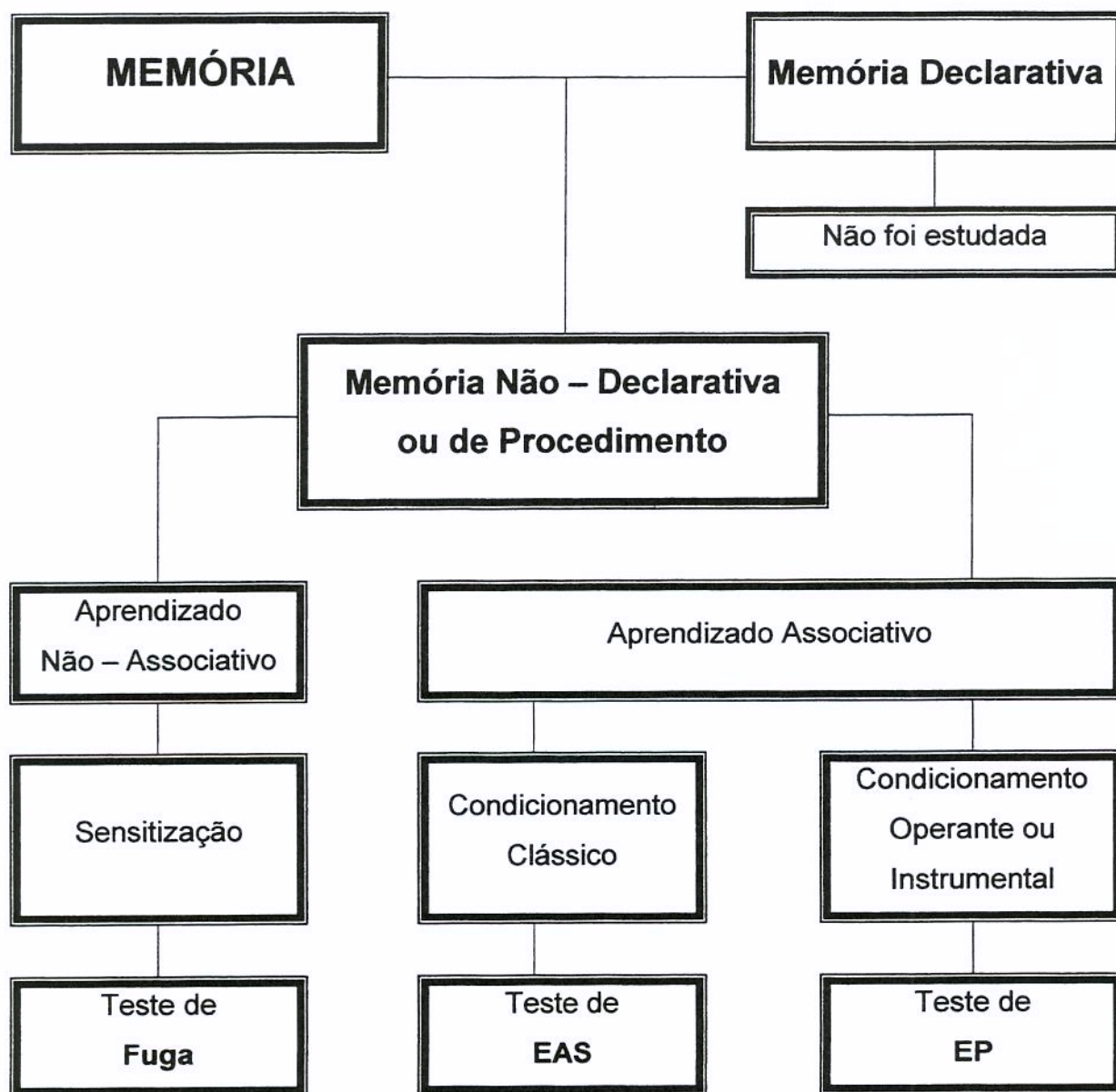
- SUPPES, T.; DENNEHY, E.B. Evidence-based long-term treatment of bipolar II disorder. *J. Clin. Psych.*, 63 Suppl. 10:29-33, 2002.
- TEIXEIRA, N.A.; LOPES, R.C.M.; SECOLI, S.R. Developmental toxicity of lithium treatment at prophylactic levels. *Braz. J. Med. And Biol. Res.*, 28:230-9, 1995a.
- TEIXEIRA, N.A., PEREIRA, D.G.; HERMINI, A.H. Chronic but not acute Li+ treatment prevents behavioral depression in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28:1003-007, 1995b.
- TOHEN, M.; WATERNAUX, C.M.; TSUANG, M.T. Outcome in mania: a 4-year prospective follow-up of 75 patients survival analysis. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47:1106-1111, 1990.
- VARRIANO, M.A.; VARRIANO, A.A.; DATTI, F.; DATTI, M.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A. Evidence that behavioral depression does not influence airway cell influx in allergic rats. *Mediators of Inflammation*, 10:229-232, 2001.
- VARRIANO, A.A.; GUILHERME, C.G.; TEIXEIRA, N.A. A influência do tratamento com lítio pré e pós-natal sobre testes de doenças mentais na prole de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 16., 2001, Caxambu. (Abstrat, p.379).
- VIGUEIRA, A.C.; COHEN, L.S. The course and management of bipolar disorder during pregnancy. *Psychopharmacol Bull.*, 34(3):339-46, 1998.
- VIGUERA, A.C.; NONACS, R.; COHEN, L.S.; TONDO, L.; MURRAY, A.; BALDESSARINI, R.J. Risk of recurrence of bipolar disorder in pregnant and

nonpregnant women after discontinuing lithium maintenance. *Am J. Psychiatry*, 157(2):179-84, Feb 2000.

- ZARRINDAST, M.R.; BAKHSHA, A.; ROSTAMI, P.; SHAFAGUI, B. Effects in intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J. Psychopharmacol*, 16(4):313-9, Dec 2002.
- 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.

Anexos

Anexo 1: Organograma de aprendizagem/memória



Anexo 2: Protocolo da CEEA – IB – UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

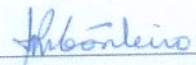
Certificamos que o Protocolo nº 311-1, sobre Estudo da influência do tratamento com lítio pre-natal e pos-natal em ratos.

sob a responsabilidade de _____ está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 08/11/01. Este certificado expira em 07/11/02.

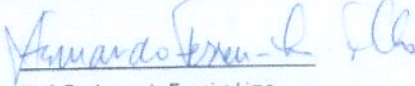
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 311-1, entitled "_____" is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 08/11/01. This certificate expires on 07/11/02.

Campinas, 08 de novembro de 2001



Prof. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP



Prof. Dr. Amando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

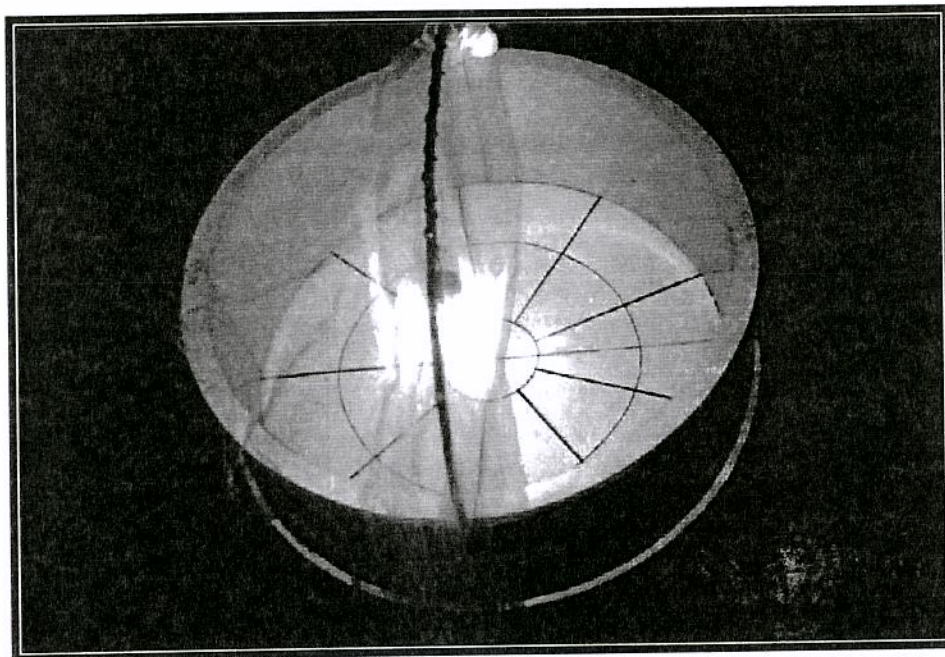
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEPERINO VAZ
CEP: 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 37847116
FAX: 55 19 32893124

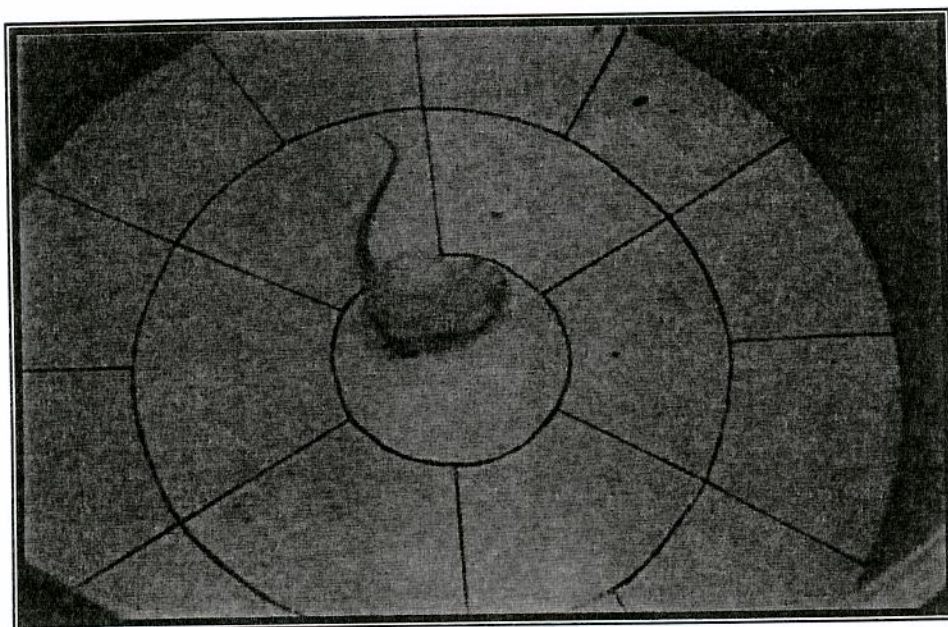
Anexo 3: Esquema experimental



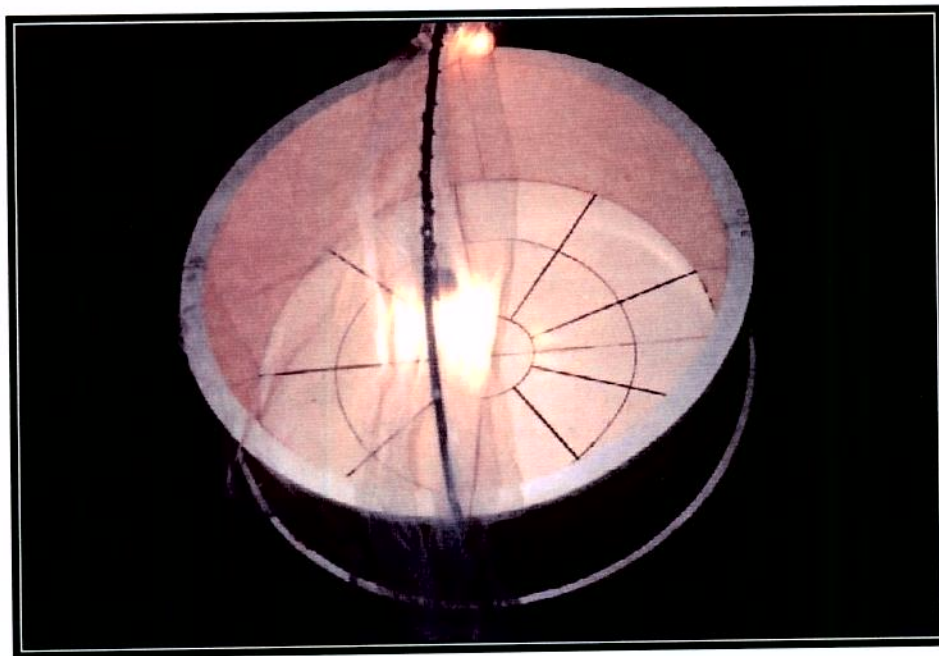
Anexo 4a: Aparelho do teste de campo aberto



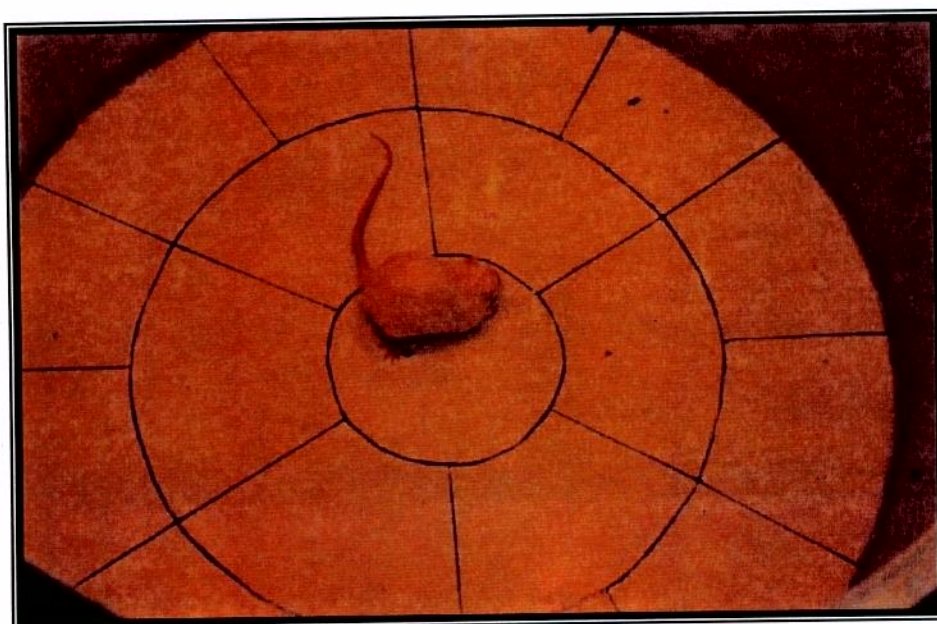
Anexo 4b: Arena do campo aberto com animal no centro



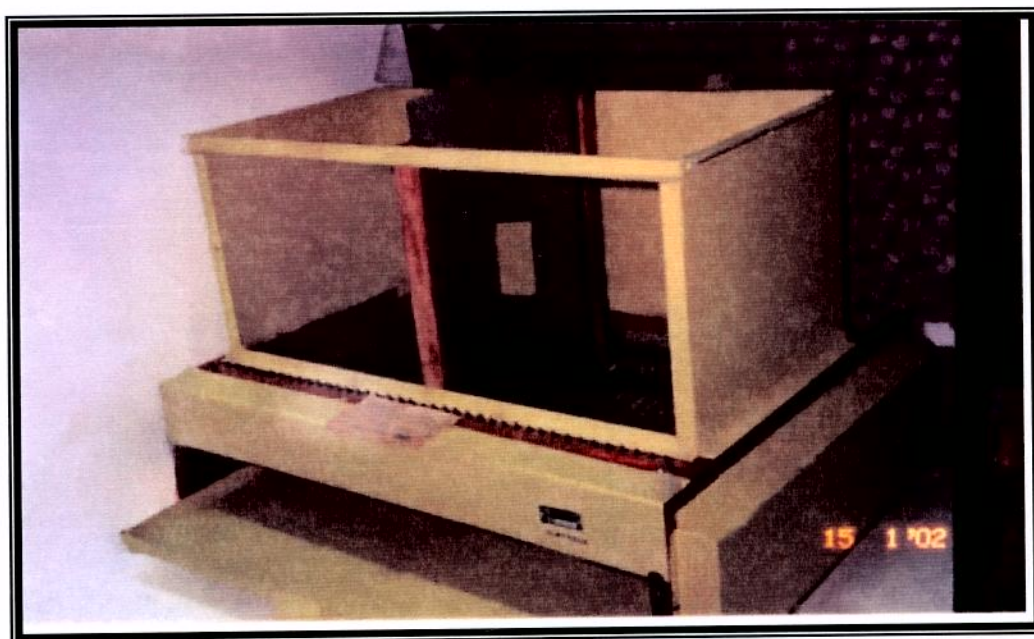
Anexo 4a: Aparelho do teste de campo aberto



Anexo 4b: Arena do campo aberto com animal no centro



Anexo 5: Aparelho do teste de fuga



*Anexo 6: Aparelho do teste de esquivas ativa
sinalizada*



Anexo 7: Aparelho do teste de esquiiva passiva

