



Este exemplar corresponde a redação final de
tese defendida pela candidata CLAUDIA REGINA
CAVAGLIERI, aprovada pela comissão julgadora.

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Die 19/12/89

Nancy Pinotti

Teixeira

" ADEQUAÇÃO DO MODELO ANIMAL
PARA ESTUDO TOXICOLÓGICO E
COMPORTAMENTAL DO LÍTIIO " .

Cláudia Regina Cavaglieri

CAMPINAS SP

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICO ESTA TESE.

Aos meus PAIS e ao meu MARIDO por
acreditarem na minha capacidade e
também por todo carinho, compreensão
e colaboração nos momentos que eu mais
necessitava. Um grande beijo.

AGRADECIMENTOS

. A DRA. NANCY AIROLDI TEIXEIRA pela orientação, elaboração do plano de pesquisa, de sua sequência experimental, criação de facilidades para a realização desta tese e principalmente pela amizade e paciência à mim dedicada todos esses anos.

. Ao DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA - UNICAMP por permitir o uso de sua dependências e equipamentos.

. Ao DR. ANIBAL VERCESI pela permissão para utilização do espectrofotômetro de absorção atômica do Departamento de BIOQUIMICA - UNICAMP.

. Ao JOAQUIM FRANCISCO DO PRADO e ADILSON JOSE THOMAZ pela excelente assessoria técnica e colaboração dedicada na realização de experimentos.

. A ELAINE MARIA DE MORAES SCAVACINI por ter padronizado parte das técnicas empregadas nesta tese, durante a vigência de sua bolsa de iniciação científica do CNPQ (Proc. 800334/87).

. A amiga CLEA DE LUCCA pela correção da ortografia.

. E a todos colegas da Pós-Graduação, funcionários e professores que de alguma forma contribuíram na realização desta tese.

"A CIENCIA se compõe de erros
que, por sua vez, são os passos
até a verdade".

Júlio Verne

1826-1905

Escritor francês

INDICE:

página

.. <u>SUMARIO</u>	01
.. <u>INTRODUÇÃO</u>	02
.. <u>OBJETIVOS</u>	21
.. <u>MATERIAIS E METODOS</u>	22
1) ANIMAIS	22
2) RAÇA O	22
3) DROGAS	23
4) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	24
4.a) Tratamentos	24
4.b) Métodos de Avaliação	28
4.b.1) Exp. I	28
4.b.2) Exp. II	41
4.b.3) Exp. III	64
4.b.4) Exp. IV	78
.. <u>CONCLUSÃO FINAL</u>	82
.. <u>ABSTRACT</u>	84
.. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	85

SUMARIO

Nesta tese procuramos de forma sistemática, através de dados comportamentais e avaliações toxicológicas, uma faixa de dosagem de lítio não intoxicante, que no rato pudesse desencadear os efeitos colaterais (possivelmente semelhantes aos registrados na clínica), e não provocasse alterações comportamentais marcantes no animal normal, mas que fosse capaz de corrigir ou impedir alterações comportamentais induzidas por drogas ou outros procedimentos.

Verificamos através de medidas físicas/fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, que a dose de 1 mEq/Kg/dia dada cronicamente é mais adequada ao estudo do lítio, quando se utilizam ratos como sujeitos experimentais. Esta dose é em média tres vezes menor do que as atualmente empregadas para este fim.

INTRODUÇÃO

O lítio é o primeiro elemento da família dos metais alcalinos (IA) da tabela periódica, onde também estão incluídos os metais: sódio, potássio, rubídio, cézio e frâncio. O lítio apresenta algumas propriedades similares às do sódio e do potássio, sendo que em outros aspectos suas propriedades se assemelham à dos metais alcalinos terrosos (IIA), especialmente as propriedades do cálcio e do magnésio (104).

No final do século passado, o lítio foi utilizado no tratamento da gota (105), que envolve a deposição de uratos nas articulações dos pacientes. Acreditava-se que o lítio viria a combinar-se com o ácido úrico (responsável pelos depósitos de uratos), formando urato de lítio, o mais solúvel dos uratos e portanto passível de maior eliminação pelo organismo. Tal prática foi abandonada devido à sua ineficácia e, também, devido ao aparecimento de sintomas de intoxicação por lítio. O lítio foi também utilizado em medicina no tratamento da hipertensão, servindo como substituto do sal de cozinha, prescrito sem restrições ou acompanhamento médico (9). Entretanto, este uso indiscriminado, hoje relegado ao plano histórico, foi completamente abandonado, pois ocasionou a morte de muitos pacientes.

As propriedades antimaniacas do lítio foram descobertas em 1949 pelo psiquiatra John Cade (106), este fato desencadeou uma série de investigações clínicas sobre os efeitos do lítio aplicado no tratamento de pacientes psiquiátricos. Desde então, embora

muitos relatos indicassem a eficácia do lítio, o mesmo demorou a ser difundido na comunidade médica como agente terapêutico e profilático da Psicose Maníaco Depressiva (PMD) devido, principalmente, à toxicidade manifesta em seu emprego clínico inicial e ao pequeno índice terapêutico que possui (1). Assim, somente em 1970, o lítio foi aprovado pelo F.D.A. (Food and Drug Administration - USA) como droga útil no tratamento agudo da mania (2) e, na década de 80, foi também aceito como agente profilático para evitar novas crises de depressão e/ou mania (3).

Várias hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a etiologia da PMD, bem como o mecanismo de ação do lítio, mas, até o momento, não se chegou a uma conclusão plausível.

Como vimos, anteriormente, a eficácia do lítio na terapia da PMD já foi estabelecida na clínica médica, porém a maior dificuldade no seu emprego, vincula-se ao seu estreito índice terapêutico. Pequenos incrementos nos níveis séricos desta droga para além da faixa terapêutica, podem desencadear efeitos tóxicos ascendentes, ou seja, de leves a graves. Por esta razão a faixa terapêutica de dosagem sérica do lítio no homem deve permanecer entre 0,6 e 1,2 mEq/l (107).

EFEITOS TÓXICOS E COLATERAIS DO LÍTIO NO HOMEM

Na maioria dos casos, a intoxicação por lítio se desenvolve gradualmente (108,109), com exceção da ingestão acidental ou com intuito de suicídio, ingerindo-se uma única dose maciça (intoxicação aguda). A severidade dos sintomas estão correlacionados com o nível sérico de lítio (108); entretanto, alguns dos efeitos podem aparecer mesmo que o nível de lítio esteja dentro da faixa terapêutica (107,110).

O lítio atinge vários sistemas fisiológicos, a saber: o nervoso, o renal, o digestivo e o endócrino.

a) SISTEMA NERVOSO

No homem a intoxicação por lítio atinge, principalmente, o sistema nervoso (31). Os efeitos neurotóxicos do lítio, tendem também a se desenvolver, gradualmente, e, na maioria das vezes, estão relacionados com a dosagem (108). Os sintomas mais frequentes podem ocorrer com níveis de lítio abaixo de 1,5 mEq/l (111) e são classificados como efeitos leves: letargia, fadiga, fraqueza, dificuldade em memorizar e concentrar, tremor fino das mãos.

Quando o nível de lítio sérico está acima de 1,5 mEq/l, os efeitos tornam-se mais graves e são classificados como moderados: tremor grosseiro das mãos, ataxia e disartria, distúrbios visuais, hiperreflexia dos tendões, aumento do tônus

muscular, fasciculação muscular, sintomas extrapiramidais, estado de confusão, desorientação e incoordenação, e nível de consciência alterado.

Com valores acima de 3,0 mEq/l, os efeitos são severos: irritabilidade neuromuscular extensa, convulsões, delírios, alterações graves de consciência que levam ao coma, dano cerebral e morte (107,108,111).

O tratamento com lítio abole os sintomas maníacos do paciente, sem alterações apreciáveis em relação a outras funções mentais ou à capacidade intelectual do paciente (2). Apenas no início do tratamento podem ser observadas alterações leves na memória e na capacidade de concentração (112,113), e mesmo estes efeitos colaterais desaparecem ao longo do tratamento (112). Estas alterações leves na memória como, por exemplo, relembrar um fato, parecem estar, também, enfraquecidas em voluntários normais tratados com lítio em doses terapêuticas (114). Não foram observadas alterações no humor, na capacidade motora e no tempo de reação (10).

Portanto, no homem a intoxicação com lítio atinge, primariamente, o sistema nervoso, podendo produzir efeitos neurotóxicos com manifestações leves a graves, mas, normalmente, em doses terapêuticas pode produzir, apenas, alterações leves na memória do paciente. É possível que o lítio, em si, altere a memória diretamente, entretanto a redução da dose pode levar à sua normalização (115).

b) SISTEMA RENAL

A principal via de eliminação do lítio no organismo é através de sua excreção renal (112). Assim, este órgão está sujeito a sofrer alterações fisiológicas e/ou patológicas com o aumento da dosagem sérica deste metal.

A poliúria e a polidipsia são efeitos colaterais comuns da litioterapia (118,112). A poliúria induzida pelo lítio está relacionada ao bloqueio da ação do hormônio antidiurético (ADH) nos túbulos coletores, pela inibição da estimulação da via da adenil-ciclase, reduzindo conseqüentemente a produção de AMP cíclico, o que resulta na produção de uma urina altamente diluída, com aumento secundário do consumo de água (107, 82, 116). Em geral, estes efeitos são reversíveis quando se interrompe o tratamento (107). Após anos de tratamento, um pequeno número de pacientes pode apresentar alterações estruturais nos tecidos renais, como por exemplo: fibrose intersticial moderada, esclerose glomerular e atrofia tubular com dilatação (111, 82).

Níveis séricos de lítio acima de 1,5 mEq/l são tóxicos para os rins e, uma vez perdurando por alguns dias, levam a uma redução na capacidade renal de eliminação do próprio lítio, agravando, ainda mais, o quadro da intoxicação.

c) SISTEMA DIGESTIVO

A intolerância do sistema digestivo aos sais de lítio desencadeia, no início da terapia, efeitos, tais como: náusea, vômito, diarreia e dor abdominal (111, 107). Normalmente, esses efeitos são transitórios, mas quando reaparecem, ao longo do tratamento, associados com os efeitos neurológicos de fadiga, fraqueza, tremores e anorexia, alertam o médico e paciente sobre o desenvolvimento de intoxicação (111).

d) SISTEMA ENDOCRINO

d.1) Metabolismo Mineral:

O tratamento com lítio pode alterar o metabolismo mineral devido, provavelmente, a sua similaridade com outros íons biologicamente ativos, como o Na^+ , o K^+ , o Ca^{++} e o Mg^{++} (112), bem como às alterações renais induzidas por esse metal.

Normalmente, não são observadas alterações nos níveis séricos de Na^+ e K^+ em pacientes tratados com doses terapêuticas de lítio (87). Somente no início da terapia pode ser observado um aumento transitório na excreção de sódio, compensada, posteriormente, em consequência da secreção de aldosterona (87, 118). O lítio também afeta inicialmente a eliminação de potássio (22), mas este não possui nenhum mecanismo compensatório (118).

Pacientes severamente intoxicados com lítio podem apresentar um balanço negativo de sódio em razão do bloqueio da secreção de aldosterona pelo lítio (118), promovendo a má reabsorção renal de sódio e, conseqüentemente, sua excreção pela urina. No homem tem sido observada uma relação recíproca entre o balanço de sódio e o balanço de lítio (118). O sódio facilita a excreção de lítio, produzindo, conseqüentemente, uma queda no seu nível sérico. Reciprocamente a depleção de sódio é associada com o aumento da retenção de lítio e elevação de seu nível sérico, agravando, então, a intoxicação.

A literatura é conflitante com relação às alterações no metabolismo de cálcio induzidas pelo lítio. Segundo o relato de vários autores, o lítio antagoniza as ações do cálcio (119) e provoca a inibição de enzimas ativadas por este metal (120).

Em pacientes tratados com lítio, observou-se um aumento na reabsorção de cálcio nos túbulos renais e, por conseguinte, hipocalciúria (121, 122, 124). O lítio pode, também, produzir outros efeitos nestes pacientes, quais sejam: hipercalcemia (123, 124), hipofosfatemia (125), hipermagnesemia (125) e um aumento nos níveis séricos de paratormônio (123, 124). Hipercalcemia e/ou elevação dos níveis séricos de paratormônio sugerem o diagnóstico de hiperparatireoidismo primário (123). Tem sido sugerido na literatura, que o lítio inibe o feedback existente entre nível sérico de cálcio e a secreção de paratormônio (126). Assim, altas concentrações de cálcio sérico são exigidas para inibir a secreção de paratormônio. Muitas outras hipóteses foram propostas na tentativa de se explicar em

que mecanismo o lítio produz estas alterações no metabolismo de cálcio e na secreção de paratormônio, mas nenhuma foi realmente conclusiva. Estes efeitos colaterais são reversíveis com a interrupção da litioterapia (126).

Com relação ao metabolismo mineral, o tratamento com lítio produz efeitos colaterais, tais como: hipercalcemia, hipofosfatemia e hipermagnesia; havendo habitualmente manutenção dos níveis de Na⁺ e K⁺. Somente podemos observar hiponatremia em pacientes intoxicados. (87, 118)

d.2) Função Tireoideana:

O tratamento crônico com lítio pode alterar a função tireoideana, produzindo em alguns pacientes, hipotireoidismo e/ou bócio (8, 13, 129, 130). Estas alterações foram observadas, primeiramente, por Schou *et al* (127) em 1968. O bócio e o hipotireoidismo não são considerados efeitos colaterais graves e, geralmente, são reversíveis com a interrupção do tratamento (27). Alguns pacientes podem apresentar, apenas, alterações laboratoriais sem sinais clínicos de alterações nas glândulas tireóides (112).

O lítio acumula-se nas glândulas tireóides e pode promover a inibição da adenil-ciclase - sensível ao hormônio estimulante da tireóide (TSH) (128, 19). Assim, não há formação de AMP cíclico e, conseqüentemente, a secreção dos hormônios

tireoidianos, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), está diminuída. Estas alterações são, em geral, observadas no início da terapia (128, 19) e compensadas ao longo do tratamento (34). Entretanto, quando permanecem por períodos relativamente longos, podem desenvolver a formação de bócio e/ou hipotireoidismo (19).

Agudamente, o lítio compete na captação, transporte e liberação do iodo na glândula tireóide (27, 69). A formação dos hormônios tireoideanos ocorre através da iodação sucessiva da tirosina. Portanto, a queda na captação e no transporte do iodo pode comprometer a formação desses hormônios.

d.3) Metabolismo de Carboidratos:

A ação do lítio no metabolismo de carboidratos é complexa, pois estão envolvidos vários hormônios e enzimas que são afetados por este metal.

Agudamente, o lítio pode aumentar o nível de glicose sanguínea em pacientes psiquiátricos (132), sendo esta alteração atribuída ao aumento na absorção de glicose no intestino e às alterações produzidas no metabolismo do cálcio e magnésio, os quais estão envolvidos no mecanismo de secreção de insulina e na atividade de enzimas relacionadas com a glicólise e gliconeogênese (131, 132).

Em pacientes tratados cronicamente com lítio, observou-se um aumento na tolerância à glicose (131, 30, 129). Estes pacientes podem desenvolver *Diabetes mellitus*, o qual é

reversível com a interrupção do tratamento (133,129). Portanto, estes efeitos colaterais são, provavelmente, decorrentes de um efeito geral do tipo "insulina" apresentado pelo lítio.

d.4) Ganho de Peso:

O aumento de peso é um efeito colateral comum da litioterapia (19,20,46) e, normalmente, é observado em pacientes tratados por um longo período (134). Este efeito pode ser observado em ambos os sexos (134), apesar de se observar um predomínio em mulheres (84).

O mecanismo pelo qual o lítio promove aumento de peso não é conhecido, mas provavelmente resulta da somatória de vários efeitos, tais como: alteração no metabolismo de carboidratos (19, 30, 131), indução de hipotireoidismo (35), alteração no metabolismo de lipídeos (135), aumento na ingestão e retenção hídrica (89, 84) e edema (84,134). Provavelmente, todos esses fatores contribuem para o aumento de peso, mas não o justificam isoladamente (56).

EFEITOS TÓXICOS E "COLATERAIS" DO LÍTIO NO RATO

E inegável a importância da utilização de animais de laboratório para o estudo das Ciências Médicas (4). As extrapolações para o homem são variavelmente limitadas em cada área, dadas as diferenças inerentes a espécies distintas; mas a criação de modelos de estudo com animais de laboratório deve ser sempre cogitada devido a sua grande importância. Para o estudo dos efeitos comportamentais do tratamento com lítio utiliza-se largamente o rato como sujeito experimental (4).

As pesquisas em animais estão divididas em estudos com administração aguda ou crônica; não obstante, muitos dos relatos com administração crônica nem sempre corroboram os resultados obtidos com administração aguda (5, 6).

As doses utilizadas no estudo em animais estão, em geral, em níveis séricos dentro da faixa clínica utilizada no homem (7, 8, 9). Para isso, o rato deve receber diariamente injeções via i.p. iguais ou acima de 3 mEq/Kg (14; 16) ou comer ração contendo lítio de 60 mEq/Kg ou mais (96; 17), dose diária de aproximadamente 3 mEq/Kg. Porém, sabendo-se das diferenças genético-fisiológicas entre espécies, não poderia ser intoxicante esta dose aplicada nos animais?

Ao contrário do homem, o rato apresenta efeitos tóxicos mais acentuados a nível renal (82) e, secundariamente no sistema nervoso.

a) SISTEMA RENAL

Em ratos, o tratamento crônico com lítio, utilizando-se doses que permitam a obtenção de níveis séricos dentro da faixa terapêutica do homem, produz poliúria primária com polidipsia secundária (112). No entanto, a menos que se complemente este tratamento com suplemento de ions Na^+ e/ou K^+ , sobrevem os efeitos tóxicos, tais como perda de peso corporal ou ,até mesmo, mortes (82, 136, 25).

Aproximadamente 99% do lítio filtrado é reabsorvido nos túbulos renais, sendo 80% na parte proximal, por mecanismos que não distinguem o Li^+ do Na^+ (118). O aumento no nível sérico de lítio devido a não suplementação de sódio ou potássio na dieta dos animais leva a uma perda de sódio nos túbulos proximais, uma vez que ambos competem pelo mesmo sítio de reabsorção proximal (137). O lítio promove também uma maior perda de sódio, impedindo a ação da aldosterona nos túbulos distais (87,138). O rim do rato compensa, parcialmente, a depleção de sódio, aumentando a produção de renina e desta forma, estimulando a produção de aldosterona (139). O mais importante mecanismo compensatório é o aumento na reabsorção de sódio nos túbulos proximais. Desde que os mecanismos da reabsorção não distinguem o Li^+ do Na^+ , ocorre ,consequentemente, um aumento na reabsorção do lítio e subsequente aumento em seu nível sérico. O alto nível sérico de lítio inibe ainda mais os hormônios , antidiurético (ADH) e aldosterona, piorando a depleção de água e sódio

respectivamente. Assim, inicia-se um círculo vicioso, e a intoxicação pode progredir até a morte (140).

Após algumas semanas de tratamento crônico com lítio, podem-se observar alterações morfológicas, tais como dilatação dos túbulos coletores corticais e da porção contígua dos túbulos distais (145). Atualmente, acredita-se que estas alterações são induzidas pelo lítio *per se* (151) e não em consequência de polidúria, como pensava-se anteriormente.

b) SISTEMA NERVOSO

O lítio, em doses elevadas, produz no rato efeitos neurotóxicos semelhantes aos observados no homem.

Em doses não intoxicantes, observa-se redução da locomoção no teste de campo aberto, tanto no que se refere à ambulação quanto ao levantar-se, quando administrado agudamente (11, 12, 13). Os mesmos resultados foram obtidos com administração crônica (16, 17, 18). O comportamento de levantar-se mostrou ser um dos mais sensíveis à administração do lítio (11, 13, 14, 15), sendo reduzido de forma dose-dependente e frequentemente em doses mais baixas do que aquelas que afetam a ambulação.

O lítio também reduziu a movimentação geral dos animais em outros testes, tais como: caixas (65), rodas ou plataformas de atividade (17).

Como descrevemos anteriormente, no homem o lítio em doses terapêuticas não altera a capacidade motora, intelectual e humor, embora altere, levemente, a memória. Já no rato, esta mesma faixa de dosagem deprime a atividade motora de maneira geral. Perguntamos novamente, não poderia ser intoxicante para o rato a faixa de dosagem geralmente utilizada nestas pesquisas ?

c) SISTEMA DIGESTIVO

O lítio afeta o trato gastrointestinal do rato, produzindo náusea e diarreia (141). Estes efeitos colaterais também são observados no homem.

Quando administramos o lítio pela dieta (via oral), uma quantidade razoável de lítio deve ser ingerida pelo rato para obter um nível sérico similar ao nível terapêutico. Consequentemente, grandes quantidades de lítio passam através do trato gastrointestinal deste animal, tornando esta área vulnerável à toxicidade do lítio (82).

d) SISTEMA ENDOCRINO

d.1) Metabolismo Mineral:

Os ratos tratados com doses de lítio semelhantes as que são normalmente utilizadas pelo homem e com dieta suplementada com Na⁺ e/ou K⁺, não apresentam alterações nos níveis séricos de sódio e potássio (82). Nesta condição, não há diferença nos efeitos induzidos pelo lítio entre homem e rato. Entretanto, quando não suplementamos a dieta com esses metais, estes animais normalmente desenvolvem intoxicação (23,87, 82). Os animais intoxicados com lítio apresentam hiponatremia (87, 23) e/ou hipercalemia (82, 142, 140). O lítio tende a inibir a habilidade dos rins de secretar o potássio e de reabsorver sódio (82, 142, 140) devido, provavelmente, à sua ação inibidora sobre a aldosterona. Este hormônio é o responsável pelo aumento da reabsorção do sódio e da secreção do potássio nos túbulos distais (142, 140). Outro mecanismo envolvido na depleção de sódio é a competição existente entre Li⁺ e Na⁺ pela mesma via de reabsorção nos túbulos proximais (82).

Quanto ao cálcio e ao magnésio, o lítio induz, no início do tratamento crônico, um aumento na excreção renal destes dois metais. Ao longo do tratamento ocorre o inverso, pois estes animais apresentam uma diminuição na eliminação do Ca⁺⁺ e do Mg⁺⁺ e, conseqüentemente, ocorre um aumento de seus níveis séricos (126, 143). A hipercalcemia e a hipermagnesemia são efeitos colaterais observados no rato e no homem.

d.2) Função Tireoideana:

O mecanismo de ação anti-tireoideana do lítio foi, também, estudado em animais. Observou-se que estas alterações endócrinas são dose-dependentes, e que existem diferenças quanto aos efeitos obtidos com a administração aguda e crônica (27). No rato, com doses agudas e altas de lítio, obtém-se queda em todos os parâmetros do metabolismo tireoideano (69, 144, 28), tais como: a captação, o transporte e a liberação do iodo, e queda nos níveis séricos de tiroxina (T4).

Cronicamente, obtém-se o aparecimento de bócio e/ou hipotireoidismo (29, 27), mesmo com os níveis séricos de lítio abaixo dos níveis terapêuticos do homem (27). Também foi observado um aumento da captação do iodo (69), uma diminuição da secreção de T4 (69, 152) e T3 (152), e conseqüentemente um aumento nos níveis séricos de TSH (69, 27). Portanto, o bócio é decorrente do acúmulo de tiroxina nas glândulas tireóides.

d.3) Metabolismo de Carboidratos:

Dentre os efeitos metabólicos do lítio, destacamos as alterações no metabolismo de carboidratos. Neste aspecto, o lítio produz efeitos semelhantes no homem e no rato, devido às propriedades que este metal tem em comum com a insulina (55, 56).

Cronicamente, o lítio induz um aumento na captação de glicose (50) e aumento na síntese de glicogênio no fígado (46), cérebro (45, 49), músculo (51) e tecido adiposo (52, 53). Agudamente, observou-se uma hipoglicemia (45, 46).

d.4) Peso Corporal:

No rato, as medidas de peso corporal e morte, são utilizadas, normalmente, para avaliação da toxicidade do lítio.

Contrastando com o homem, o rato tratado cronicamente com lítio, em doses não intoxicantes, apresenta, na maioria dos relatos, perda de peso (69, 42, 29, 22, 23, 21) ou peso abaixo do controle quando há suplementação da dieta com Na⁺ e/ou K⁺. Há relatos (24, 25, 26, 64) de aumento de peso corporal somente em ratos fêmeas, sob certas condições de tratamento e, por coincidência, este é um efeito colateral mais frequente em mulheres (84).

Novamente o rato parece ser "mais sensível" que o homem frente à mesma dosagem de lítio. Assim, acreditamos que a dose utilizada nos estudos com animais são elevadas e, por esta razão, não há correlação entre este efeito colateral observado no homem e no rato.

ANALOGIA ENTRE OS EFEITOS DO LÍTIO NO HOMEM E NO RATO

Reuendo a literatura, observamos que os efeitos tóxicos do lítio, desencadeados no homem, são frequentemente equivalentes aos observados no rato (31, 32, 33, 34). Por outro lado, esta correlação não é constante quando comparamos os efeitos comportamentais e colaterais produzidos no homem em relação aos produzidos em animais. Acreditamos que as doses relativas utilizadas para os estudos em ratos são, na realidade, maiores que aquelas empregadas na terapia. Portanto, esta faixa de dosagem utilizada favoreceria o paralelo entre os efeitos tóxicos no homem e nos animais, mas impossibilitaria o estudo do efeito na faixa de dosagem clínica, isto é, não intoxicante. Alguns autores (82, 145), intuitivamente, já apontaram o rato como um animal "mais sensível" do que o homem aos efeitos do lítio, não havendo entretanto, até o momento nenhum estudo sistemático que focalize este aspecto.

Torna-se evidente portanto, a importância de se determinar uma faixa de dosagem não intoxicante que no rato pudesse desencadear os efeitos colaterais (possivelmente semelhantes aos registrados na clínica), e não provocasse alterações comportamentais marcantes no animal normal, mas que fosse capaz de corrigir ou impedir alterações comportamentais, induzidas por drogas ou outros procedimentos.

O encontro desta faixa de dosagem seria crucial na viabilização do modelo animal como referência à situação de utilização do lítio na clínica.

OBJETIVOS:

Encontrar uma faixa de dosagem que no rato não provoque efeitos tóxicos ou comportamentais evidentes, mas que seja capaz de corrigir ou impedir alterações comportamentais induzidas por drogas ou outros procedimentos.

Verificar se nesta faixa de dosagem obtem-se algum dos efeitos colaterais observados na clinica e mais ainda, através de estudo da farmacocinética do lítio, comprovar a hipótese levantada.

MATERIAIS E METODOS

1. ANIMAIS:

Utilizamos ratos albinos machos e fêmeas da cepa Wistar com 60 dias de idade no início do experimento, proveniente do Biotério Central da UNICAMP. Foram mantidos durante o experimento em grupos de 3 por gaiola de arame (30 x 16 x 25 cm) e submetidos a um ciclo de 12 h claro/escuro sob temperatura ambiente constante de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com alimentação e bebida *ad libitum*.

2. RAÇÃO:

A ração utilizada (Probiotério 40 G - Anderson Clayton S/A), avaliada em nossos laboratórios revelou o conteúdo total (em mEq/kg) dos seguintes ions, relevantes para nosso estudo: Na^+ - $117,3 \pm 6,2$ mEq/kg ; K^+ - $5,95 \pm 0,13$ mEq/Kg.

3. DROGAS:

3.a) CLORETO DE LITIO (pro-análise Merck)

As soluções eram preparadas diluindo-se o sal em água deionizada, formando soluções de 3,0 ; 2,0 ; 1,5 ; 1,0 e 0,5 N.

3.b) HIDROCLORETO DE APOMORFINA (Sigma)

Foram utilizadas as concentrações de 3 mg/ml e 0,6 mg/ml. As soluções eram preparadas diluindo-se o sal em água deionizada.

3.c) TRANILCIPROMINA (Parnate R. - Smith Kline)

Cada comprimido contém 13,7 mg de sulfato de tranilcipromina, que equivalem a 10 mg de d-1 tranilcipromina.

Utilizamos a concentração de 5 mg/ml sendo a solução preparada através da lavagem da drágea para a retirada do revestimento de corante seguida de dissolução em água deionizada e filtragem. O filtrado obtido era utilizado para o tratamento em animais.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

4.a) TRATAMENTOS:

Descrevemos este item de acordo com os experimentos realizados. Todos experimentos foram realizados 4 h. após a última injeção de lítio (meia vida sérica, em nossas condições).

4.a.1) TRATAMENTO CRÔNICO COM LiCl:

a) Grupo I: administramos a ratos machos e fêmeas as soluções na concentração correspondente a cada grupo experimental e no grupo controle, sempre por via i.p. no volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal dadas uma vez ao dia, aproximadamente às 9:00 hs da manhã, por 4 semanas (28 dias) consecutivos.

As doses empregadas nos grupos experimentais foram: 3,0; 2,0 e 1,0 mEq/kg/dia e para o grupo controle foi utilizado água deionizada como placebo.

Os animais foram avaliados física e comportamentalmente desde o pré-tratamento até o final do tratamento. Ao término deste, os animais foram sacrificados por decaptação. Procedemos:

1. Avaliação ponderal

2. Escala avaliação de toxicidade

3. Teste de campo aberto

4. Indução de polidipsia

- . Indução de bócio e hipertrofia das adrenais
- . Alterações em metais séricos

b) Grupo II: neste experimento, administramos a ratos machos soluções de lítio na concentração correspondente a cada grupo experimental e o grupo controle, sempre por via i.p. no volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal, dados uma vez ao dia, aproximadamente às 9:00 hs da manhã, por 5 semanas (35 dias) consecutivos.

As doses empregadas nos grupos experimentais foram: 1,5; 1,0 e 0,5 mEq/kg/dia e para o grupo controle foi utilizado água deionizada como placebo.

Após 4 semanas de tratamento crônico com lítio ou placebo, os animais foram submetidos ao teste de estereotipia, recebendo uma dose única de solução de apomorfina, via i.p., no volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal (doses de 3 mg/kg ou 0,6 mg/kg) realizada no início do teste.

Após uma semana do teste de estereotipia, portanto após 5 semanas de tratamento crônico com lítio ou placebo, os animais foram colocados na caixa de atividade, ocasião em que receberam uma única dose de solução de tranilcipromina, via i.p., no volume de 0,2 ml/100 g de peso corporal (dose de 10 mg/kg) realizada 2:30 h antes do teste. Procedemos:

- . Avaliação ponderal

- . Teste de estereotipia induzido por apomorfina nas

doses de 3,0 mg/kg ou 0,6 mg/kg

. Hiperatividade induzida por tranilcipromina

c) Grupo III: neste experimento administramos a ratos machos, soluções de lítio na concentração correspondente a cada grupo experimental e no grupo controle, sempre por via i.p., no volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal, dados uma vez ao dia, aproximadamente às 9:00 hs da manhã.

As doses empregadas nos grupos experimentais foram de 1,0 e 0,5 mEq/kg/dia e para o grupo controle foi utilizado água deionizada como placebo.

Os animais foram injetados por 1, 2 ou 3 semanas (correspondentes a cada grupo experimental tratado subcronicamente) e por 4 semanas (correspondente ao grupo experimental tratado cronicamente).

Após as semanas de tratamento correspondentes a cada grupo, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral na dose única de 0,33 ml/100 g por via i.p. e, imediatamente após a indução, foi colhido sangue em seringa heparinizada introduzida na cavidade ventricular.

O sangue colhido foi colocado imediatamente em um recipiente contendo gelo, no intuito de reduzir a utilização de glicose pelas células sanguíneas. Este sangue foi então utilizado para as dosagens sanguíneas de glicose pelo método Somogy Nelson (que descreveremos na parte 2, no item a.4.1).

Após a coleta de sangue, retirou-se um fragmento de fígado do animal, que foi imediatamente colocado em um tubo previamente pesado, contendo hidróxido de potássio. O tubo, agora com a amostra, foi novamente pesado e por diferença calculado o peso da amostra, que variou em torno de aproximadamente 1 g de tecido. Este fragmento de tecido hepático foi utilizado para dosagem de glicogênio pelo método de Pflieger Modificado (que descrevemos na parte 2 no item a.4.2). Procedemos:

- . Dosagem de glicose sanguínea
- . Dosagem de glicogênio hepático

4.b) METODOS DE AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO LÍTIO:

4.b.1) Experimento 1:

Foram utilizados diferentes procedimentos para selecionar uma dose de lítio que no rato não provocasse efeitos tóxicos ou comportamentais evidentes:

- . evolução ponderal
- . escala avaliação toxicidade
- . teste de campo aberto

a) METODOLOGIA:

a.1) EVOLUÇÃO PONDERAL:

Todos os animais foram inicialmente pesados e distribuídos quanto ao peso, para que os grupos não diferissem *a priori* entre si.

Os animais foram avaliados quanto à alteração de peso corporal, sendo repesados semanalmente.

a.2) AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE:

Os animais foram avaliados semanalmente, por aproximadamente 10 minutos por gaiola. Esta avaliação de

toxicidade foi feita observando-se os animais tratados e os controles, alojados em suas gaiolas de criação. A cada item foi dado um grau (que variava de 0 a 3) definido pela comparação dos animais tratados em relação aos animais controle, nas mesmas condições.

Assim:

- . Grau 0 sem alterações em relação ao controle
- . Grau 1 alteração leve
- . Grau 2 alteração moderada
- . Grau 3 alteração acentuada

A avaliação é subjetiva e foi feita sempre pelo mesmo observador, desde o início até o final do tratamento, quanto aos seguintes índices de toxicidade:

. diarréia (leve - aumento do volume de fezes, sem alteração do número de bolos fecais; moderada - aumento do volume e do número de bolos fecais e acentuada - aumento do volume de fezes, não sendo possível contar o número de bolos fecais devido as fezes estarem liquefeitas)

. presença de piloerção (leve - em 1 animal; moderada - em 2 animais e acentuada - nos 3 animais)

. aumento de volume de urina (os graus eram dados de acordo com o aspecto dos papéis que forravam as bandejas colocadas sob as gaiolas de criação: leve - papel umedecido; moderado - papel molhado e acentuado - papel encharcado)

. presença de hemorragia nas mucosas dos olhos, boca, nariz e ânus (leve - em 1 animal; moderada - em 2 animais e acentuada - nos 3 animais)

. ptose palpebral (leve - em 1 animal; moderado - em 2 animais e acentuado - nos 3 animais)

. dispnéia (leve - em 1 animal; moderada - em 2 animais e acentuada - nos 3 animais)

Anotávamos também a ocorrência (+) ou ausência (-) dos sinais abaixo relacionados durante a semana de tratamento, não nos restringindo apenas ao período de observação destinado à avaliação descrita acima:

- . tremores e/ou abalos musculares
- . ataxia
- . coprofagia
- . convulsão
- . dor (na hora da injeção)
- . ulcerações
- . mortes

Essas avaliações eram feitas diariamente no mesmo horário (9 h da manhã).

a.3) CAMPO ABERTO:

- Aparelho de Campo Aberto:

O aparelho consiste de um círculo de madeira de 85 cm de diâmetro, totalmente cercado de um parapeito também de madeira, com altura de 32 cm.

O aparelho todo é pintado de cor branca. Há no fundo desta arena, desenhado em linhas negras, 3 círculos concêntricos interceptados por 9 segmentos de retas radiais (ficando portanto o chão do aparelho subdividido em 19 regiões de áreas iguais).

Circundando este sistema, há uma estrutura metálica à uma altura de 110 cm do piso do aparelho. Este sistema, suporta 2 lâmpadas de 110 watts cada e um cortinado de tule circular, de forma que o observador não possa ser visto pelo animal, no interior do Campo Aberto. Ao lado do aparelho foi colocado um circulador de ar com o intuito de: produzir um ruído de fundo constante (abafador de ruídos externos à sala de teste) manter a temperatura da sala onde está o aparelho e distribuir homogeneamente qualquer odor exalado no local.

- Procedimento:

Os animais foram submetidos ao Campos Aberto no pré-tratamento e também uma vez por semana, nas 4 semanas de tratamento.

O teste consistiu na exposição individual do animal à arena por 3 minutos, sendo os testes realizados sempre no mesmo horário.

Iniciou-se pela colocação do animal no centro da arena, com as luzes acesas e o circulador de ar ligado. O cortinado foi então fechado, o cronômetro acionado e observou-se a movimentação horizontal (ambulação), que é a somatória do número de espaços invadidos com as 4 patas, e a movimentação vertical (levantar-se), avaliada pelo número de vezes que o animal apoiou-se apenas nas patas traseiras.

Registrrou-se também o "tempo de centro" que é o tempo que o animal demorou para deixar o centro da arena. Não utilizamos o índice referente a número de bolos fecais emitidos até o final da sessão, uma vez que o tratamento com lítio produziu diarreia em diversos animais.

No intervalo entre o teste de cada animal, a arena era completamente limpa com papel higiênico e um pano embebido com álcool a 70% (para retirar possíveis odores emitidos pelo animal anterior). Após o último teste, os animais eram sacrificados por decaptação, sendo o soro e amostras dos tecidos colhidos para dosagens bioquímicas (descrito na parte 2, item a.3).

a.4) ANÁLISE ESTATÍSTICA:

As comparações foram feitas sempre entre os grupos tratados e o grupo controle.

a.4.1) Análise Paramétrica:

Efetuamos uma análise de variância seguida do teste de t-Student (38, 39, 40) aplicado nos resultados de avaliação ponderal. Utilizamos $\alpha = 5\%$ monocaudal. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados estatisticamente significantes.

a.4.2) Análise não-Paramétrica:

Efetuamos o teste de Kruskal Wallis seguido de teste de Mann Whitney segundo (41) com $\alpha = 5\%$ monocaudal para as observações do teste de campo aberto. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados estatisticamente significantes.

b) RESULTADOS:

b.1) EVOLUÇÃO PONDERAL:

- Resultados obtidos em fêmeas

Na evolução ponderal dos ratos fêmeas, observamos na 1a. semana de tratamento, uma diminuição de peso dos grupos de doses 3 e 2 mEq/kg quando comparados com o grupo controle. Esta diferença foi à nível de $p < 0,05$ para ambos os grupos.

Na 2a. semana de tratamento notamos que apenas o grupo de dose 3 mEq/kg, continuava com a média de peso menor em relação ao grupo controle, sendo que a diferença inicial foi mantida ($p < 0,05$).

Na 3a. semana de tratamento observamos que na dose de 2 mEq/Kg houve uma diminuição do peso em relação ao grupo controle, sendo esta diferença de $p < 0,05$.

Os demais grupos tratados com lítio não diferiram estatisticamente nesta ou nas demais semanas de tratamento.

(Fig.1)

- Resultados obtidos em machos:

Excetuando-se o grupo de dose de 3 mEq/kg, para a 3a. semana de tratamento, onde ocorreu uma redução de peso significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, não

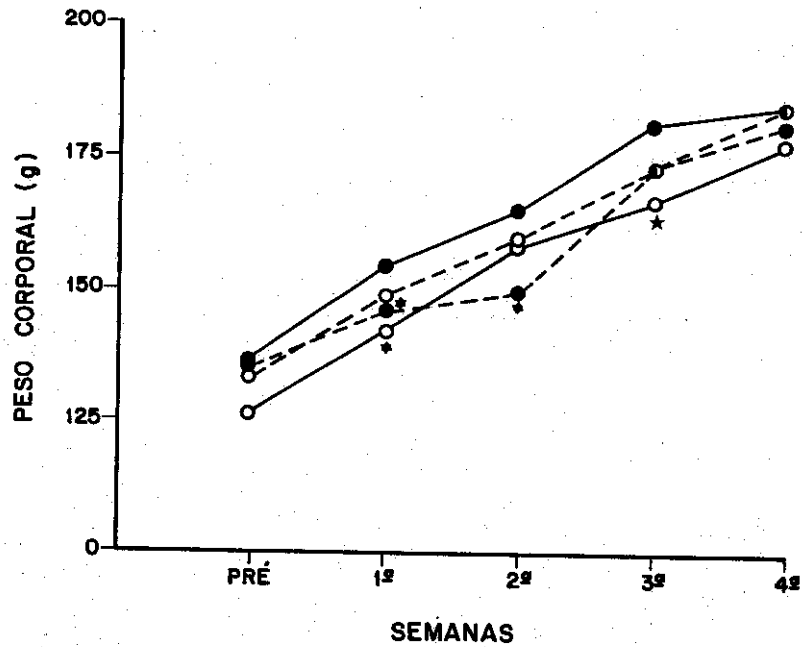


Fig. 1 - EVOLUÇÃO PONDERAL, ratos fêmeas tratadas cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam a média do peso corporal (g), medidos semanalmente desde o pré até o final do tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos * $p < 0,05$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 18 animais para o grupo controle e Li-3,0, e 9 animais para os grupos Li-2,0 e Li-1,0.

●—● controle; ●---● Li-3,0 ; ○—○
Li-2,0 ; ○---○ Li-1,0 .

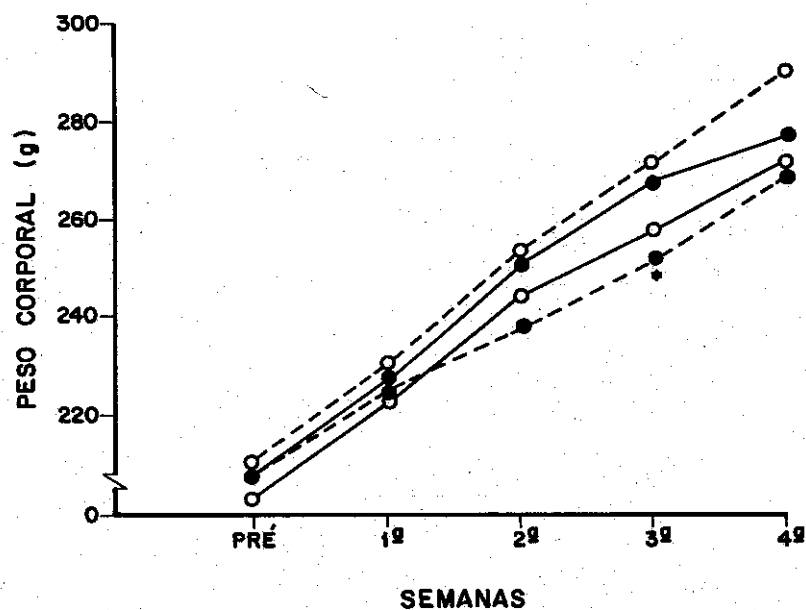


Fig. 2 - EVOLUÇÃO PONDERAL, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou litio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam a média do peso corporal (g), medidos semanalmente desde o pré até o final do tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos * $p \leq 0,05$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-3,0 ; ○—○
 Li-2,0 ; ○---○ Li-1,0 .

observamos qualquer outra diferença estatisticamente significativa.
(Fig.2)

b.2) AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

- Resultados obtidos em fêmeas e machos:

Os resultados aparecem nas tabelas 1 e 2.

b.3) TESTE DE CAMPO ABERTO

- Resultados obtidos em fêmeas:

Observamos na 1a. semana de tratamento, uma diminuição significativa da ambulação e levantar-se, no grupo com dose de 3 mEq/kg ($p < 0,05$) para ambos os comportamentos. Observamos também um aumento apenas na ambulação dos animais que receberam a dose de 1 mEq/kg ($p < 0,05$).

Na 3a. semana de tratamento observamos uma diminuição da ambulação dos grupos de doses 3 e 2 mEq/kg ($p < 0,01$ para o grupo de dose 3 mEq/kg e $p < 0,05$ para o grupo de dose 2 mEq/kg). Quanto ao levantar-se, obtivemos também uma diminuição para estes grupos ($p < 0,01$ para ambos).

Na 4a. semana de tratamento obtivemos uma diminuição da ambulação do grupo de dose 3 mEq/kg ($p < 0,01$), sendo que o levantar-se só estava diminuído no grupo de dose 2 mEq/kg ($p < 0,05$). Para os demais grupos nas diversas semanas de tratamento,

Tabela 1 - Avaliação de toxicidade. Ratos fêmeas submetidos ao tratamento crônico com placebo ou lítio em várias doses.

MEDIANA DOS GRAUS (0, 1, 2, 3)

AVALIAÇÃO/SEMANA	1ª SEMANA			2ª SEMANA			3ª SEMANA			4ª SEMANA		
Dose (mEq/kg/dia)	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1
Volume urina	3	1	0	3	2	1	2	2	0	1	1	0
Diarréia	2	2	0	3	3	1	3	2	1	2	2	0
Hemorragia mucosa	0	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
Ptose palpebral	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispneia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Não observamos os efeitos: tremores, ataxia, coprofagia, convulsão, prostração e morte, nas diversas semanas de tratamento.

Tabela 2 - Avaliação de toxicidade. Ratos machos submetidos ao tratamento crônico com placebo ou lítio em várias doses.

MEDIANA DOS GRAUS (0, 1, 2, 3)

AVALIAÇÃO/SEMANA	1ª SEMANA			2ª SEMANA			3ª SEMANA			4ª SEMANA		
	3	2	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1
Dose (mEq/kg/dia)	3	1	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0
Volume de urina	3	1	0	3	2	0	3	2	0	2	1	0
Diarréia	2	1	0	3	2	0	2	2	1	2	1	0
Hemorragia mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Piloereção	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispneia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Não observamos os efeitos: tremores, ataxia, coprofagia, convulsão, prostração e morte, nas diversas semanas de tratamento.

não notamos qualquer diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros medidos. (Fig.3)

- Resultados obtidos em machos:

Na 1a. semana de tratamento o grupo de dose de 3 mEq/kg mostrou redução na ambulação ($p < 0,01$) e levantar-se ($p < 0,05$). O grupo 2 mEq/kg reduziu apenas o levantar-se ($p < 0,01$) em relação ao controle. Não houve diferença nos demais parâmetros medidos.

Para a 2a. semana de tratamento notamos redução na ambulação para os grupos de dose 3 mEq/kg e 1 mEq/kg (ambos com $p < 0,05$). O grupo 2 mEq/kg reduziu o levantar-se ($p < 0,05$). Nesta semana nenhum outro parâmetro mostrou diferença.

Na 3a. semana de tratamento observou-se redução na ambulação ($p < 0,01$ grupo 2 mEq/kg) e no levantar-se ($p < 0,01$ para o grupo 2 mEq/kg e $p < 0,05$ para o grupo 1 mEq/kg). Notamos também, redução no número de bolos fecais nos grupos 3 e 2 mEq/kg (ambos com $p < 0,05$).

Na última semana de tratamento apenas o grupo 3 mEq/kg manteve redução em relação ao controle (ambulação $p < 0,01$ e levantar-se $p < 0,05$). (Fig.4)

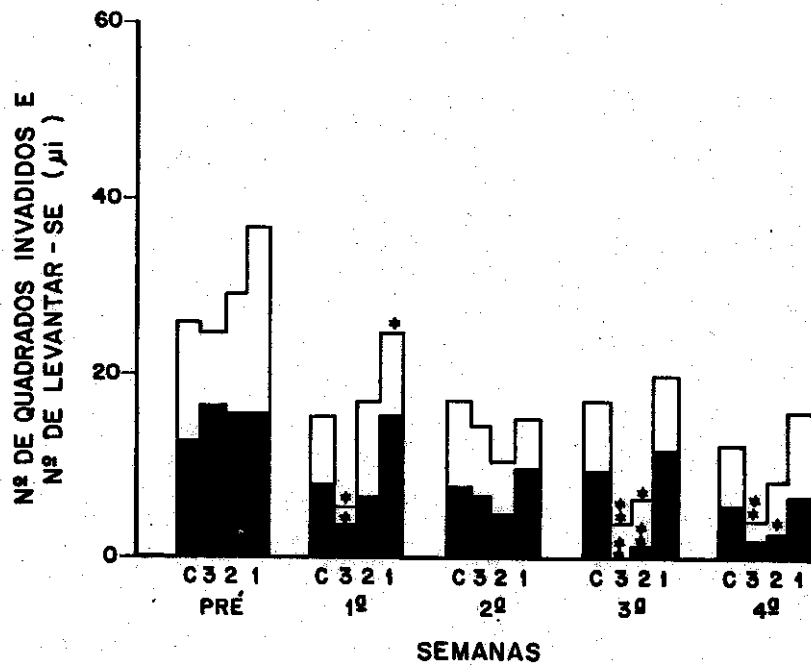


Fig. 3 - TESTE DE CAMPO ABERTO, ratos fêmeas tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As barras representam a mediana dos comportamentos: ambulação e levantar-se onde foram distribuídos os grupos controle; Li-3,0; Li-2,0 e Li-1,0 consecutivamente, semanalmente desde o pré até o final do tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Mann Whitney), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

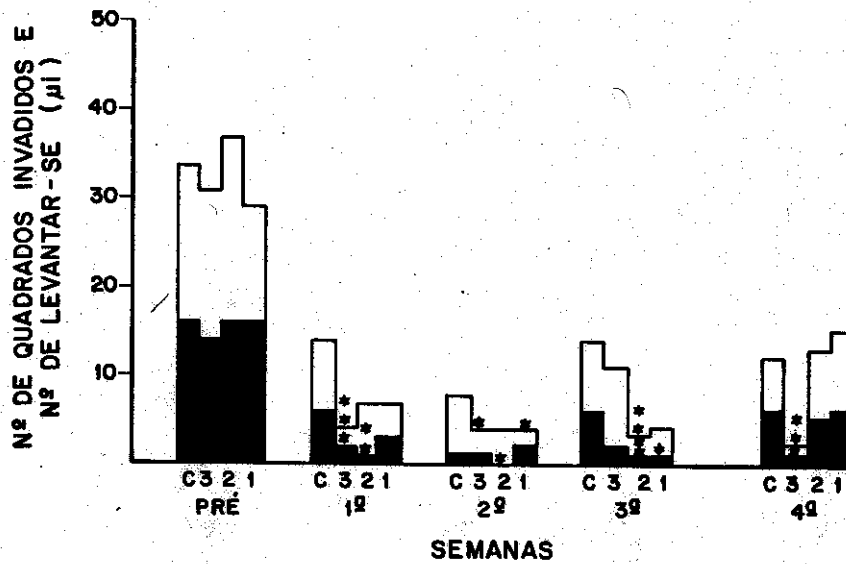


Fig. 4 - TESTE DE CAMPO ABERTO, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/kg/dia). As barras representam a mediana dos comportamentos: ambulação e levantar-se onde foram distribuídos os grupos controle; Li-3,0; Li-2,0 e Li-1,0 consecutivamente, semanalmente desde o pré até o final do tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Mann Whitney), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

c) DISCUSSÃO

c.1) Evolução Ponderal e Avaliação da Toxicidade:

Notamos, através da evolução ponderal dos animais, que o tratamento com lítio nas doses administradas, não impediu o crescimento corporal característico do rato na idade utilizada, porém, a taxa de crescimento foi menor para a dose de 3 mEq/kg e menos intensamente para a dose de 2 mEq/kg, em uma ou mais das semanas centrais de tratamento. Esta observação de perda de peso em relação ao controle coincide com as semanas em que os efeitos tóxicos foram vistos com maior frequência e/ou intensidade. Aparentemente, ao menos para os parâmetros de intoxicação com lítio, nossos animais pareceram ser capazes de desenvolver mecanismos compensatórios que reduzem a manifestação de sinais de toxicidade, ao longo do tratamento.

O efeito de peso igual ou abaixo do controle foi observado no rato e documentado por outros autores, em alguns relatos (21, 22, 23). No entanto, a maioria dos trabalhos aponta perda de peso corporal e utiliza doses iguais ou maiores que 3 mEq/kg diários (42, 43, 69); em doses equivalentes à estas que consideramos altas, a perda de peso corporal pode ser evitada por suplementação de Na⁺ e/ou K⁺, na dieta dos animais (22, 23).

Sabe-se que os cátions sódio e/ou potássio, quando administrados concomitantemente ao tratamento com lítio são capazes de atenuar ou reverter a intoxicação por lítio (82). O mecanismo deste efeito é renal, pois promove aumento do

"clearance" de lítio (83) evitando a instalação do ciclo de aumento de lítio sérico/queda no "clearance" do lítio/aumento adicional de lítio sérico, cuja progressão é geralmente fatal (23).

Em nossos experimentos, não obtivemos com a dose de 1 mEq/kg, um aumento real de peso corporal, tal como é característico, nos pacientes tratados com lítio (19, 20) e somente foi relatado para ratos fêmeas (24, 26, 25).

Claro está, pelos dados de peso corporal e avaliação toxicológica que quanto menor for a dose utilizada, menos intensos e/ou frequentes foram os sinais de intoxicação. Assim, a dose de 1 mEq/kg não provocou alteração da taxa de crescimento quer em machos ou em fêmeas e apresentou apenas alterações classificadas como "leves" na avaliação toxicológica subjetiva. Cabe notar que todas as doses empregadas nos experimentos não apresentaram os sinais mais graves de intoxicação, tais como: ataxia, convulsões e mortes.

c.2) Teste de Campo Aberto:

Desde o artigo inicial de Cade (1), que relatava a produção de depressão na atividade motora espontânea de cobaia, muitos investigadores sentiram que esse seria o efeito esperado de uma droga que reduzisse a excitação maníaca dos pacientes; a confirmação dessa expectativa, foi apenas obtida em doses relativamente altas (88), não aparecendo em doses mais reduzidas (5).

Para o teste de campo-aberto, metodologia largamente utilizada para a avaliação de drogas de ação central (89), os resultados de administração aguda do lítio, mostram redução de ambulação e especialmente levantar-se (11, 13, 14, 15, 17, 90) sendo obtidos também em administração crônica (16, 17) mas não, quando a última injeção antes do teste é substituída por salina (91). Acredita-se que estes resultados, sejam apenas decorrentes dos efeitos do lítio agindo periféricamente, uma vez que praticamente não se detectam níveis de lítio no SNC no período de até 24 h após uma injeção i.p. (92) e os efeitos observados ao campo-aberto, não aparecem quando o lítio é administrado intracisternamente (93).

Obviamente, para estudos semelhantes ao nosso, com administração diária de lítio, inclusive no dia dos testes comportamentais, tanto efeitos centrais, quanto periféricos se misturam. A medida desta influência dos efeitos periféricos sobre os comportamentos emitidos ao campo-aberto, no entanto, embora possa ser consequência de efeitos tóxicos gerais, tais como a redução de peso corporal (17), não significam sempre, ou apenas, decorrências de efeitos tóxicos (18)

Considerando-se os estudos já estabelecidos dos efeitos do lítio no teste de campo-aberto, esperávamos, para a dose de 3 mEq/kg (a mais alta utilizada em nosso estudo); uma redução dos comportamentos de ambulação e especialmente do levantar-se, após a administração crônica.

Os resultados assim esperados, foram confirmados para ratos machos e fêmeas. Na sequência de nosso pensamento

esperávamos também, reduzir a dosagem diária de lítio a um nível tal que já não pudéssemos notar reduções na atividade espontânea de nossos animais, durante o tratamento. De maneira consistente, estes resultados foram obtidos para as doses de 1 mEq/kg em fêmeas em todas as semanas, e, com exceção das semanas centrais de tratamento, observado também em ratos machos. Curiosamente, a dose de 1 mEq/kg em fêmeas chegou a induzir aumento de ambulação no início do tratamento.

De maneira geral, frente aos resultados iniciais obtidos, quer com as medidas físicas/fisiológicas, quer com as observações subjetivas, cremos ser a dose de 1 mEq/kg, dada cronicamente, mais adequada ao estudo do lítio. Pois, a dose de 1 mEq/kg além de não alterar a taxa de crescimento de nossos animais, também não afetou o comportamento emitido naturalmente e não provocou efeitos tóxicos marcantes.

4.b.2) Experimento II:

Procedimentos utilizados para demonstrar que a dose de lítio selecionada é capaz de provocar os efeitos colaterais semelhantes aos observados na clínica:

- . indução de polidipsia
- . evolução ponderal
- . indução de bócio e hipertrofia das adrenais
- . alteração em metais séricos
- . alteração metabólicas (glicemia e glicogênio hepático)

a) METODOLOGIA:

a.1) AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE LÍQUIDO:

Forneciamos água de torneira *ad libitum* aos animais, sendo o consumo avaliado através da pesagem diária das garrafas, realizadas sempre após a injeção dos animais.

Acompanhamos diariamente o consumo de água até a 4ª semana após o início das injeções.

a.2) EVOLUÇÃO PONDERAL:

Idem ao descrito na parte 1, item a.1.

a.3) ALTERAÇÃO EM METAIS SÉRICOS E GLÂNDULAS TIREÓIDES E ADRENAIS:

a.3.1) Procedimento:

Três dias após o último teste de Campo Aberto (4a. semana de tratamento com LiCl), os animais foram mortos por decaptação, sendo colhido imediatamente o sangue necessário para as dosagens séricas de Na⁺, K⁺, Li⁺ e Catt. Retiraram-se, então fragmentos de cérebro, fígado, rim e músculo (de aproximadamente 0,5 g - pesado logo após a retirada) para a dosagem de Li⁺ (Procedimento descrito posteriormente na parte 4). Após a retirada de fragmentos de órgãos para a extração de lítio, as glândulas tireóides e supra renais, foram dissecadas e imediatamente pesadas em balança analítica. Os pesos dessas glândulas foram corrigidos em porcentagem do peso corporal, sendo calculada a média de cada grupo de tratamento.

a.3.2) Dosagens Séricas de Metais:

O aparelho (fotometro de chama) foi zerado com água deionizada e calibrado com padrão fornecido pelo fabricante. Após a calibração lemos as amostras sucessivamente, sendo a limpeza entre as leituras feita com água deionizada.

A cada 10 amostras lidas, lemos o padrão novamente, para verificar se o aparelho continuava calibrado, não sendo aceitas variações superiores a 0,1 mEq/l (limite da precisão do aparelho).

a.3.3) Dosagem de Cálcio Sérico:

- Reagentes:

. Solução Estoque de Óxido de Lantâneo 0,5% (p/v):

Pesaram-se em balança analítica 5,85 g de óxido de lantâneo (pro-análise Merck) que foram dissolvidos em 200 ml de água deionizada. Acrescentaram-se 25 ml de ácido clorídrico pró-análise (p.a.) concentrado (Merck). Agitou-se até a dissolução completa do óxido de lantâneo. Adicionaram-se a esta mistura, 40 ml de n-butanol p.a. (Merck) e completou-se o volume para 1.000 ml com água deionizada.

. Solução Estoque de Carbonato de Cálcio (25 mM):

Pesaram-se em balança analítica 2,50225 g de carbonato de cálcio p.a. (Merck) que foram dissolvidas em 4 ml de ácido clorídrico p.a. concentrado (Merck). Após a dissolução completa do cálcio, completou-se q.s.p. 1 litro com água deionizada.

- Dosagem :

A dosagem de cálcio sérico foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica de acordo com Gichman *et al.* (35).

Diluímos as amostras de soro com solução estoque de lantâneo na proporção de 1:6. O aparelho foi zerado com solução estoque de lantâneo. Lemos as soluções padrão de cálcio e montamos a nossa curva. Após a leitura das soluções padrões, iniciamos as leituras sucessivas das amostras já diluídas. A cada 20 amostras lidas, relíamos as soluções padrões de cálcio para verificarmos se o aparelho continuava calibrado.

a.4) ALTERAÇÃO METABOLICA:

a.4.1) DOSAGEM DE GLICOSE SANGUINEA:

- Reagentes:

. Sulfato de Zinco Heptahidratado (p.a. Merck) - solução 5% (p/v): dissolveram-se 10 g do sal em q.s.p. 200 ml de água deionizada.

. Hidróxido de Bário Octahidratado (p.a. Merck) - solução 0,3 N: dissolveram-se 12 g do sal em q.s.p. 250 ml de água deionizada.

. Reagente A: - 25 g de carbonato de sódio anidro (p.a. Merck):
- 25 g de tartarato duplo de sódio e potássio
(p.a. Merck)
- 20 g de bicarbonato de sódio (p.a. Merck)

- 200 g de sulfato de sódio anidro (p.a. Merck) dissolver em 800 ml de água deionizada. Completar para 1 litro. Filtrar se necessário.

. Reagente B: adicionar 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado (p.a. Merck) a uma solução 15% (p/v) de sulfato cúprico pentahidratado.

. Reagente Arsenomolibdico: - 25 g de molibdato de amônia (p.a. Merck) dissolvidos em 450 ml de água deionizada. Juntar a essa solução 21 ml de ácido sulfúrico concentrado (p.a. Merck). Misturar. Dissolver 3 g de arseniato de sódio heptahidratado (p.a. Merck) em 25 ml de água deionizada. Misturar as soluções e incubar a 37°C de 24 a 48 horas. Guardar em frasco escuro com tampa de vidro.

- Procedimento:

Utilizamos o método de Somogy-Nelson para a dosagem de glicose sanguínea conforme descrito (36) e procedemos conforme descrito no item 4.a.3. Após a coleta, o sangue foi imediatamente colocado em um recipiente contendo gelo, com a finalidade de reduzir a utilização de glicose pelas células presentes no sangue.

- Desproteínização:

Transferimos 0,1 ml de sangue para um tubo de centrifuga contendo 1,5 ml de água deionizada. Adicionamos 0,2 ml de solução de hidróxido de bário e agitamos. Esperamos que a mistura adquirisse cor castanha. Acrescentamos 0,2 ml de solução de sulfato de zinco, agitamos e esperamos 5 minutos. Centrifugamos de 10 à 15 minutos em velocidade 4.000 rpm. Retiramos o sobrenadante.

- Reação:

Colocamos 1 ml de desproteínizado (sobrenadante) em tubos de ensaio e no tubo correspondente ao branco, colocamos 1 ml de água deionizada. Adicionamos a cada tubo 1 ml de água deionizada. Acrescentamos mais 1 ml de reativo cúprico. Colocamos os tubos em banho-maria fervente por 20 minutos, resfriando logo em seguida com água gelada. Adicionamos 1 ml de reativo arsenomolibdico e misturamos. Acrescentamos 6 ml de água deionizada em todos os tubos, obtendo um volume final de 10 ml. Fizemos a leitura em espectrofotocolorímetro no comprimento de onda 500 nm, ajustando o zero com o branco.

a.4.2) DOSAGEM DE GLICOGENIO HEPATICO

A determinação de glicogênio hepático foi de acordo com o método de Pflieger Modificado (37).

- Reagentes:

- . Hidróxido de potássio 30% (p/v) (p.a. Merck)
- . Etanol 95% (v/v) (p.a. Merck)
- . Etanol 60% (v/v) (p.a. Merck)
- . Ácido Sulfúrico 0,6 N - diluíram-se 8 ml de ácido sulfúrico concentrado (p.a. Merck) em 200 ml de água deionizada e completou-se o volume até 250 ml.
- . Solução Saturada de Sulfato de Sódio (p.a. Merck)
- . Solução 0,5 N de Hidróxido de Sódio - dissolveram-se 5 g de hidróxido de sódio (p.a. Merck) em 200 ml de água deionizada e completou-se o volume até 250 ml.
- . Corante Fenol Red 0,5% (p/v)

- Procedimento:

. Extração e Purificação:

Dissecamos 1 g de fígado e colocamos em tubos de centrifuga, contendo 3 ml de hidróxido de potássio. O tecido foi então digerido por aquecimento em banho-maria fervente por cerca de 30 minutos. Adicionamos então, 0,5 ml de solução saturada de sódio e o glicogênio foi precipitado pela adição de 1,2 volumes de etanol 95% (volume do tecido + volume de KOH x 1,2 = volume de etanol).

Aquecemos novamente a mistura até que começasse a ferver, com objetivo de evaporar o excedente de álcool adicionado.

Resfriamos e centrifugamos então por 15 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado. Aquecemos o tubo por cerca de 3 minutos em banho-maria, para eliminação do álcool residual. O glicogênio precipitado foi então redissolvido em 2 ml de água deionizada e reprecipitado com 2,5 ml de etanol 95%. Centrifugamos novamente por 10 minutos em 2.000 rpm. Desprezamos o sobrenadante.

. Hidrólise:

Redissolvemos o glicogênio purificado com 6 ml de ácido sulfúrico 0,6 N. Esta mistura foi então transferida para um tubo de ensaio contendo um condensador com ar frio (bolinha de vidro), e o glicogênio foi hidrolizado por aquecimento durante 2:30 horas em banho-maria fervente.

A solução foi resfriada e neutralizada com hidróxido de sódio, utilizando-se como indicador o fenol red. Transferimos esta solução para um frasco volumétrico e diluímos para 20 ml de água deionizada.

O glicogênio foi hidrolizado à glicose, e esta glicose foi determinada pelo método de Somogy-Nelson, descrito no item a.4.1).

a.5) ANÁLISE ESTATÍSTICA:

a.5.1) Análise Paramétrica:

Efetuamos uma análise de variância seguida do teste de t-Student (38, 39, 40) aplicado em todos os resultados obtidos nesta parte experimental. Utilizamos $\alpha = 5\%$ monocaudal. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados estatisticamente significantes.

b) RESULTADOS:

b.1) CONSUMO DE AGUA:

Notamos que os animais tratados com lítio (machos e fêmeas) consumiram mais água ($p < 0,001$). Quanto ao grupo de dose 1 mEq/kg, as fêmeas iniciaram com diferença estatística de $p < 0,01$ na 2a. semana e atingiram $p < 0,001$ mantendo-se com esta diferença até o final do experimento. Nos machos, houve um aumento do consumo de água iniciado de forma estatisticamente significativa também na 2a. semana de tratamento ($p < 0,01$), sendo que o consumo de água reduziu-se ao nível do grupo controle na 3a. semana e voltou a aumentar na última semana de tratamento ($p < 0,001$). (Figs. 5 e 6)

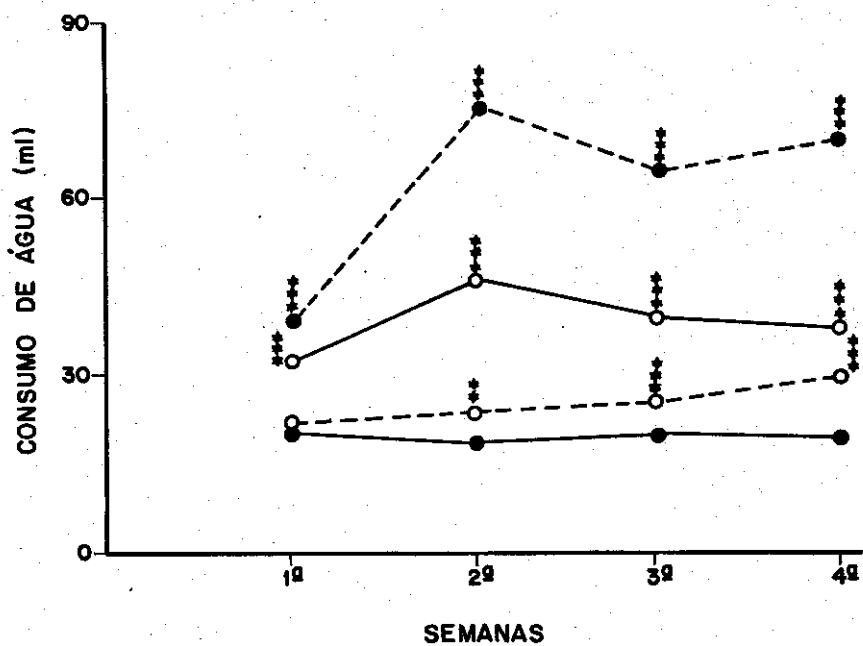


Fig. 5 - CONSUMO DE ÁGUA, ratos fêmeas tratadas cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam a média do consumo de água (em ml) por animal, medidos semanalmente durante o tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-3,0 ; ○—○
Li-2,0 ; ○---○ Li-1,0 .

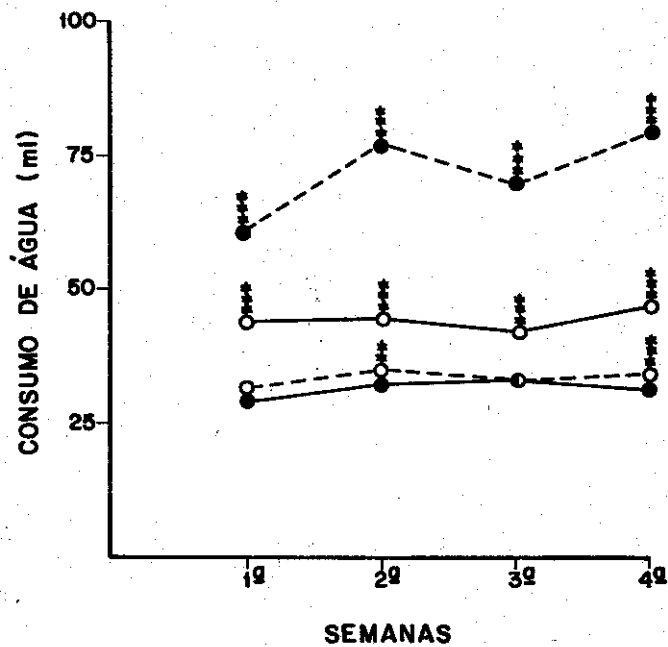


Fig. 6 - CONSUMO DE ÁGUA, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam a média do consumo de água (em ml) por animal, medidos semanalmente durante o tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-3,0 ; ○—○
 Li-2,0 ; ○---○ Li-1,0 .

b.2) EVOLUÇÃO PONDERAL:

O tratamento com lítio nas doses descritas, não afetou a evolução ponderal dos animais. (Fig. 7)

b.3) PESAGEM DAS GLANDULAS

- Resultados obtidos em fêmeas:

Obtivemos aumento de peso da tireóide, somente no grupo com dose de 2 mEq/kg sendo esta variação significativa ($p < 0,01$). O aumento de peso observado na glândula suprarenal foi significativo ($p < 0,001$). (Fig. 8)

- Resultados obtidos em machos:

Obtivemos na pesagem das glândulas tireóides e adrenais, um aumento de peso significativo ($p < 0,001$) em todos os grupos. (Fig. 9)

b.4) DOSAGEM SÉRICA DE METAIS:

- Resultados obtidos em fêmeas:

Quanto à concentração de sódio, não houve diferença estatisticamente significativa. Observamos que os grupos tratados com lítio tem concentrações de potássio mais altas que o grupo

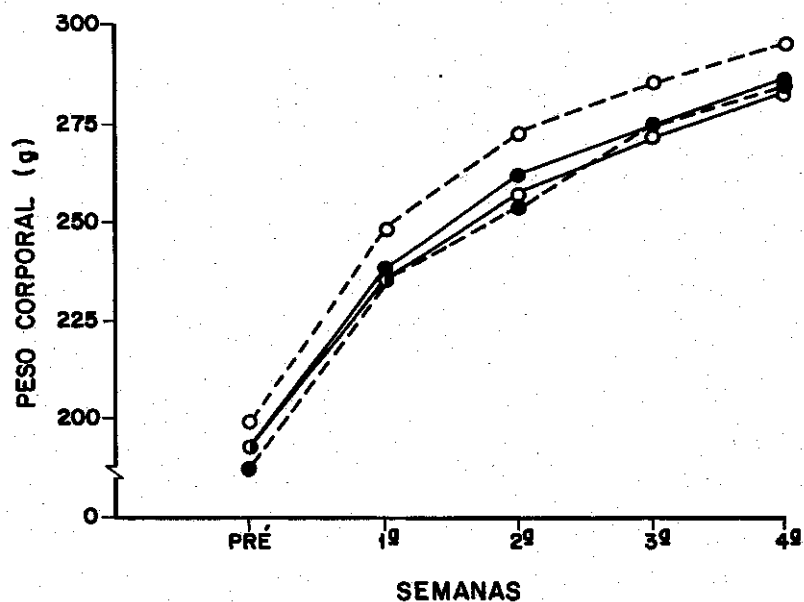


Fig. 7 - EVOLUÇÃO PONDERAL, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam a média do peso corporal (g), medidos semanalmente desde o pré até o final do tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, não observamos (teste t-Student) qualquer diferença. Foram utilizados 9 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-1,5 ; ○—○
 Li-1,0 ; ○---○ Li-0,5 .

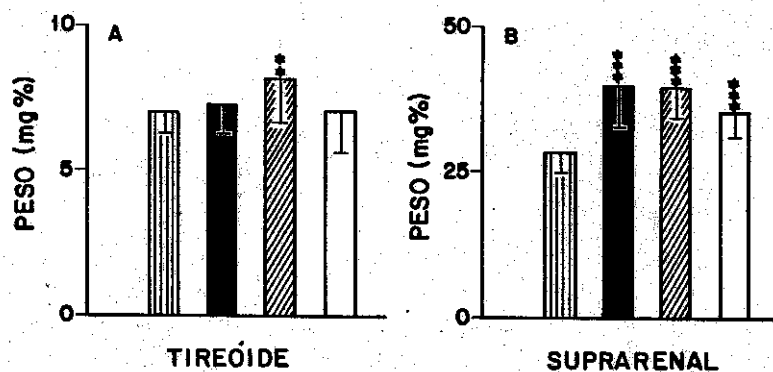


Fig. 8 - PESO DE GLÂNDULAS, ratos fêmeas tratadas cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As barras representam a média do peso das glândulas (mg%) dos diversos grupos. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo, exceto o grupo Li-3,0 (N=18).

controle;
 Li-3,0;
 Li-2,0;
 Li-1,0.

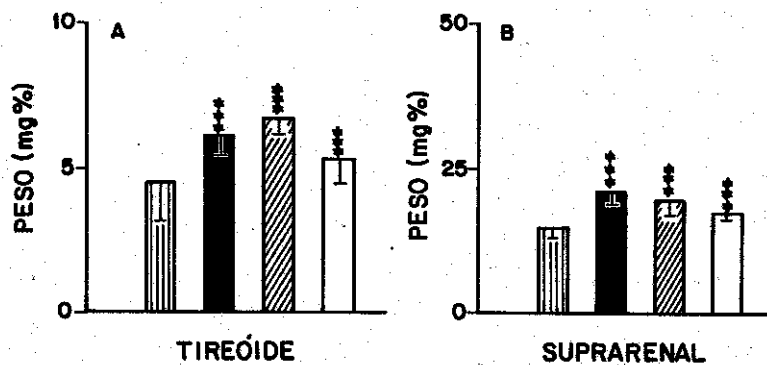


Fig. 9 - PESO DE GLÂNDULAS, ratos macho tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As barras representam a média do peso das glândulas (mg%) dos diversos grupos. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos *** $p \leq 0,001$ (teste t-Student) para todos os grupos. Foram utilizados 9 animais por grupo.

controle;
 Li-3,0 ;
 Li-2,0 ;
 Li-1,0 .

controle, com exceção do grupo 3 mEq/Kg que não diferiu. Estas diferenças são, para o grupo com dose de 2 mEq/kg a nível de $p < 0,01$ e para o grupo com dose de 1 mEq/kg a nível de $p < 0,001$. Quanto à concentração sérica de cálcio, observamos concentrações mais altas, sendo esta diferença a nível $p < 0,001$ em todos os grupos. As concentrações de lítio foram proporcionais às doses (Tab.3).

- Resultados obtidos em machos:

Não obtivemos diferenças em relação às dosagens de sódio. Houve um aumento do conteúdo sérico de potássio no grupo 3 mEq/kg ($p < 0,001$), sendo que não observamos diferenças significantes nos demais grupos. As concentrações de lítio foram proporcionais às doses. Quanto a concentração de cálcio, observamos aumento na concentração sérica deste íon no grupo tratado com dose 3 mEq/kg, sendo esta diferença a nível de $p < 0,001$. Os demais não diferiram. (Tab. 3)

b.5) DOSAGEM DE GLICOSE SANGUÍNEA:

Na 1ª. semana de tratamento observamos um aumento da glicose sanguínea. Esta diferença foi de $p < 0,001$ para o grupo tratado com a dose de 1 mEq/kg e de $p < 0,01$ para o grupo tratado com a dose de 0,05 mEq/kg.

Tabela 3 - Dosagens séricas de metais. Ratos machos e fêmeas, tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses.

FÊMEAS						
	Na ⁺	K ⁺	Li ⁺	N	Ca ⁺⁺	N
Controle	123,94 ± 26,74	3,62 ± 1,13	—	18	2,67 ± 0,27	9
3 mEq/kg/dia	130,16 ± 22,46	4,53 ± 1,27	2,64 ± 0,48	18	3,21 ± 0,17 ^{***}	9
2 mEq/kg/dia	121,22 ± 9,64	5,05 ± 1,51 ^{**}	2,03 ± 0,32	9	3,41 ± 0,30 ^{***}	9
1 mEq/kg/dia	122,11 ± 5,06	5,28 ± 0,99 ^{***}	1,04 ± 0,14	9	3,22 ± 0,14 ^{***}	9
MACHOS						
	Na ⁺	K ⁺	Li ⁺	N	Ca ⁺⁺	N
Controle	145,79 ± 7,53	4,93 ± 0,63	—	38	2,54 ± 0,22	18
3 mEq/kg/dia	143,61 ± 6,92	6,28 ± 1,16 ^{***}	2,75 ± 0,78	18	2,84 ± 0,11 ^{***}	18
2 mEq/kg/dia	145,50 ± 6,82	5,06 ± 0,25	1,70 ± 0,26	18	2,66 ± 0,26	18
1 mEq/kg/dia	145,00 ± 7,05	4,72 ± 0,57	0,84 ± 0,41	29	2,64 ± 0,18	9

Os resultados representam as dosagens (em mEq/l) ± desvio padrão. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos ^{**} p ≤ 0,01 e ^{***} p ≤ 0,001 (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram.

Na 3a. semana de tratamento houve um aumento da glicose sanguínea significativa $p < 0,001$ para o grupo tratado com a dose de 1 mEq/kg e $p < 0,01$ para o grupo tratado com a dose de 0,5 mEq/kg.

Na 4a. semana de tratamento observamos que o aumento perdurou apenas no grupo tratado com a dose de 1 mEq/kg ($p < 0,01$). (Tab. 4)

B.6) DOSAGEM DE GLICOGENIO HEPATICO

Na 1a. semana de tratamento, observamos um aumento ($p < 0,001$) em todos os grupos tratados com lítio.

Na 2a., 3a. e 4a. semanas de tratamento, não observamos diferença estatisticamente significativa. (Tab. 4)

c) DISCUSSÃO:

c.1) Indução Polidipsia:

A dose de 1 mEq/kg aumentou o consumo de água, tanto em machos quanto em fêmeas. Este aumento, foi no entanto mais discreto (não atingindo a 50% do controle) se comparado ao aumento médio de consumo do grupo tratado com 3 mEq/kg.

De fato, os resultados de aumento de sede, em pacientes tratados com lítio, não ultrapassam em média, o que os autores

Tabela 4 - Dosagem de glicose sanguínea e glicogênio hepático, ratos machos submetidos ao tratamento subcrônico e crônico com placebo ou lítio em várias doses.

GLICOSE SANGUÍNEA (mg%)	1ª SEMANA	2ª SEMANA	3ª SEMANA	4ª SEMANA
Controle	131,66 ± 7,53	136,25 ± 13,48	127,50 ± 10,25	151,25 ± 17,44
Li - 1,0 mEq/kg/dia	192,92 ± 36,52 ^{***}	144,58 ± 24,92	181,66 ± 18,68 ^{***}	192,92 ± 36,52 ^{**}
Li - 0,5 mEq/kg/dia	151,66 ± 19,98 ^{**}	160,83 ± 40,42	149,58 ± 18,80 ^{**}	151,66 ± 19,98

GLICOGÊNIO HEPÁTICO (mg/g DE TECIDO)	1ª SEMANA	2ª SEMANA	3ª SEMANA	4ª SEMANA
Controle	2,47 ± 0,78	17,56 ± 1,80	19,45 ± 4,16	17,80 ± 3,64
Li - 1,0 mEq/kg/dia	17,32 ± 2,69 ^{***}	18,06 ± 3,35	16,18 ± 4,55	16,75 ± 2,47
Li - 0,5 mEq/kg/dia	17,44 ± 3,21 ^{***}	16,86 ± 2,05	18,57 ± 2,68	15,39 ± 1,85

Os resultados representam as dosagens ± desvio padrão. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos ^{***} p ≤ 0,001 e ^{**} p ≤ 0,01 (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizado 6 animais por grupo.

classificam como "leve" ou "moderado" (84) e, especialmente, não cremos que sejam tão impressionantes quanto o volume médio observado de 76,51 ml consumido por fêmeas tratadas com a dose de 3 mEq/kg, na 2a. semana de tratamento, onde os animais pesavam em média apenas 148,58 g de peso corporal (aumento aproximado de 4 vezes o do controle).

Não podemos confiar que a indução de polidipsia tal como vista no rato, em nossos resultados, para as doses de 3 e 2 mEq/kg sejam aceitáveis como modelo da indução do mesmo efeito em humanos.

A polidipsia induzida pela dose de 1 mEq/Kg foi evidente, porém dentro de limites fisiológicos, e portanto cremos ser mais compatível com aquela observada no homem.

c.2) Indução Bócio e hipertrofia das adrenais:

Os resultados obtidos em glândulas corresponderam à expectativa de glândulas mais pesadas em fêmeas do que em machos. Quanto à indução de bócio, este ocorreu consistentemente em todos os grupos de tratamento, em ratos machos e apenas no grupo 2 mEq/kg em fêmeas. Cabe notar no entanto que o grupo controle apresentou maior peso médio relativo em fêmeas que em machos. Este grupo controle de peso médio alto, poderia estar "mascarando" a indução de bócio dos grupos 3 e 1 mEq/kg de lítio. A indução de bócio e/ou hipotireoidismo é um efeito colateral significante, em pacientes tratados com lítio (27, 28, 29) e pode, inclusive ser

observado em nossos ratos machos, na dose de 1 mEq/kg onde efeitos intoxicantes foram mínimos.

Outro efeito endócrino que estudamos, foi o aumento de peso das glândulas suprarenais que é um índice de "stress" reconhecido e utilizado na investigação básica (85). Este aumento ocorreu em todas as doses nos animais tratados.

No caso específico da administração do lítio, a dor após a injeção, foi observada em todos os grupos tratados e ocorreu como "stress" adicional ao da injeção. Além desta observação, lembramos que o lítio possui um efeito direto, provavelmente via aumento de secreção de aldosterona, que poderia estar contribuindo, na hipertrofia das adrenais (29).

c.3) Evolução Ponderal:

Acompanhamos a evolução ponderal de ratos machos, agora utilizando doses mais baixas de lítio (em torno de 1 mEq/kg) e não observamos qualquer alteração na taxa de crescimento desses animais. Por outro lado, frequentemente observa-se, em pacientes tratados com lítio, um aumento de peso corporal (19, 20). Em nossos animais tratados cronicamente com lítio, este efeito não foi observado.

c.4) Alterações Metabólicas :

O estudo dos efeitos do lítio no metabolismo intermediário de carboidratos é complexo e os resultados obtidos são muitas vezes controversos. A causa principal da obtenção de dados conflitantes nesta área, reside na ação disseminada e profunda do lítio nos diversos tecidos e em funções do organismo. Assim, os efeitos do lítio no metabolismo de carboidratos decorrem de alterações celulares e hormonais. Tais alterações, por sua vez, são afetadas por variáveis dependentes do sujeito (idade, sexo, espécie), do esquema experimental (dose, via, duração do tratamento e tempo após administração) e condições de tratamento (jejum/alimentação; stress/habituação, etc.).

Desta forma, não foi fácil compilar os dados fornecidos pela literatura clínica e básica, sendo que resumiremos a revisão feita, nos atendo apenas aos itens a) alterações no glicogênio hepático e b) alterações na glicemia.

c.4.1) Alterações no Glicogênio Hepático:

Com referência ao glicogênio, há relatos na literatura onde o tratamento agudo com lítio, levou à diminuição do glicogênio no fígado e conseqüentemente aumentou a glicose sérica (45, 46). Sabe-se que o conteúdo de glicogênio hepático é influenciado por diversos hormônios e metabólitos tais como insulina, glucagon, adrenalina, corticosteróides e glicose circulante (47). A diminuição do glicogênio hepático seria devida a efeitos diretos e indiretos do lítio. Em sua ação direta, a

atividade glicogenolítica do lítio seria decorrente de uma ação no sistema de fosforilase do fígado (45, 46). O lítio aumentaria a atividade da fosforilase-a, aumentando a metabolização do glicogênio e conseqüentemente liberando glicose para a corrente sanguínea.

Em sua ação indireta, o aumento no metabolismo do glicogênio seria decorrente do aumento da liberação de adrenalina e glucagon que, por sua vez também ativam a fosforilase hepática (45, 46, 48).

A maioria dos relatos, no entanto constatam que o tratamento com lítio em ratos aumenta a captação (50) e incorporação da glicose à glicogênio no fígado (46), cérebro (45, 49), diafragma (45), músculo (51) e tecido adiposo (52, 53). Neste aspecto o lítio teria muitas propriedades em comum com os efeitos da insulina (54, 55, 56).

Outras enzimas, envolvidas no metabolismo do glicogênio, são também diretamente influenciadas pelo lítio. O glicogênio é sintetizado pela uridina-difosfato-glicose, sendo esta reação catalizada pela enzima glicogênio sintetase (54). Demonstrou-se que o lítio age diretamente na enzima glicogênio sintetase aumentando sua atividade (53). Tal efeito poderia ser mediado pela estimulação de uma fosfatase ou pela inibição de uma proteína quinase, provavelmente a proteína glicogênio sintetase quinase 3 (53), já que ambas são moduladoras da atividade da glicogênio sintetase. Qualquer das duas possíveis ações descritas levariam ao aumento da atividade da glicogênio sintetase pelo lítio, elevando assim os depósitos de glicogênio.

Observamos em nossos animais tratados (tabela 4) subcrônicamente (1a. semana) com lítio, um aumento na concentração de glicogênio hepático. Esses resultados concordam com o relato de Krulik e Zvolsky (46), que também observaram no rato elevação nos níveis de glicogênio hepático após 7 dias de tratamento com lítio. Desta forma, o aumento na concentração de glicogênio hepático que obtivemos, poderia também ser decorrente do aumento da atividade da enzima glicogênio sintetase induzido pelo lítio.

Por outro lado, tanto os nossos resultados quanto os obtidos por Krulik e Zvolsky (46), poderiam ser interpretados, observando-se ao invés de um aumento nos níveis de glicogênio nos animais tratados com lítio, uma queda desta concentração no grupo controle, tendo em vista os resultados que possuímos dos níveis de glicogênio nas semanas subsequentes de tratamento.

Nossos resultados da 1a. semana de tratamento, no grupo controle, forneceram valores de $2,47 \pm 0,78$ (mg/g), sendo da mesma magnitude daquela obtida por aqueles autores ($3,48 \pm 0,88$ mg/g) estando inclusive bem abaixo dos dados considerados normais (16 a 26 mg/g) descrito para o rato da cepa Wistar sob condições experimentais (45).

Assim, nos parece mais plausível interpretar os resultados pelo prisma da queda do glicogênio hepático no grupo controle e sua manutenção a níveis "normais" no grupo tratado com lítio. E, alternativamente, imaginar que o tratamento com lítio foi capaz de impedir a queda do glicogênio hepático, conforme observado no grupo controle na 1a. semana de tratamento.

Qualquer que fosse o efeito sobre o glicogênio hepático ocorrido no grupo controle este foi compensado no decorrer do tratamento (tabela 4). Qual seria a causa responsável pela queda inicial do glicogênio?

Se considerarmos isoladamente os dados obtidos somente para o glicogênio hepático poderíamos reafirmar a idéia de que no grupo tratado estaria predominando a ação "tipo insulina" do lítio, com ativação da glicogênio sintetase, camuflando o efeito do stress (somente visível no grupo controle) nos animais não adaptados à rotina das injeções.

Se por outro lado, considerarmos os dados obtidos para o glicogênio em associação aos dados fornecidos pela glicemia, esperaríamos um aumento da glicose circulante no grupo controle, em relação aos grupos tratados. Observamos no entanto, valores discretamente aumentados de glicemia para todos os grupos, estando acentuada nos grupos tratados com lítio.

A hipótese de camuflagem do efeito do stress inicial pelo lítio, embora não obtivesse total confirmação pelo aumento da glicemia no controle, ainda não poderia ser descartada, já que os níveis de glicose sanguínea são mais elevados que os normalmente obtidos em ratos machos ($117,25 \pm 20,75$ N = 38) de mesma cepa e origem, em condições semelhantes de manutenção, porém sem qualquer manipulação ou tratamento (65) e refletiriam o stress dos animais.

Assim, os animais tratados com lítio estariam desde o início do experimento tanto ou mais estressados que os animais controle mas, dado ao efeito estimulante direto do lítio sobre a

síntese do glicogênio, este stress não apresentou a queda típica nos níveis de glicogênio hepático associados à hiperglicemia.

Esta interpretação é reafirmada, acrescentando-se outros dados, na discussão que se segue.

c.4.2) Alterações na Glicemia::

Em pacientes tratados cronicamente com lítio e pacientes não maniaco-depressivos tratados agudamente com lítio, encontrou-se aumento na tolerância à glicose (50, 51, 54). Estudos em ratos com administração aguda de lítio, mostraram um aumento na glicemia, atingindo seu pico máximo 2 hs após a injeção, com subsequente queda a níveis abaixo do controle que persistiram até 24 hs após a injeção (45, 46, 54). Ao que tudo indica, a elevação inicial da glicemia ocorreu provavelmente em consequência da mobilização de adrenalina mas, com o passar do tempo a queda na glicemia seria compensatória, ocorrendo em função da liberação de insulina, do aumento na captação de glicose para a síntese de glicogênio (45, 54, 55).

A liberação hepática de glicose, através da glicogenólise está mais adaptada a ocorrer em resposta a emergência agudas, sendo que em situação de stress crônico, a produção de glicose se faz por outras vias, tais como a gliconeogênese (47). Os glicocorticóides estimulam a gliconeogênese (transformação hepática de resíduos desaminados de aminoácidos em glicose) elevando portanto a concentração de glicose.

Observamos em nossos animais tratados subcrônica e cronicamente com lítio (tabela 4) uma elevação dos níveis de glicose sanguínea. Este aumento, provavelmente decorre da mobilização de adrenalina e da maior produção de glicocorticóides, em função do stress crônico do tratamento. A favor dessa interpretação estão também as observações de aumento significativo no peso das glândulas suprarenais e da ocorrência de dor após a injeção de lítio (efeitos descritos anteriormente, em condições idênticas de tratamento).

Desta forma, nos parece que no caso do tratamento com lítio (na dose selecionada e até mesmo mais reduzida), há coexistência dos efeitos celulares (sobre a glicogênio sintetase, captação de glicose, etc.) e hormonais (mobilização de adrenalina e glicocorticóides) fornecendo dados aparentemente paradoxais de hiperglicemia com manutenção de níveis normais de glicogênio, ao longo do tratamento.

c.5) Alterações em Metais Séricos:

Quanto as alterações em metais séricos teríamos a comentar que o controle das concentrações de Na^+ e K^+ são mantidas em limites fisiológicos estreitos, através de mecanismos fisiológicos já bastante conhecidos. Quando o lítio é introduzido no organismo, perturba este equilíbrio eletrolítico na célula, aumentando a condutância ao K^+ e assim, sua concentração sérica, conforme observado em ratos (86). Há também relatos de balanço negativo de sódio em ratos (23), provocado em decorrência de

natriurese, mas no homem não se observam alterações séricas à menos que a intoxicação profunda tenha se instalado (87, 118).

Em nossos resultados, conforme esperado, não observamos qualquer alteração nos níveis de Na⁺. Devemos concluir que nenhuma das doses utilizadas foi francamente intoxicante.

A literatura especializada é conflitante quanto a obtenção ou não de hipercalemia (82, 140, 142, 119, 86), como efeito colateral à terapia com lítio. Em nossos resultados este pode ser detectado predominantemente em fêmeas. Cabe notar aqui, que o nível basal de K⁺ em fêmeas (controle) está particularmente baixo (inclusive abaixo dos níveis de controle obtidos em machos). Não encontramos na literatura, qualquer referência que justificasse a diferença de valores de K⁺ sérico entre ratos machos e fêmeas. Acreditamos no entanto, que este valor baixo inicial, certamente influenciou o aparecimento de diferença tão significativa nos níveis de K⁺, mesmo com a menor dose utilizada de lítio. (Tab. 3)

Os estudos sobre os efeitos do lítio no metabolismo do cálcio são, também, bastante conflitantes. Foi sugerido na literatura (57) que a Psicose Maníaco Depressiva poderia ser um distúrbio no metabolismo do cálcio e/ou magnésio, o mesmo ocorrendo somente para o metabolismo do cálcio na depressão (59). Pacientes tratados cronicamente com lítio, apresentam distúrbio no metabolismo mineral, refletidos no aumento do cálcio e magnésio e diminuição do fosfato séricos (58). Por outro lado, outros autores, estudando pacientes (50, 60) ou ratos (61) não confirmaram tais mudanças no cálcio sérico.

Alguns mecanismos foram propostos para explicar a hipercalcemia induzida pelo tratamento com lítio. O primeiro mecanismo atribui esta alteração ao hiperparatireoidismo primário induzido pela lítio-terapia (58). Como mecanismo alternativo, propõem os autores que o lítio venha a aumentar a captação do fosfato em células musculares e como no efeito "tipo insulina", que descrevemos anteriormente, este aumento de captação parece secundário ao aumento no transporte de glicose (50), observando-se queda nos níveis séricos de fosfato (51, 62). Com estes fatores, há redução na captação do fosfato no osso. Como o fosfato e o cálcio são depositados no tecido ósseo, uma redução na captação leva a redução no depósito de cálcio (59), acarretando o desenvolvimento de osteoporose (62, 50).

Observamos em nossos animais tratados cronicamente com lítio, uma elevação da concentração sérica de cálcio em ratos fêmea para todas as doses utilizadas (tabela 3). Concordando com a maioria dos autores que apontam hipercalcemia como efeito colateral ao uso do lítio (3, 50, 54, 58, 59, 63, 68, 123, 124). Por outro lado, os ratos machos foram mais "resistentes" a tais alterações onde pudemos observar uma hipercalcemia somente nos animais tratados com a maior dose utilizada (Tab. 3).

A dose de lítio por nós selecionada como não intoxicante (em torno de 1 mEq/kg) não alterou os níveis de potássio e de cálcio sérico no estudo crônico em machos, mas alterou-os em fêmeas. Curiosamente nossos dados de alterações em metais, na dose de lítio selecionada, assemelham-se aos resultados clínicos, - isto é, fornecem resultados conflitantes.

No metabolismo mineral do homem sob tratamento crônico com lítio, é frequente a menção de aumento no magnésio sérico (50, 54, 60, 61, 63). Observou-se em um relato, que o aumento do magnésio sérico seria afetado pela variável sexo (67). Tal variável entretanto, não tem sido citada como responsável pela maior "sensibilidade" de fêmeas ao aumento de Ca^{++} sérico. Por outro lado, coincidentemente ou não, a maioria dos trabalhos que apontam aumento deste item, utilizam ratos fêmeas como sujeito experimental (59, 61, 68) ou analisam juntos, resultados obtidos em homens e mulheres (3, 50, 54, 63).

Como descrevemos no item anterior, as alterações do lítio no metabolismo de eletrólitos, podem ocorrer tanto pela semelhança físico-química deste cátion com os demais (Ca^{++} e Mg^{++}), segundo Plenge *et al.* (62); ou serem decorrentes das alterações do lítio no metabolismo intermediário.

Quanto às concentrações de lítio sérico, estas foram proporcionais às doses injetadas tanto em ratos machos, quanto em fêmeas.

Assim, a dose de 1 mEq/kg/dia se por um lado não alterou a taxa de crescimento de nossos animais, por outro, na ausência de efeitos tóxicos marcantes, foi capaz de provocar efeitos considerados colaterais à terapia com lítio no homem, quais sejam: a indução de polidipsia, à poliúria e diarreia, alteração no metabolismo de carboidratos e em metais séricos.

4.c) Experimento III:

Procedimentos utilizados para demonstrar que a dose de lítio selecionada é capaz de corrigir ou impedir alterações comportamentais:

- . estereotipia induzida por apomorfina
- . hiperatividade induzida por tranilcipromina
- . indução de desamparo aprendido

a) METODOLOGIA:

a.1) TESTE DE ESTEREOTIPIA:

Realizamos um único teste de estereotipia nos animais após 4 semanas de tratamento. Isolaram-se os animais em gaiolas de arame (30 x 16 x 25 cm), privando-os de água e de comida, por aproximadamente 20', antes do início das injeções de Apomorfina.

Injetou-se via i.p., solução de Apomorfina (nas doses de 3 ou 0,6 mg/Kg) e iniciaram-se as observações no tempo 0 (logo após a injeção) em intervalos de 5 minutos até 40 minutos após a injeção, e, a partir deste horário de 10 em 10 minutos até o máximo de 60 minutos.

As observações eram feitas pelo período de 1 minuto por animal e o maior índice observado neste período era registrado.

Modificamos a escala de estereotipia descrita por Creese e Iversen (101), após vários estudos pilotos em nossas condições experimentais, para a escala abaixo especificada:

- . Grau 0 estacionário
- . Grau 1 ativo
- . Grau 2ativo, com surtos de cheirar esteriotipado
- . Grau 3 cheirar contínuo durante o período de avaliação
- . Grau 4 ativo, com surtos de levantar simultâneo a cheirar
- . Grau 5 cheirar contínuo, com surtos de lambar
- . Grau 6 lambar contínuo durante o período de avaliação
- . Grau 7 surtos de morder
- . Grau 8 morder contínuo durante o período de avaliação

a.2) TESTE DE LOCOMOÇÃO:

a.2.1) Aparelho:

O aparelho consiste em caixa retangular de madeira com as dimensões de 73 cm de comprimento, 29,5 cm de largura e 22 cm de altura, com piso em arame e tampa.

Nas paredes internas do aparelho estão dispostas regularmente, à 3,5 cm de altura das barras do piso, 3 células fotoelétricas com 3 focos luminosos no lado oposto, dispostos à 19 cm um das outras. Quando o animal está parado dentro da caixa, ele estimula apenas uma célula fotoelétrica.

Acoplado à caixa, há um contador digital de motilidade, onde é computada a somatória da motilidade captada pela interrupção do feixe de luz das fotocélulas durante a sessão. No temporizador, a sessão foi fixada em 15 minutos por animal. Fim do este período o registro final era retido no visor de contagem e anotado.

a.2.2) Procedimentos:

Após 5 semanas de tratamento crônico com lítio ou placebo (isto é, uma semana após o teste de Estereotipia) os animais foram submetidos à caixa de motilidade, sendo previamente tratados com tranilcipromina. A injeção de tranilcipromina (na dose de 10 mg/kg) era aplicada intraperitonealmente, 2:30 h antes do início do teste.

Os animais foram expostos individualmente à caixa de motilidade por 15 minutos e a locomoção (captada pela fotocélulas) registrada.

No intervalo entre o teste de um animal e o subsequente, limpávamos completamente as barras e bandejas, conforme descrito para o teste de Campo-Aberto.

a.3) INDUÇÃO DE DESAMPARO APRENDIDO

a.3.1) Equipamento:

. Caixa de choques incontrolláveis:

Os choques incontrolláveis foram ministrados numa caixa de 22,5 x 22,5 x 19,5 cm, tendo a parede frontal de acrílico transparente, as restantes de alumínio, com tampa no teto. O piso desta é composto de barras de ferro de 0,3 cm de diâmetro, distando 1,2 cm entre si, através das quais os choques elétricos são ministrados (choque "scrambler").

. Caixa de teste de fuga:

A caixa que é utilizada no teste de fuga corresponde a uma caixa de 50,0 x 29 x 29 cm em alumínio, com tampa e parede frontal de acrílico transparente, modelo "vai e vem". A caixa é dividida em dois compartimentos iguais separados por uma parede de alumínio onde há um orifício de 7,5 cm de altura, por 6,0 cm de largura, localizado no centro e à 8,0 cm acima do piso em barras da caixa.

O piso é composto por barras de latão de 0,3 cm de diâmetro, distando 1,0 cm entre si, através das quais os choques elétricos são ministrados, com mecanismo "scrambler".

Cada compartimento possui 2 fotocélulas, distando 6,0 cm entre si, as quais são sensíveis (por interrupção do feixe de luz)

ao movimento do sujeito experimental entre os compartimentos, assim, registrando sua presença no compartimento em que se localizar, num dado momento do teste.

É necessário a travessia de um compartimento interno para outro para ser registrada uma resposta. Foi definido como resposta de fuga a travessia de um compartimento para o outro durante a apresentação do choque. Essa resposta de fuga tinha como consequência a interrupção do choque.

a.3.2) Procedimento:

As sessões de choques incontroláveis consistiram em submeter o sujeito experimental a 30 choques de 1 mA, com duração de 10 segundos, ministrados a intervalos que variavam de 1 a 60s (choques randômicos).

Utilizamos 2 sessões de choques incontroláveis, com intervalo de 24 hs entre si. A última sessão foi também 24 h antes do teste de fuga (procedimento padronizado em nossos laboratórios, ver tabela anexa).

O teste de fuga para todos os grupos consistiu em 30 choques de 1 mA com duração de acordo com a permanência do animal em um dos compartimentos. Quando o animal atravessava para o outro compartimento, o choque era interrompido. O tempo máximo de duração por choque foi de 30 s, sendo que se o animal não cruzasse os compartimentos o choque continuava. O cronômetro, uma vez alcançado o valor de 30 s, voltava ao zero e iniciava um novo ciclo.

Toda vez que o animal atravessava para o outro lado, o choque cessava registrando-se sua latência. O intervalo entre o cruzamento do animal e o início do próximo choque era randômico variando de 20 - 100 s.

A análise era sempre feita dividindo-se a sessão de 30 choques em 6 blocos de 5 tentativas cada.

a.4) ANÁLISE ESTATÍSTICA:

a.4.1) Análise Paramétrica:

Efetuamos uma análise de variância, seguida do teste de t-Student (38, 39, 40), aplicado nos resultados de desamparo aprendido. Utilizamos $\alpha = 5\%$ monocaudal. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados estatisticamente significantes.

a.4.2) Análise não-Paramétrica:

Efetuamos o teste de Kruskal Wallis, seguido de teste de Mann Whitney (41), com $\alpha = 5\%$ monocaudal para as observações do teste de estereotipia e locomoção. Os valores de probabilidade (p) maiores que 0,05 não foram considerados estatisticamente significantes.

b) RESULTADOS:

b.1) TESTE DE ESTEREOTIPIA

. Apomorfina (dose 3 mg/Kg):

No teste de estereotipia observamos que no tempo 1 (5 minutos após a injeção i.p. de apomorfina) todos os grupos tratados com lítio mostravam um aumento de estereotipia registrada quando comparados com o grupo controle, sendo esta diferença de $p < 0,01$ para todos os grupos.

No tempo 2 (10 minutos após a injeção i.p. de apomorfina) os grupos que receberam dose de 1,5 mEq/kg e de 0,5 mEq/kg permaneceram com níveis de estereotipia superiores aos do grupo controle ($p < 0,05$ para ambos), sendo que o grupo que recebeu 1,0 mEq/kg não diferiu do grupo controle, nesta observação.

Nos demais tempos de observação, não notamos quaisquer diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os grupos tratados com lítio x grupo controle. (Fig. 10)

. Apomorfina (dose 0,6 mg/Kg):

Não observamos quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo controle, nos diversos tempos após a injeção de apomorfina. (Fig. 11)

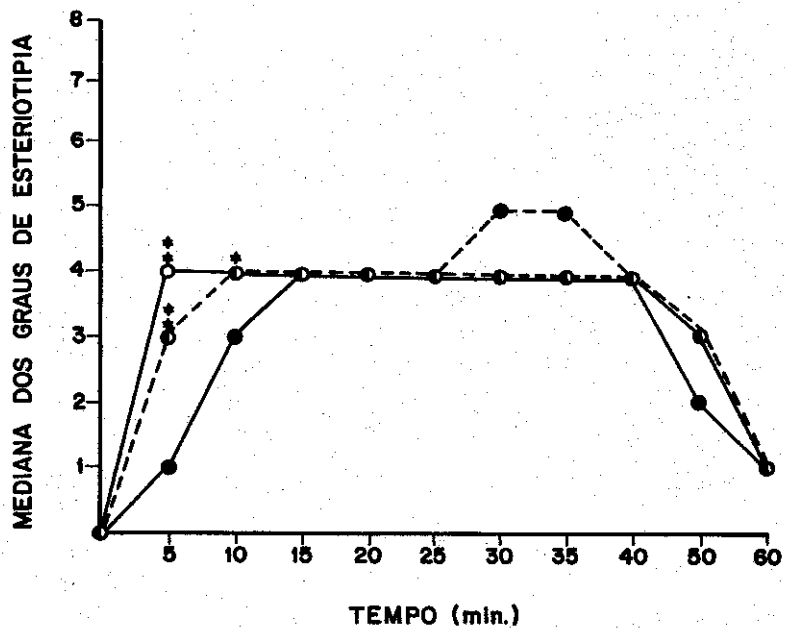


Fig: 10 - TESTE DE ESTERIOPIA, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio. As linhas representam as medianas obtidas para cada grupo nos diversos tempos de observação após a injeção. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Mann Whitney), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-1,5 ; ○—○ Li-1,0 ; ○---○ Li-0,5 .

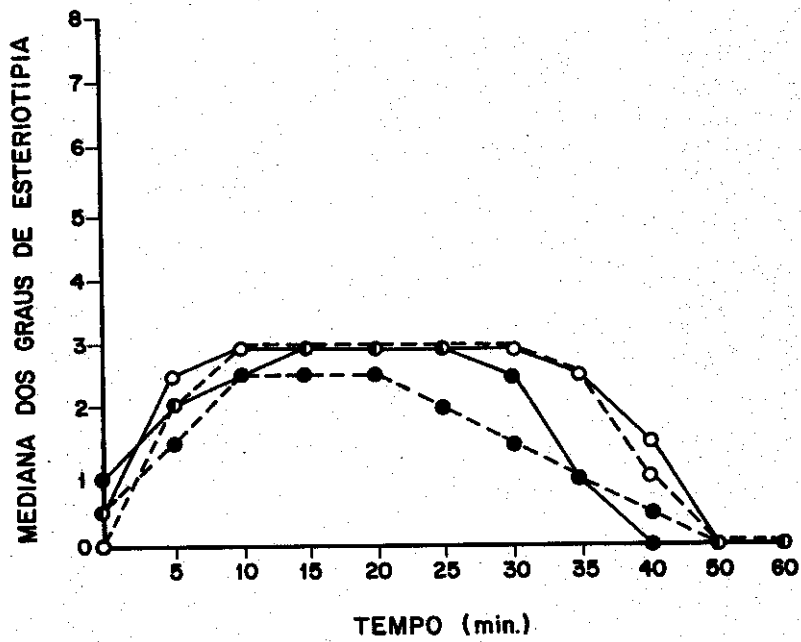


Fig. 11 - TESTE DE ESTERIOPIA, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As linhas representam as médias obtidas para cada grupo nos diversos tempos de observação após a injeção. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, não observamos (teste de Mann Whitney) qualquer diferença estatística. Foram utilizados 12 animais por grupo.

●—● controle; ●---● Li-1,5 ; ○—○
 Li-1,0 ; ○---○ Li-0,5 .

b.2) TESTE DE LOCOMOÇÃO:

Nos grupos de dose de 1,5 mEq/kg e de 1,0 mEq/kg, houve uma redução na locomoção à nível de $p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente. O grupo de dose de 0,5 mEq/kg não diferiu do grupo controle. (Fig. 12)

b.3) INDUÇÃO DE DESAMPARO APRENDIDO

A Tabela 5 mostra os resultados do grupo tratado e controle, bem como os resultados obtidos com um grupo de animais que não receberam nenhum tipo de tratamento ou manipulação prévia ao teste de fuga, identificado como normal. Nestas condições obtivemos no grupo tratado em relação ao grupo controle, queda na latência média obtida para o 1o., 3o. e 4o. blocos de tentativas, $p < 0,05$, sendo que nos demais, as latências estiveram abaixo do controle, mas não atingiram níveis de significância. (Tab. 5)

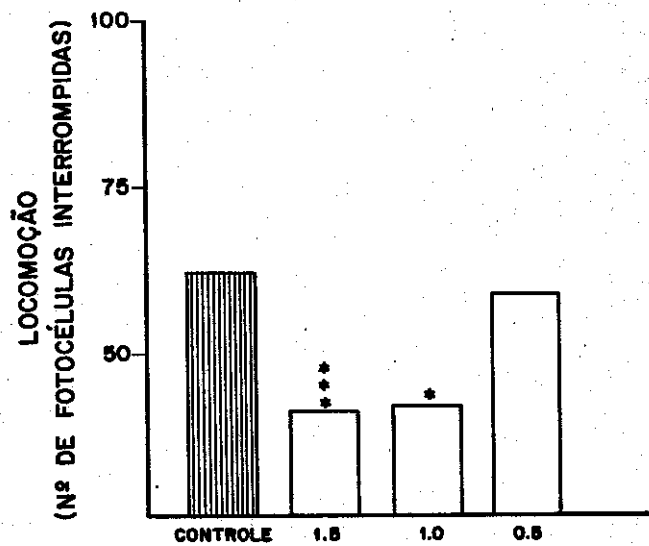


Fig. 12 - TESTE DE LOCOMOÇÃO, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio em várias doses (mEq/Kg/dia). As colunas representam a mediana da locomoção registrada no final de 5 semanas de tratamento. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos *** $p \leq 0,001$ e * $p \leq 0,05$ (teste de Mann Whitney), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados 9 animais por grupo.

▨ grupo tratado com placebo

□ grupos tratados com lítio

Tabela 5 - Teste de Desamparo Aprendido, ratos machos tratados cronicamente com placebo ou lítio (1 mEq/Kg/dia)

GRUPO	BLOCOS DE 5 TENTATIVAS					
	1º BLOCO	2º BLOCO	3º BLOCO	4º BLOCO	5º BLOCO	6º BLOCO
Normal (N= 20)	2,89 ±	6,04 ±	3,18 ±	3,15 ±	2,11 ±	2,41 ±
	3,35	4,54	2,93	2,01	1,01	2,19
Controle (N= 21)	24,02 ±	21,12 ±	18,14 ±	15,65 ±	13,57 ±	10,96 ±
	5,62	6,64	7,59	10,96	11,74	11,69
Lítio (N= 20)	* 19,78 ±	17,72 ±	* 13,88 ±	* 10,57 ±	8,47 ±	6,46 ±
	7,62	9,73	9,07	9,18	10,03	8,17

Os resultados representam a latência média (em segundos) ± desvio padrão, para cada bloco de 5 tentativas. Na comparação entre o grupo controle x grupos de tratamento, observamos

* $p \leq 0,05$ (teste t-Student), sendo que os demais não diferiram. Foram utilizados N animais por grupo.

c) DISCUSSÃO:

c.1) Estereotipia induzida por Apomorfina:

Devido aos resultados obtidos inicialmente, nos propusemos a investigar se as doses próximas de 1 mEq/kg de lítio administradas cronicamente, eram capazes de reverter ou prevenir alterações comportamentais, induzidas ou não por drogas, isto é, verificar se estas doses de lítio seriam farmacologicamente ativas.

Investigações clínicas recentes tem demonstrado, em certos casos, que antagonistas do receptor dopaminérgico tais como a pimozide ou o haloperidol podem, quando administrado agudamente, suprimir a sintomatologia maníaca, enquanto que agonistas dopaminérgicos como o piribidil ou a L-Dopa podem precipitar episódios maníacos em pacientes deprimidos (100).

Tem-se aventado a possibilidade de que na fase maníaca da PMD, os mecanismos dopaminérgicos estão aumentados e que a eficiência do tratamento com lítio é decorrente da diminuição desta função. Porém, até o presente momento, não se conhece inequivocamente, o mecanismo pelo qual o lítio atuaria neste sistema (99).

A função dopaminérgica é geralmente estudada induzindo-se supersensibilidade de receptores, utilizando-se da administração de neurolépticos (100) ou privação da de sono REM (102).

Nestes estudos, o lítio foi administrado concomitantemente para verificar sua eficácia na reversão ou prevenção das alterações de sensibilidade induzidas (100, 102). Em nossos experimentos, decidimos investigar se o tratamento crônico prévio com lítio alteraria a resposta comportamental frente a um agonista dopaminérgico. Utilizamos a apomorfina (doses de 3 e 0,6 mg/kg), com o intuito de investigar possíveis alterações no funcionamento do sistema dopaminérgico (97). Observamos que o tratamento crônico com lítio, supostamente não levou a qualquer alteração, pois o comportamento induzido por apomorfina nos animais tratados com lítio, não se distinguiu do controle. Somente pudemos observar que nos grupos de animais tratados com LiCl (Fig. 9), o comportamento estereotipado, induzido pela dose de 3 mEq/Kg de apomorfina, se iniciou mais rapidamente do que no grupo tratado com placebo. Tal diferença poderia advir de diferenças farmacocinéticas, na absorção/distribuição da apomorfina administrada ou demonstrar uma diferença na interação tratamento x dose mais reduzida de apomorfina do que aquela utilizada (uma vez que esta, não estaria completamente absorvida no curto período após a administração). Para testar ambas hipóteses, escolhemos replicar este experimento, agora utilizando uma dose mais baixa de apomorfina.

A figura 10 apresenta os resultados obtidos com a dose escolhida de 0,6 mEq/kg de apomorfina, dose também agonista pós-sináptica, já que é capaz de desencadear respostas estereotipadas (76, 77). Não verificamos aqui, qualquer distinção entre os tratamentos com lítio em relação ao placebo. Assim, as dosagens de

lítio administradas cronicamente, não afetaram as alterações no comportamento provocadas pela apomorfina. Concluímos que as diferenças inicialmente obtidas (na dose de 3 mg/Kg de apomorfina), seriam provavelmente decorrentes de alterações farmacocinéticas.

c.2) Hiperatividade induzida por Tranilcipromina:

As crises maníacas são caracterizadas por hiperatividade, aumento de fala, insônia, euforia e outras alterações comportamentais incluindo a agressão (103). Estas manifestações de ativação comportamental também podem ser produzidas, no homem, por psicoestimulantes, tais como: anfetamina (146), cocaína (147) e metilfenidato (148). O lítio é um antagonista efetivo dos episódios de mania em pacientes, podendo ainda atenuar ou bloquear estas alterações comportamentais quando induzidas por drogas (146, 147, 148).

Em animais, tem-se utilizado estas drogas com intuito de produzir um modelo de "mania", e assim poder estudar os efeitos do lítio. A maioria dos estudos tem descrito que o lítio bloqueia ou atenua os efeitos comportamentais induzidos pela anfetamina (93, 103), - metiltirosina (149, 96) e clordiazepóxido + dexanfetamina (150). Porém, existem estudos que apontam que o tratamento crônico com lítio potenciou o aumento de locomoção em ratos induzidos pela tranilcipromina (94, 96). Decidimos investigar se as doses em torno de 1 mEq/kg de lítio dadas cronicamente seriam capazes de alterar a resposta induzida por

este antidepressivo. Em nossos experimentos, observamos que as doses de 1,5 e 1,0 mEq/kg de lítio dadas cronicamente, atenuaram o aumento de locomoção induzida pela d-1 tranilcipromina. Nossos resultados concordam com os relatos de redução na hiperatividade induzida por psicoestimulantes e discordam dos relatos onde o tratamento crônico com lítio potenciou os efeitos da tranilcipromina (94, 96). Naqueles estudos no entanto, as doses de lítio utilizadas foram superiores a 3 mEq/kg (superiores à maior dose utilizada por nós). Além desse fator, poderíamos destacar que os efeitos do tratamento com antidepressivo dependem de muitas variáveis, incluindo o estado pré-existente do organismo (deprimido, normal ou estressado), a espécie utilizada, a duração do tratamento, etc. (98). Estas variações entre nossos estudos, poderiam justificar a discrepância entre os resultados. De toda forma, fica claro por nossos resultados que o lítio na dose escolhida é farmacologicamente ativo, já que foi capaz de alterar o efeito de outro fármaco.

c.3) Teste de desamparo aprendido:

O teste de desamparo aprendido foi escolhido por ser considerado um modelo de depressão induzida em animais de laboratório (70, 71, 72).

Weiss, pesquisador pioneiro e introdutor deste procedimento, verificou que, se submetemos ratos a eventos aversivos (tais como natação ou choques nas patas) incontroláveis e inescapáveis para os animais, mais tarde, quando lhes é dada a

possibilidade de escapar não o fazem. A este fenômeno deu-se o nome de "desamparo aprendido" (73).

Cabe ressaltar a necessidade de serem choques inescapáveis, uma vez que, se é dada a possibilidade de controle dos animais sobre o choque (mesmo recebendo a mesma quantidade e intensidade de choques), estes não desenvolvem o efeito de desamparo aprendido) (71, 72, 74).

Este teste mostrou-se sensível ao efeito de antidepressivos, que são capazes de "recuperar" a capacidade de fuga do animal (70). Atualmente utilizam-se tais testes no "screening" de novas drogas antidepressivas (75).

No teste de fuga, realizado com ratos que não receberam qualquer experiência prévia com choques inescapáveis ou tratamento crônico com lítio (grupo normal), notamos que frente ao choque liberado no dia do teste de fuga, os animais levaram poucos segundos para cruzar a passagem divisória e atingir a câmara oposta, na caixa de "vai e vem" (Tab. 5). Esta latência é reduzida com o decorrer do teste, isto é, há redução na latência do primeiro para o último bloco de tentativa (t-pareado ** $P < 0,01$). O mesmo efeito pode ser observado nos animais expostos previamente aos choques incontroláveis (grupos controle e tratado) mas as latências para a fuga destes animais estão grandemente aumentadas, desde o início ao fim do teste.

Na comparação entre o grupo controle e o grupo tratado, observamos redução nas latências de fuga em metade dos blocos de

tentativas e tendência à redução nos demais. Portanto, o tratamento com lítio atenuou, preveniu ou reverteu a indução do desamparo aprendido.

4.d) Experimento IV:

Procedimentos utilizados para o estudo farmacocinético do lítio.

• curva de distribuição do lítio nos tecidos

a) METODOLOGIA:

a.1) DISTRIBUIÇÃO DO LÍTIO NOS TECIDOS:

A extração de lítio dos tecidos foi feita de acordo com Schou (44). Após a decaptação e retirada do sangue, dissecamos fragmentos de tecidos (cérebro, rim, músculos e fígado) de aproximadamente 0,5 g, pesados imediatamente após a retirada. Utilizando-nos de capela, colocamos as amostras já pesadas em tubos com igual volume de ácido nítrico concentrado, postos à seguir em banho-maria fervente por uma hora. Esperamos que o extrato obtido voltasse à temperatura ambiente e acrescentamos 23 volumes de álcool isopropílico 10% (v/v) em água deionizada. Centrifugamos por 10 minutos à 3.000 rpm. Após a centrifugação, filtramos o sobrenadante e o extrato obtido foi utilizado para a dosagem de Li⁺ em fotômetro de chama.

A preparação do padrão (1 mEq/l) e branco para dosagem de Li⁺ nos extratos de tecidos, seguiu a mesma sequência e o mesmo volume de reagentes adicionados aos tecidos. Foi colocado

para o padrão 1 ml de solução 1 mEq/l de LiCl e para o Branco 1 ml de água deionizada, acrescentando-se então igual volume (1 ml) de ácido nítrico concentrado, sendo os tubos colocados em banho-Maria por 1 hora, após a qual acrescentaram-se 23 ml de álcool isopropílico 10%. Mantendo esta proporção, preparamos o equivalente à 500 ml de solução padrão 1 mEq/l para dosagem dos extratos.

b) RESULTADOS

b.1) Distribuição de lítio em tecidos:

As médias \pm desvio padrão (dosagens fornecidas em mEq/kg) obtidas para o rim, músculo, fígado e cérebro aparecem para ratos machos e fêmeas na Tabela 6. Para facilitar a comparação relativa, fornecemos as dosagens séricas correspondentes.

Tabela 6 - Distribuição do lítio crônico, ratos machos e fêmeas tratados cronicamente com LiCl em várias doses.

DOSE (mEq/kg/dia)	SEXO (N)	TECIDOS (mEq/kg)				
		SORO	RIM	MÚSCULO	FÍGADO	CÉREBRO
3,0	M (9)	2,75 ± 0,77	2,72 ± 0,65	1,95 ± 0,58	0,83 ± 0,13	1,12 ± 0,21
	F (18)	2,64 ± 0,48	2,02 ± 0,77	1,43 ± 0,50	0,62 ± 0,22	1,21 ± 0,31
2,0	M (9)	1,70 ± 0,26	2,45 ± 0,97	1,18 ± 0,23	0,61 ± 0,12	0,64 ± 0,18
	F (9)	2,03 ± 0,16	1,24 ± 0,47	1,15 ± 0,35	0,69 ± 0,19	0,92 ± 0,97
1,0	M (19)	0,84 ± 0,41	1,38 ± 0,31	0,79 ± 0,13	0,66 ± 0,35	0,73 ± 0,42
	F (9)	1,04 ± 0,14	0,33 ± 0,39	0,63 ± 0,10	0,33 ± 0,10	0,56 ± 0,53

c) DISCUSSÃO:

Pesquisas em farmacocinética, demonstraram que variações individuais na absorção, distribuição, metabolismo e excreção são fatores determinantes na ação de drogas. Assim, variáveis tais como idade e sexo podem influenciar marcadamente a biodisponibilidade de drogas a seus sítios de ação (79, 78).

O lítio obedece à cinética de 1ª. ordem, com volume final de distribuição igual àquele da água corporal total (80).

No tratamento crônico com lítio, observamos que as concentrações obtidas nos tecidos tenderam à decair na seguinte ordem: rim > músculo > fígado (Tab.6). Administrando LiCl à ratos fêmeas em dose única dada endovenosamente, Schou (44) mostrou que tal sequência é determinada pela razão de entrada/saída do lítio em cada tecido. O rim é o tecido que mais rapidamente apresenta o pico máximo de concentração após a administração e o cérebro o mais lento. O estudo atual mostra que esta sequência ocorreu independentemente do sexo e da dose de lítio utilizada, em administração crônica. (Tab. 6)

Nosso estudo crônico diferiu do de Schou (que mostrou os menores valores nos cérebros dos animais), já que em nosso caso, as concentrações cerebrais determinadas são a somatória das concentrações atingidas através das administrações feitas nos dias anteriores ao sacrifício. Este fato pode ser explicado, tendo em vista a baixa velocidade de entrada e exclusão do lítio do tecido cerebral (44) com conseqüente acúmulo deste metal na administração crônica.

As concentrações cerebrais de lítio, no entanto, tenderam à manter-se abaixo das obtidas no rim e músculo, estando sempre maiores ou iguais àquelas observadas no fígado, nestas condições. As concentrações séricas de lítio 4 h após a última injeção, mostraram-se dose-dependentes como esperado. As concentrações séricas (em mEq/l) são aproximadas às dosagens de lítio administradas por quilo de peso do animal. Existiu também, o paralelo entre a dose administrada e os níveis de lítio nos tecidos, assim, as maiores concentrações teciduais estão na maior dose empregada, decaindo paralelamente, com a redução da dose administrada.

O conhecimento da concentração de lítio após a dose crônica de 1 mEq/Kg/dia, pode servir como diretriz para estudos bioquímicos *in vitro*, sabendo-se serem estas as doses mais adequadas na administração crônica *in vivo*.

CONCLUSÃO FINAL

Neste trabalho verificamos, através de medidas físicas/fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, que a dose de 1 mEq/kg/dia dada cronicamente é mais adequada ao estudo do lítio, quando se utilizam ratos como sujeitos experimentais. Esta dose é em média três vezes menor do que as atualmente empregadas para este fim.

Assim, a dose de 1 mEq/kg, se por um lado não alterou a taxa de crescimento dos animais, por outro, na ausência de efeitos tóxicos marcantes, foi capaz de provocar efeitos considerados colaterais à terapia com lítio no homem, quais sejam: a indução de polidipsia em níveis fisiológicos, a poliúria e diarreia compensadas no decorrer do tratamento, a hipercalemia e hipercalcemia, induzindo também ao bócio e à hiperglicemia.

Esta dosagem de maneira geral, não afetou o comportamento emitido naturalmente, mas foi capaz de bloquear a hiperatividade induzida pela tranilcipromina, e reduzir a indução do desamparo aprendido, portanto esta dose apresenta atividade farmacológica.

Verificamos ademais, a influência desta dosagem em outros itens de medidas que não podem ser rotineiramente utilizadas na clínica (hipertrofia de adrenais, glicogênio hepático, dosagem tecidual de lítio).

Através da dosagem tecidual de lítio determinamos sua concentração após distribuição, que poderá servir como diretriz para posteriores estudos *in vitro*.

Através desses resultados, torna-se evidente supor que a dose de 1 mEq/Kg/dia é realmente mais adequada ao estudo do lítio em ratos.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to search, through behavioral and toxicological evaluations a non-intoxicating range of lithium dosage that given to normal rats could be able to produce collateral effects (possibly the same observed in clinical trials) but no marked behavioral changes. This range of dosage should also correct as avoid behavioral changes such as induced by drugs administration and other produces.

We observed through physical/physiological, biochemical and behavioral tasks that the dose of 1 mEq/Kg/day chronically is more suitable to the study of lithium when the experimental subject is the rat.

This dose is averagely three times smaller than those presently used in lithium research, using the rat.

BIBLIOGRAFIA

01. Johnson, F.N.; Cade, J.F. The historical background of lithium research and therapy. In: *Lithium Research and therapy*. Johnson F.N., ed. Academic Press, pp. 9-20, 1975.
02. Kocsis, O. The clinical uses of lithium. Lithium in the acute treatment of mania. In: *Handbook of lithium therapy*. Johnson, F.N. ed., University Park Press, Baltimore, pp. 9-17, 1980.
03. Baastru, P.C. Lithium in the prophylactic treatment of affective disorders. In: *Handbook of lithium therapy*. Johnson, F.N. ed. University Park Press, Baltimore, pp. 26-38, 1980.
04. The role of animal in Biomedical Research. Sechzer, J.A. ed. *Annals of the N.Y. Academy of Science*, vol. 406, 1983.
05. Cappeliez, P.; White, N. Lithium induces dose-related increases and decreases in activity levels in the rat. *Psychopharmacology*, 73: 34-38, 1981.
06. Radomski, J.L.; Fuyat, H.N.; Nelson, A.A.; Smith, P.K. The toxic effect excretion and distribution of lithium chloride. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 100: 429-444, 1950.

07. Jefferson, J.W. & Greist, J.H. Lithium poisoning. In: *Primer of Lithium Therapy*. Williams e Wilkins Company.
08. Bligenberg, B.G. & Leonse, B. The determination of lithium in serum by atomic absorption spectroscopy and flame emission spectroscopy. *Clin. Chem. Acta.*, 10: 97-99, 1968.
09. Schou, M. Lithium treatment of Manic Depressive illness Karges Basel, 1980.
10. Kripke, D.C.; Judd, L.L.; Hubbard, B.; Janowski, D.S.; Leighton, Y.H. The effect of lithium carbonate on normal human subjects. *Biological Psychiatry*, 14(3): 545-548, 1978.
11. Johnson, F.N. Dissociation of vertical and horizontal components activity in rats treated with lithium chloride. *Specialia*, 15(5): 533-535, 1972.
12. Smith, D.F. Lithium and carbamazepine. Effects on learned taste aversion and open field behavior in rats. *Pharm. Bioch. Behav.* 18: 483-488, 1983.
13. Johnson, F.N. & Wormington, S. Effects of lithium on rearing activity in rats. *Nature New Biol.* 235: 159-160, 1972.

14. Smith, D.F. Reexamination of vertical activity in rats treated with lithium chloride. *Experientia* 32(10): 1320-1321, 1976.
15. Gray, P.; Solomon, J.; Dunphy, M.J. Can, F.; Hession, M. Effects of lithium on open field behavior in "stressed". *Psychopharmacology* 48: 277-281, 1976.
16. Smith, D.F. Biogenic amines and the effects of short term lithium administration on open field activity in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 41: 295-300, 1975.
17. Smith, D.F. & Smith, H.B. The effects of prolonged lithium administration on activity, reactivity, and endurance in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 30: 80-94, 1973.
18. Teixeira, N.A.; Karniol, I.G. Dissociation of the toxic and behavioral effects of lithium on rats. *Bras. Journal Med. Biol. Res.* 18(3): 349-354, 1985.
19. Mannisto, P.T.S. Endocrine side-effects of lithium. In: *Handbook of Lithium Therapy*. Johnson, F.N. University Park Press, Baltimore, pp. 443-469, 1980.
20. Teixeira, N.A.; Karniol, I.G. Variação de peso causada pelo uso crônico de lítio. *J. Bras. Psiqu.* 34(1): 5-10, 1985.

21. Cameron, O.G.; Smith, B.C. Comparison of acute and chronic lithium treatment on 3H-norepinephrine by rat brain slices. *Psychopharmacology*, 67: 81-85, 1980.
22. Thomsen, K. The effects of sodium chloride on kidney function in rats with lithium intoxication. *Acta Pharm. Toxicol.* 33: 92-102, 1973.
23. Thomsen, K.; Jensen, J.; Olensen, O.V. Lithium induced loss of body sodium and the development of severe intoxication in rats. *Acta Pharm. Toxicol.*, 35: 337-346, 1974.
24. Plenge, F.K.; Møllerup, E.T.; Rafaelsen, O.J. Weight gain in lithium treated rats. *Int. Pharmacopsychiatr.*, 8, 1973.
25. Teixeira, M.A.; Karniol, I.G. The influence of age and sex on weight variation in rats treated chronically with lithium chloride. *Acta Pharm. Toxicol.*, 51: 1-5, 1982.
26. Vendisborg, P.B. Weight gain and body composition in lithium treated rats. *Acta. Pharm. Toxicol.*, 46: 373-381, 1980.
27. Berens, S.C.; Wolff, J. The endocrine effects of lithium. In: *Lithium Research Therapy*. Johnson, F.N. Ed. Academic Press, London, pp. 443-469, 1975.

28. Sedoall, G.; Johnson, B.; Petterson, V.; Uvin, K. Effects of lithium salts on plasma protein bound iodine and uptake of I 131 in thyroid of man and rat. *Life Science*, 7: 1258-1264, 1968.
29. Schreiter, V.; Rohacova, J.; Fribyl, T. Endocrine changes after chronic lithium carbonate administration in rats. *Physiol. Bohemoslov.*, 20: 249-255, 1971.
30. Mellerup, E.T.; Reafaelson, O.J. Lithium and carbohydrate metabolism. In: *Lithium Research and Therapy* Johnson, F.N. ed. Academic Press, London, pp. 381-388, 1975.
31. Jefferson, J.W. & Greist, J.H. Adverse reactions renal. In: *Primer of Lithium Therapy*. Willians e Wilkins Co., Baltimore, pp. 151-154, 1977.
32. Thomsen, K. Renal elimination of lithium in rats with lithium intoxication. *J. Pharm. Exp. Therap.* 199: 483-489, 1976.
33. Glen, A.I.M. Lithium its indications, use and clinical implication. *Topic in Therapeutics*. Pittman Press, Bath. Ed. Paul Turnes, 1976.
34. Jefferson, J.W. & Greist, J.H. Adverse reactions neurological. In: *Primer of Lithium Therapy*. Willian e Wilkins Co., Baltimore, pp. 139-147, 1977.

35. Gichman, N.; Givelber, B. *Clinical Chemistry*, 16(3): 229-234, 1970.
36. Nelson, N. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380, 1944.
37. Hassid, W.Z.; Abraham, S. Chemical Procedures Analysis of Polysaccharides. *Methods Enzymol.*, 3: 34-35, 1957.
38. Dixon, W.J., Massey Jr., F.J. Introduction to Statistical Analysis. 3 ed. Internacional Student Edition, Cap. 10, pp. 150-184, 1969.
39. Beiguelman, B. Curso Prático de Bioestatística. Revista Brasileira de genética. Cap. 6, pp. 153-182, 1988.
40. Siegel, R.G.D.; Torrie, J.H. Principles and Procedures os Statistics. McGraw-Hill Book Company Inc. Cap. 7, pp. 107-109, 1960.
41. Spiegel, M.R. Estatística. Editora McGraw-Hill do Brasil, 1970.

42. Cristensen, S. Effect of antidiuretic drugs in rats with lithium-induced polyuria. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 38: 81-89, 1976.
43. MacLead, S.; Swan, R.G.; Aiken, A.J. Lithium effects on human spermatozoa, rat testicular tissue and upon rats in vivo. *Am. J. Physiol.* 157: 177-183, 1949.
44. Schou, M. Lithium Studies. 3. Distribution between serum and tissues. *Acta Pharm. Toxicol.*, 15: 115-124, 1958.
45. Plenge, P.; Møllerup, E.T.; Rafaelsen, O.J. Lithium action on glycogen synthesis in rat, brain, liver, and diaphragm. *J. Psychiatr. Res.*, 8: 29-36, 1970.
46. Krulik, R.; Zvoosky, F. The effect of lithium on metabolism of experimental animals. *Activ. Nerv. Sup. (Praha)*, 12(3): 279-283, 1970.
47. Jay Tepperman, M.D. *Fisiologia Endócrina e Metabólica*. 3 ed. Ed. Guanabara Koogan. Cap. 10, pp. 187-219, 1977.
48. Møllerup, E.T.; Thomsen, H.G.; Plenge, P.; Rafaelsen, O.J. Lithium effect on plasma glucagon, liver phosphorylase- α and liver glycogen in rats. *J. Psychiatr. Res.* 8: 37-42, 1970.

49. Plenge, P. Lithium effects on rat brain glucose metabolism in vivo. Effects after administration of lithium by various routes. *Psychopharmacology*, 77: 348-355, 1982.
50. Vendsborg, P.B.; Mellerup, E.T.; Rafelsen, O.J. Lithium in man. Serum electrolytes and glucose after a single lithium load. *Acta Psychiatr. Scand.* 49: 97-103, 1973.
51. Vendsborg, P.B.; Rafaelson, O.J. Lithium in man: Effects on glucose tolerance and serum electrolytes. *Acta Psychiatr. Scand.* 49: 601-610, 1973.
52. Cheng, K.; Creacy, S.; Lanner, J. "Insulin-like" effects of lithium ion on isolated rat adipocytes. I. Stimulation of glycogenesis beyond glucose transport. *Molecular and Cellular Biochemistry* 56: 177-182, 1983.
53. Cheng, K.; Cracy, S.; Larner, J. "Insulin-like" effects on lithium ion on isolated rat adipocytes. II. Specific activation of glycogen synthase. *Molecular and Cellular Biochem.* 56: 183-189, 1983.
54. Mellerup, E.T.; Rafaelson, O.J. Lithium and carbohydrate metabolism. In: *Lithium Research and Therapy*. Johnson F.N. ed. Academic Press, London, pp. 381-388, 1975.

55. Storlien, L.H.; Higson, F.M.; Gleeson, R.M.; Smythe, G.A.; Atrens, D.M. Effects of chronic Lithium, Amitriptyline and Mianserin on Glucoregulation, Corticosterone and Energy balance in the rat. *Pharm. Biochem. & Behav.* 22: 119-125, 1985.
56. Rafaelsen, O.J. Lithium: mode and range of action. In: *Advances in the drug Therapy of Mental illness*. World Health Organization. Proceedings of Symposium, 1973.
57. Gotfredson, C.F.; Rafaelsen, O.J. Effects of Lithium and others Psychopharmaca on rat electrolyte metabolism. *Int. Pharmacopsychiatr.* 5: 242-248, 1970.
58. Cristensen, C.; Baastrup, P.C.; Transbol, J. The effects of lithium on calcium and magnesium metabolism. In: *Lithium in Medical Practice*, 1978.
59. Mellerup, E.T.; Flenge, P.; Ziegler, R.; Rafaelsen, O.J. Lithium effects on calcium metabolism in rats. *Int. Pharmacopsychiatr.* 5: 258-264, 1970.
60. Srinivasan, V.; Parvathi Devi, S.; Venkoba Rao, A. Lithium effects on serum magnesium and calcium in Manic Depressive Psychosis. In: *Lithium in Medical Practice*, 1970.

61. Plenge, P. Møllerup, E.T. Lithium effects on serum calcium, magnesium and phosphate, in rats. *Psychopharm.* 49: 187-190, 1976.
62. Plenge, P.; Møllerup, E.T.; Rafaelsen, O.J. Lithium action on rat phosphate metabolism. *Int. Pharmacopsychiat.* 6: 52-59, 1971.
63. Beastrup, P.C.; Christiansen, C.; Transbøll, J. Calcium metabolism in lithium-treated patients. *Acta Psychiat. Scand.* 57: 124-128, 1978.
64. Teixeira, N.A. Tese de Doutorado defendida na Escola Paulista de Medicina, agosto de 1983.
65. Pires-Barbosa, R. Tese de Mestrado defendida na UNICAMP, em março de 1989.
66. Møllerup, E.T.; Rafaelsen, O.J. Brain glycogen after intracisternal insulin injection. *J. Neurochem.* 16: 777-778, 1969.
67. Carney, M.W.P.; Sheffield, B.F. Sex difference in mean serum-magnesium levels in depression. *Lancet* 10: 1287, 1972.

68. Møllerup, E.T. Insulin effects on calcium magnesium and phosphate metabolism in rats. *Acta Endocr.* 75: 748-755, 1975.
69. Berens, S.C.; Berenstein, R.S.; Robbin, J.; Wolt, J. Anti thyroid effects of lithium. *J. Clin. Invest.* 49: 1357-1367, 1970.
70. Sherman, A.D.; Sacquitne, J.L.; Petty, F. Specificity of the learned helplessness model of depression. *Pharm. Bioch. Behav.* 16: 449-454, 1982.
71. Nomura et col. Swimming mice: in search of an animal model for an animal model fro human depression. *Advances in:* pp. 203-209.
72. Stress induced analgesia. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 467, 1986. Dennis D. Kelly ed. New York.
73. Weiss, J.M.; Goodman, P.A.; Losito, B.G.; Corrigan, S.; Charry, J.M.; Bailey, W.H. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Research Reviews.* 3: 167-205, 1981.

74. Maier, S.F. Stressor controllability and stress-induced analgesia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 467: 55-71, 1986.
75. Willner, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm cases. *Prog. Neuropsych. Biol. Psychiatr.* 10: 677-690, 1986.
76. Bianchi, G. et al. Disposition of a apomorphine in rat brain areas: relationship to stereotypy. *Eur. J. Pharmacology* 131: 229-236, 1986.
77. Klemm, W.R. Experimental catalepsy is bath entranced and disrupted by a apomorphine. *Psychopharmacology* 82: 12-15, 1985.
78. Suva, J.; Janousek, I. Li and mineral levels in the brain and kidney of guinea pigs injected with LiCl. *Activ. Nerv. Sup (Praha)* 24(4): 32-39, 1982.
79. Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 70th edition. Macmilan Publishing Co. no. 4, 1985.

80. Arancibia, A.; Cosvalan, F.; Mella, F. & Concha, L. Absorption and disposition kinetics of lithium carbonate following administration of conventional and controlled release formulation. *Intern. Jour. Clinical Pharmacol. Therap. Toxicol.* 24(5): 240-245, 1986.
81. Heninger, G.R.; Kirstein, L. Effects of lithium carbonate on motor activity in mania and depression. *J. Nerv. Mental Disease* 164(3):168-175, 1977.
82. Cater, R.E. The use of sodium and potassium to reduce toxicity and toxic side effects from lithium. *Medical Hypothesis* 20: 359-383, 1986.
83. Thomsen, K. Renal elimination of lithium in rats with lithium intoxication. *J. Pharm. Exp. Therap.* 199: 483-489, 1976.
84. Vendsborg, P.B.; Bech, P. Rafaelsen, O.J. Lithium treatment and weight gain. *Acta Psychiatr. Scand.* 53: 139-147, 1976.
85. Hennessy, M.B.; Levine, J. Sensitive pituitary adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol. Behav.* 21: 295-297, 1978.

86. Baer, L.; Kassis, S.; Fieve, R. Lithium induced changes in electrolyte balance and tissue electrolyte concentration. *Psychopharmacologia (Berl)* 17: 216-224, 1970.
87. Baer, L.; Glassman, A.H.; Kassis, S. Negative sodium balance in lithium carbonate toxicity. *Arch. Gen. Psychiatr.* 29: 823-827, 1973.
88. Corridi, H.; Fuxe, K.; Hokfelt, T.; Schou, M. The effect of lithium on central monoamine nervous. *Psychopharmacologie*, 11: 345-353, 1967.
89. Cunha, J.M.; Masur, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. *Pharmacology* 16: 259-267, 1978.
90. Johnson, F.N. Lithium effects on vertical activity in rats: A replay to D.F. Smith. *Specialia* 32(10): 1350-1351, 1979.
91. Segal, D.A.; Callaghan, M.; Mandell, A.J. Alteration in behaviour and catecholamine biosynthesis induced by lithium. *Nature* 254: 58-59, 1975.
92. Morrison, J.M.; Pritchard, M.D.; Brade, M.C.; D'Aguanna, W. Plasma and brain lithium levels after lithium carbonate and lithium chloride administration by different routes in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 889-892, 1971.

93. Smith, D.F. Central and peripheral effects of lithium on amphetamine-induced hyperactivity in rats. *Pharm. Bioch.* 14: 439-442, 1981.
94. Smith, D.F. Effects of Tranylcypromine Stereoisomers, Clorgyline and Deprenyl on Open Field Activity during Long Term Lithium Administration in Rats. *Psychopharmacology* 50: 81-84, 1976.
95. Hampson, D.R.; Baker, G.B. & Couts, R.J. A comparison of the neurochemical propetics of the stereoisomers of Tranylcypromine in the central nervous system. *Cellular Mol. Biol.* 32(5): 593-599, 1986.
96. Smith, D.F.; Shimizu, M. Effects of alpha methyl-tyrosine and panchlorophenylalanine on Open Field Behavior in rats given tranylcypromine stereoisomers and lithium carbonate. *Pharm. Biochem. & Behav.* 5: 515-518, 1976.
97. Sweridlow, N.R.; Lee, D.; Koob, G.F.; Vaccarino, F.J. Effects of chronic dietary lithium on behavioral indices of dopamine denervation supersensitivity in the rat. *J. Pharm. Exp. Therap.* 235(2): 324-328, 1985.

98. Murphy, D.L.; Aulakh, C.S.; Garrick, N.A. How antidepressants work: cautionary conclusions based on clinical and laboratory studies of the longer-term consequences of antidepressant drug treatment. *Ciba Found Symp.* 123: 106-125, 1986.
99. Lal, S.; Nair, N.P.V.; Guyda, H. Effect of lithium on hypothalamic-pituitary dopaminergic function. *Acta Psychiat. Scand.* 57: 91-96, 1978.
100. Staunton, D.A.; Magistretti, F.I.; Shoemaker, W.J.; Deyo, S.N.; Bloom, F.E. Effects of chronic lithium treatment on dopamine receptors in the rat corpus striatum. II. No effect on denervation or neuroleptic-induced supersensitivity. *Brain Research.* 232: 401-412, 1982.
101. Creese, I.; Iversen, J.D. The Pharmacological and anatomical substrates on the amphetamine response in the rat. *Brain Res.* 83: 419-436, 1975.
102. Rodrigues, F.C.; Zwicken, A.P.; Calil, H.M. Chronic lithium prevents REM sleep deprivation-induced increase responsiveness to apomorphine. *J. Pharm. Pharmacol.* 37: 210-211, 1985.

103. Kammen, D.F., Murphy, D.L. Attenuation of the Euphoriant and Activating effects of d- and l-amphetamine by lithium carbonate treatment. *Psychopharmacology (Berl)*44:215-224, 1975.
104. Tosteson, C.D. Lithium and mania. *S. Americ*, April, 164-174, 1981.
105. Garrod, A.B. Gout and rheumatic gout. *Walson & Maberly (ed)*, London, 1959.
106. Cade, J.F. Lithium salts in the treatment of of psychotic excitement. *Med. J. Ausf.* 36: 349-352, 1949.
107. Johnson, G. Lithium. *Med. J. Ausf.*, Oct, 595-601, 1984.
108. Schou, M.; Amdisen, A.; Trap-Jensen, J. Lithium Poisoning. *Amer. J. Psychiat.* 125(4):520-526, 1968.
109. Borwn, N.T. The pattern of lithium side-effects and toxic reactions in the course of lithium therapy. In: *Handbook of lithium therapy*. Johnson, F.N. ed. University Park Press. Baltimore, pp. 279-289, 1980.

110. Strayhorn, J.M.Jr.; Nash, J.L. Severe neurotoxicity despite "therapeutic" serum lithium levels. *Dis. Nerv. Syst.* 38:107-111, 1977.
111. Simard, M.; Gumbiner, B.; Lee, A.; Lewis, H.; Norman, D. Lithium Carbonate Intoxication. A case report and review of the literature. *Arch. Intern. Med.* 149:36-46, 1989.
112. Schou, M. Pharmacology and Toxicology of Lithium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 16: 231-244, 1976.
113. Saxena, S. et al. Severe Memory Impairment with Acute Overdose Lithium Toxicity. *Brit. J. Psychiatry* 152:853-854, 1988.
114. Kropf, D. & Muller-Derlinghausen, B. Changes in learning, memory and mood during lithium treatment. *Acta. Psych. Scand.* 59:97-124, 1979
115. Kukulsumo, K.S.; Vaughan, M. Effect of lithium salts on memory. *Brit. J. Psychiatr.* 131:453-457, 1977.

116. Abramow, M.; Cogan E. Role of lithium - ADH interaction in lithium - induced polyuria. *Adv. Nephrol.* 13:29-34, 1984.
117. Bendz, H. Kidney function in lithium-treated patients. *Acta. Psych. Scand.* 68:303-324, 1983.
118. Pyro, B. & Sedvall, G. The excretion of lithium. In: *Lithium Research and Therapy*. Johnson, F.N. (ed) Academic Press, London, pp. 287-310, 1975.
119. Hullin, R.P. Effects of lithium on electrolyte balanced and body fluids. In: *Lithium Research and Therapy*. Johnson, F.N. (ed). Academic Press, London, pp. 359-379, 1975.
120. Inoue, A.; Iwata, H. Effects of monovalent cations and ATP on brain thiamine diphosphatase of normal rats. *Bioch. Biophys. Acta.* 242:459-469, 1971.
121. Crammer, J. Lithium, Calcium, and mental illness. *Lancet*, pp. 215-216, 1975.
122. Miller, P.D.; Dubovsky, S.L.; McDonald, K.M. , et al. Hypocalciuric effect of lithium in man. *Mineral. Electr. Metab.* 1:3-11, 1978.

123. Franks, R.D. et al. Long-term Lithium Carbonate Therapy Causes Hyperparathyroidism. *Arch. Gen. Psychiatry* 39:1074-1077, 1982.
124. Davis, B.M.; Pfefferbaum, A.; Krutzik, S.; Davis, K.L. Lithium's Effect on Parathyroid Hormone. *Am. J. Psychiatry* 138(4):489-492, 1981.
125. Plenge, P.; Rafaelsen, O. Lithium effects on calcium, magnesium and phosphate in man: effects on balance, bone mineral content, faecal and urinary excretion. *Acta. Psychiatr. Scand.* 66:361-373, 1982.
126. Shen, F.H.; Sherrard, D.J. Lithium - induced hyperparathyroidism: An alteration of the 'set - point'. *Ann. Intern. Med.* 96:63-65, 1982.
127. Schou, M.; Amdisen, A.; Jensen, S.E., et al. Occurrence of goitre during lithium treatment. *Br. Med. J.* 3:710-713, 1968.

128. Bakker, K. The influence of lithium carbonate on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Aggressologie* 23:89-93, 1982.
129. Humphreys, M.S.; Waddell, J.L. Lithium, Psoriasis, Abnormal Glucose Tolerance, and Thyroid Dysfunction. *Brit. J. Psychiatry* 152:437-38, 1988.
130. Leroy, M.C.; Villeneuve, A.; Lajeunesse, C. Lithium and Anthyroid Antibodies. *Am. J. Psychiatry* 145(4):534, 1988.
131. Russel, J.D.; Johnson, G.F.S. Affective disorders, diabetes mellitus and lithium. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 15:349-353, 1981.
132. Shopsin, D.; Stern, S.; Gershon, S. Altered carbohydrate metabolism during treatment with lithium carbonate. *Arch. Gen. Psychiatry* 26:366-371, 1972.
133. Johnston, B. Diabetes mellitus in patients on lithium. *Lancet* 29:935-936, 1977.

134. Vestergaard, F.; Amdisen, A.; Schou, M. Clinical significant side-effects of lithium treatment. *Acta. Psychiatr. Scand.* 62:193-200, 1980.
135. Reisberg, B.; Gershon, S. Toxicology and side-effects of lithium therapy, in Cooper T., Gershon S., Kçine N. et al (eds): *Lithium. Controversies and Unresolved Issues.* Amsterdam, Excerpta Medica, pp. 449-478, 1979.
136. Jensen, J.; Thonsen, K.; Olensen, O.V. Current determination of lithium-induced minimum sodium requirement in rats. *Psychopharmacology* (Berl) 45:295-299, 1976.
137. Hecht, B.; Kashgarian, M.; Forrest, J.N.; et al. Micropuncture study on the effects of lithium on proximal and distal tubule function in the rat kidney. *Physiolog. Arch.* 377:60-74, 1978.
138. Thonsen, K.; Jensen, J.; Olensen, O.V.; Effect of prolonged lithium ingestion on the response to mineralocorticoids in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* 196:463-468, 1976.

139. Cox, M.; Singer, I. Lithium induced natriuresis in
Lithium: Controversies and Unresolved Issues,
Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton, pp.
646, 1979.
140. Olensen, O.V. The effect of potassium on some
nephrotoxic actions of lithium in rats. *Dan. Med.
Bull.* 31:270-282, 1984.
141. Wegrepopal, B. & Wokley, T. B. Toxicity of group I
Metals. In: Metal Toxicity in mammals - 2,
Plenum Press, pp. 1-10, 1978.
142. Olensen, O.V.; Thomsen, K. Potassium-Induced
Renal loss of sodium in lithium-treated
rats. *Acta. Pharm. Toxicol.* 46:178-184,
1980.
143. Birch, L.I.A.; Jemer, F.A. The distribution
of and excretion of other ions in the rat.
Brit. J. Pharmacol., 47: 586-594, 1973.
144. Hullin, R.P.; Johnson, A.W. Effect of lithium
salts on uptake of I0125 by rat thyroid gland.
Life Sci. 9 (part 11):9-20, 1970.

145. Kling, M.A.; Fox, J.G.; Johnston, S.M.; Tolkoﬀ
-Rubin, N.E.; Rubin, R.H.; Covin, R.B. Effects
of long-term lithium administration on renal
struture and function in rats. A distinctive
tubular lesion. *Lab. Invest.* 50(5):526-535,
1984.
146. Van Kammen, D.P.; Murphy, D.L. Attenuation of
the euphoriant and activating effects of d-
and l-amphetamine by lithium carbonate
treatment. *Psychopharmacology*, 44:215-224,
1975.
147. Cronson, A.J.; Flemenbaum, A. Antagonism of
cocaine highs by lithium. *Am. J. Psychiatry*,
135:856-857, 1978.
148. Huey, L.Y.; Janowisky, D.S.; Judd, L.L.; Abrams,
A.; Parker, D.; Clopton, P. Effects of
lithium carbonate on methylphenidate -
induced Mood, Behavior, Cognitive Processes.
Psychopharmacology 73:161-164, 1981.

149. DaUie, C.; Sanger, D.J.; Steinberg, H.; Tonkiewicz, M.
;U'Frichard, D.C. Lithium and alpha-methyl
-p- tyrosine Prevent "Manic" Activity in
Rodents. *Psychopharmacologia (Berl)*36:263-274,
1974.
150. Cox, C.; Harrison-Read, P.E.; Steinberg, H.; Towkiewicz,
M. Lithium attenuates drug-induced Hyperactivity
in Rats. *Nature* 232(30):336-337, 1971.
151. Ottosen, P.D.; Jacobsen, N.O.; Christensen, S.
Lithium- induced morphological changes in the
rat kidney at different levels of urine flow.
Pharmacol. Toxicol. 63(2):108-113, 1988.
152. Dhawan, D.; Sharma, R.; Sharma, R.R.; Dash, R.J.
Serum thyroxine and thriiodothyroxine
concentrations in rats receiving lithium
carbonate *Horm. Metab. Res.* 17(2):109-110,
1985.

Tabela 5 - Teste Piloto Desamparo Aprendido: ratos machos que foram submetidos somente ao teste de fuga (grupo controle) e ratos machos que foram submetidos a 1, 2 ou 3 sessões de choques/dia antes do teste de fuga (grupos manipulados).

Grupos	Bloco de 5 tentativas					
	1º Bloco	2º Bloco	3º Bloco	4º Bloco	5º Bloco	6º Bloco
Controle	2,89 ±	6,04 ±	3,18 ±	3,15 ±	2,11 ±	2,41 ±
N = 20	3,35	4,54	2,93	2,01	1,01	2,19
1 sessão de						
60 choques	4,09 ±	8,13 ±	10,69 ±	8,46 ±	8,76 ±	6,32 ±
N = 20	3,69	8,10	7,76**	5,04*	10,83*	6,59*
2 sessões de						
30 choques	23,38 ±	18,51 ±	15,32 ±	13,04 ±	9,91 ±	11,06 ±
N = 10	5,66**	8,30**	8,69**	10,26**	9,40**	10,60**
3 sessões de						
20 choques	19,46 ±	12,41 ±	11,82 ±	9,21 ±	8,75 ±	4,32 ±
N = 10	7,94**	9,66*	8,24*	8,72*	6,07*	2,91*

Os valores acima significam a média de 6 blocos de 5 tentativas cada, no teste de fuga. Realizamos teste t-Student na comparação de cada bloco de 5 tentativas do grupo controle em relação ao respectivo bloco dos grupos manipulados e observamos: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, sendo que os demais não diferiram.