



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM LÍLIO E/OU ESTRADIOL
SOBRE UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO**

Mestrando: José Menna Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Elizabete Rocha da Rocha

Co-orientadora: Prof^ª. Carla Dalmaz

Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, 2006

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM LÍTIO E/OU ESTRADIOL
SOBRE UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO**

José Menna Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Elizabete Rocha da Rocha

Co-orientadora: Prof^ª. Carla Dalmaz

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, janeiro de 2006.

aos meus pais
José Antônio Colvara Oliveira e
Maria Luisa Menna de Oliveira

à minha mulher
Isabel Castro Bonow

...e ao Pedro Macedo
que há 18 anos me apresentou ao Led Zeppelin.

AGRADECIMENTOS

(Sem muita preocupação com a seqüência...)

Obrigado, Beti e Carla, minhas queridas orientadora e co-orientadora. Vocês foram pacientes e carinhosas, e – o mais importante – têm o dom de fazer despertar nos alunos o encantamento com a ciência e com o universo.

Obrigado, Ana. Foi através de ti que tive o primeiro contato com o PPG Neuro, primeiro através de tua dissertação, depois pessoalmente. Também fostes paciente e compreensiva, e me auxiliastes muito em meus primeiros contatos com ciência básica – esse vasto mundo, sempre novo.

Obrigadão, Mari, por tudo mesmo! Metade deste trabalho é teu. Te dedicavas ao laboratório às vezes com mais afinco que eu próprio. Te desejo sucesso na vida e na profissão.

Obrigado Leila e Nathália, por toda a ajuda. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Agradecimento especial presto a Carmen Pilla que gentilmente – e de modo plenamente voluntário – realizou as medidas bioquímicas, emprestando-nos um tempo precioso de sua agenda. Obrigado também pelas “aulas” de prática em laboratório, Carmen.

Léo, obrigado por todo o “help” e pelos inesquecíveis – embora raros – papos de boteco. Ainda não esqueci aquele churrasco na casa da Carla, no final de 2003, e nossa “esticada” depois – nem aqueles chopos no Calicu.

Obrigado pelo exemplo, Jorge. És o melhor professor – e o mais dedicado, o que são duas coisas diferentes e independentes – que já conheci.

André e Patty, seu casal canadense: vocês são pessoas muito especiais e doces (sem trocadilho, ok?). Como é bom conviver com médicos não contaminados pela arrogância e amargura, como tantos outros colegas em nossa profissão, não é mesmo?

Lenir, Nice, Fernanda, toda turma do lab: obrigado pela agradável convivência e os incansáveis exemplos de dedicação e seriedade. Uma das coisas que me surpreendeu convivendo com vocês todas foi justamente o envolvimento e o deslumbre com o próprio trabalho.

Isa, meu amor: enquanto escrevo isso estás ali atrás, na escrivanhinha, debruçada sobre geometria diferencial. Além de todo o resto (óbvio, não?) foste parceira para lidarmos bem com os silêncios e ausências necessários ao trabalho.

E, finalmente, pai e mãe: vejam só, título de mestre, hein? (P.S.: pai, na verdade tu és o melhor professor que já conheci – o Jorge é o segundo.)

“Como refrear a força que invade e expulsa a vida e, cega, se lança?”

(José Antônio Colvara Oliveira, meu pai, em *Weltanschauung* [2003])

RESUMO

A exposição ao estresse está envolvida na gênese e prognóstico de inúmeros transtornos neuropsiquiátricos. Em modelos animais, o estresse crônico variado é um paradigma que modela sintomas de depressão e ansiedade. Há também evidência de que determinadas formas de estresse sejam neurotóxicas. Sais de lítio são usados há mais de meio século no manejo de transtornos de humor e, recentemente, tem se demonstrado propriedades neuroprotetoras deste íon. Hormônios estrógenos também estão envolvidos na regulação de uma série de funções fisiológicas, de programações comportamentais, e acredita-se que exibam propriedades neuroprotetoras. Com o objetivo de avaliar os efeitos comportamentais e a possível interação entre as três intervenções, delineamos o seguinte experimento: ratas Wistar entre 90 e 120 dias de vida, ooforectomizadas, pesando entre 160 e 220g, foram divididas em grupos de estressadas e controles; cada grupo subdividiu-se em ratas recebendo ração normal ou com lítio; finalmente cada subgrupo foi novamente dividido em ratas recebendo ou não reposição hormonal (17- β -estradiol na forma de implante subcutâneo de liberação lenta). Por um período de 40 dias submeteram-se os animais, diariamente, em horários e com duração variados, a um dentre sete estressores: imobilização, imobilização a baixa temperatura, nado forçado, luz piscante, barulho, isolamento e inclinação das caixas-moradia. Após esse período os animais foram testados nas seguintes tarefas comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado, tarefa de comportamento alimentar (desenhada por nosso laboratório em que se quantifica consumo de alimento palatável), teste de latência para retirada da cauda e labirinto aquático de Morris. Observou-se a evolução do peso dos animais nesse período e, após o sacrifício, aferiu-se o peso das glândulas adrenais e as concentrações plasmática e eritrocitária de lítio. Nossa hipótese era a de que a administração de lítio e/ou estrógeno preveniria os efeitos do estresse sobre os parâmetros comportamentais citados e de que se observariam interações entre estrógeno, lítio e estresse quanto aos mesmos parâmetros.

Houve um efeito do estresse em reduzir o tempo nos quadrados centrais do campo aberto e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz, em relação ao tempo total, o que foi interpretado como efeito ansiogênico. A reposição com estrógeno aumentou: [1] o tempo de permanência (relativo e absoluto) no braço aberto do labirinto em cruz, interpretado como efeito ansiolítico e [2] o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto e o consumo de alimento palatável, o que sugere um possível efeito antidepressivo. Os sais de lítio aumentaram a ingestão de alimento doce – sugerindo efeito antidepressivo – e reduziram o número de reações de orientação no campo aberto, o número de entradas total e nos braços fechados do labirinto em cruz – efeito inibitório sobre a atividade exploratória. Houve interações entre estresse, lítio e estrógeno bem como entre estresse e estrógeno e estrógeno e lítio isoladamente em relação a diversas medidas comportamentais. As três intervenções reduziram o peso dos animais ao término do período. Conclui-se que na tarefa do labirinto em cruz a administração de estrógeno protegeu contra os efeitos do estresse e que as intervenções lítio, estrógeno e estresse possivelmente compartilham, ao menos em parte, alvos bioquímicos comuns. Este fato é de relevância clínica na medida que o sexo do paciente poderá influenciar na resposta à farmacoterapia e na vulnerabilidade ao estresse.

ABSTRACT

Stress exposure is involved in the genesis and prognosis of various neuropsychiatric disorders. In animal models, chronic mild stress models symptoms of depressive and anxiety disorders. There is also evidence that stress may be neurotoxic. Lithium salts have been used for more than half a century in the treatment of affective disorders and, recently, neuroprotective properties of this ion have been demonstrated. Estrogens are involved in regulation of physiologic functions and behavioral programs and it is believed that they may also have neuroprotective properties. With the aim of evaluating the behavioral effects of the three interventions and a possible interaction among them the following experiments were designed.

Female Wistar rats, 90-120 days-old, 160-220g of weight, were oophorectomized and allocated in groups of stressed and controls; each group was subdivided in rats receiving normal or a lithium-containing chow; finally, each group was subdivided in rats receiving or not hormonal replacement (17- β -estradiol). For a 40 days period animals were exposed daily, in a unpredictable way, to one of seven stressors: restraint, restraint at 4°C, forced swimming, flashing light, noise, isolation and inclination of home cage. After this time animals were tested in the following behavioral tasks: open field, elevated plus maze, measurement of palatable food intake, tail-flick and Morris' water maze. Weight of animals was observed during this period; weight of adrenals, serum and erythrocyte lithium concentrations were measured after decapitation. Our hypothesis was that lithium and/or estrogen administration will be preventive against stress effects on the behavior and that interactions among estrogen, lithium and stress will be observed.

Stress reduced the time in the central squares of the open field and the relative time spent in the open arms of plus maze and this was interpreted as an anxiogenic effect. Estrogen replacement increased: [1] time (absolute and relative) spent in the plus maze open arm, interpreted as anxiolytic effect and [2] number of crossings in the open field and palatable food consumption, which suggests a possible antidepressive effect. Lithium salts increased palatable food intake – antidepressive effect –, reduced the number of rearings in the open field, reduced the number of entries (total and in the closed arm) of plus maze – inhibitory effect on the exploratory activity. There were interactions among stress, lithium and estrogen, among stress and estrogen, and among estrogen and lithium in relation to various behavioral measures. All interventions reduced the animal weight at the end of this period. In conclusion, estrogen administration was protective against stress effects in the plus maze task, and the three interventions may share some biochemical targets, which is important in the clinical context, since the patient sex may influence its response to drugs and its vulnerability to stress.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 3.1 – distribuição dos grupos.....	15
Fig. 4.1 – efeito do estresse sobre o tempo nos quadrados centrais no CA.....	24
Fig. 4.2 – efeito do estresse sobre o tempo nos quadrados centrais no CA.....	25
Fig. 4.3 – efeito do estrógeno sobre o número total de cruzamentos no CA.....	25
Fig. 4.4 – efeito do estrógeno sobre o número total de cruzamentos no CA.....	26
Fig. 4.5 – efeito do lítio sobre o número de reações de orientação no CA.....	26
Fig. 4.6 – efeito do lítio sobre o número de reações de orientação no CA.....	27
Fig. 4.7 – interação entre as três intervenções quanto à eliminação de bolos fecais no CA.....	27
Fig. 4.8 – efeito do estrógeno e do estresse sobre o tempo no BA em relação ao total no LCE.....	29
Fig. 4.9 – efeito do estresse sobre o tempo relativo no BA do LCE.....	29
Fig. 4.10 – efeito do estrógeno sobre o tempo relativo no BA do LCE.....	30
Fig. 4.11 – efeito do estrógeno e do estresse sobre o tempo no BA do LCE.....	30
Fig. 4.12 – efeito do estresse sobre o tempo no BF do LCE.....	31
Fig. 4.13 – efeito do lítio e interação entre as três intervenções quanto ao número de entradas no BF do LCE.....	31
Fig. 4.14 – efeito do lítio sobre o número de entradas no BF do LCE.....	32
Fig. 4.15 – interação entre as três intervenções quanto ao número de entradas no BA do LCE.....	32
Fig. 4.16 – efeito do lítio sobre o número total de entradas, interação entre as três intervenções quanto ao número total de entradas no LCE.....	33
Fig. 4.17 – efeito do lítio sobre o número total de entradas no LCE.....	33
Fig. 4.18 – efeito do lítio, do estrógeno e interação entre ambos quanto ao consumo de alimento palatável.....	34
Fig. 4.19 – comparação entre cada um dos oito grupos quanto ao consumo de alimento palatável.....	35

Fig. 4.20 – efeito do estrógeno sobre o consumo de alimento palatável no teste de comportamento alimentar.....	35
Fig. 4.21 – efeito do lítio sobre o consumo de alimento palatável no teste de comportamento alimentar.....	36
Fig 4.22 – efeito do lítio e estrógeno sobre a latência para início do consumo alimentar no dia do teste.....	37
Fig 4.23 – efeito do estrógeno sobre a latência para início de consumo de alimento palatável.....	38
Fig. 4.24 – efeito do lítio sobre a latência para início de consumo de alimento palatável.....	38
Fig 4.25 – ausência de diferença entre as intervenções quanto à latência para exploração da caixa no dia do teste.....	40
Fig 4.26 – ausência de diferença entre os grupos quanto à latência para retirada da cauda no dia do teste.....	41
Fig. 4.27 – distribuição dos grupos para a tarefa memória de referência no labirinto aquático.....	42
Fig. 4.28 – ausência de diferença entre os grupos quanto ao tempo transcorrido no quadrante alvo na tarefa de memória de referência.....	43
Fig. 4.29 – ausência de diferença entre os grupos quanto ao tempo transcorrido no quadrante oposto na tarefa de memória de referência.....	43
Fig. 4.30 – ausência de diferença entre os grupos quanto ao número de cruzamentos sobre o local onde se encontrava a plataforma nos dias de treino, na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris.....	44
Fig. 4.31 – tendência do estrógeno diminuir o número total de cruzamentos e do estresse reverter esse efeito, na tarefa de memória de referência do labirinto aquático de Morris.....	45
Fig. 4.32 – latência para encontrar a plataforma em cada dia do treino no labirinto aquático – tarefa memória de referência.....	46

Fig. 4.33 –latência para encontrar a plataforma na tarefa do labirinto aquático – tarefa memória de trabalho.....	47
Fig 4.34 – efeito do lítio sobre o peso das adrenais e interação entre efeitos do estrógeno e estresse.....	49
Fig 4.35 – efeito do lítio sobre o peso das adrenais.....	49
Fig. 4.36 – efeito das intervenções sobre o peso dos animais.....	50
Fig. 4.37 – interação entre os efeitos de estresse e estrógeno sobre o peso dos animais na 6 ^a semana de tratamento.....	51
Fig. 4.38 – efeito do estrógeno sobre o peso corporal dos animais na 12 ^a semana de tratamento.....	51
Fig. 4.39 – efeito do lítio sobre o peso corporal dos animais na 12 ^a semana de tratamento.....	52
Fig. 4.40 – efeito do estresse sobre o peso corporal dos animais na 12 ^a semana de tratamento.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – desenho experimental.....	23
Tabela 4.1 – efeito do lítio e do estrógeno sobre o consumo de alimento palatável conforme o dia do treino.....	37
Tabela 4.2 – efeito do lítio e estrógeno sobre o tempo para início de consumo de alimento palatável conforme o dia do treino.....	39
Tabela 4.3 – litemias.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
- BA – braços abertos
- BF – braços fechados
- CA – campo aberto
- CCK - colecistocinina
- CRH – hormônio liberador de corticotrofina
- ECT – eletroconvulsoterapia
- ECV – estresse crônico variado
- GFAP – proteína glial fibrilar ácida
- HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal
- HPT – hipotálamo-hipófise-tireóide
- ISRS – inibidores seletivos da recaptação da serotonina
- LA – labirinto aquático
- LCE – labirinto em cruz elevado
- LTP – potenciação a longo prazo
- m-CPP – meta-clorofenilpiperazina
- MPP+ – 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESTRESSE.....	1
1.2. ESTRESSE E NEUROTOXIDADE.....	3
1.3. LÍTIO.....	5
1.4. LÍTIO E NEUROPROTEÇÃO.....	8
1.5. ESTRÓGENOS.....	9
1.6. ESTRÓGENOS E NEUROPROTEÇÃO.....	10
1.7. ESTRESSE, LÍTIO E ESTRÓGENOS.....	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	14
3.2. DESENHO EXPERIMENTAL.....	14
3.3. OVARECTOMIA.....	14
3.4. IMPLANTES SUBCUTÂNEOS PARA REPOSIÇÃO DE ESTRÓGENO.....	15
3.5. ADMINISTRAÇÃO DE LÍTIO.....	16
3.6. ESTRESSE.....	16
3.7. ESTUDO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	17
3.7.1. Tarefa do campo aberto (“open field”)	18
3.7.2. Tarefa do labirinto em cruz elevado (“elevated plus-maze”)	18
3.7.3. Tarefa de comportamento alimentar	19
3.7.4. Medida da latência para retirada da cauda (“tail-flick”)	20
3.7.5. Tarefa do labirinto aquático de Morris (“Morris water-maze”)	20
3.8. ESTUDO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FÍSICOS.....	22
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4. RESULTADOS	24

4.1. TAREFA DO CAMPO ABERTO.....	24
4.2. TAREFA DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	28
4.3. TAREFA DE COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	34
4.4. MEDIDA DA LATÊNCIA PARA RETIRADA DA CAUDA.....	41
4.5. TAREFA DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS.....	42
4.5.1. Tarefa memória de referência.....	42
4.5.2. Tarefa memória de trabalho.....	47
4.6. ESTUDO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FÍSICOS.....	48
4.6.1. Litemias.....	48
4.6.2. Adrenais.....	48
4.6.3. Pesos dos animais.....	50
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
8. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE

No final da década de 1950 observou-se hipercortisolemia como um dos aspectos da depressão e, na década de 70, o grupo de Carrol descreveu o achado, replicado até hoje, de que 40 a 50% dos pacientes com depressão endógena apresentavam resistência no teste de supressão de cortisol pela dexametasona (Carrol, 1982). Desde então a participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, especialmente na depressão maior, tem sido bem documentada (Musselman *et al.*, 1998). Nesse sentido, foi descrito:

[1] No hipotálamo:

◆ Elevação nos níveis de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no líquido de pacientes deprimidos não medicados (Arato *et al.*, 1986; Banki *et al.*, 1987, 1992; France *et al.*, 1988; Nemeroff *et al.*, 1984; Rish *et al.*, 1992) e em vítimas de suicídio (Arato *et al.*, 1989), o qual retorna aos níveis normais quando há recuperação dos sintomas após tratamento com ECT (Nemeroff *et al.*, 1991) ou fluoxetina (DeBellis *et al.*, 1993). A ausência de retorno aos níveis normais, apesar da melhora sintomática, indicaria possibilidade de recaída precoce (Banki *et al.*, 1992);

◆ Aumento na expressão de CRH em neurônios no hipotálamo de pacientes deprimidos (Raadsheer *et al.*, 1994).

◆ Aumento de neurônios expressando vasopressina e ocitocina no hipotálamo (núcleo paraventricular) de pessoas deprimidas (Purba *et al.*, 1996) – neuropeptídeos que potencializam liberação de ACTH mediada por CRH (Gillies e Lowry, 1979; Yates e Maran, 1974);

◆ Efeito depressivogênico, em animais, de CRH injetado diretamente no líquido (Musselman *et al.*, 1998).

Por outro lado, tem sido demonstrado um papel do CRH em outras estruturas encefálicas que não o hipotálamo. Thompson e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a administração de corticosterona aumenta a expressão de m-RNA para CRH no núcleo central da amígdala de animais submetidos a um paradigma de medo condicionado ao contexto (Thompson *et al.*, 2004).

[2] Na hipófise:

◆ Diminuição de produção de ACTH e β -endorfina em resposta à estimulação por CRH em pacientes portadores de depressão sem tratamento medicamentoso (através do teste descrito por Hermus *et al.*, 1984 e Watson *et al.*, 1986) (Amsterdam *et al.*, 1987; Gould *et al.*, 1984, 1986; Holsboer *et al.*, 1984; Kathol *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1990). Esse efeito seria decorrente de uma infra-regulação (*down-regulation*) dos receptores hipofisários em resposta à excessiva concentração de CRH (Musselman *et al.*, 1998);

- ◆ Alargamento hipofisário em portadores de depressão (Krishnan *et al.*, 1991);
- ◆ Elevação nos níveis de ACTH em portadores de depressão (Deuschle *et al.*, 1997).

[3] Na adrenal:

◆ Alargamento da adrenal em portadores de depressão e suicidas (Zis e Zis, 1987; Amsterdam *et al.*, 1987; Nemerof *et al.*, 1992), reversível após tratamento (Rubin *et al.*, 1995).

◆ Aumento na produção de cortisol plasmático em portadores de depressão (Carpenter e Bunney, 1971; Gibbons e McHugh, 1962) bem como de metabólitos do cortisol (Sachar *et al.*, 1970);

◆ Não supressão no teste de supressão do cortisol pela dexametasona em praticamente todos pacientes com depressão psicótica (Arana *et al.*, 1985; Schatzberg *et al.*, 1984; Evens and Nemeroff, 1983; Krishnan *et al.*, 1985).

Talvez muitos dos achados de anormalidade no eixo HPA na depressão possam ser rastreados até hipersecreção de CRH, o que tem levado à pesquisa de antagonistas não peptídeos dos receptores de CRH como possíveis antidepressivos (Schatzberg *et al.*, 1998; Bear *et al.*, 2002). Uma teoria de como o estresse levaria à hiperativação do eixo propõe que cortisol em excesso provocaria infra-regulação dos receptores para glucocorticóides no hipocampo, o que levaria a efeito desinibitório sobre o hipotálamo. Em coerência com essa idéia, há o achado de que tratamentos com inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) parecem aumentar a expressão de receptores corticóides no hipocampo (Bear *et al.*, 2002).

Por outro lado, outros sistemas endócrinos parecem também participar da fisiopatologia dos transtornos depressivos, como tem sido proposto desde 1969, quando Prange e colegas (Prange *et al.*, 1969; Prange *et al.*, 1972) demonstraram utilidade de T₃ como adjuvante no tratamento antidepressivo, o que fala a favor de participação, nessa doença, do eixo HPT (hipófise-pituitária-tireóide). Da mesma forma, e como já foi falado, estes eixos endócrinos parecem também participar de outros quadros psiquiátricos, como transtornos ansiosos e alimentares.

1.2. ESTRESSE E NEUROTOXIDADE

A primeira evidência de efeitos neurotóxicos de glicocorticóides foi descrita no hipocampo por Aus der Muhler (apud Lee *et al.*, 2002). Desde então, diversos trabalhos com animais de laboratório têm demonstrado efeitos deletérios de modelos de estresse e/ou exposição prolongada a corticóides sobre as células piramidais das camadas CA3 e CA4 do hipocampo, entre eles:

- ◆ atrofia dendrítica, retração celular e morte neuronal (Wooley *et al.*, 1990; Sapolski, 2000);
- ◆ aumento na vulnerabilidade tecidual a insultos induzidos por outros agentes lesivos como processos isquêmicos (Sapolsky, 1996) e drogas convulsivantes, como o ácido caínico (Smith-Swintosky *et al.*, 1996; Sapolsky 2000);

◆ diminuição da neurogênese, tanto em cérebros em desenvolvimento (Tanapat *et al.*, 1998) como na fase adulta (Gould e Tanapat, 1999; Gould *et al.*, 2000);

◆ efeito prejudicial sobre a LTP e a “*primed burst potentiation*”, modelos eletrofisiológicos de memória (Diamond *et al.*, 1996).

Além disso, as alterações hipocampais causadas por estresse são semelhantes às encontradas no hipocampo idoso (Kerr *et al.*, 1991; Sapolsky *et al.*, 1985).

Em humanos, também foram observadas diminuição no volume hipocampal e outras alterações nessa estrutura em situações de depressão, estresse traumático e síndrome de Cushing, condições em que há sabidamente hiperatividade do eixo HPA (Magariños *et al.*, 1997). Em coerência com isso, demonstrou-se que cortisol aumentado, em episódios depressivos, correlaciona-se com mudanças cerebrais. As regiões CA3 e CA4 do hipocampo mencionadas parecem ser as estruturas encefálicas mais sensíveis a injúrias mediadas por glicocorticóides (McEwen, 1999; McKittrick, 2000). Contudo, há controvérsias quanto à existência de lesão celular hipocampal em decorrência de estresse (Fuchs e Flügge, 1998). Por exemplo, em um experimento de Volmann-Honsdorf (1997) foi demonstrado que 28 dias de estresse, com conseqüente aumento nos níveis séricos de glicocorticóides, não provocou lesão no hipocampo.

Um método indireto de avaliar-se a função hipocampal é através de tarefas comportamentais, e tais tarefas podem ser úteis na investigação de declínio cognitivo conseqüente a um prejuízo na função neuronal não identificável por métodos histológicos (Vasconcellos *et al.*, 2003). Nesse sentido, estudos mostraram, após administração contínua de corticóides em doses elevadas, prejuízos cognitivos avaliados nos testes do labirinto aquático de Morris (Bodnoff *et al.*, 1995) e no labirinto de Barnes (McLay *et al.*, 1998). Da mesma forma, estudos mostraram, após estresse, prejuízos cognitivos em testes como o labirinto radial, labirinto em Y e labirinto aquático (Foy *et al.*, 1987; Nishimura *et al.*, 1999; Conrad *et al.*, 1996; Vasconcellos *et al.*, 2003).

Como em vários modelos de estresse existe o aumento sustentado de corticóides, sugere-se que os efeitos comportamentais do estresse podem ser conseqüência de dano neuronal (Sapolsky, 1992; Sapolsky, 1996; Sapolsky *et al.*, 1985; Sapolsky *et al.*, 1986). Nesse sentido sabe-se que, em alguns aspectos, a depressão pode ser compreendida como um transtorno neurodegenerativo (Swaab *et al.*, 2005; Myint e Kim, 2003).

Recentemente, Gamaro e colegas demonstraram que o estresse crônico variado reduz a procura por alimento doce em ratos. A redução na procura por doces pode ser considerada expressão de anedonia e, portanto, o referido modelo pode ser compreendido como um modelo de depressão (Gamaro *et al.*, 2003a).

Como em muitas doenças neurodegenerativas a depressão é um sintoma importante, e como na depressão existem mudanças plásticas importantes – em alguns aspectos degenerativas – na arquitetura encefálica, modelos animais de depressão podem ser úteis no estudo de neuroproteção (Gamaro *et al.*, 2003a; Pucilowski *et al.*, 1993; Katz *et al.*, 1981; Willner, 1991).

Em síntese, dado o vínculo existente entre estresse, depressão e neurotoxicidade é possível que modelos de depressão como o estresse crônico variado sejam úteis, tanto para o estudo da fenomenologia dos transtornos depressivos, como daqueles aspectos em que processos degenerativos tomem parte em sua gênese.

1.3. LÍTIO

O lítio (Li) é um elemento químico, pertencente à família 1A da tabela periódica, encontrado na natureza na forma de dois isótopos estáveis – ${}^6\text{Li}$ e ${}^7\text{Li}$ – o último constituindo aproximadamente 93% do lítio natural. Sua descoberta data de 1817. Até sua introdução formal para manejo da mania (Cade, 1949) sais de lítio foram usados no tratamento de uma série de transtornos – por exemplo, no tratamento da gota (“diátese do ácido úrico”). Já no final do século XIX John Aulde e Carlo Lange chamaram atenção para o efeito do lítio na profilaxia e no tratamento de sintomas depressivos recorrentes. Foram usados também em uma série de remédios populares, e seu uso como substituto do sal de cozinha em pacientes hipertensos levou ao relato de toxicidade por lítio na década de 1940, o que fez com que caísse em desuso. Foi reintroduzido na farmacoterapia por Cade, em 1949 e por Shou no princípio de 1950, os quais demonstraram seu poder antimaniaco e profilático na anteriormente chamada doença maniaco depressiva (Cade, 1949; Schou 1979) denominada hoje em dia transtorno afetivo bipolar.

Desde então, vários estudos duplo-cegos randomizados confirmaram a eficácia do lítio na mania aguda (Arana and Rosenbaum, 2000) e na profilaxia de sintomas maníacos e ansiosos no transtorno bipolar (Davis *et al.*, 1999).

O lítio é uma das drogas mais interessantes conhecidas, dado seu complexo mecanismo de ação. Este íon interfere em diversos sistemas de neurotransmissão, em vários níveis – desde a concentração de neurotransmissores na fenda sináptica, passando por sistemas de segundos-mensageiros, até a expressão de determinados genes. Numa visão panorâmica, sabe-se que o lítio:

- ◆ Interfere no transporte e, conseqüentemente, no gradiente de íons transmembrana. Transita para o interior da célula tanto às custas de ATP, usando a bomba Na^+/K^+ para isso, ou usando a energia da diferença de concentração, através do sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. Foi demonstrado também que o influxo se dá por canais de sódio voltagem dependentes, quando no seu estado ativo, o que leva a um maior influxo de íons quando a célula está ativa (na mania, hipoteticamente) e um menor influxo na eutimia. Talvez isso explique porque os níveis séricos de lítio sejam mais altos quando um paciente em litioterapia está eufímico, em comparação com os períodos sintomáticos da doença. Parece ainda exercer um efeito sobre a bomba Na^+/K^+ , alguns estudos demonstrando um efeito inibitório, outros excitatório (Lenox e Maji, 1996).

- ◆ Aumenta a relação acetilcolina/dopamina e aumenta a relação GABA/glutamato (Lenox e Manji, 1996; Jope, 1999; Dunigan e Shamoo, 1995); em termos mais específicos: agudamente inibe a recaptação de glutamato e cronicamente supra-regula essa recaptação (Dixon e Hokin, 1998; Dixon *et al.*, 1994);

- ◆ Interfere no sistema do fosfoinositol, inibindo a ativação da proteína-Gq, da proteína cinase C (PKC), inibindo a liberação de cálcio do retículo endoplasmático pelo inositol-trifosfato (IP_3) e inibindo a enzima inositol-monofosfatase (Jope, 1999; Bachmann *et al.*, 2005);

◆ Interfere no sistema do AMP cíclico, estimulando a conformação inativa (heterotrimérica) das proteínas Gi e Gs, o que resulta numa ação bimodal: inibição da adenilciclase em situações de estimulação excessiva e estimulação da mesma enzima em situações basais (Jope, 1999; Harwood e Agam, 2003);

◆ Interfere na expressão de determinados genes modulando a ação de fatores de transcrição como AP-1, NF-kB e elemento responsivo a AMP cíclico (Jope, 1999; Harwood e Agam, 2003).

Além disso, entre os fármacos psicoativos talvez seja aquele que apresenta o modelo menos complicado de distribuição e eliminação, pois não sofre transformação hepática, não se liga substancialmente a proteínas plasmáticas e não apresenta substancial excreção hepática (Swartz e Wilcox, 1984).

Esse perfil complexo lhe confere utilidade em contextos clínicos tão heterogêneos como transtornos do humor, agressividade, determinados carcinomas e Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – SIDA (Schatzberg e Nemeroff, 1998). Embora por algum tempo tenha existido uma tendência de relegar-se o lítio ao segundo plano no manejo do transtorno bipolar, sabe-se atualmente que o lítio é a primeira opção no tratamento deste transtorno (Yatham *et al.*, 2005).

Uma recente e importante revisão (Geddes *et al.*, 2004) mostra claramente eficácia do lítio na prevenção de recaídas, principalmente maníacas. Além disso, o fato de o lítio ser um elemento encontrado na natureza – sobre o qual a indústria farmacêutica não pode, portanto, reclamar patente – faz com que seja um tratamento extremamente barato comparado a muitos dos fármacos disponíveis para o manejo dos transtornos neuropsiquiátricos. No contexto da “redescoberta” do lítio, um promissor campo de estudo que vem sendo desenvolvido recentemente diz respeito à sua utilidade como agente neuroprotetor.

1.4. LÍTIO E NEUROPROTEÇÃO

O primeiro estudo sugerindo efeito neuroprotetor do lítio foi publicado em 1995, demonstrando ação do íon em recuperar déficit comportamental e enzimático decorrente de estimulação glutamatérgica (Pascual e Gonzales, 1995).

Desde então muito tem sido produzido sobre o assunto. Foi comprovado que o tratamento com lítio aumenta a neurogênese no hipocampo de ratos (Chen *et al.*, 2000), provoca aumento na substância cinzenta cerebral em humanos (Moore *et al.*, 2000), diminui a extensão da lesão e o déficit neurológico em um modelo de isquemia em ratos no qual a artéria cerebral média é ocluída (Nonaka e Chuang, 1998), atenua a neurotoxidade induzida por beta-amilóide (Wei *et al.*, 2000) e suprime a fosforilação da TAU (processo importante na geração das placas) provavelmente através da inibição da GSK-3 β (Hong *et al.*, 1997; Munoz-Montano *et al.*, 1997).

Além disso, em concordância com a proposição de que a gliose pode ser benéfica por estar envolvida com neuroproteção (Ridet *et al.*, 1997), Rocha e colegas detectaram aumento no imunoconteúdo de GFAP (proteína fibrilar ácida marcadora de astrócitos maduros) em ratos tratados com lítio (Rocha, 1996), e predominância de astrócitos estrelados entre os ratos tratados, em comparação com os controles (Rocha *et al.*, 1998). Recentemente, foi demonstrado que tratamento com lítio após isquemia reduz a lesão cerebral e facilita a recuperação (Ren *et al.*, 2003).

O possível efeito neuroprotetor do lítio tem sido atribuído a diversos de seus alvos, como diminuição da excitotoxicidade por glutamato (Nonaka *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2003; Kopnisky *et al.*, 2003), diminuição na expressão de p53, Bax e cdk5 (Chen e Chuang, 1999; Jorda *et al.*, 2005), aumento na expressão da proteína neuroprotetora Bcl-2 (Chen e Chuang, 1999; Wei *et al.*, 2001) e inibição da enzima GSK-3 β (Ryves e Harwood, 2001; Grimes e Jope, 2001; De Sarno *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado efeito do lítio sobre a expressão do gene BAG-1, aparentemente com ações anti-apoptóticas (Zhou *et al.*, 2005).

Em concordância com um possível efeito neuroprotetor do lítio, alguns estudos demonstram efeitos do lítio contrários àqueles obtidos com intervenções que modelam estresse. Por exemplo, demonstrou-se que o lítio reverte o efeito de estresse precoce

(privação materna) sobre os níveis de neuropeptídeo Y (Husum e Mathe, 2002), que o tratamento com lítio reverte o aumento na síntese de poliaminas induzido por estresse (Gilad e Gilad, 1996) e, recentemente, Vasconcellos demonstrou que o tratamento com lítio atenua o efeito do estresse crônico sobre a memória espacial em ratos machos (Vasconcellos *et al.*, 2003).

Embora exista evidência em sentido oposto – por exemplo, de que a administração de lítio e rubídio teria o mesmo efeito que o estresse crônico em determinados parâmetros comportamentais e nos níveis de dopamina (Gambarana *et al.*, 1999) – predomina na literatura informação no sentido de que lítio oferece proteção contra o estresse.

1.5. ESTRÓGENOS

Estrógenos são hormônios sexuais que participam da regulação de uma série de processos fisiológicos, tanto em machos como em fêmeas.

O principal dos estrógenos circulantes é o 17- β -estradiol, ou 17- β -E₂. Os estrógenos agem, classicamente, através de dois receptores nucleares, através do que modulam transcrição gênica e síntese protéica (Sak e Everaus, 2004). Tais receptores são denominados ER α e ER β , e a constante de dissociação (Kd) do 17 β -E₂, para cada um deles, é 0,1nM e 0,4nM, respectivamente, sugerindo uma maior afinidade do 17- β -E₂ pelo ER α . Contudo, atualmente têm sido propostos locais de ação não nucleares para os estrógenos, provavelmente a nível de membrana, ainda não claramente identificados (Sak e Everaus, 2004).

Os níveis séricos de estrógenos variam conforme a espécie estudada e a fase do ciclo estral: em mulheres pré-menopausa a concentração de 17- β -E₂ é menor ou igual a 0,28nM na fase folicular, na fase lútea é menor ou igual a 1,1nM e pode atingir níveis de 150nM ou mais durante a gestação. Com a terapia de reposição hormonal pós-menopausa os níveis séricos podem exceder 0,77nM, chegando a ser dez vezes maiores que aqueles em mulheres na pós-menopausa sem reposição (Clarke *et al.*, 2001). Além disso, embora a principal fonte de estrógenos circulantes em mulheres pré-menopausa seja a produção ovariana,

muitos tecidos extragonadais podem sintetizar estrógenos, e pode ocorrer acúmulo destes hormônios em determinados tecidos, inclusive no encéfalo (Sak e Everaus, 2004; Simpson *et al.*, 1999).

Hormônios sexuais, em especial estrógenos, sabidamente estão relacionados à gênese e prognóstico de uma série de condições psiquiátricas. Frequentemente a deficiência hormonal do puerpério resulta em sintomatologia depressiva, o que é efetivamente tratado, em grande número dos casos, com reposição hormonal (Tinelli *et al.*, 2003). O prognóstico de transtornos como AVC, demência de Alzheimer e esquizofrenia pode relacionar-se aos níveis de estrógenos circulantes e a terapia de reposição hormonal (TRH) pode ser útil em alguns aspectos no tratamento dessas condições (Garcia-Segura *et al.*, 2001). Em uma revisão sistemática de estudos empregando estrógenos no tratamento da esquizofrenia observamos resultados contraditórios, embora um ensaio clínico placebo-controlado com 16 homens portadores do transtorno tenha evidenciado uma melhora em escalas de sintomatologia com valerato de estradiol 2mg em associação com antipsicóticos (Oliveira *et al.*, 2004). Sabe-se também que a incidência de muitas doenças é diferente entre homens e mulheres e que, em mulheres, há variações na incidência e curso de diversos transtornos, conforme a fase de vida (fértil ou não) (Garcia-Segura *et al.*, 2001).

Apesar disso, e infelizmente, tem estado aquém do que seria justificado o esforço na compreensão do papel dos esteróides sexuais na regulação de funções cerebrais que não aquelas relacionadas, diretamente, ao comportamento sexual. Em pesquisa básica, apesar das evidentes diferenças de fisiologia entre os sexos, muitas vezes se prefere conduzir experimentos com machos devido às dificuldades oferecidas pelo breve ciclo estral das fêmeas, o que torna necessária uma interpretação cuidadosa dos resultados (Garcia-Segura *et al.*, 2001; Gamaro *et al.*, 2003b). Assim, o mecanismo subjacente ao possível efeito terapêutico dos estrógenos em transtornos neuropsiquiátricos, bem como a maior compreensão de seu papel fisiológico, permanece fértil campo para pesquisa.

1.6. ESTRÓGENOS E NEUROPROTEÇÃO

Há crescente evidência na literatura de que os hormônios sexuais exerçam efeito neuroprotetor: sabe-se, por exemplo, que fêmeas em período fértil têm menos vulnerabilidade ao dano causado por isquemia em comparação com fêmeas pós-menopausa

ou machos (Hawk *et al.*, 1998; Rusa *et al.*, 1999). Além disso, o uso de estrógenos como terapia de reposição hormonal parece diminuir o risco e a gravidade de doenças neurodegenerativas como demência de Alzheimer (Wise, 2002), demência de Parkinson (Saunders-Pullman *et al.*, 1999) e esquizofrenia (Garcia-Segura *et al.*, 2001) e parece melhorar a memória e a cognição. Sabe-se também que estrógenos podem aumentar a neurogênese hipocampal (Gould *et al.*, 2000).

Foi demonstrado um efeito dos estrógenos em reverter ou amenizar o dano causado por estresse: por exemplo, o tratamento com estradiol reduz a injúria hipocampal induzida por convulsão em ratas ooforectomizadas, embora não em machos (Galanopoulou *et al.*, 2003). Nesse sentido, há relatos quanto a diferenças na resposta ao estresse conforme o sexo: o estresse repetido por imobilização provocou mais em fêmeas do que em machos aumento na reatividade antioxidante total e na produção de radicais livres (Tabajara *et al.*, 2003); Gamaro e colegas demonstraram que o efeito de estresse agudo por imobilização induz analgesia tanto em ratos machos como fêmeas, mas que estresse repetido por imobilização induz hiperalgesia somente em machos (Gamaro *et al.*, 1998).

Propõe-se que o possível efeito neuroprotetor dos estrógenos seja devido à diminuição da expressão de receptores de glutamato (Garcia-Segura *et al.*, 2001), a um efeito antioxidante diminuindo a peroxidação lipídica (Mossman e Behl, 1999) e a vasodilatação (Hurn e Macrae, 2000). Recentemente foi demonstrado que 17- β -estradiol tem seu efeito neuroprotetor mediado, ao menos em parte, por inibição da enzima GSK-3 β (Zamin, 2003).

1.7. ESTRESSE, LÍTIO E ESTRÓGENOS

Como explicitado acima, é bem documentada, tanto em estudos com humanos como em modelos animais, a correlação entre estresse e transtornos neuropsiquiátricos. Da mesma forma, tanto em estudos clínicos como em pesquisa básica, sais de lítio e hormônios estrógenos podem ser úteis no manejo de alguns destes transtornos ou na proteção contra alguns dos efeitos eliciados pelo estresse. Até onde é de nosso conhecimento, não existem dados que comparem diretamente os efeitos do lítio com os de estrógeno sobre modelos de estresse. De modo mais amplo, a literatura é escassa na exploração de eventuais interações ou intersecções entre os mecanismos que medeiam os efeitos terapêuticos de ambas as

intervenções. Ademais, mesmo tendo em vista o fato de que a depressão atinge mais mulheres que homens (Burvill, 1995), não há estudos considerando interações entre lítio e estrógenos em modelos de depressão. Neste trabalho abordamos este tema a partir da ótica proporcionada por determinados modelos comportamentais, para o que levantamos as seguintes questões:

- ◆ Existem diferenças entre os tratamentos (lítio e estrógeno) quando testados em modelos comportamentais de ansiedade, depressão e memória?
- ◆ Existe ou não superioridade de um tratamento em relação ao outro (lítio versus estrógeno) na possível prevenção dos efeitos comportamentais do estresse?
- ◆ Existe ou não efeito somatório quando ambos os tratamentos são administrados em conjunto?

Nossas hipóteses são as de que ambos previnem os efeitos comportamentais do estresse, existindo diferenças e interações entre ambos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Comparar os efeitos do tratamento com lítio, com estrógeno e com ambos sobre parâmetros comportamentais de ratas ooforectomizadas submetidas a estresse crônico variado.

2.2. Objetivos Específicos

[1] Estudar os efeitos do estresse e do tratamento com lítio na presença ou não de estrógeno sobre a ansiedade, atividade locomotora e comportamento exploratório, utilizando para isso a tarefa do labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*) e do campo aberto (*open field*);

[2] Estudar os efeitos do estresse e do tratamento com lítio na presença ou não de estrógeno sobre o comportamento alimentar, utilizando para isso tarefa que avalia o consumo de alimento palatável;

[3] Estudar os efeitos do estresse e do tratamento com lítio na presença ou não de estrógeno sobre a nocicepção, utilizando para isso o teste de latência para retirada da cauda (*tail flick*);

[4] Estudar os efeitos do estresse e do tratamento com lítio na presença ou não de estrógeno sobre a memória, utilizando para isso a tarefa do labirinto aquático de Morris (*Morris water-maze*);

[5] Estudar os efeitos do estresse e do tratamento com lítio na presença ou não de estrógeno sobre o peso corporal e das glândulas adrenais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 83 ratas (fêmeas) Wistar adultas, entre 90 e 120 dias de vida, pesando entre 160 e 220g, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Exceto durante a realização do estresse e das tarefas comportamentais os animais mantinham-se em caixas-moradia medindo 42 x 34 x 16 cm, confeccionadas em *plexiglass*, tendo o assoalho recoberto com maravalha. Admitia-se um máximo de 5 ratos por caixa (em média 3,5). Os animais dispunham de água e ração *ad libitum* e eram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas. Toda manipulação dos animais (preparo, cirurgias, estresse e tarefas comportamentais) era realizado no período claro.

3.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos à ovariectomia e divididos em dois grandes grupos – aqueles *recebendo* e aqueles *não recebendo* reposição hormonal de estrógeno; estes dois grupos subdividiram-se em ratas *recebendo* e *não recebendo* dieta com lítio e, finalmente, cada grupo foi ainda subdividido em *estressados* e *não stressados* (Fig.3.1).

3.3. OVARECTOMIA

Todos os animais eram anestesiados com infusão intraperitoneal de solução contendo Xilazina (18,4µg/g de peso do animal) e Cetamina (120µg/g de peso), e submetidas a ovariectomia bilateral através de uma única incisão abdominal mediana. Após a cirurgia eram mantidas por 1 a 2 horas em uma caixa aquecida com uma lâmpada vermelha de 25W. Após, transcorria um período de recuperação de cinco dias a uma semana, quando então se realizavam os implantes subcutâneos.

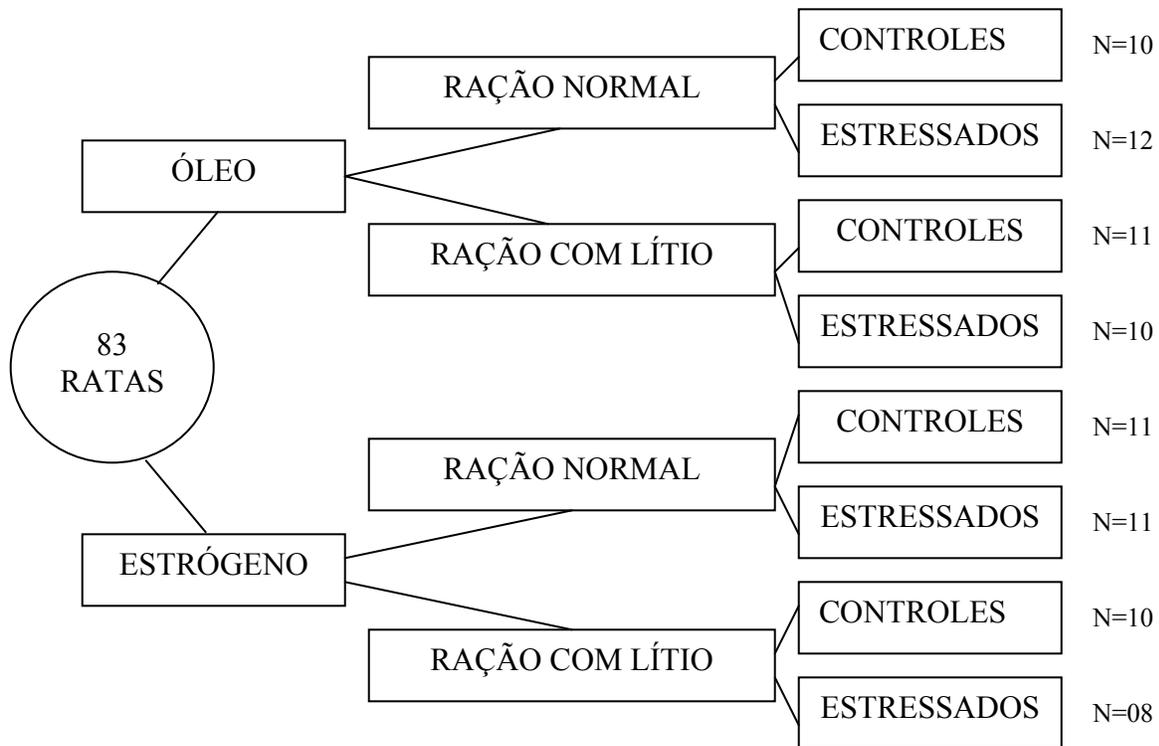


Fig. 3.1.: Distribuição dos grupos

3.4. IMPLANTES SUBCUTÂNEOS PARA REPOSIÇÃO DE ESTRÓGENO

Um tubo de silicone de 15mm (1,02 mm i.d. x 2.16 mm o.d.; Medicone®, Multiplast, Porto Alegre, RS, Brasil) era abastecido com 10 μ L de benzoato de β -estradiol a 5% em veículo de óleo de girassol e lacrado com silicone em ambas extremidades, conforme técnica descrita por Gamaro *et al.* (2003b). De 5 a 7 dias após a ovariectomia, os animais eram novamente anestesiados (usando o mesmo procedimento acima descrito) e, através de pequena incisão cervical dorsal, recebiam essa preparação via subcutânea, aproximadamente doze horas após sua preparação. Implantes-controle eram preparados com 10 μ L de óleo de girassol e administrados da mesma maneira. Após 35 dias os implantes eram renovados através de procedimento semelhante.

3.5. ADMINISTRAÇÃO DE LÍTIO

Em 1,5L de água diluía-se 3,81g de cloreto de lítio (LiCl), 25g de cloreto de sódio (NaCl) e 1,5 Kg de pó de ração. Isso resultava em uma massa que, homogeneizada, era disposta em uma forma revestida de papel alumínio, em que se abriam, com auxílio de uma espátula, sulcos perpendiculares formando pequenos blocos de ração que eram posteriormente destacados com facilidade. A forma era então levada à estufa, à temperatura de 65°C por cerca de 16 horas, após o que a preparação estava disponível para consumo. Esta ração contendo lítio foi administrada diariamente como único alimento disponível durante o período de estresse, aos grupos que recebiam lítio. Este procedimento já foi descrito na literatura e leva à obtenção de níveis séricos entre 0,4 a 1,2 mEq/L (Vasconcellos, 2002; Rocha, 1996). Adiciona-se NaCl à ração a fim de minimizar as perdas de sódio decorrentes da filtração glomerular do lítio (Rocha, 1996).

3.6. ESTRESSE

O estresse crônico é um paradigma naturalístico de um ambiente hostil bastante encontrado na literatura (Murua e Molina, 1992; Willner *et al.*, 1992; Konarska, 1990; Katz, 1982). Admite-se que seja um modelo de *anedonia*, um sintoma importante nos quadros depressivos, definido clinicamente como incapacidade de sentir prazer (Oliveira e Lima, 2000) e, a nível experimental, como interesse diminuído por estímulos ambientais ou redução nos efeitos de recompensa eliciados por estímulos ambientais (Gambarana *et al.*, 2001).

Foi utilizado neste trabalho o modelo de estresse crônico variado (ECV), conforme descrito em trabalhos anteriores deste laboratório (Manoli *et al.*, 2000; Gamaro *et al.*, 2003a; Gamaro *et al.*, 2003b; Vasconcellos *et al.*, 2003). Tal modelo consiste na aplicação diária, em diferentes horários e por períodos variáveis – na tentativa de minimizar a previsibilidade da aplicação do estressor – ao longo de 40 dias, de um dentre sete diferentes estressores, definido aleatoriamente: *imobilização*, *imobilização e frio*, *inclinação das caixas-moradia*, *barulho*, *luz piscante*, *nado forçado* e *isolamento*.

[1] Imobilização: realizada em cilindros plásticos de diâmetro regulável, que permitem movimentos respiratórios e movimentos mínimos das patas e pescoço. Duração máxima de 1,5 hora.

[2] Imobilização e frio: imobilização com exposição, por até 1h à temperatura de 4°C, para o que era utilizada a câmara fria do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

[3] Inclinação das caixas moradia: com duração máxima de 8 horas e mínima de 3 horas, era realizada utilizando-se um suporte que gera uma angulação de aproximadamente 30° entre o assoalho das caixas e o solo.

[4] Barulho: utilizava-se uma fonte de som agudo e intermitente, com pulsos na frequência de 0,5 Hz, aproximadamente, por um período de 10 minutos.

[5] Luz piscante: exposição à fonte de luz incandescente de 60W, piscando na frequência aproximada de 0,5 Hz, por períodos variáveis de até 6 horas.

[6] Nado forçado: realizado em aquário medindo 50 x 47 x 40 cm, com volume de água alcançando 30 cm da altura, a temperaturas de 24 ou 5°C;

[7] Isolamento: colocação dos animais em pequenas caixas individuais por períodos de até 3 dias.

O protocolo foi desenhado visando utilizar tanto estressores físicos – frio, nado forçado e inclinação – como outros não diretamente associados a desconforto físico – isolamento, barulho e luz piscante.

3.7. ESTUDO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Para avaliar os efeitos causados pelo estresse e pelos tratamentos propostos foram utilizadas as seguintes tarefas comportamentais: tarefa do campo aberto, labirinto em cruz elevado, tarefa de comportamento alimentar, teste de latência para a retirada da cauda e labirinto aquático de Morris. Durante o período em que se realizavam as tarefas comportamentais o estresse era mantido (com exceção das semanas destinadas à tarefa do labirinto aquático, ela própria um evento estressante) – mas as sessões diárias de estresse eram aplicadas sempre após a realização das tarefas comportamentais.

3.7.1. Tarefa do campo aberto (“*open-field*”)

Foi utilizada uma caixa de madeira retangular medindo 60 cm de extensão, 40 cm de largura e 50 cm de altura, com uma parede de vidro permitindo a visualização do animal. O piso desta caixa é dividido em 3 fileiras de 4 quadrados (12 quadrados ao todo, 2 quadrados centrais). Após higiene da caixa com álcool diluído a 30% o animal é colocado no primeiro quadrado (em um dos vértices do piso), com a face virada para o vértice e, durante 5 minutos, é permitido que explore livremente o restante do aparato. Observamos o comportamento do animal quanto aos seguintes parâmetros:

[1] *número de quadrados percorridos* – uma medida da atividade locomotora e atividade exploratória. Consideramos um cruzamento de um quadrado a outro quando o animal transpunha com suas duas patas traseiras o limite entre um e outro;

[2] *tempo gasto nos dois quadrados centrais* – uma medida de ansiedade, na medida em que, quanto mais ansioso está o animal, menos tempo permanece nestes quadrados centrais;

[3] *número de respostas de orientação (ou “rearings”)* – movimento de erguer-se sobre as patas traseiras e movimentar o tronco lateralmente. Trata-se também de um comportamento exploratório; e

[4] *número de bolos fecais eliminados* – também uma possível medida emocional.

3.7.2. Tarefa do labirinto em cruz elevado (“*elevated plus-maze*”)

Descrito originalmente por Pellow e colegas (1985), o labirinto em cruz elevado (LCE) é construído em um plano elevado, distante cerca de 1m do piso, na forma de uma cruz, sendo dois de seus braços cercados por paredes altas – braços fechados (BF) – e os outros dois braços destituídos de paredes – braços abertos (BA). Os animais são colocados no centro do labirinto (no cruzamento entre os braços), com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento é avaliado por um período de 5 minutos. Registrou-se o tempo total que o animal permanece em cada braço e o número total de entradas em cada braço. Neste paradigma, o número total de entradas pode ser compreendido como uma medida da atividade locomotora e exploratória e – o principal em relação ao LCE – postula-se que a preferência do animal pelo braço aberto (aferida tanto

pelo número total de entradas neste, tempo transcorrido neste e proporção de tempo neste em relação ao braço fechado) relaciona-se inversamente à ansiedade do animal (Hogg, 1996). Neste trabalho, foi considerado que o animal entrava em um dos braços quando se encontrava com as quatro patas sobre o braço em questão.

3.7.3. Tarefa de comportamento alimentar

Este é um procedimento desenhado pela equipe de nosso laboratório e descrito em publicação prévia (Gamaro *et al.*, 2003a). Os animais passavam por um período de cinco dias de habituação onde eram colocados por três minutos em caixas individuais contendo alimento palatável (10 *pellets* do cereal *Froot-loops*® – *Kellog's*). Nos cinco dias de treinamento e no sexto dia (teste) eram quantificados:

[1] tempo gasto para iniciar a exploração do aparato – consistindo no tempo gasto pelo animal para cruzar com as patas traseiras o limite de $\frac{1}{4}$ de extensão da caixa onde era realizado o teste.

[2] tempo gasto para iniciar o consumo de alimento palatável – considerado o tempo transcorrido até que o animal iniciasse movimentos mastigatórios, identificados pelo ruído característico.

[3] consumo de alimento palatável após três minutos – aferido a partir de um esquema padronizado pelo laboratório que contava o número de *pellets* restantes, atribuindo-lhes valor de 1 (um *pellet* inteiro), $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{8}$ conforme a quantidade consumida.

Um consumo reduzido de alimento palatável, bem como um maior tempo para iniciar o consumo podem ser considerados como expressando anedonia (Gamaro *et al.*, 2003a). O tempo para início de exploração do aparato pode ser considerado como uma medida de memória ou de atividade exploratória, quando se considera o teste.

3.7.4. Medida da latência para retirada da cauda (“tail-flick”)

É uma medida da nocicepção do animal. Consiste em um aparato que gera uma fonte luminosa de intensidade ajustável sobre a qual é colocada a cauda do animal. A luz incidindo, continuamente, sobre a cauda gera uma sensação térmica que, a partir de determinado momento, transforma-se em estímulo nódico, gerando uma deflexão reflexa da cauda. Quando acionada a fonte de luz, inicia-se simultaneamente a contagem de um cronômetro de precisão, o qual cessa a contagem exatamente no instante em que o animal retira a cauda.

Realizou-se o experimento em duas sessões: na primeira, o animal foi habituado ao aparelho, quando se realizou uma medida basal da latência para retirada da cauda. No dia seguinte, foi submetido a duas sessões de medida. Admitiu-se como “teto” (ou seja, tempo transcorrido após o que se interrompia o procedimento) para todas as sessões um máximo de 10 segundos. Os animais que alcançavam o teto tinham sua latência codificada como 10 segundos. Codificava-se na avaliação do resultado a média aritmética das duas aferições feitas no dia do teste. Se houvesse uma diferença superior a 2 segundos entre as duas medidas, era realizada uma terceira aferição e considerada a média aritmética das três medidas.

3.7.5. Tarefa do labirinto aquático de Morris (“Morris water-maze”)

Esta é uma tarefa consagrada em estudos experimentais de memória que leva o nome de seu criador (Morris, 1984; Brandeis *et al.*, 1989). Os animais são postos a nadar em um tanque preto circular medindo 180 cm de diâmetro por 60 cm de altura, preenchido com aproximadamente 30 cm de água, contendo uma plataforma circular submersa (com aproximadamente 10 cm de diâmetro, situada 1,5 cm abaixo da superfície). Esta plataforma não é visível ao animal, mas uma vez ele a encontrando – quer ao acaso, quer seguindo as “dicas” espaciais (ver a seguir) – ele ali permanece pois assim não despense esforço nadando e mantendo-se emerso. Externamente ao tanque, fixadas à parede da sala, existem algumas “dicas”: cartazes com cores contrastantes, visíveis ao animal, que facilitam sua orientação.

Na circunferência do tanque constam quatro pontos cardeais (norte – sul – leste – oeste), delimitando quatro quadrantes. Durante os treinos, os animais são mergulhados no tanque, na proximidade de cada um desses pontos, de onde nadam até encontrar a plataforma ou até atingirem o tempo limite (“teto”) de 60 segundos, após o que, se não a houverem encontrado, são gentilmente conduzidos pelo examinador até ela, sem que sejam retirados d’água. Após alcançarem a plataforma ficam ali por 10 segundos, quando geralmente realizam vários movimentos de orientação (“*rearings*”), que lhes permitem estabelecer uma relação entre a posição da plataforma e as dicas espaciais, e em seguida são secados e recolocados em suas caixas-moradia. Com o decorrer das sessões de treino, os animais tendem a localizar a plataforma submersa mais rapidamente, o que denota seu aprendizado.

Foram realizados dois tipos de medida utilizando esse mesmo aparato: [1] memória espacial de referência e [2] memória espacial de trabalho.

[1] Memória Espacial de Referência: nesta variação, os animais foram submetidos a cinco dias consecutivos de sessão treino, com quatro sessões de nado a cada dia, com duração de 60 segundos cada, partindo de diferentes pontos cardeais em ordem alternada e com um intervalo de aproximadamente 20 minutos entre cada sessão. No sexto dia (dia do teste) a plataforma foi retirada e os animais foram mergulhados na proximidade do ponto sul e mantidos no tanque por 60 segundos. Assim, *ao longo da semana* o animal aprendia onde estava a plataforma. Aferiram-se os seguintes parâmetros: [a] número de cruzamentos sobre o local exato da plataforma; [b] número de cruzamentos totais de um para outro quadrante; [c] tempo de permanência no quadrante em que estava a plataforma; [d] tempo gasto no quadrante oposto àquele em que estava a plataforma.

As principais informações fornecidas por esta tarefa diriam respeito ao número de cruzamentos no local exato da plataforma e ao tempo transcorrido no quadrante alvo. Tanto maiores seriam estes quanto mais íntegro se encontrar o processamento da memória espacial de referência.

[2] Memória Espacial de Trabalho: realizado no período de quatro dias, durante cada um dos quais se executam quatro sessões de nado no tanque. Em cada dia, a plataforma é colocada em um quadrante diferente, e o animal nada até encontrá-la ou até atingir o “teto” de 60 segundos, quando então é conduzido até ela nos moldes descritos. Aqui, expressando

de um modo grosseiro, postula-se que o animal aprende *ao longo do mesmo dia* a localização da plataforma. Analisa-se as médias das sessões 1, 2, 3 e 4 em cada dia, ou seja: compara-se a média de todas as sessões 1 (dos dias 1, 2, 3 e 4) com a média de todas as sessões 2 (dos dias 1, 2, 3 e 4) e assim sucessivamente.

3.8. ESTUDO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FÍSICOS

Realizaram-se as seguintes medidas:

- ◆ Concentrações de lítio plasmático e no sangue total;
- ◆ Hematócrito;
- ◆ Peso dos animais;
- ◆ Peso das glândulas adrenais.

As medidas bioquímicas foram realizadas, através do *Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, na *Unidade de Pesquisa Biomédica* e na *Unidade de Bioquímica do Hospital de Clínica de Porto Alegre*. A concentração de lítio eritrocitário foi calculada utilizando-se a fórmula

$$Li_{Er} = \frac{[Li_{Tot} - Li_{Plasm} \times (1 - Htc)]}{Htc}$$

onde: Li_{Er} = lítio eritrocitário; Li_{Tot} = lítio total; Li_{Plasm} = lítio plasmático; Htc = hematócrito.

O peso das glândulas adrenais se realizava após decapitação e dissecação dos animais através de balança de alta precisão e se justifica como uma medida da efetividade do estresse. Um esquema do desenho experimental do estudo está ilustrado na tabela 3.1.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como cada grupo era submetido a mais de uma intervenção, existindo três variáveis em exame (estresse, lítio e estrógeno) em cada um dos oito grupos, privilegiam-se os resultados

da ANOVA de 3 vias – o que diz respeito ao efeito *de cada uma das intervenções e às possíveis interações entre elas* – expressos na forma de médias \pm erro padrão. Diferenças entre os grupos observadas através da ANOVA de 1 via, com *Post-Hoc* utilizando-se o *Teste de Duncan*, são apresentadas diretamente nos gráficos. Para a análise dos resultados da tarefa memória de trabalho utilizou-se a ANOVA de medidas repetidas.

Semana	Procedimento
1 ^a	Ovarectomia e recuperação
2 ^a	Implantes de estrógeno e recuperação
3 ^a	Estresse / lítio
4 ^a	
5 ^a	
6 ^a	
7 ^a	Reimplante de estrógeno e recuperação
8 ^a	Estresse, lítio e tarefas comportamentais, na seqüência: LCE, tarefa do campo aberto e latência para retirada da cauda Tarefa do comportamento alimentar LA – tarefa memória de referência LA – tarefa memória de trabalho Sacrifício, aferição das litemias e peso das adrenais
9 ^a	
10 ^a	
11 ^a	
12 ^a	

Tabela 3.1.: desenho experimental.

4. RESULTADOS

4.1. TAREFA DO CAMPO ABERTO

Analisamos os seguintes parâmetros: número de cruzamentos, tempo de permanência nos quadrados centrais, número de respostas de orientação e de bolos fecais eliminados.

Observou-se um efeito do estresse em diminuir o tempo nos quadrados centrais (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=6,341$, $p=0,014$), um efeito do estrógeno em aumentar o número total de cruzamentos (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=4,003$, $p=0,049$) e um efeito do lítio em reduzir o número de respostas de orientação (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=6,647$, $p=0,012$). Além disso, observou-se uma interação entre estrógeno e estresse (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=4,245$, $p=0,043$) e entre estrógeno, lítio e estresse (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=5,560$, $p=0,021$) quanto ao número de cruzamentos e quanto à eliminação de bolos fecais (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=3,928$, $p=0,05$) (Figs. 4.1-4.7).

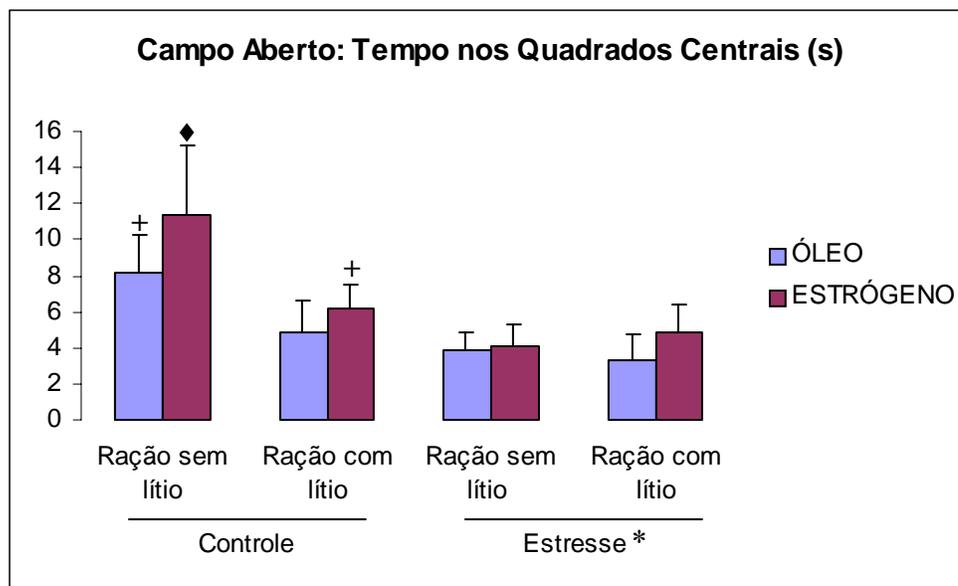


Fig. 4.1 – efeito do estresse sobre o tempo nos quadrados centrais (* $p=0,014$ em comparação com os grupos não estressados). *Duncan*: ◆ $p<0,05$ em comparação com todos outros grupos, exceto +.

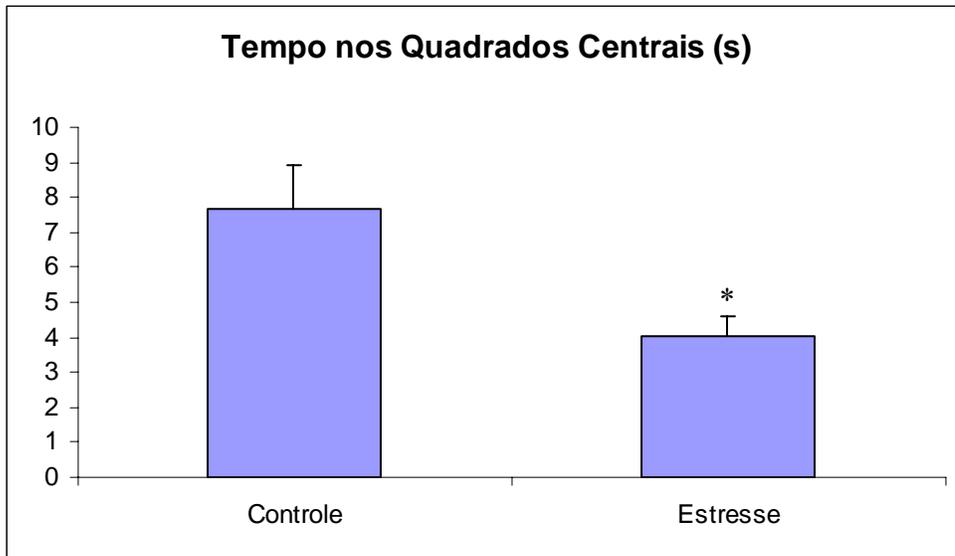


Fig. 4.2 – efeito do estresse sobre os quadrados centrais, identificado como significativo pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

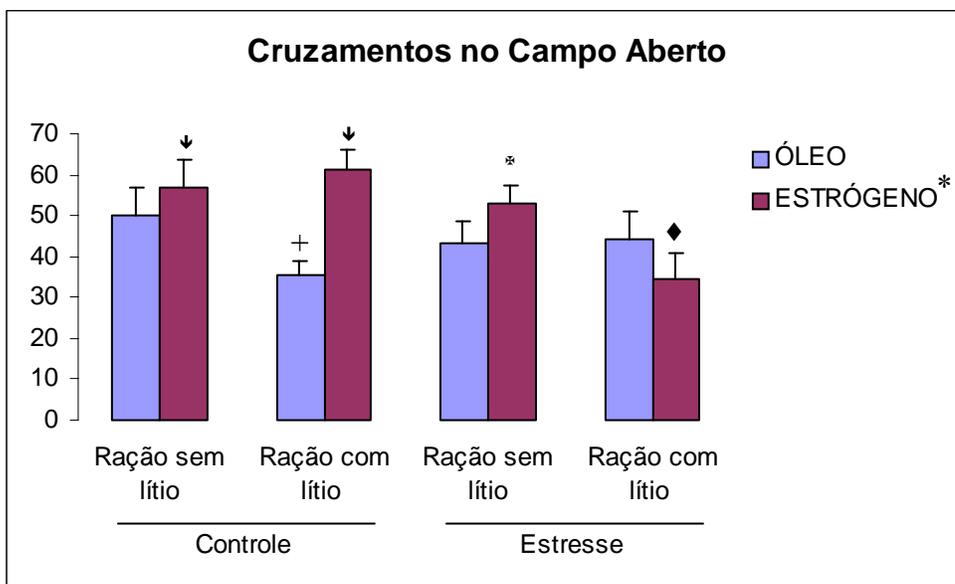


Fig. 4.3 – efeito do estrógeno sobre o número total de cruzamentos (* $p=0,049$ em comparação com os grupos recebendo óleo); interação entre estrógeno e estresse ($p=0,043$) e entre as três intervenções ($p=0,021$); *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com † e ‡; † $p<0,05$ em comparação com ‡.

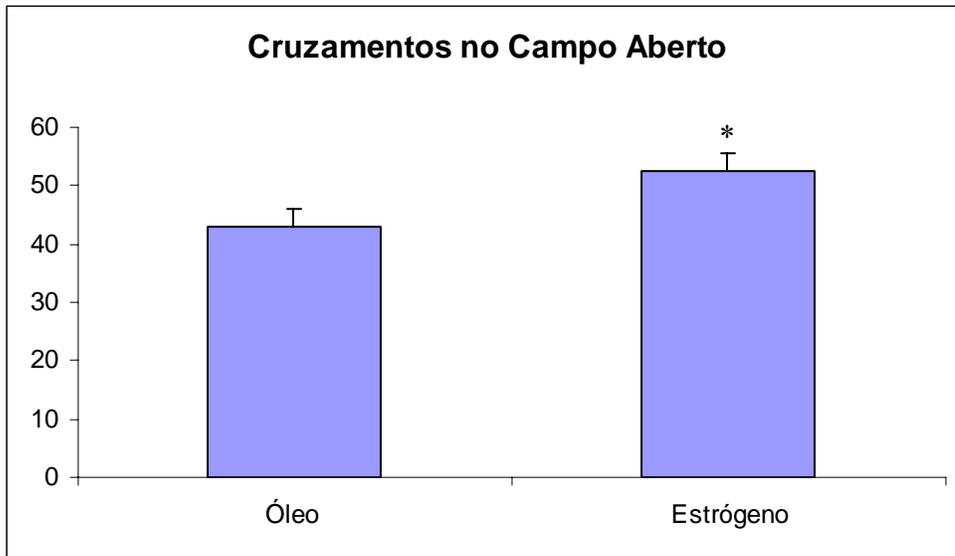


Fig. 4.4 – efeito do estrógeno sobre o número de cruzamentos no CA, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

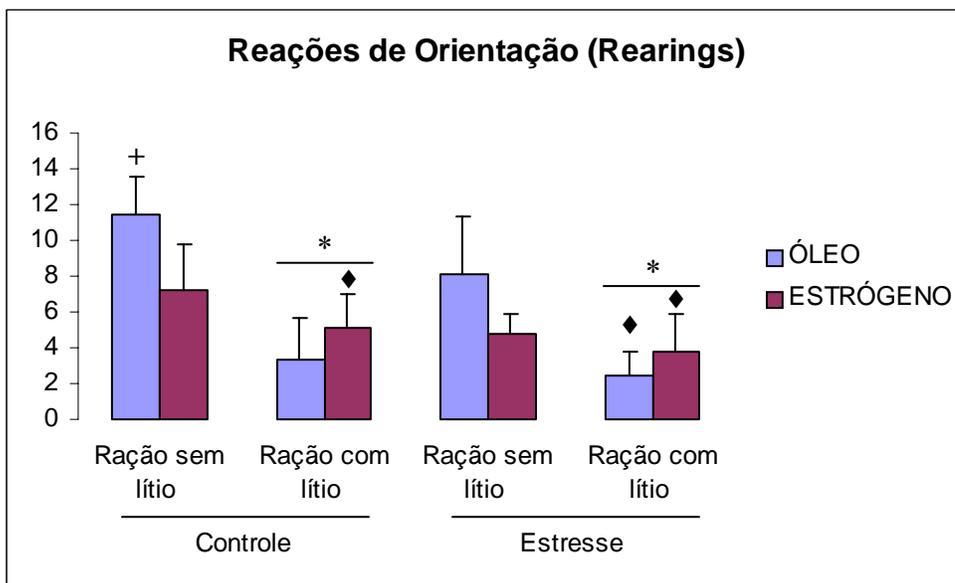


Fig. 4.5 – efeito do lítio sobre o número de respostas de orientação no CA (* $p=0,012$ em comparação com ausência de lítio). *Duncan*: \blacklozenge $p<0,05$ em comparação com +.

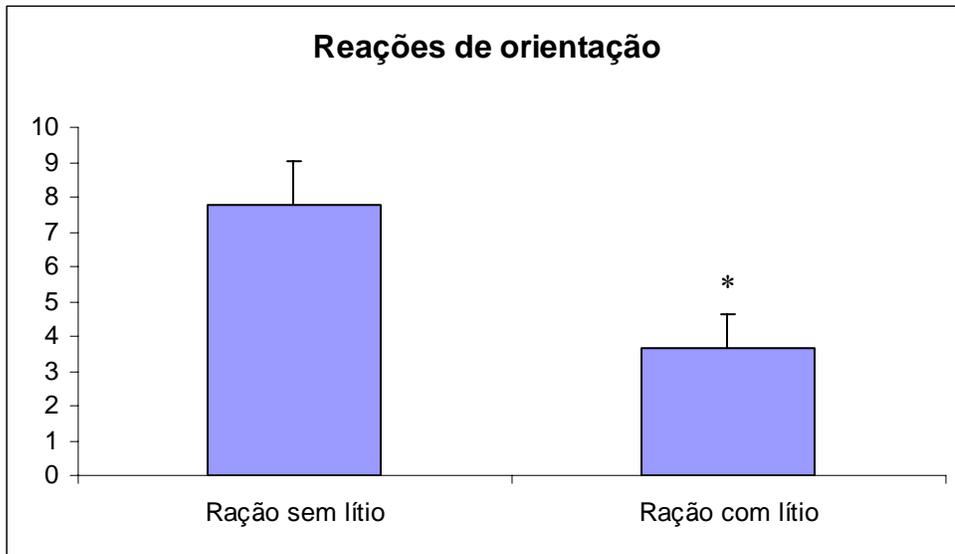


Fig. 4.6 – efeito do lítio sobre o número de respostas de orientação no CA, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

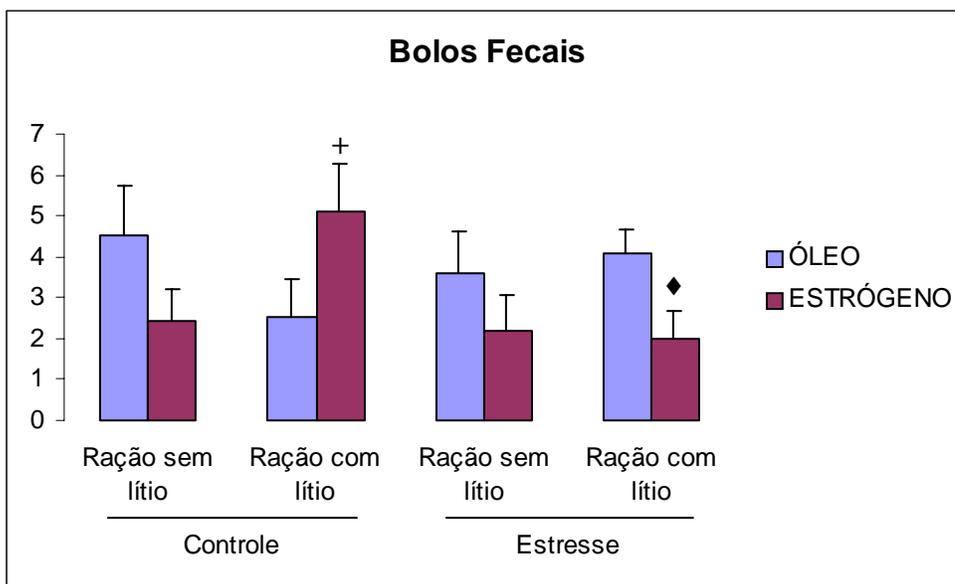


Fig. 4.7 – interação entre as três intervenções quanto à eliminação de bolos fecais no CA ($p=0,05$). Duncan: ♦ $p<0,05$ em comparação com +.

4.2. TAREFA DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Analisamos os seguintes parâmetros: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto (BA), tempo de permanência e número de entradas no braço fechado (BF), tempo relativo no BA (tempo no BA / [tempo no BA + tempo no BF]) e número total de entradas. O tempo foi expresso em segundos.

O estrógeno aumentou o tempo relativo no BA (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=4,426$, $p=0,039$) e aumentou o tempo no BA isoladamente (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=4,619$, $p=0,035$). Observou-se também efeito do estresse em diminuir o tempo no BA em relação ao tempo total (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=3,879$, $p=0,05$), uma tendência do estresse a diminuir o tempo no BA isoladamente (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=3,404$, $p=0,069$) e uma tendência a aumentar o tempo no BF isoladamente (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=3,002$, $p=0,087$). O lítio reduziu as entradas no braço fechado (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=6,649$, $p=0,012$) e reduziu o número total de entradas (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=8,371$, $p=0,014$). Além disso, houve interação entre as três intervenções quanto a entradas no BA (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=4,340$, $p=0,041$), quanto às entradas no BF (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=5,685$, $p=0,020$) e quanto ao número total de entradas (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=8,180$, $p=0,005$) (Figs. 4.8-4.17).

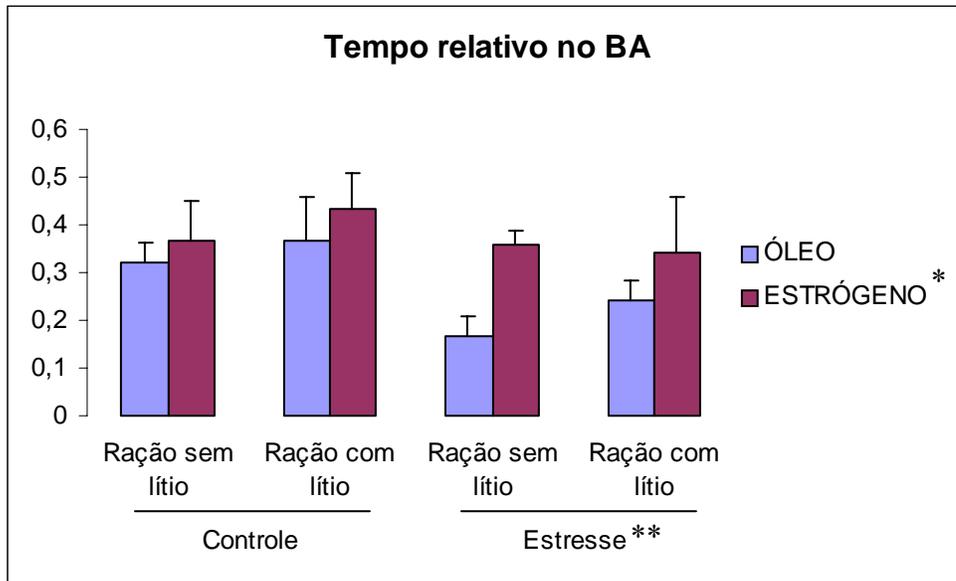


Fig. 4.8 – efeitos do estrógeno (* $p=0,039$ em comparação com óleo) e estresse (** $p=0,05$ em comparação com ausência de estresse) sobre o tempo no BA em relação ao total; não houve diferença quando os grupos foram comparados 1 a 1 na ANOVA de 1 via.

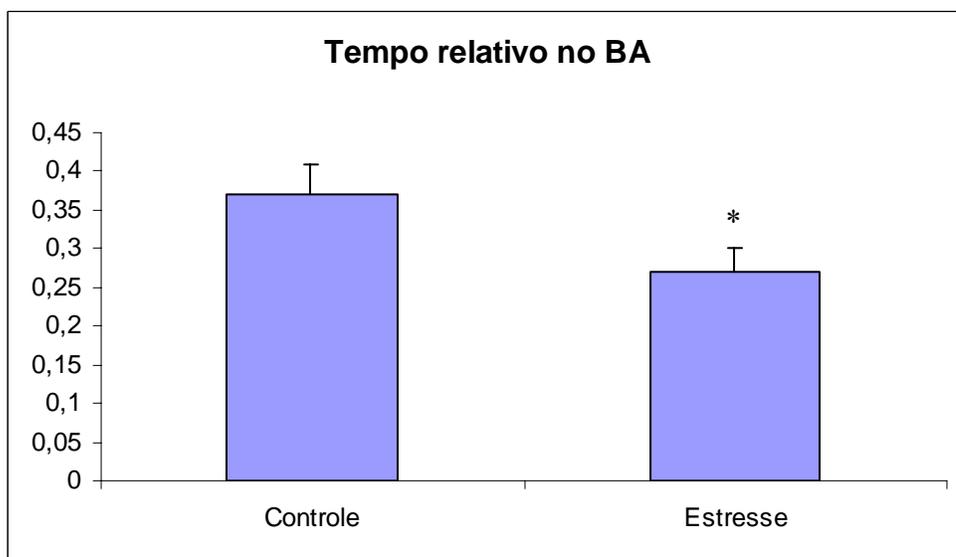


Fig. 4.9 – efeito do estresse sobre o tempo relativo no braço aberto do labirinto em cruz, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

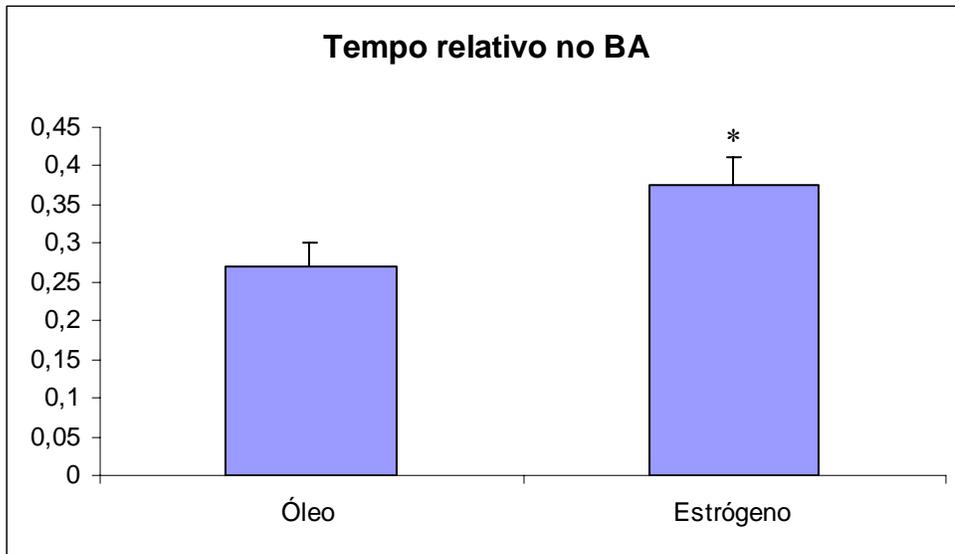


Fig. 4.10 – efeito do estrógeno sobre o tempo relativo no braço aberto do labirinto em cruz, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

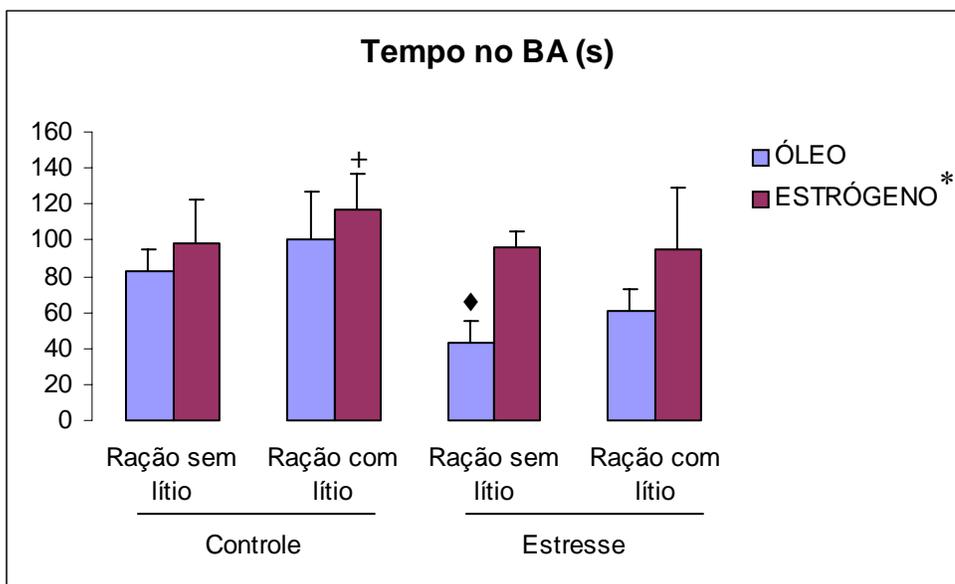


Fig. 4.11 – efeito do estrógeno sobre o tempo no braço aberto (* $p=0,035$ em comparação com óleo) e tendência não significativa ($p=0,069$) de o estresse influenciar o tempo no braço aberto. *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com +.

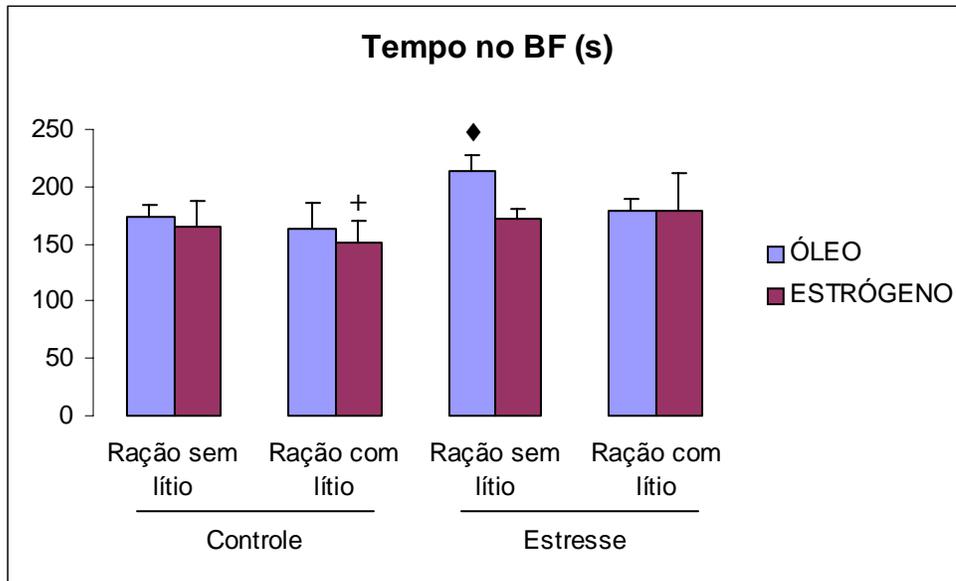


Fig. 4.12 – tendência não significativa ($p=0,087$) de o estresse influenciar o tempo no braço fechado. *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com +.

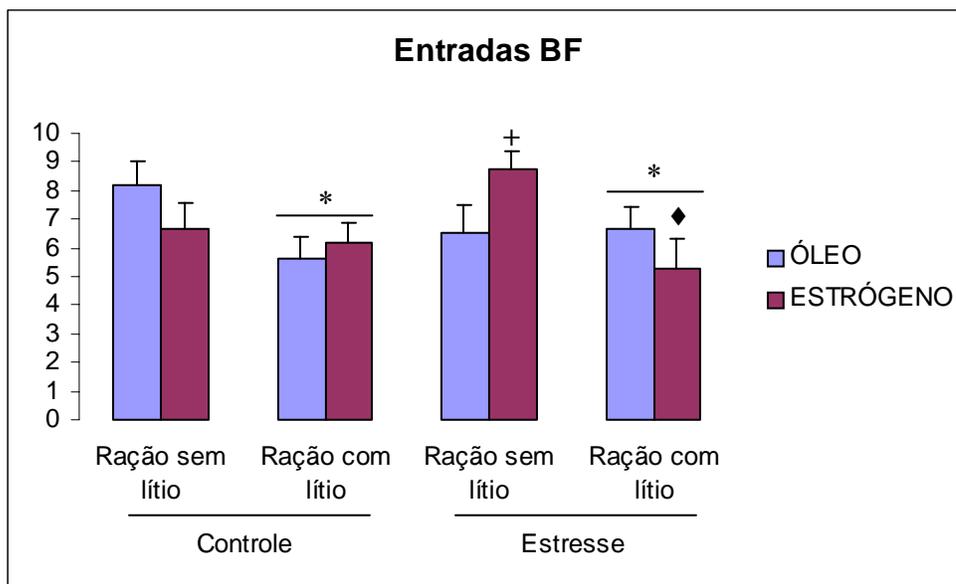


Fig. 4.13 – efeito do lítio sobre o número de entradas no braço fechado ($*p=0,012$ em comparação com ausência de lítio). Interação entre as três intervenções quanto ao número de entradas no braço fechado ($p=0,020$). *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com ausência de intervenções; + $p<0,05$ em comparação com o grupo recebendo somente lítio.

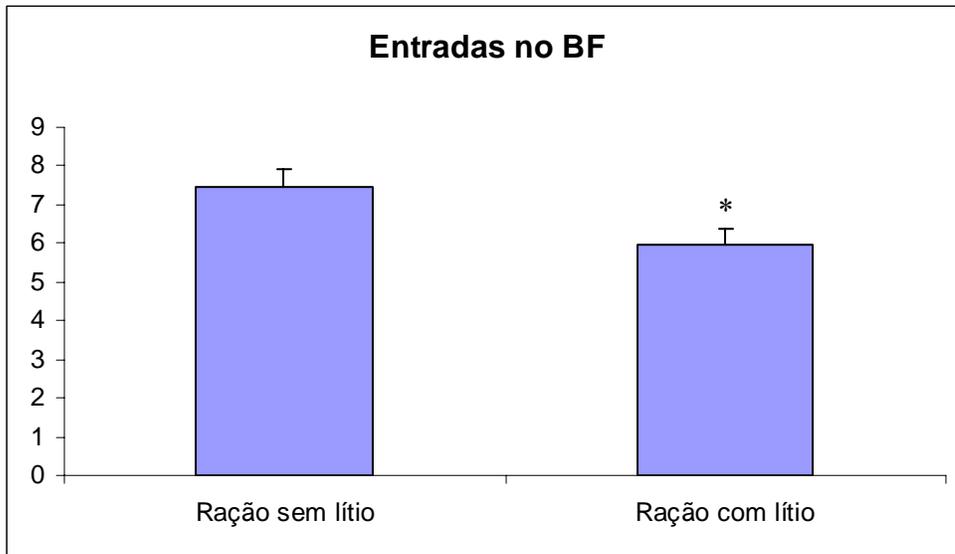


Fig. 4.14 – efeito do lítio sobre o número de entradas no braço fechado do labirinto em cruz, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

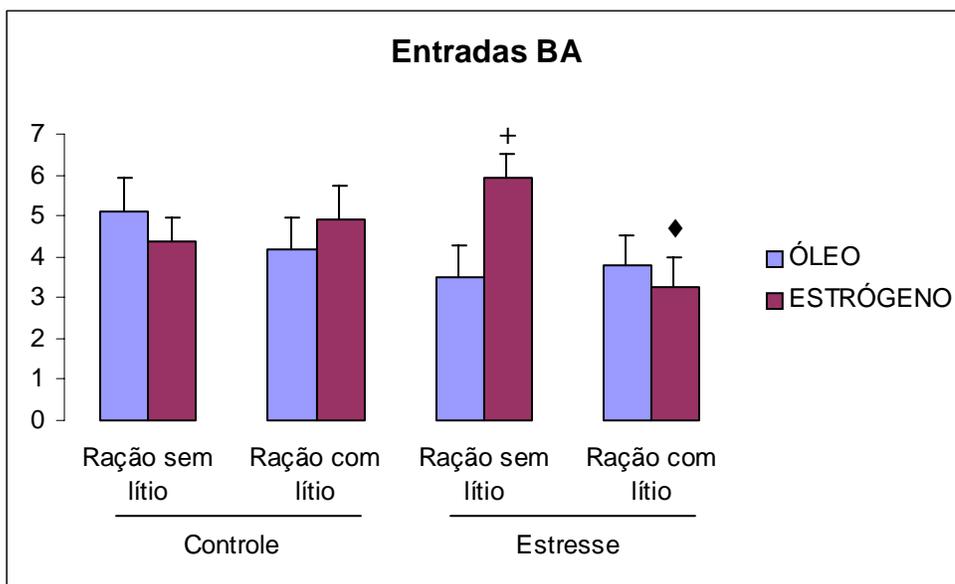


Fig 4.15 – interação entre as três intervenções quanto ao número de entradas no braço aberto ($p=0,041$). *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com +.

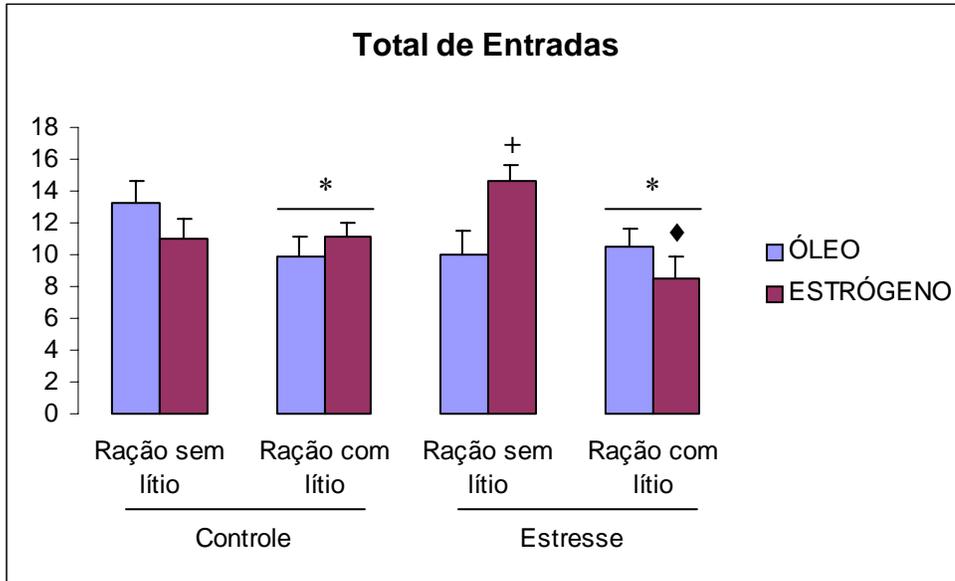


Fig 4.16 – efeito do lítio sobre o número total de entradas (* $p=0,014$ em comparação com ausência de lítio). Interação entre as três intervenções quanto ao número total de entradas ($p=0,005$). *Duncan*: ♦ $p<0,05$ em comparação com ausência de intervenções e com +; + $p<0,05$ em comparação com os grupos só lítio, só estresse e lítio/estresse.

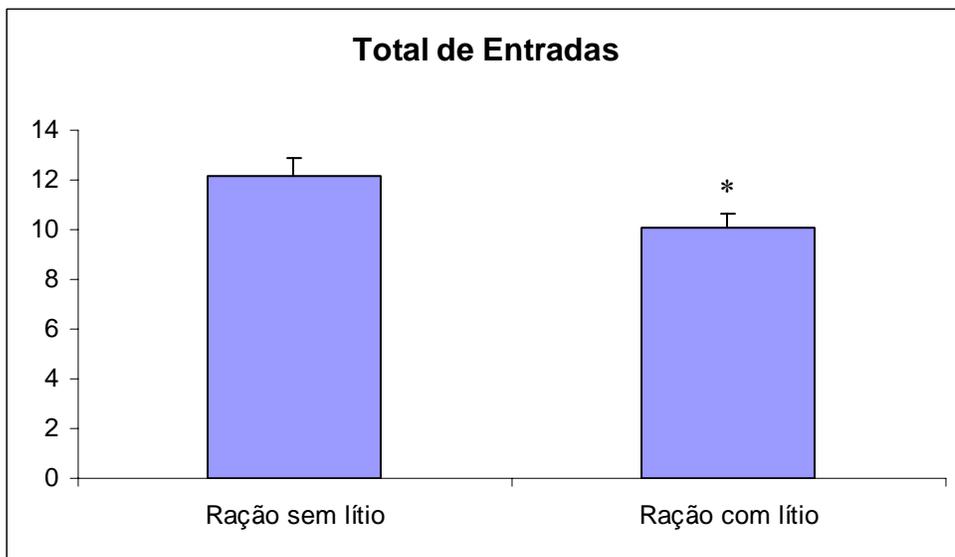


Fig. 4.17 – efeito do lítio sobre o número total de entradas nos braços do labirinto em cruz, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

4.3. TAREFA DE COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Observamos os seguintes parâmetros, no dia do teste e nos dias do treino: quantidade de alimento palatável consumido, latência para iniciar o consumo e latência para iniciar a exploração do aparato. Este último parâmetro consistia no tempo gasto pelo animal para cruzar com as patas traseiras o limite de $\frac{1}{4}$ de extensão da caixa onde foi realizado o experimento.

No dia do teste observamos efeito do lítio e do estrógeno aumentando a ingestão de alimento palatável, e interação entre os efeitos do lítio e do estrógeno (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$; $F(1,75)=80,935$, $p<0,001$ para o lítio; $F(1,75)=4,875$, $p=0,03$ para o estrógeno; $F(1,75)=9,336$, $p=0,003$ para a interação entre lítio e estrógeno) (Fig 4.18-4.21).

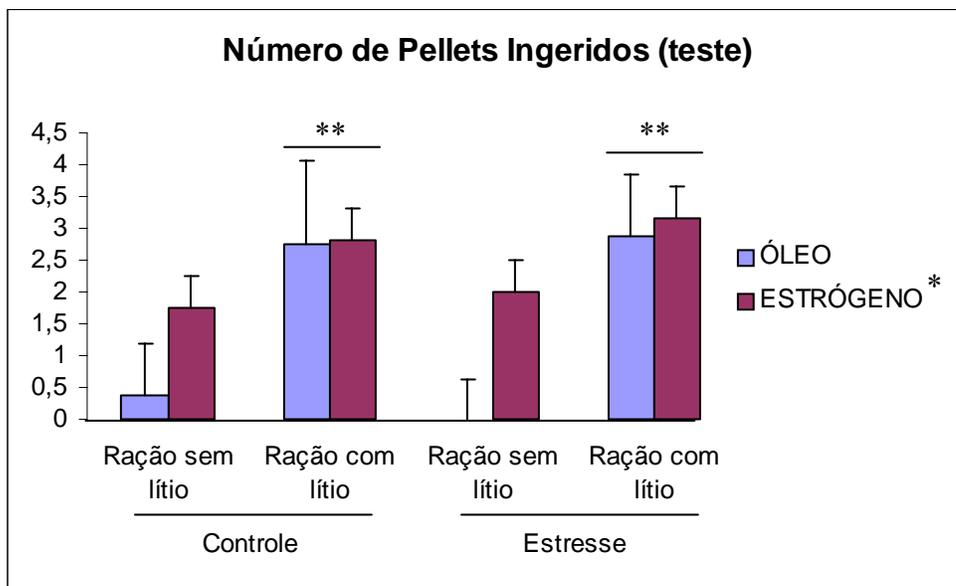


Fig 4.18 – efeito do lítio e do estrógeno sobre o consumo de alimento palatável (* $p=0,003$ em comparação com óleo; ** $p<0,001$ em comparação com ausência de lítio); interação entre efeitos do lítio e estrógeno ($p=0,003$).

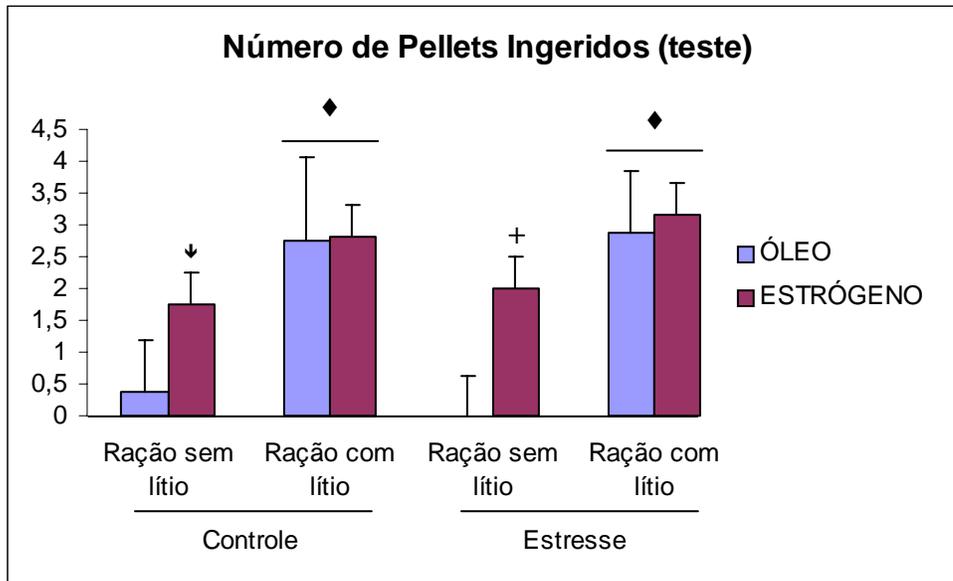


Fig 4.19 – mesmos dados da figura anterior, mostrando ANOVA de 1 via com Post-Hoc com *Teste de Duncan* comparando cada grupo individualmente: ♦ $p < 0,05$ em comparação com os grupos recebendo apenas estrógeno, apenas estresse e nenhuma intervenção; + $p < 0,05$ em comparação com o grupo somente submetido a estresse e com o grupo não recebendo nenhuma intervenção; ↓ $p < 0,05$ em comparação com o grupo somente submetido a estresse.

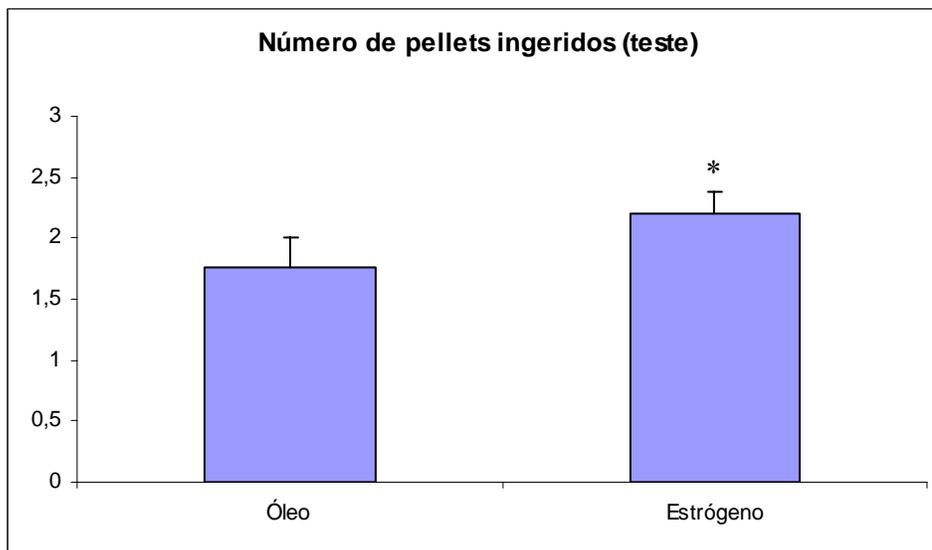


Fig. 4.20 – efeito do estrógeno sobre o consumo de alimento palatável no teste de comportamento alimentar, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

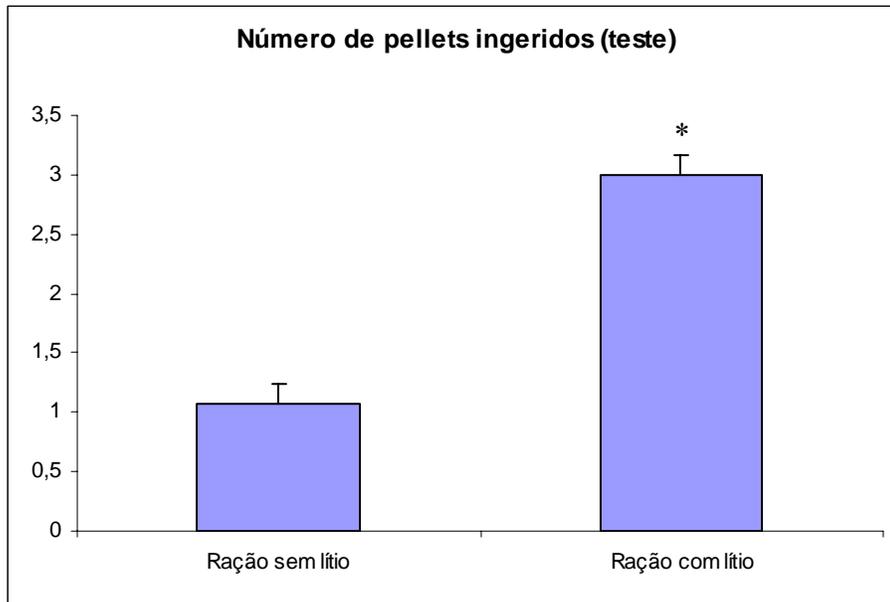


Fig. 4.21 – efeito do lítio sobre o consumo de alimento palatável no teste de comportamento alimentar, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

Enquanto o efeito do lítio de aumentar a ingestão se observa já no primeiro dia da tarefa e se mantém inalterado ao longo dos seis dias, o efeito do estrógeno parece variar, existindo uma tendência para aumento no primeiro dia, ausência de efeito no segundo, tendência para aumento no terceiro, efeito significativo no quarto, ausência de efeito no quinto e, como já foi falado, efeito significativo no sexto dia (tabela 4.1). Analisando-se os cinco dias de treino o efeito do lítio é significativo em acelerar a progressão de consumo de alimento doce (ANOVA de medidas repetidas, $n=8-12$, $F(1,75)=24,905$, $p<0,001$).

Dia	<i>p</i> (ANOVA de 3 VIAS)	
	Lítio	Estrógeno
1º	0,000	0,082
2º	0,000	NS
3º	0,000	0,084
4º	0,000	0,003
5º	0,000	NS
6º (teste)	0,000	0,03

Tabela 4.1 – efeito do lítio e estrógeno sobre o consumo de alimento palatável conforme o dia do treino. NS = não significativo.

Em relação à latência para início do consumo alimentar, observamos efeito marcante do lítio (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=16,898$, $p<0,001$) e do estrógeno (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=6,958$, $p=0,010$) reduzindo a latência no dia do teste (Fig 4.22-4.24).

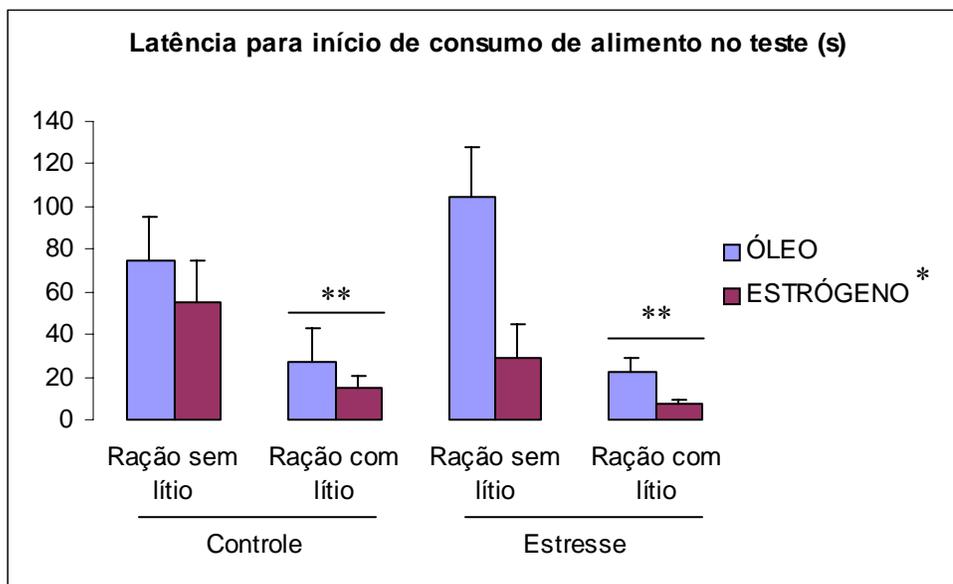


Fig 4.22 – efeito do lítio e do estrógeno sobre a latência para início do consumo alimentar no dia do teste (* $p=0,010$ em comparação com óleo; ** $p<0,001$ em comparação com ausência de lítio).

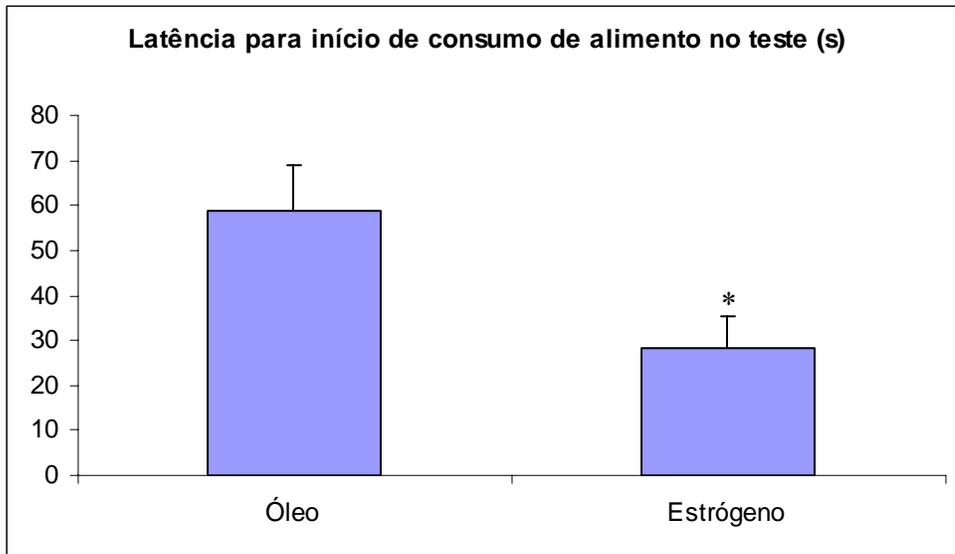


Fig 4.23 – efeito do estrógeno sobre a latência para início de consumo de alimento palatável, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

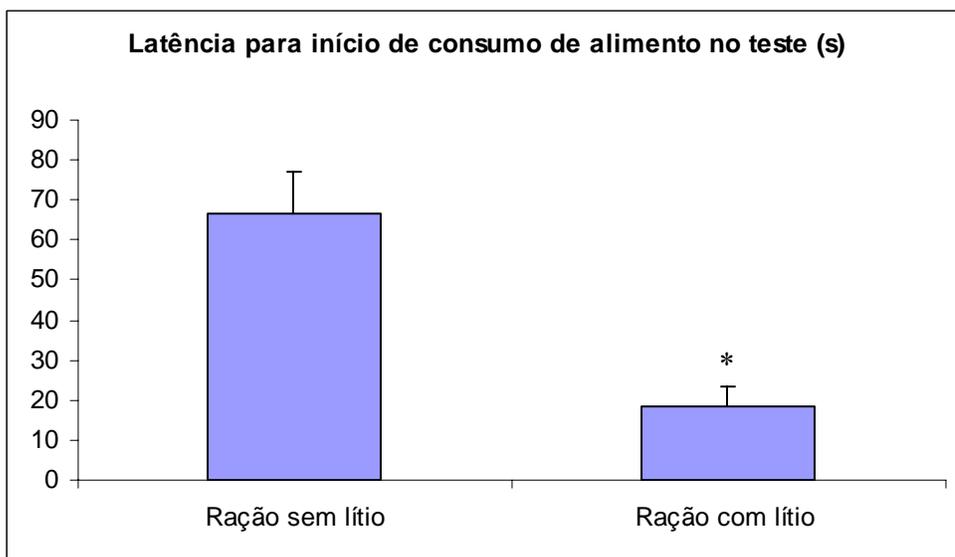


Fig. 4.24 – efeito do lítio sobre a latência para início de consumo de alimento palatável, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

Este efeito se manifesta para o lítio já no primeiro dia de treino, e se mantém nos restantes, com exceção do segundo dia. Em relação ao estrógeno se manifesta significativamente no segundo dia, como tendência no terceiro e do quarto em diante com significância (tabela 4.2). Ao longo dos cinco dias de treino, contudo, aplicando-se uma

ANOVA de medidas repetidas, não se observa efeito significativo de nenhuma das intervenções sobre a redução da latência para início de exploração do alimento (ANOVA de medidas repetidas, $n=8-12$, $F(1,75)=2,775$, $p=0,1$ para o lítio e $F(1,75)=1,752$, $p=0,19$ para o estrógeno).

Dia	<i>p</i> (ANOVA de 3 VIAS)	
	Lítio	Estrógeno
1°	0,041	NS
2°	NS	0,047
3°	0,001	0,066
4°	0,001	0,016
5°	0,000	0,004
6° (teste)	0,000	0,010

Tabela 4.2 – efeito do lítio e estrógeno sobre o tempo para início de consumo de alimento palatável conforme o dia do treino. NS = não significativo.

Em relação à latência para iniciar exploração da plataforma não houve diferença entre as intervenções no dia do teste pela ANOVA de três vias ($p>0,05$ para todos os casos) (Fig 4.25). Também não houve diferença no dia do teste quando cada grupo era comparado individualmente utilizando-se ANOVA de 1 via. Nos dias anteriores também não se observou diferença, utilizando-se os mesmos métodos estatísticos para análise (dados não mostrados).

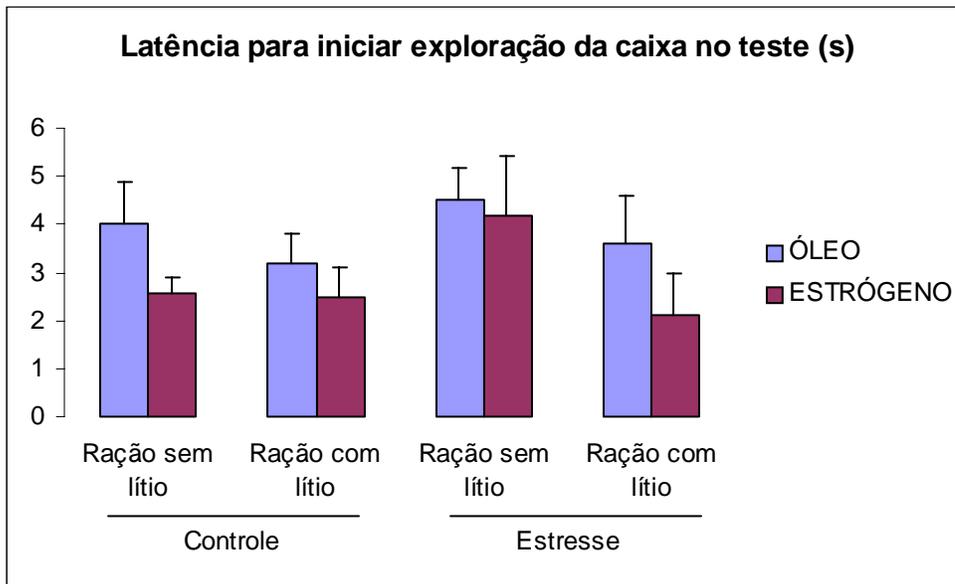


Fig 4.25 –latência para exploração da caixa no dia do teste ($p>0,05$ para todas intervenções).

4.4. MEDIDA DA LATÊNCIA PARA RETIRADA DA CAUDA

Não houve diferença entre os grupos quanto à latência para retirada da cauda tanto no dia do teste (Fig 4.26) como na habituação (dados não mostrados).

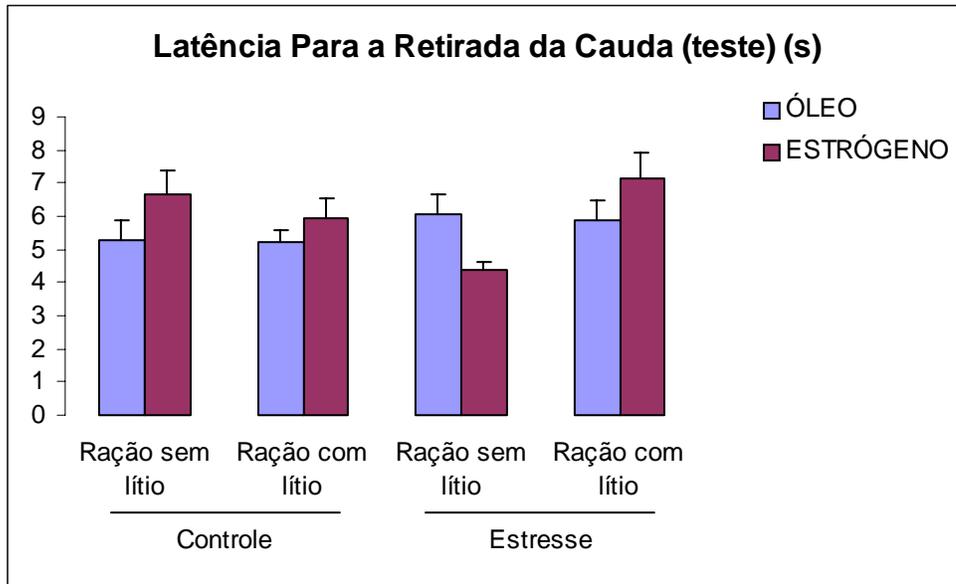


Fig 4.26 – latência para retirada da cauda no dia do teste ($p > 0,05$ para todas intervenções).

4.5. TAREFA DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

4.5.1. Tarefa memória de referência

A tarefa memória de referência foi realizada com 51 animais, divididos nos oito grupos (Fig.4.27).

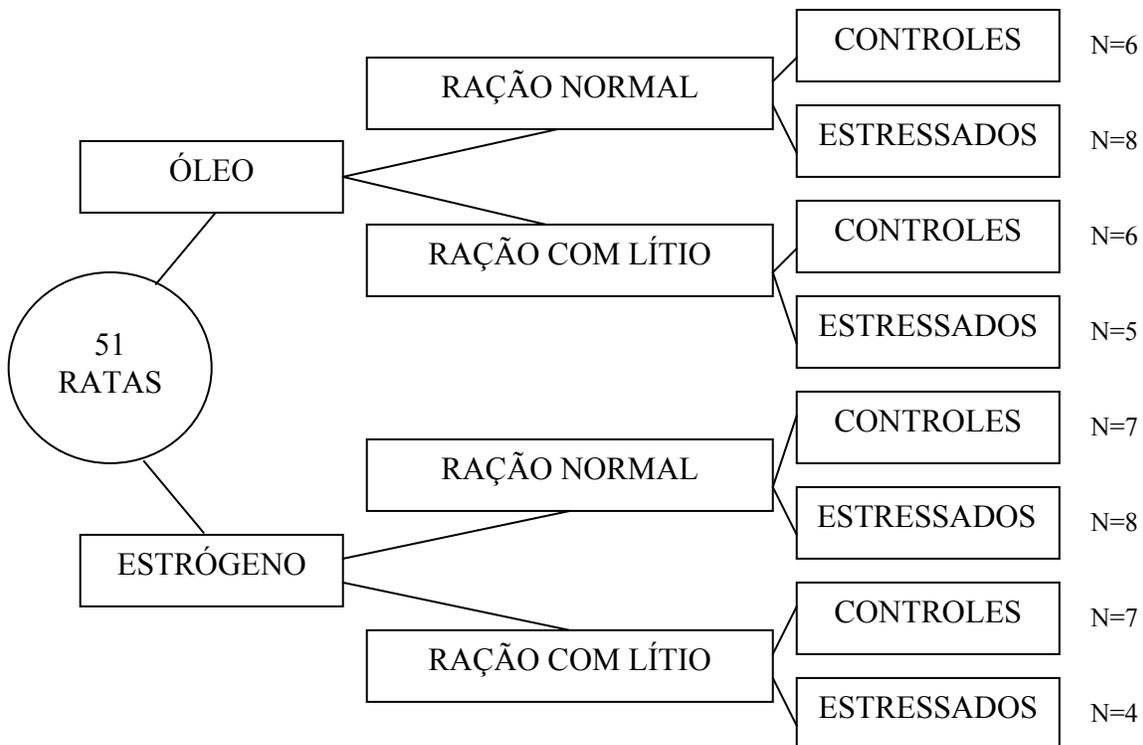


Fig. 4.27 – distribuição dos grupos para a tarefa memória de referência do labirinto aquático

Nesta tarefa, após cinco dias de treino, no dia do teste (sexto dia) avaliamos os seguintes parâmetros: tempo gasto no quadrante-alvo (quadrante em que a plataforma submersa se encontrava nos dias de treino), tempo gasto no quadrante-oposto ao quadrante-alvo, número de cruzamentos sobre o local exato em que se encontrava a plataforma nos dias de treino e número de cruzamentos entre os quadrantes.

Não houve diferenças quanto ao tempo gasto no quadrante-alvo, tempo gasto no quadrante oposto e número de cruzamentos sobre o local exato da plataforma (ANOVA de 3 vias, $n=4-8$, $p>0,05$ para todas intervenções) (Figs. 4.28-4.30).

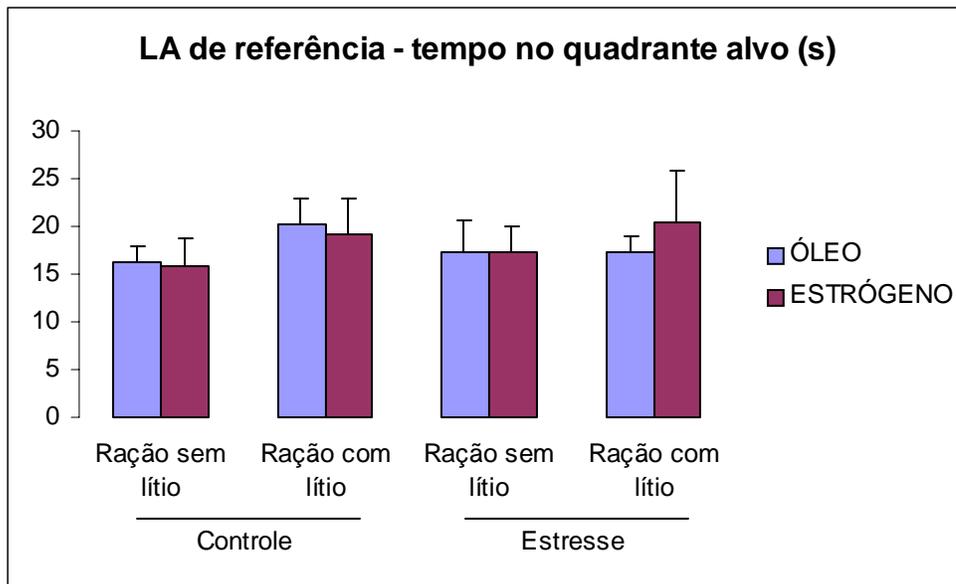


Fig. 4.28 – tempo transcorrido no quadrante alvo na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris ($p>0,05$ para todas intervenções).

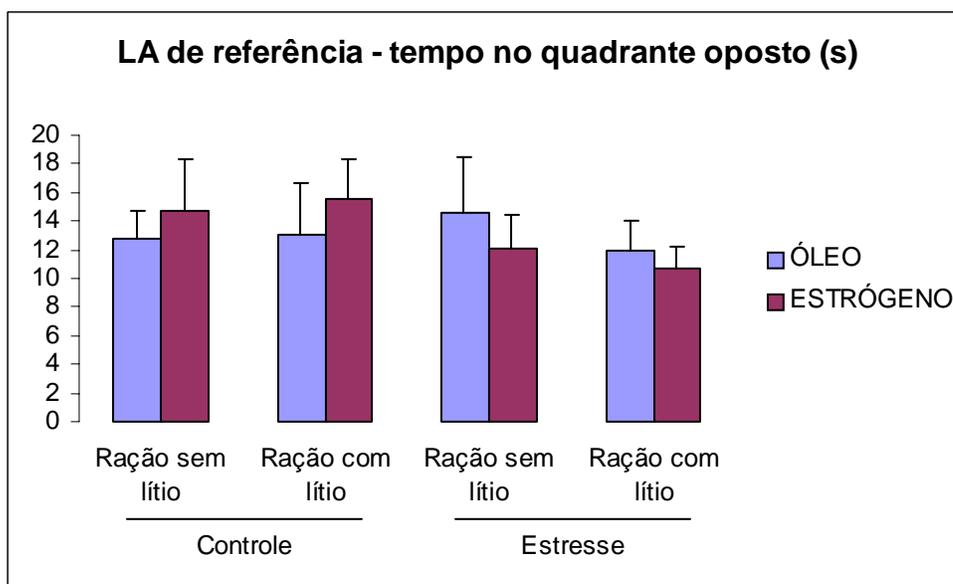


Fig. 4.29 – tempo transcorrido no quadrante oposto na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris ($p>0,05$ para todas intervenções).

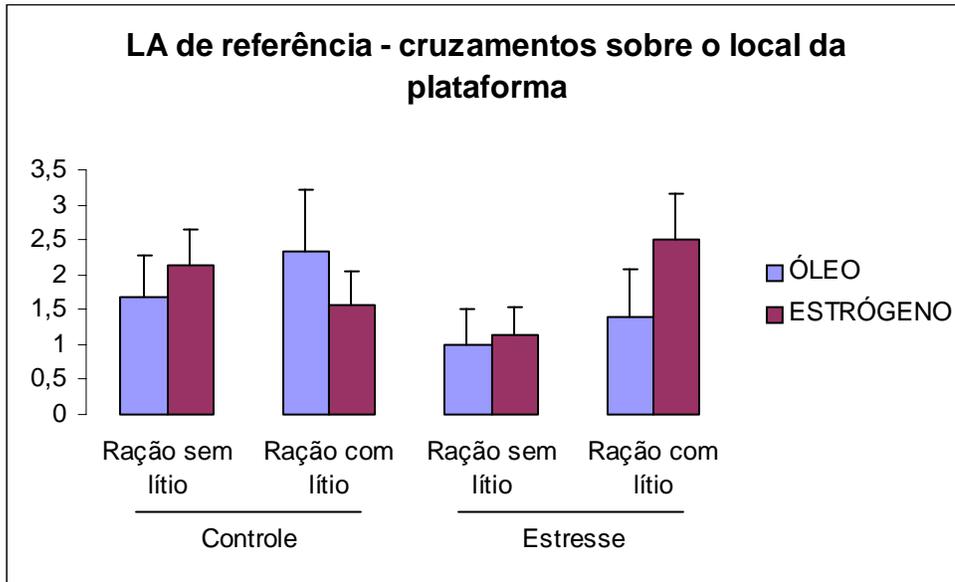


Fig. 4.30 – número de cruzamentos sobre o local onde se encontrava a plataforma nos dias de treino, na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris ($p > 0,05$ para todas intervenções).

Quanto ao número total de cruzamentos houve uma tendência (ANOVA de 3 vias, $n=4-8$, $F(1,51)=3,542$, $p=0,067$) do estrógeno em reduzir o número total de cruzamentos, em função do estresse também apresentar uma tendência a reduzir esse número, porém sem haver efeito aditivo (ANOVA de 3 vias, $n=4-8$, $F(1,51)=3,507$, $p=0,068$) (Fig 4.31).

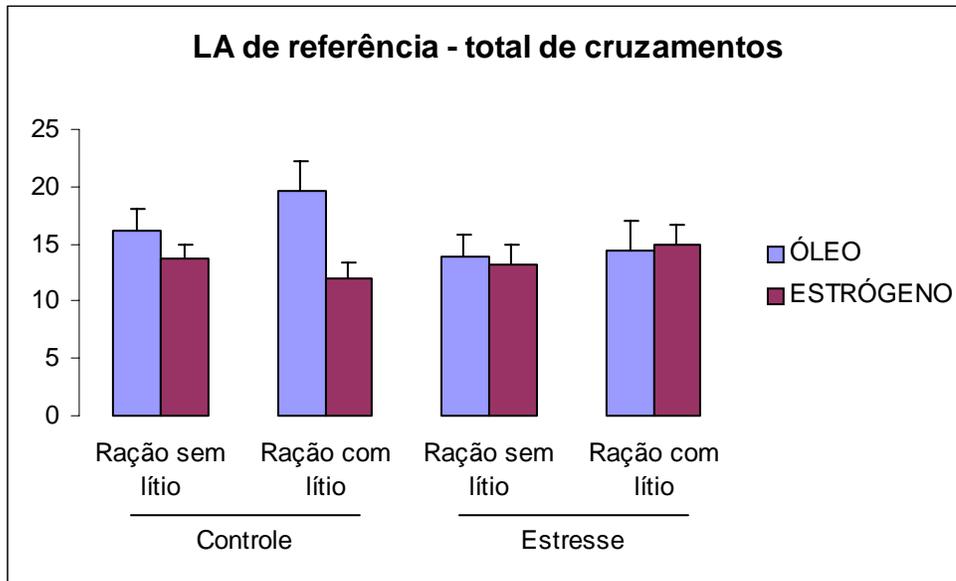


Fig. 4.31 – tendência do estrógeno influenciar o número total de cruzamentos, que não aparece na presença do estresse, na tarefa de memória de referência do labirinto aquático de Morris ($p=0,067$ para o efeito do estrógeno e $p=0,068$ para a interação entre estrógeno e estresse).

Ao longo dos cinco dias do treinamento todos os grupos ($n=8-12$) exibiram aprendizado na medida em que diminuíram o tempo gasto, ao final do dia, para encontrar a plataforma submersa (este tempo era calculado somando-se as medianas das quatro sessões de nado que ocorriam em cada dia do treino, cada sessão começando aleatoriamente de um ponto cardinal do tanque). Comparando os grupos entre si através da ANOVA de 1 via com teste de *Duncan*, observou-se que no primeiro dia três grupos (o grupo recebendo estresse, lítio e estrógeno; o grupo recebendo estresse e lítio; e o grupo recebendo somente estresse) apresentavam latências superiores ao grupo recebendo lítio e estrógeno. Ainda, neste primeiro dia de treino, o grupo recebendo estresse, lítio e estrógeno apresentava latência superior ao grupo sem nenhuma intervenção. Do segundo ao quarto dia de treino não houve diferença entre os grupos, mas no quinto dia observou-se, pelo mesmo método estatístico, que o grupo submetido a estresse como única intervenção apresentava latências maiores que o grupo controle e que o grupo recebendo somente lítio (Fig. 4.32).

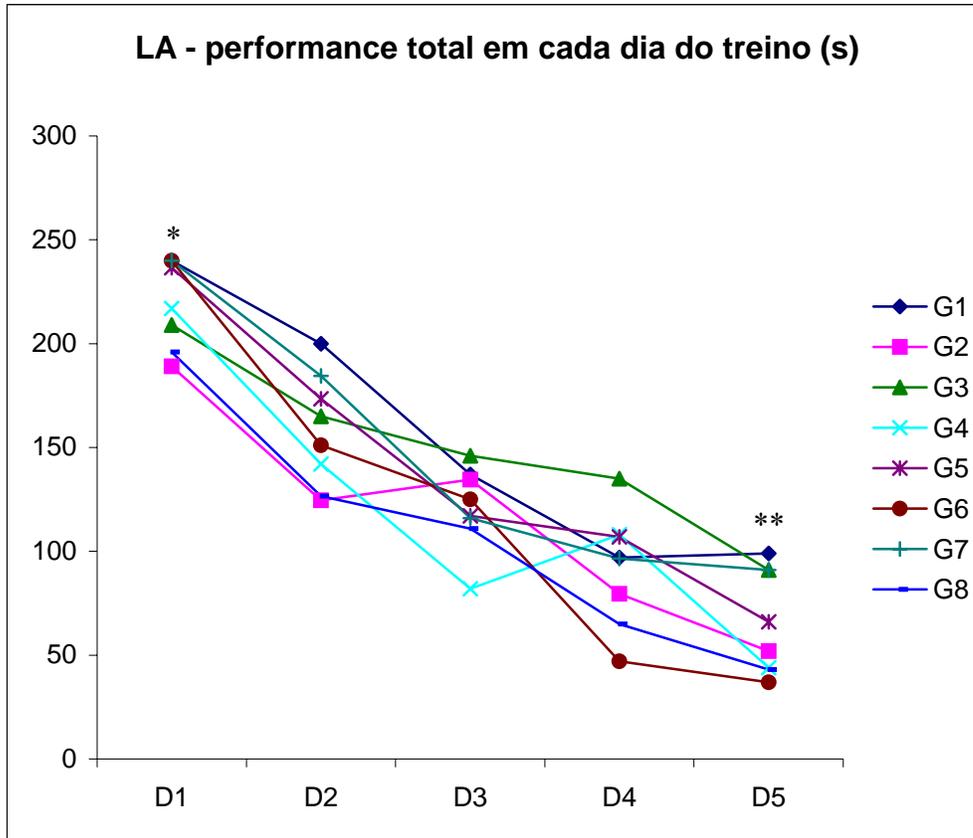


Fig. 4.32 – latência para encontrar a plataforma em cada dia do treino no labirinto aquático – tarefa memória de referência (os dados para cada dia são expressos na mediana da soma dos tempos dos quatro *trials* de cada dia). * G1, G5, G7 > G2; G1 > G8. ** G7 > G8, G7 > G6. G1 = lítio, estrógeno e estresse; G2 = lítio, estrógeno; G3 = estrógeno e estresse; G4 = estrógeno; G5 = lítio e estresse; G6 = lítio; G7 = estresse; G8 = controle.

4.5.2. Tarefa memória de trabalho

Quanto à segunda etapa da tarefa do labirinto aquático de Morris os dados dos 81 animais foram analisados. Observamos redução na latência para encontrar a plataforma em todos os grupos ao longo das quatro tentativas (ANOVA de medidas repetidas, $n=8-12$, $F(1,75)=134,8$, $p<0,001$), o que indica que todos os animais adquiriram memória para a localização da plataforma. Contudo não foi identificado efeito de nenhuma das intervenções em modificar a aquisição de memória (ANOVA de medidas repetidas, $n=8-12$, $p>0,05$ para todas intervenções) (Fig. 4.33).

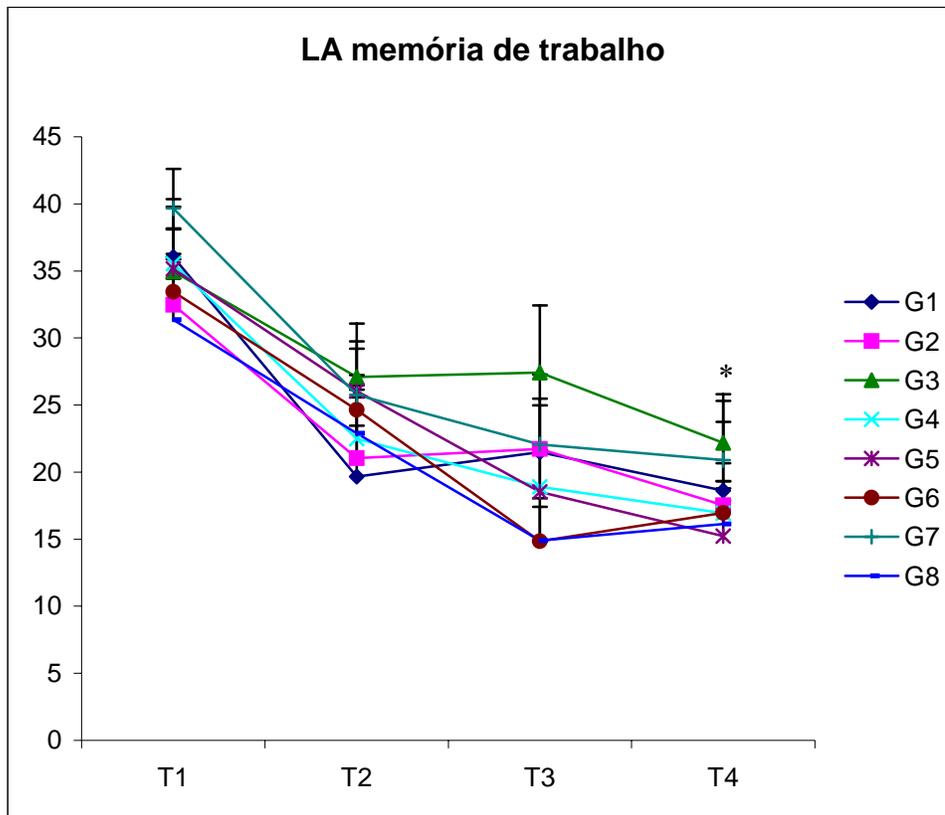


Fig. 4.33 – redução na latência para encontrar a plataforma em todos os grupos (* $p<0,001$) na tarefa memória de trabalho do labirinto aquático, sem influência significativa de nenhuma das intervenções sobre esta redução ($p>0,05$ para o estresse, lítio, e estrogênio). G1 = lítio, estrogênio e estresse; G2 = lítio, estrogênio; G3 = estrogênio e estresse; G4 = estrogênio; G5 = lítio e estresse; G6 = lítio; G7 = estresse; G8 = controle.

4.6. ESTUDO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FÍSICOS

4.6.1. Litemias

Todos os animais que receberam ração com lítio apresentaram concentração plasmática de lítio entre 0,25 e 1,3 mEq/L (média de 0,71 mEq/L), concentração eritrocitária entre 0,38 e 1,54 mEq/L (média de 0,99 mEq/L) e concentração no sangue total entre 0,3 e 1,35 mEq/L, com uma média de 0,82 mEq/L. Foi realizada dosagem de lítio de seis animais controles, encontrando-se em todos eles 0,1 e 0,15 mEq/L como concentrações de lítio plasmático e total, respectivamente (Tabela 4.3).

Lítio*	Média	Mínimo	Máximo	Erro Padrão
<i>Plasmático</i>	0,71	0,25	1,3	0,213
<i>Eritrocitário</i>	0,99	0,38	1,54	0,283
<i>Total</i>	0,82	0,3	1,35	0,229

*concentrações apresentadas em mEq/L.

Tabela 4.3 – litemias.

4.6.2. Adrenais

O peso médio das glândulas adrenais foi 0,0671g. Observamos um efeito do lítio em promover aumento do peso das glândulas adrenais (ANOVA de 3 vias, n=8-12, $F(1,75)=3,833$, $p=0,05$) e uma interação altamente significativa (ANOVA de 3 vias, n=8-12, $F(1,75)=10,734$, $p=0,002$) entre as intervenções estrógeno e estresse quanto a este parâmetro (Fig 4.34 e 4.35, Tabela 4.4).

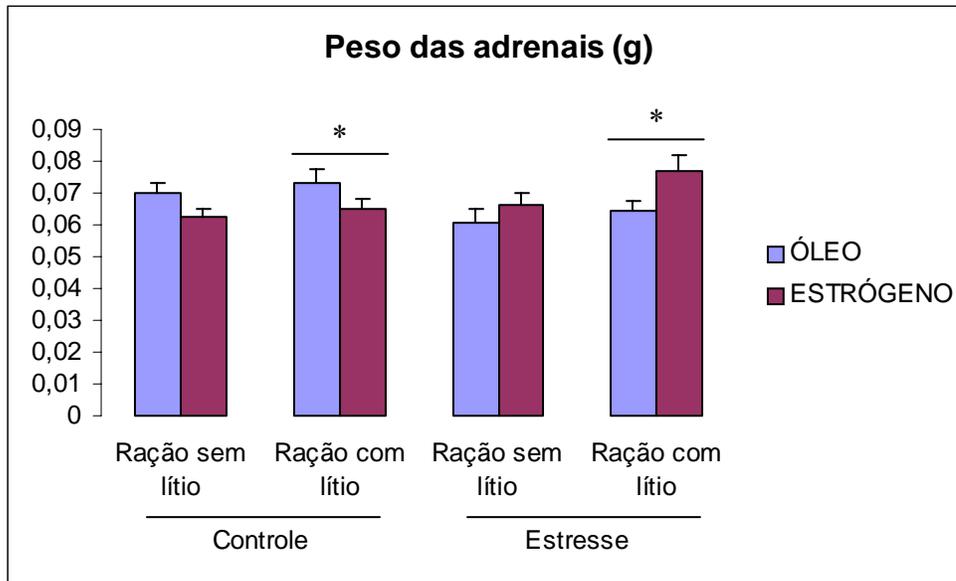


Fig 4.34 – efeito do lítio sobre o peso das adrenais (* $p=0,05$) e interação entre efeitos do estrógeno e estresse ($p=0,002$).

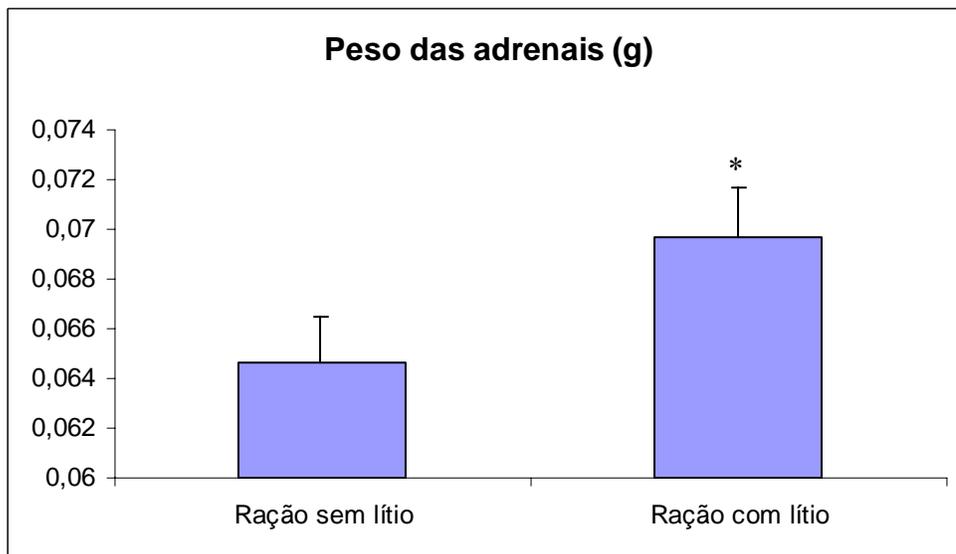


Fig 4.35 – efeito do lítio sobre o peso das adrenais, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

4.6.3. Pesos dos animais

Na primeira semana não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao peso. Na 6^a semana houve um efeito significativo do lítio em reduzir o peso dos animais (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=42,969$, $p<0,001$) (Fig. 4.36) e uma interação entre as intervenções estrógeno e estresse: na ausência de hormônio, o estresse tem efeito de reduzir o peso dos animais, enquanto na presença de hormônio o efeito do estresse é oposto (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=42,969$, $p=0,021$) (Fig. 4.37). Houve também uma tendência do estrógeno isoladamente reduzir o peso dos animais (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$, $F(1,75)=3,707$, $p=0,058$).

Na 12^a semana houve um efeito significativo de todas as intervenções (estrógeno, lítio e estresse) em reduzir o peso corporal (ANOVA de 3 vias, $n=8-12$; $F(1,75)=16,685$, $p<0,001$ para estrógeno; $F(1,75)=39,126$, $p<0,001$ para lítio; e $F(1,75)=4,092$, $p=0,047$ para estresse) (Fig.4.36-4.40).

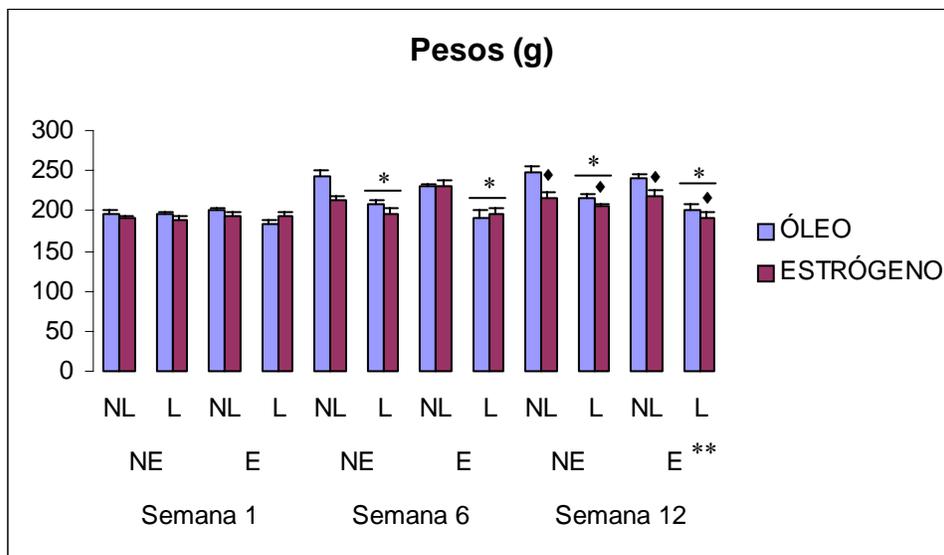


Fig. 4.36 – efeito das intervenções sobre o peso dos animais. NL = ausência de lítio; L = lítio; NE = ausência de estresse; E = estresse. * $p<0,001$ comparado com a ausência de lítio; ** $p=0,047$ comparado com ausência de estresse; e ♦ $p<0,001$ comparado com ausência de estrógeno.

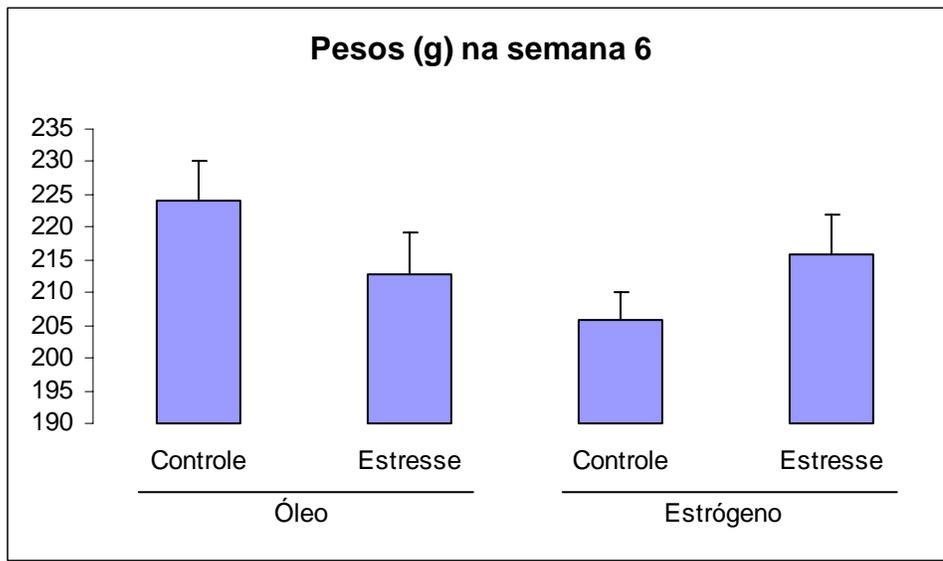


Fig. 4.37 – interação entre os efeitos de estresse e estrógeno sobre o peso dos animais na 6ª semana de tratamento.

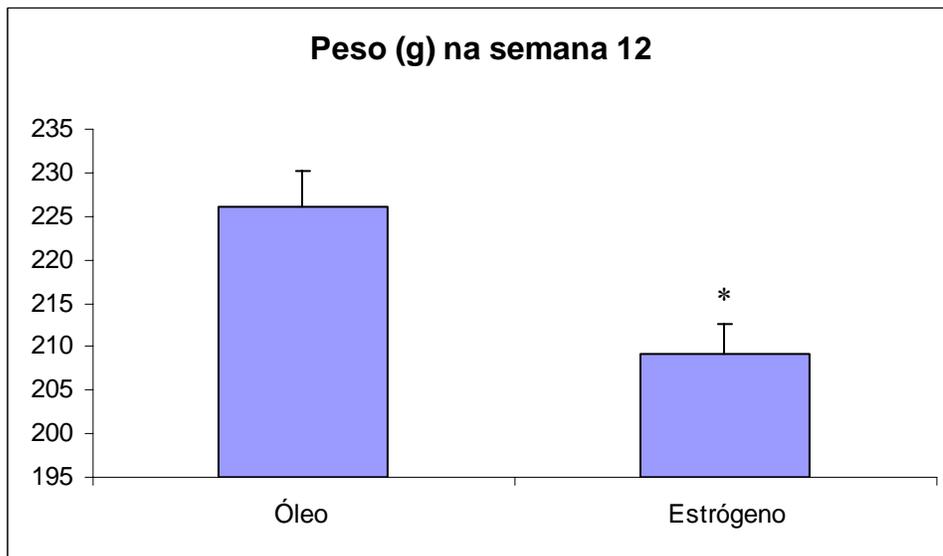


Fig. 4.38 – efeito do estrógeno sobre o peso corporal dos animais na 12ª semana de tratamento, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

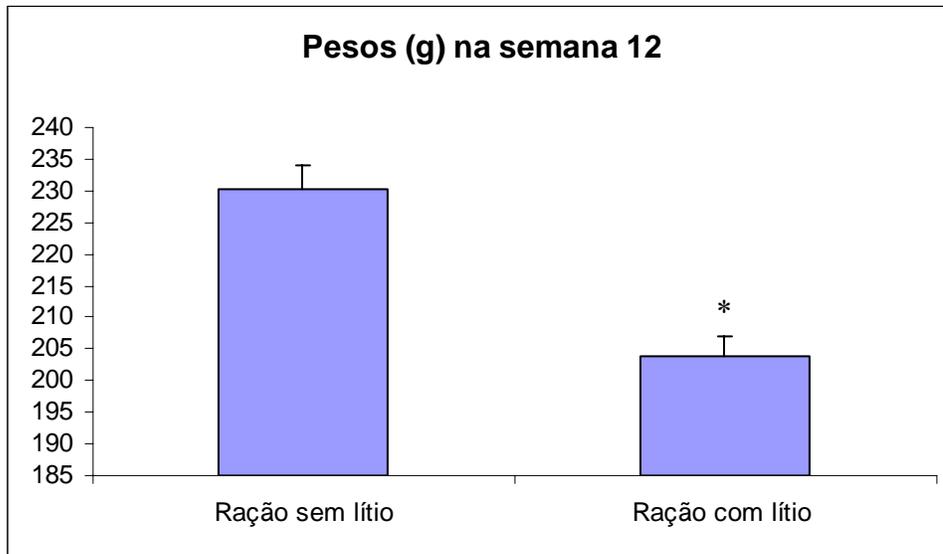


Fig. 4.39 – efeito do lítio sobre o peso corporal dos animais na 12^a semana de tratamento, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

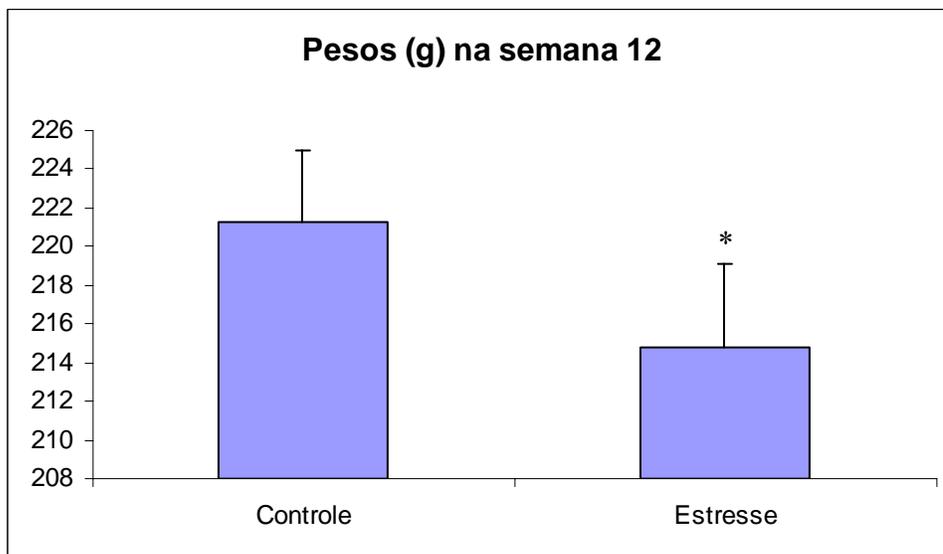


Fig. 4.40 – efeito do estresse sobre o peso corporal dos animais na 12^a semana de tratamento, detectado pela ANOVA de 3 vias e aqui mostrado isoladamente.

5. DISCUSSÃO

Sumarizando os principais resultados, observamos para cada intervenção estudada os seguintes efeitos:

◆ **Estresse:**

Redução do tempo nos quadrados centrais do campo aberto e do tempo relativo de permanência no braço aberto do LCE; redução do peso dos animais.

◆ **Estrógeno:**

Aumento do número de cruzamentos no campo aberto, do tempo de permanência absoluto e relativo no braço aberto do LCE e da ingestão de alimento palatável, com redução na latência para início de consumo deste alimento; redução do peso dos animais.

◆ **Lítio:**

Redução no número de respostas de orientação no campo aberto, no número de entradas no braço fechado e no número total de entradas no LCE; aumento na ingestão de alimento palatável com redução na latência para o início de consumo deste alimento e redução do peso dos animais.

Além disso, houve interação entre as intervenções quanto aos seguintes parâmetros:

◆ **Estresse e estrógeno:**

Cruzamentos do campo aberto: na ausência de estresse, estrógeno aumenta o número de cruzamentos; na presença de estresse esse efeito diminui;

Peso das adrenais: na ausência de estresse, estrógeno reduz o peso das adrenais; na presença de estresse, ocorre efeito inverso.

Peso dos animais: na ausência de estrógeno o estresse reduziu o peso na 6^a semana de tratamento, enquanto na sua presença, o efeito foi contrário.

◆Estrógeno e lítio:

Na tarefa de consumo alimentar, houve um efeito não somatório de ambas as intervenções em aumentar o consumo de alimento palatável.

◆Estrógeno, lítio e estresse:

Houve interação entre as três intervenções nos parâmetros: bolos fecais e cruzamentos no campo aberto, número de entradas no braço fechado, no braço aberto e número total de entradas no LCE.

As tarefas do campo aberto e do LCE são consagradas em pesquisa básica e permitem a avaliação do comportamento animal em diversos aspectos. O tempo gasto nos quadrados centrais do campo aberto geralmente é utilizado como uma medida de ansiedade, no sentido de que quanto mais tempo o animal permanecer nesta área, menos ansioso estará (Morgan e Pfaff, 2001). Por sua vez, a exploração dos braços abertos no LCE também parece estar inversamente relacionada à ansiedade (File, 1996; Padovan *et al.*, 2000). Acredita-se que a aversão dos ratos Wistar a espaços abertos, provavelmente, se deva à impossibilidade de orientação por suas vibrissas, importante órgão sensorial destes animais (Treit, 1985). Atualmente tem sido proposto que a tarefa do LCE seja enriquecida com a medida da avaliação de risco e que sejam individualizadas as medidas de cada minuto ao longo do experimento (Carobrez e Bertoglio, 2005; Mikics *et al.*, 2005), contudo, não tivemos a oportunidade de realizar essas medidas em nosso trabalho.

Observamos que o estresse reduziu o tempo nos quadrados centrais do campo aberto e o tempo relativo de permanência no BA do LCE; houve também tendência não significativa do estresse diminuir o tempo no BA isoladamente. Nossos resultados estão em concordância com o trabalho de D'Aquila e colegas onde foi demonstrado um efeito ansiogênico do estresse crônico variado (ECV) sobre a tarefa do LCE (D'Aquila *et al.*, 1994). Embora existam dados na literatura sugerindo um efeito “ansiolítico” do ECV (Rossler *et al.*, 2000), talvez isso se explique por diferenças no procedimento (teste de discriminação claro-escuro em oposição ao LCE) e no modelo de estresse utilizados. No trabalho de Rossler e

colaboradores, por exemplo, usou-se como estressores: elevação de temperatura das caixas moradias, agrupamento em pares, exposição à maravalha úmida – práticas que não compunham nosso modelo de estresse. Por outro lado, é bem documentado na literatura o efeito de diferentes formas de estresse modelando comportamento ansioso no LCE. Por exemplo, Calvo-Torrent e colegas demonstraram que a exposição de camundongos ao predador aumenta a eliminação de bolos fecais no LCE, se os animais forem testados imediatamente após a exposição; se forem testados três semanas após, observa-se diminuição do tempo gasto no BA e do número de avaliações de risco executadas pelos animais (Calvo-Torrent et al., 1999). Hata e colaboradores, usando como estressor alterações súbitas na temperatura ambiente demonstraram um efeito em reduzir o tempo gasto no BA do LCE, que foi revertido com administração de diazepam ou buspirona (Hata *et al.*, 2001), fármacos com propriedades ansiolíticas quando administrados em pacientes portadores de transtornos ansiosos.

Compreende-se a ansiedade como uma resposta fisiológica do organismo a um perigo iminente (real ou não). Nesse sentido, a cascata de ativação endócrina observada em situações de estresse pode levar a alterações bioquímicas e humorais que resultam na sensação subjetiva de ansiedade. A sabida conexão entre determinadas vivências de estresse e alguns transtornos de ansiedade, como transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico (TP) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), pode, ao menos em parte, ser explicada através de anormalidades na regulação destes processos.

Classicamente, drogas conhecidas por reduzir a ansiedade, como benzodiazepínicos, aumentam a permanência nos braços abertos do LCE (Silva e Frussa-Filho, 2000). Por outro lado, embora benzodiazepínicos e agonistas 5HT_{1A} sejam eficazes em evocar comportamento ansiolítico no campo aberto (aumento do tempo na área central), inibidores seletivos da recaptação da serotonina e o benzodiazepínico de alta potência alprazolam – ambas drogas utilizadas na clínica para manejo de transtornos ansiosos como TAG e TP – não demonstram esse efeito (Prut e Belzung, 2003). Isso levou à proposta de que o campo aberto é um paradigma útil na modelagem de ansiedade em resposta a situação de novidade, mas não da ansiedade presente em processos mórbidos.

Neste trabalho observamos um efeito ansiolítico do estrógeno no LCE, mas não na tarefa do campo aberto, o que está em concordância com dados da literatura e sugere um efeito

específico sobre a ansiedade patológica. Frye e Walf demonstraram, por exemplo, que a administração intra-amígdala de estrógeno isolado ou em associação com progesterona, bem como a administração subcutânea da associação estrógeno e progesterona aumenta o tempo nos BA do LCE e o número de entradas na área central do campo aberto em comparação com veículo (Frye e Walf, 2004). Tais achados são consoantes com resultados de estudos clínicos, em que a terapia de reposição hormonal com estrogênios resultou em efeitos benéficos sobre sintomas de ansiedade e depressão do climatério (Yazici *et al.*, 2003; De Leo *et. al.*, 2001).

Embora existam relatos de um efeito ansiogênico destes hormônios, variável em intensidade conforme a raça do animal em estudo (ver, por exemplo, Morgan e Pfaff, 2002), predomina na literatura informação no sentido oposto, ou seja, de um efeito benéfico dos estrógenos sobre a ansiedade.

O mecanismo bioquímico subjacente a isto é tema de controvérsia. Sabe-se há longo tempo que os estrógenos atuam em receptores nucleares (ER α e ER β) modulando a expressão gênica e a síntese de proteínas (Sak e Everaus, 2004). Dentre estes receptores, o subtipo ER β tem sido associado à ansiólise. Por exemplo, camundongos manipulados geneticamente para não expressarem estes receptores, ao serem ooforectomizados e tratados com reposição de estrógeno, não exibiram comportamento distinto dos controles (animais expressando os receptores ER β) sem reposição hormonal na tarefa do LCE (Imwalle *et. al.*, 2005). Contudo, recentemente, vêm sendo demonstradas ações dos hormônios estrógenos que: [1] não são rápidas; [2] não são sensíveis a inibidores da transcrição e tradução gênicas; e [3] tampouco são sensíveis a antagonistas dos receptores nucleares ER α e ER β – o que sugere a presença de receptores a nível de membrana (Sak e Everaus, 2004). A estimulação destes sítios não-genômicos pode influenciar cascatas de transdução de sinal como as via do IP₃-DAG, do AMPc e da MAPK (Revelli *et. al.*, 1998). É possível que tais vias também estejam envolvidas no efeito putativo destes hormônios sobre a regulação da ansiedade (Abraham *et. al.*, 2004; McEwen e Alves 1999). Além disso, é possível que o efeito ansiolítico dos estrógenos se dê de forma indireta, mediante produção de substâncias com propriedades ansiolíticas, como alopregnanolona, por exemplo (Plucino *et. al.*, 2005).

Em trabalhos anteriores deste grupo observou-se, no LCE, um efeito ansiolítico dos sais de lítio. Ratos tratados com esse sal permaneciam mais tempo nos braços abertos do labirinto

e exibiam um aumento no número de entradas nos BAs (Vasconcellos, 2002). No trabalho presente não encontramos efeito do lítio sobre nenhum destes parâmetros. Embora seja possível argumentar que o efeito do lítio em reduzir o número de entradas nos braços fechados seja uma expressão de alívio da ansiedade – ainda que menos substancial que um efeito nos BA – em vista dos demais resultados, entre eles o da diminuição, eliciada pelo lítio, no número total de entradas no labirinto em cruz e no número de respostas de orientação na tarefa do campo aberto, parece-nos que o efeito predominante deste sal se dá no sentido de modular atividade exploratória, conforme discutido a seguir. Além disso, uma diferença importante entre nosso trabalho e o de Vasconcellos foi que neste utilizamos fêmeas e naquele foram utilizados ratos machos. Embora não se tenha observado interações entre estrógeno e lítio nos parâmetros aferidos no LCE, é possível que particularidades da fisiologia e bioquímica do organismo conforme o sexo expliquem essa diferença de resultados.

Como na tarefa do campo aberto o número de cruzamentos é a medida mais utilizada na avaliação da atividade locomotora, e como não houve alteração neste parâmetro específico com a administração de lítio, podemos argumentar que os efeitos do íon em reduzir: [1] as respostas de orientação; [2] o número de entradas no braço fechado; e [3] o número total de entradas no LCE – dizem respeito, todos, a uma forma específica de atividade locomotora, qual seja a que envolve comportamento exploratório. Já foi descrito, nesse sentido, uma dissociação do efeito do lítio sobre o parâmetro locomoção horizontal e as respostas de orientação (Gray *et al.*, 1976).

Contudo, os dados disponíveis na literatura a respeito do efeito do lítio sobre a atividade locomotora e a atividade exploratória de um modo geral são controversos. Por um lado, há resultados demonstrando uma diminuição da atividade locomotora causada pelo lítio (Cappelliez, 1986; Berggren, 1988; Jahkel *et al.*, 1994; Bowden, 2000). Por exemplo, Smith demonstrou que 1,5 mmol/Kg/dia de LiCl administrados por cinco dias reduzem a atividade locomotora no campo aberto (Smith, 1983). Na medida em que a administração de mio-inositol é capaz de reverter essa redução (Kofman *et al.*, 1991) é possível que a ação do lítio sobre a via do IP₃-DAG esteja implicada no efeito do lítio sobre a atividade exploratória.

Por outro lado, foi demonstrada a propriedade do lítio reverter a hipocinesia observada após a exposição aguda ao estresse (Redrobe e Bourin, 1999).

Vasconcellos (2002) propôs a possibilidade de que o efeito do lítio varie conforme o estado fisiológico do animal, ou seja, talvez em condições normais os animais respondam ao tratamento com lítio de uma forma, e de forma diferente quando submetidos a situações de estresse. Isso está em parte de acordo com o observado em nosso trabalho, na medida em que interações entre lítio, estresse e estrógeno foram detectadas quanto aos parâmetros bolos fecais, cruzamentos no campo aberto, número de entradas no braço fechado, número de entradas no braço aberto e número total de entradas no LCE – relacionados, como comentado, à ansiedade e à atividade locomotora.

Gray e colaboradores testaram efeitos comportamentais na tarefa do campo aberto, durante 3 minutos por dia, por 4 dias sucessivos, 20 minutos após a injeção de 2mEq/Kg de LiCl (Gray *et al.*, 1976). Em um de seus experimentos o campo aberto foi iluminado com uma luz brilhante para alguns ratos (estressados) e luz vermelha para outros (controles). Em outro experimento, alguns animais dividiram-se entre aqueles que recebiam ou não, 5 horas antes da tarefa, um pequeno choque elétrico nas patas. Em ambos os experimentos os sais de lítio reduziram significativamente o número de reações de exploração entre os animais stressados, mas não entre os não-stressados. Por outro lado, a locomoção horizontal foi reduzida pelo lítio tanto nos ratos stressados como nos não stressados.

Sabe-se que o lítio apresenta um efeito dual sobre uma série de fenômenos, desde um nível fenomenológico – é útil no tratamento tanto de sintomas maníacos como depressivos do transtorno bipolar (Goodwin e Jamison, 1990) – ao nível bioquímico – pode, por exemplo, tanto inibir como estimular a enzima adenilciclase, conforme o estado metabólico da célula em questão (Jope, 1999). Assim, não surpreende que, também quanto aos parâmetros comportamentais aqui analisados, os dados apontem para múltiplas direções.

No presente trabalho houve um efeito robusto do estrógeno aumentando o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto. Embora um efeito ansiolítico destes hormônios na tarefa do campo aberto seja bem documentado na literatura (vide acima), não encontramos efeito semelhante descrito quanto ao parâmetro número de cruzamentos. Pelo contrário, foi demonstrado em ratas ooforectomizadas que implantes bilaterais de estrógenos, quer na

área preóptica medial, quer nas áreas anterior, ventromedial e posterior do hipotálamo – em nenhuma delas eliciava efeitos na atividade locomotora no campo aberto, embora se tenham observado efeitos de estimulação em rodas giratórias (Fahrbach et. al., 1985). Da mesma forma, em um interessante trabalho (Bowman et. al., 2002), embora se tenha demonstrado uma melhora na performance no campo aberto e no labirinto radial em uma série de parâmetros com a reposição de estradiol – não houve efeitos específicos sobre o número total de cruzamentos como os obtidos em nosso experimento.

Uma série de mecanismos bioquímicos podem subjazer o efeito do estrógeno sobre a atividade locomotora. Por exemplo, existem complexas interações entre estrógenos e o sistema dopaminérgico nigroestriatal – sabidamente envolvido no processamento motor. Especificamente, estrógenos atenuam a recaptação de dopamina no estriado (Thompson, 1999; Thompson *et al.*, 2000); têm efeito sobre a neurotoxicidade eliciada por MPP+ (1-metil-4-fenilpiridina, metabólito tóxico do MPTP [1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina]), metanfetamina e 6-hidroxi-dopamina; atenuam a liberação de dopamina eliciada por metanfetamina; e alteram as propriedades de ligação do transportador de dopamina (Thompson e Certain, 2005; Disshon e Dluzen, 2000 e 1999). Por outro lado, foi descrita uma possível ação inibitória dos estrógenos sobre os receptores dopaminérgicos D₂ (Munemura *et al.*, 1989). Acreditamos que a contradição entre nossos achados e o documentado anteriormente a respeito de estrógeno e atividade locomotora é coerente com o conflito entre os resultados sobre estrógeno e o sistema dopaminérgico – o que apenas faz reforçar que ainda muito resta por ser compreendido nesse campo.

Por outro lado, no contexto da interação observada entre estrógenos e estresse quanto ao número de cruzamentos – e dado um possível efeito da estrogenização (a presença de estrógenos) aumentando os níveis séricos de corticosterona demonstrado por Bischoff e Bryson (Bischoff e Bryson, 1981) – é possível que um efeito sobre o próprio eixo límbico-hipotálamo-hipófise-adrenal justifique a influência ativadora dos hormônios estrógenos sobre a atividade locomotora observada em nosso experimento.

Dados referentes ao efeito do estresse sobre atividade locomotora no campo aberto são controversos. Foi demonstrado que animais estressados cronicamente por 20 dias apresentavam diminuição na atividade locomotora (Ferreti *et al.*, 1995). No entanto, 35 dias

de exposição ao gato, seu predador natural, não gerava nenhuma diferença entre ratos estressados ou controles na primeira exposição ao campo aberto, somente surgindo diferença no sentido de que não havia habituação entre as sessões treino e teste, caso o campo aberto fosse realizado em dois dias. Isso caracterizaria um efeito mais sobre a memória do animal do que propriamente sobre sua atividade locomotora (Park *et al.*, 2001). Foi observado que estresse crônico variável com duração de 8 semanas levava a diminuição da atividade exploratória, enquanto estresse crônico por imobilização não surtia qualquer efeito sobre esse parâmetro (Dáquila *et al.*, 2000).

Embora se tenha observado uma interação na margem de significância entre as três intervenções quanto ao número de bolos fecais eliminados no campo aberto, e embora a excreção de bolos fecais possa ser considerada também como uma medida de ansiedade, é necessário interpretar esse resultado à luz de que não houve controle quanto ao estado alimentar do animal no dia da realização desta tarefa. Isso somado ao fato de que os grupos apresentavam diferenças nas dietas que lhe eram fornecidas e, provavelmente, no consumo de água, torna mais difícil a interpretação desses efeitos (Vasconcellos, 2002).

Houve um efeito importante do lítio e do estrógeno em aumentar o consumo de alimento palatável. Além disso, ambas as intervenções (assim como a aplicação de estresse) reduziram o peso corporal ao término do tratamento.

A influência dos hormônios estrógenos sobre o comportamento alimentar é estudada há mais de meio século (Meites, 1949; Lyman e Okey, 1956; Sullivan e Smith, 1957). De um modo geral, os estudos demonstram um efeito inibitório do estrógeno sobre a ingestão de alimento e sobre o ganho de peso – o procedimento de ooforectomia aumenta o consumo de alimento e o ganho de peso, enquanto a terapia de reposição de estrógenos reverte esses efeitos (Wade *et al.*, 1985; Gale e Van Itallie, 1979; Tarttelin e Gorski, 1973; Liao e Peng, 1982). Curiosamente, não só em fêmeas, mas também em ratos machos a administração de estrógenos reduziu a ingestão de comida e o peso – este último efeito parecendo variar conforme a idade – ou seja, sendo mais pronunciado quanto maior for a idade dos animais (Kuchar *et al.*, 1982). Um achado equivalente em humanos é o de que nos anos próximos à menopausa, mulheres experimentam um ganho de peso de em 2 Kg em média (van

Seumeren, 2000), o que é contrabalançado pela reposição de estrógeno (Espeland *et al.*, 1997).

Assim, o efeito de redução no peso corporal observado no presente trabalho está em conformidade com os dados na literatura referente aos estrógenos. Por outro lado, nossos achados referentes ao consumo de alimento podem parecer divergir dos trabalhos citados até o momento – contudo, estes se referem, via de regra, ao consumo de ração normal, e não alimento palatável, foco de nosso estudo.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo foi demonstrado que o consumo de alimento doce pode ser uma medida de reatividade a estímulos com propriedades de reforço, sobre o que procedimentos de estresse têm efeito deletério. Assim, é possível que o efeito de aumentar o consumo de alimento doce expresse maior sensibilidade a estímulos prazerosos e maior susceptibilidade a reforçadores positivos, eliciada pelos tratamentos citados. Acreditamos que isso configure um estado oposto à anedonia, sintoma comum aos quadros depressivos, o que está em consonância com a ação observada na clínica dos sais de lítio e estrógenos sobre sintomas depressivos.

Gamaro e colegas demonstraram que o estresse crônico variado é capaz de reduzir o consumo de alimento doce, fenômeno associado à redução na atividade da Na^+/K^+ -ATPase hipocampal (Gamaro *et. al.*, 2003c) e à redução na transmissão dopaminérgica no hipotálamo (Gamaro *et. al.*, 2003a). Em ratas ooforectomizadas submetidas a ECV, a reposição de estrógeno reduziu o ganho de peso corporal e aumentou o consumo de alimento doce (Gamaro *et. al.*, 2003b), resultados de acordo com os encontrados em nosso experimento. É possível que isso esteja relacionado a alterações nos níveis séricos de leptina, hormônio com importante papel no metabolismo e na regulação do peso corporal (Gamaro *et. al.*, 2003b). Por outro lado, o efeito observado por Gamaro do estresse em reduzir o consumo de alimento doce não foi encontrado em nosso trabalho. É possível que diferenças entre os modelos de estresse utilizados expliquem isso: por exemplo, determinados modelos de anorexia obtêm recusa alimentar com privação sistematizada de alimentos em determinadas condições (Smith, 1989; Klein e Walsh, 2004). Gamaro utilizou restrição de água e de alimento entre os agentes estressores, o que não estava incluído em nosso protocolo. Sabe-se também que a influência dos estrógenos sobre o comportamento alimentar pode variar, por exemplo, conforme condições ambientais, como o tipo de caixa

em que os animais são condicionados – talvez, por exemplo, em função de outros fatores associados, como diferenças de temperatura entre distintos ambientes (Bischoff e Bryson, 1980) – e conforme o tipo de alimento analisado (Wurtman e Baum, 1980). Assim, dada a complexidade dos sistemas fisiológicos sobre os quais os hormônios sexuais exercem algum efeito regulador, é plenamente possível que outras diferenças, mesmo sutis, entre protocolos de estudo, contribuam para eventuais contradições entre diferentes experimentos.

Em nosso trabalho, embora tenhamos encontrado após 12 semanas um efeito importante das intervenções isoladas (estrógeno, estresse e lítio) em reduzir o peso dos animais, na 6^a semana de tratamento observamos uma significativa interação entre as intervenções hormônio e estresse: na ausência de estrógeno, o estresse mostrou efeito de reduzir o peso dos animais, enquanto em sua presença, o estresse demonstra efeito oposto. De modo semelhante, no experimento de Gamaro e colegas, que se realizou em um período de 30 dias, foi observado que a diferença no ganho de peso entre os animais recebendo reposição de estrógeno e os controles foi máxima no princípio do tratamento, e diminuía com o tempo (Gamaro et. al., 2003b). Há uma série de mecanismos bioquímicos que pode participar dessa interação. Por exemplo, foi demonstrado que o estresse por imobilização diminuiu os níveis de ácido homovanílico no córtex pré frontal em ratas ooforetomizadas – mas não em fêmeas intactas estressadas. Além disso, o estradiol aumenta os níveis de noradrenalina na região CA3 do hipocampo, efeito contrário às mudanças eliciadas por estresse (Bowman et. al., 2002).

Atualmente é aceito que os hormônios ovarianos, em especial o estradiol, exerçam efeitos inibitórios tônicos e fásicos sobre a ingestão de alimento (Geary, 2001; Eckel, 2004; Wade, 1972), em especial reduzindo o tamanho da refeição, e não o número de refeições (Murphy *et al.*, 2001). O efeito inibitório tônico é demonstrado em experimentos de ooforectomia bilateral – procedimento que elimina quase totalmente os níveis de estradiol circulantes e que, em ratas e camundongas, leva a aumento no consumo e a um aumento de 10 a 30% na adiposidade corporal (Blaustein e Wade, 1976; Wade and Gray, 1979), sendo ambas alterações normalizadas com a reposição de estrógeno (Geary e Asarian, 1999; Tarttelin e Gorski, 1973). A inibição fásica é observada em ratas intactas, na medida em que existe uma diminuição no consumo de alimento durante o estro, comparada com o

diestro e o proestro (Drewett, 1974). Dada a janela temporal de 36 a 40 horas, aproximadamente, entre a elevação plasmática de estradiol e a redução observada no comportamento alimentar, postula-se que o efeito do estradiol se processe via uma ação genômica clássica, talvez em áreas centrais para regulação de comportamentos essenciais, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (Eckel, 2004). Através de uma cirurgia de derivação que impedia o acúmulo de alimento no estômago, foi sugerido que o efeito do estradiol em reduzir o tamanho das refeições necessitaria de algum estímulo gástrico e/ou pós-gástrico (Geary *et al.*, 1995).

Uma teoria bastante interessante e fértil (Smith, 1996) é a de que a modulação do comportamento alimentar se dê na forma de um controle direto e indireto. O controle direto estaria relacionado à atividade de receptores periféricos, acionados durante uma refeição, sendo exemplos o paladar exercendo controle através de feedback positivo e a liberação de colecistocinina (CCK) no intestino delgado através de feedback negativo. Por outro lado, fatores independentes da ativação de receptores durante uma refeição seriam denominados controladores indiretos. Consistiram em fatores metabólicos, cognitivos, ecológicos, sociais, culturais e patológicos que, ao contrário dos controladores diretos, estariam ativos também fora do contexto de uma refeição (Eckel, 2004).

Nesse contexto, acredita-se que o estradiol exerça um controle indireto sobre o comportamento alimentar, ou seja, [1] exiba um efeito tônico independente do evento alimentar e [2] module controladores diretos, como a CCK (Eckel, 2004).

No primeiro minuto de uma refeição avalia-se a influência modulatória da gustação. No restante, de outros moduladores diretos, como CCK. Em ratas ooforectomizadas foi demonstrado que a alteração no padrão das refeições acontecia não no primeiro minuto, mas após isso. A partir daí se propôs que os estrógenos não influenciariam na palatabilidade do alimento, mas sim tomariam parte em algum mecanismo de regulação do comportamento alimentar pós-ingestão (Hrupka *et al.*, 1997). Tratamento com estradiol em ratas ooforectomizadas não diminuiu a taxa inicial de lambidas em uma solução doce durante o primeiro minuto de uma refeição (período em que o gosto pode influenciar), mas diminuiu durante o restante da refeição, quando entram em jogo outros moduladores diretos, no caso a secreção de CCK (Hrupka *et al.*, 1997). Isso, junto com evidência de outros estudos, aponta para que o efeito da inibição fásica do estradiol sobre o

comportamento alimentar seja mediado, ao menos em parte, por potencializar o efeito inibitório da CCK (Asarian e Geary, 1999a e b; Eckel e Geary, 1999).

Além dos efeitos dos estrógenos sobre a CCK, é possível que sua ação sobre o comportamento alimentar se deva a outros alvos. Sabe-se que a serotonina (5-HT), especialmente atuando sobre os receptores 5HT_{2C}, exerce efeito inibitório sobre a alimentação (Heisler *et al.*, 1998). Foi demonstrado que a droga fenfluramina (um derivado anfetamínico, com mecanismo de ação controverso, mas aparentemente eliciando liberação de 5-HT do terminal pré-sináptico) tem poder anorexigênico aumentado na presença de estrógeno (Dixon *et al.*, 2002; Rivera e Eckel, 2003). Nesse sentido, foi observado um efeito também fásico e não tônico do estrógeno.

Quanto aos sais de lítio, há na literatura resultados diversos quanto à sua influência sobre o comportamento alimentar. Em um estudo piloto, aberto, com cinco homens voluntários hígidos, Chen e colegas demonstraram que a ingestão de lítio por um mês na dose a proporcionar litemia sérica de 12 horas entre 0,5 e 0,8 mmol/L não alterou o peso dos indivíduos, mas levou a um discreto aumento na ingestão de comida ao final de 1 mês, com uma flutuação na ingestão ao longo deste intervalo de tempo. O efeito na alimentação não se relacionou com eventual mudança no peso (Chen *et. al.*, 1992).

Foi demonstrado que injeções de lítio nos núcleos supraquiasmáticos bilateralmente, embora não tenham causado uma alteração na ingestão total de alimento, causaram um aumento no consumo de alimento durante o período claro e uma diminuição no consumo no período escuro (Reghunandanan *et. al.*, 1989). Isso poderia ser explicado por um efeito do lítio especificamente sobre os ritmos circadianos, já demonstrado (Cristensen e Agner, 1982; Reghunandanan *et al.*, 1989) ou por um efeito do íon sobre etapas bioquímicas confluentes entre a regulação do comportamento alimentar e dos ritmos biológicos.

Tratamento a longo prazo (21 a 25 dias) mas não a curto prazo (3 a 7 dias) com lítio atenuou o decréscimo na ingestão de alimento eliciado por meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) – um agonista 5-HT. Contudo, a administração de m-CPP também diminuiu a atividade locomotora, o que não foi influenciado pelo lítio, sugerindo que ambos efeitos são mediados por vias diferentes (Aulakh *et al.*, 1989). Já foi sugerido um efeito do lítio (e do estrógeno) sobre os níveis de leptina (Atmaca *et al.*, 2002, Machinal-Quelin *et al.*, 2002)

bem como um efeito do lítio sobre o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Himmerich *et al.*, 2005), peptídeos que participam da regulação do comportamento alimentar.

É possível que o efeito de reforço observado com a administração de alimentos palatáveis seja mediado por sistemas de neurotransmissão e segundos-mensageiros, ao menos em parte distintos daqueles envolvidos no comportamento alimentar de modo geral. Se isso é verdade – e quais receptores e moléculas tomariam parte desse processo – permanece por ser determinado.

Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento agudo com cloreto de lítio (0,3-1,5mmol/Kg) provoca um paladar aversivo a sacarina (Smith, 1983). Isso sugere que o efeito do lítio especificamente sobre o consumo de alimento doce pode se dever, também, a efeitos do íon sobre o próprio paladar do animal, sensibilizando-o a sabores agradáveis.

Em nosso trabalho, o efeito do lítio de aumentar o consumo de alimento palatável e de reduzir a latência para o início do consumo se mantinha ao longo de todos os dias da tarefa, enquanto o efeito do estrógeno sofria uma variação, sendo significativo no último dia, do teste ($p=0,03$), mas oscilando entre níveis não significativos, limítrofes e significativos ao longo do experimento. Embora a reposição hormonal utilizada fosse contínua (implantes subcutâneos com o que se prevê uma concentração sérica estável ao longo do tempo) é possível que a ação dos estrógenos necessite de etapas bioquímicas reguladas por outros ritmos biológicos que não a secreção periódica de hormônios ovarianos. Por outro lado, é também possível que, em sendo o efeito do lítio mais acentuado que o do estrógeno, fosse necessário um número maior de animais para que o efeito do estrógeno aparecesse em todas as medidas.

Além do efeito isolado de ambas as intervenções, observamos uma interação entre os efeitos do lítio e do estrógeno em aumentar o consumo de alimento doce. Uma interação, contudo, no sentido oposto, foi demonstrada por Opitz e Schafer (1976). Após injeções intraperitoneais de LiCl na dose de 3,6 a 7,2 mmol/Kg observou-se uma redução na ingestão de alimento e no consumo de água. Altas doses de LiCl levaram anorexia precoce, com posterior polidipsia e perda de peso – efeitos mais pronunciados em ratos machos em comparação com fêmeas. Doses pequenas de lítio, por outro lado, aumentaram a ingestão de alimento e o peso corporal, durante tratamento a longo prazo (Opitz e Schafer, 1976).

A diferença destes resultados para aqueles observados em nosso experimento pode se dever a distintas técnicas do preparo e administração da ração. Acreditamos que possíveis alterações na consistência, no sabor e na hidratação da ração diária possam interferir na quantidade ingerida e, conseqüentemente, levar a um consumo modificado de qualquer outro tipo de alimento quando disponibilizado. Finalmente, a ausência de diferença entre as intervenções quanto à latência para exploração da caixa no dia do teste de comportamento alimentar pode se dever ao fato que era realizada uma medida de pouca precisão (ao nível de segundos), enquanto muitas vezes o movimento do animal era bastante rápido.

Finalmente, apesar da redução no peso dos animais, houve um aumento na preferência por alimentos doces. Isso pode sugerir que o ganho de peso observado em pacientes usando lítio possa ser devido, em parte, a um aumento preferencial de alimentos palatáveis, facilmente disponíveis a humanos – mas disponíveis apenas em escassos momentos aos animais de nosso experimento.

Segundo Paul Willner (1991), um modelo animal de transtornos psiquiátricos para ser consistente deve possuir validades de face (ou aparente), preditiva e de constructo (“*face validity*”, “*predictive validity*” e “*construct validity*”). Por validade de face ou aparente compreendemos que o modelo deve provocar no animal uma reação comportamental que mimetize algum aspecto fenomenológico do transtorno em si (por exemplo, lentificação psicomotora na modelagem de depressão). Por validade preditiva compreende-se que intervenções úteis na clínica para reverter determinado sintoma também o façam no modelo animal (por exemplo, antidepressivos – úteis no manejo da depressão clínica – revertendo a lentificação psicomotora no modelo). Por fim, validade de constructo diz respeito à racionalidade subjacente ao modelo.

De acordo com nossos resultados observamos que o Estresse Crônico Variado, aplicado a fêmeas ooforectomizadas, nos moldes como o foi em nosso trabalho, apresenta validades aparente, preditiva e de constructo como um modelo de ansiedade: foi construído, a nosso ver, sobre uma base racional sólida, resultando em modelagem de comportamento ansioso em duas tarefas comportamentais (LCE e campo aberto), o que foi aliviado com fármacos que têm efeito ansiolítico na clínica. Por outro lado, a intervenção estresse não exerceu efeito modelando o sintoma *anedonia*, como aferido na tarefa do comportamento alimentar

– embora sobre este parâmetro se tenha observado efeito robusto das intervenções lítio e estrógeno. Nestes termos, podemos argumentar que o protocolo de Estresse Crônico Variado utilizado não possui validade de face (aparente) como modelando depressão, pelo menos em fêmeas ooforectomizadas. Isso analisado em conformidade com a não modificação nos pesos das adrenais levanta a possibilidade de que o estresse aplicado tenha sido moderado, menos severo que os outros estresses estudados por nosso grupo. É possível que diferenças entre os estressores utilizados, período de cada sessão de estresse e a própria seqüência usada contribuam para diferentes efeitos sobre os animais. O efeito do estresse crônico em reduzir o consumo de alimento foi demonstrado em ratas fêmeas (Gamaro et al., 2003b e c), o que exclui que particularidades quanto ao sexo justifiquem a diferença entre nossos resultados e os de outros grupos. Pelo contrário, há relatos de que ratos Wistar machos são mais resistentes a efeitos comportamentais relacionados a aspectos hedônicos (Nielsen et al., 2000).

Por outro lado, talvez a distinção que se esforce por obter em pesquisa básica entre ansiedade e depressão não seja transportável para a clínica e, por isso, seja de validade questionável. Sabe-se que a ansiedade é um sintoma extremamente freqüente em quadros depressivos (Stefanis e Stefanis, 2005). Além disso, o tratamento farmacológico (e até mesmo psicoterápico) dos sintomas ansiosos é, em grande parte, o mesmo utilizado em quadros depressivos (Bech, 2005; Greenberg, 1994). Por fim, é bem estabelecido em psiquiatria que a regra, e não a exceção, é a comorbidade entre os transtornos depressivos e de ansiedade (Schatzberg e Nemeroff, 1998).

No teste de retirada da cauda e na tarefa do Labirinto Aquático de Morris não encontramos resultados significativos. Trabalhos anteriores demonstraram que o estresse por imobilização, em sessão única, aumenta a latência no teste de retirada da cauda (efeito analgésico). Animais estressados cronicamente por contenção podem apresentar uma diminuição nessa latência, caracterizando um efeito hiperalgésico (Gamaro *et al.*, 1998), embora com diferentes modelos de estresse crônico se obtenha efeitos diversos sobre a nocicepção (ver, por exemplo, Pinto-Ribeiro *et al.*, 2004). Os mecanismos subjacentes a tais fenômenos são objeto de estudo. É possível que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por situações de estresse, e a conseqüente liberação de inúmeros peptídeos

possa modular esse processo de alguma forma. Por exemplo, a liberação de β -endorfina, um opióide endógeno, eliciada pelo estresse (Heyden-Hixon e Nemeroff, 1993) pode explicar parte do efeito analgésico observado. Outras situações que levam a analgesia como exposição à novidade também estimulam a liberação hipotalâmica desse peptídeo (Izquierdo *et al.*, 1984). Nossos resultados negativos no teste de latência para retirada da cauda podem apontar para que exista uma espécie de janela de efeito, na medida em que determinados níveis ou determinadas formas de estresse possam ser necessárias para uma modulação no limiar da dor. Nesse sentido, os estressantes utilizados em nosso modelo diferem em parte dos estressantes usados em trabalhos anteriores.

Dentre as tarefas que utilizamos, o Labirinto Aquático de Morris (LA) seria aquela, a princípio, mais adequada para o estudo de um possível efeito neuroprotetor das intervenções em curso. Foi demonstrado, por exemplo, que na tarefa de memória de referência do LA, no dia do teste, animais estressados exibem maior latência para o primeiro cruzamento sobre o local exato em que a plataforma se encontrava nas sessões-treino, redução no número total de cruzamentos sobre este local e maior tempo de permanência no quadrante oposto – efeitos revertidos pela administração de lítio (Vasconcellos *et. al.*, 2003). Isso é compreendido como um efeito deletério do estresse e um efeito benéfico do lítio sobre a performance cognitiva, em especial sobre a memória visual-espacial. Dado o envolvimento de áreas como o hipocampo no processamento desse tipo de informação, e os dados referentes à neuroplasticidade nessa estrutura (Fuchs e Flügge, 1998; Rocha *et. al.*, 1998), foi proposto que o acima descrito pode indicar um efeito neuroprotetor dos sais de lítio.

Embora não tenhamos diferenças no dia do teste, nossos resultados no quinto dia de treino evidenciaram uma maior latência para encontrar a plataforma entre os animais estressados em comparação com os animais controle e aqueles recebendo somente lítio, o que está de acordo com o citado acima. Provavelmente este efeito não foi observado no dia do teste pois dispúnhamos de dados referentes a um número reduzido de animais no teste, em comparação com no treino, o que talvez tenha comprometido o alcance de significância estatística.

As interações entre os efeitos do estrógeno, do lítio e do estresse observadas em nosso trabalho também advogam a favor de que existam intersecções entre os alvos moleculares do lítio e estrógeno, de um lado, e os efeitos deletérios do estresse, por outro. Nesse sentido foi demonstrado, por exemplo, que altos níveis de estresse são preditores de uma pobre resposta ao lítio em portadores de transtorno bipolar (Kleindienst *et al.*, 2005).

Mais recentemente, Vasconcellos e colaboradores demonstraram um efeito desse modelo de estresse em reduzir a atividade da Na^+/K^+ -ATPase hipocampal, e a capacidade dos sais de lítio prevenir esse efeito – se administrados durante o estresse – ou revertê-lo – se administrados após (Vasconcellos *et. al.*, 2005).

O principal ponto em que o protocolo de Vasconcellos difere do nosso reside em que ali se utilizaram, em ambos experimentos, ratos machos. É possível, dessa forma, que existam diferenças entre os sexos quanto a algumas respostas a procedimentos de estresse e quanto aos efeitos do lítio sobre o organismo.

Nesse sentido, em outra tarefa que avalia performance cognitiva, foi observada uma diferença importante do estresse conforme o sexo: foi demonstrado que 21 dias de estresse crônico por imobilização piora a performance de machos (Luine *et al.*, 1994) mas melhora a performance de fêmeas no labirinto radial (Bowman *et al.*, 2001). Ratas ooforectomizadas submetidas a estresse com 6 horas diárias de imobilização por 21 dias não tiveram sua performance no labirinto radial alterada. Contudo, a reposição de estrógeno melhorou essa performance, em especial nos animais recebendo estrógeno e estresse (Bowman *et. al.*, 2002).

Curiosamente, os estudos com animais em que se evidencia efeito neuroprotetor do lítio são via de regra realizados com machos (vide, por exemplo, Angelucci *et. al.*, 2003; Chen *et. al.*, 2000; Dixon e Hokin, 1998 e, entre nós, Vasconcellos, 2002; Vasconcellos *et. al.*, 2005). Pascual e Gonzales, em seu experimento pioneiro na pesquisa sobre lítio e neuroproteção, utilizaram ratos Wistar machos para demonstrar o efeito de cloreto de lítio intraperitoneal em reduzir os déficits provocados por lesões encefálicas com ácido ibotênico (Pascual e Gonzales, 1995). Por sua vez, estudos com culturas de células não costumam apontar qual seu genótipo – masculino ou feminino – (vide, por exemplo, Chen *et. al.*, 2003; Grimes e Jope, 2001; Hashimoto *et. al.*, 2002), o que pode ser uma omissão relevante nesse contexto.

Em pesquisas com animais é compreensível a preferência por machos em função do obstáculo técnico de controlar-se a fase do ciclo estral, exigido no trabalho com fêmeas. Isso é especialmente relevante em estudos sobre estresse, pois a coleta de material vaginal (para determinação da fase do ciclo) certamente é um procedimento estressante, que interferiria como um viés na análise dos resultados. Assim, experimentos utilizando ooforectomia podem ser uma alternativa. Embora cirurgias para extirpação de ovários e os implantes subcutâneos também sejam um procedimento estressante, em nosso protocolo foram realizadas pontualmente, em três momentos à distância dos dias em que se realizavam as tarefas comportamentais – em comparação com procedimentos de coleta de material vaginal, que seriam feitas diariamente, e ao longo dos dias de realização das tarefas, em ratas não ooforectomizadas. Por outro lado, uma importante limitação dos estudos com ooforectomia é que se obtém, com implantes subcutâneos, níveis circulantes estáveis ao longo do tempo de hormônio, o que configura um quadro distinto dos níveis variáveis conforme a fase do ciclo observados em organismos intactos.

Em um interessante trabalho com humanos, utilizando ressonância magnética de alta resolução, Moore e colaboradores identificaram que, de dez pacientes portadores de transtorno bipolar em litioterapia, oito exibiram aumento no volume de substância cinzenta encefálica. Contudo, dessa amostra sete pacientes eram homens e três mulheres – e não é claro o número de mulheres entre aqueles em que o efeito foi observado, tampouco se as mulheres que participaram do estudo encontravam-se em idade fértil ou não (Moore et. al., 2000).

Uma hipótese (bastante infeliz para a legião de pacientes do sexo feminino, no mundo inteiro, portadoras de algum transtorno neurodegenerativo) é a de que o possível efeito neuroprotetor do lítio se dê exclusivamente no sexo masculino – ou ao menos, que exista uma diferença neste efeito conforme o sexo. Isso é endossado pelas interações entre lítio e estrógeno, já discutidas, encontradas em nosso trabalho.

Embora em uma revisão da literatura sobre diferença de eficácia do lítio no tratamento de síndromes afetivas conforme o sexo do paciente, analisando 17 estudos publicados entre 1967 e 1998, envolvendo 1548 pacientes numa média de 38,6 meses, não tenha sido observada diferença significativa de resposta entre mulheres e homens (Viguera et. al., 2000) – é possível que os mecanismos bioquímicos envolvidos na estabilização do humor

sejam distintos daqueles envolvidos no possível efeito neuroprotetor dos sais de lítio, e a semelhança entre os sexos nos resultados de Viguera não possam ser extrapolados para a neuroproteção.

Ainda por outro lado, é possível que alterações no labirinto aquático sejam apenas uma das expressões possíveis de um efeito neuroprotetor. Como algumas situações de dano neuronal (por exemplo, modelos animais de depressão) exibem diminuição da atividade exploratória, nossos resultados no campo aberto e labirinto em cruz podem contribuir para a argumentação a favor do papel protetor do estradiol e do lítio e sugerir a possível utilidade do parâmetro atividade exploratória como, indiretamente, relacionado à integridade neuronal.

Não encontramos dados na literatura que relacionem a atividade no campo aberto ou no labirinto em cruz com a expressão ou modulação da atividade das proteínas envolvidas com neurotoxicidade como GSK-3 β (Ryves e Harwood, 2001; Grimes e Jope, 2001; De Sarno *et al.*, 2002), p53, Bax e cdk5 (Chen e Chuang, 1999; Jorda *et al.*, 2005), e proteínas neuroprotetoras como como BCL-2 (Chen e Chuang, 1999; Wei *et al.*, 2001). Por outro lado, foi demonstrado, por exemplo, um efeito do MK-801 (um antagonista glutamatérgico) em aumentar a atividade no campo aberto (Zuo *et al.*, 2005). Isso à luz do conceito de excitotoxicidade glutamatérgica poderia advogar a favor de uma relação entre neuroproteção e a tarefa do campo aberto. Tal apontamento é bastante reducionista e, evidentemente, há uma série de fatores envolvidos na modulação de todos esses resultados. Contudo, as tarefas comportamentais utilizadas em nosso trabalho são extremamente baratas e de fácil realização, o que justifica incentivar que se as explore ao máximo e, sobre uma base racional, se procure ampliar o repertório de informações por elas oferecido.

Caso no futuro alguma relação seja determinada nesse sentido, entre atividade neuroprotetora ou neurotóxica e as tradicionais tarefas do campo aberto e do labirinto em cruz, é possível que tenhamos meios indiretos para estudar neuroproteção. Contudo, provavelmente será necessária, para isso, uma observação de parâmetros mais sutis nas tarefas comportamentais – como, por exemplo, velocidade e mudanças de direção – e utilizar tempos de observação superiores a cinco minutos. Nesse sentido, foi demonstrado que CPP (antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA) e CNQX (antagonista dos receptores AMPA e Kainato) determinaram uma velocidade crescente de corrida com mais

mudanças abruptas de direção em comparação com 2-MeSATP (um agonista dos receptores nucleotídeos P2) (Kittner et. al., 2004).

As medidas de lítio sérico e em sangue total eram tais que, em média, ofereciam níveis terapêuticos, contudo existia uma variação bastante grande (0,25 a 1,3mEq/L no plasma, com média de 0,62 e entre 0,3 e 1,35 mEq/L em sangue total, com média de 0,73). Isso em parte pode explicar resultados distintos daqueles esperados com o lítio, na medida em que animais com litemia não a pleno possam ter contribuído para esta modificação. Em média, os níveis obtidos assemelham-se àqueles recomendados no manejo do transtorno bipolar, em especial na fase de manutenção – recomenda-se, na fase de mania aguda, litemia sérica de 1,0 a 1,2 e, na fase de manutenção, de 0,6 a 0,8mmol/l (Walden e Grunze, 2000).

De Roos demonstrou que após duas semanas de administração oral de uma dose fixa de lítio (250 micromol por dia), a redução abrupta para a metade deste valor repercutia significativamente na concentração plasmática, levando a um decréscimo médio, no dia seguinte, de 1 micromol/litro nesta e, dois dias após, mais 0,3 micromol/litro. Assim, a concentração plasmática de lítio é um bom parâmetro para adesão a uma dieta contendo sais de lítio. Contudo, embora em um mesmo indivíduo os níveis se relacionem bem com a ingestão, há variações interindividuais importantes (de Ross *et al.*, 2001).

Nossos resultados ilustram que determinados efeitos comportamentais podem ser obtidos com sais de lítio atingindo concentrações séricas não necessariamente tão elevadas quanto as necessárias no tratamento do transtorno bipolar. Isso pode ser de relevância clínica no contexto de eventuais características neuroprotetoras. Caso surjam no futuro novas aplicações terapêuticas deste íon, a possibilidade de empregarem-se doses menores certamente traria ganhos em termos de custos e, principalmente, efeitos colaterais.

6. CONCLUSÕES

◆ O estresse crônico variado reduziu o tempo nos quadrados centrais do campo aberto e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz, em relação ao tempo nos braços fechados, mostrando-se um modelo de ansiedade.

◆ A reposição hormonal com 17- β -estradiol aumentou [1] o tempo de permanência (relativo e absoluto) no braço aberto do labirinto em cruz, demonstrando efeito ansiolítico e [2] aumentou o número de cruzamentos na tarefa do campo aberto e o consumo de alimento palatável, o que sugere efeito antidepressivo.

◆ Na tarefa do labirinto em cruz a administração de estrógeno foi protetora contra os efeitos do estresse.

◆ Os sais de lítio aumentaram a ingestão de alimento doce – efeito possivelmente antidepressivo – e reduziram o número de respostas de orientação no campo aberto, o número de entradas total e nos braços fechados do labirinto em cruz – efeito inibitório sobre a atividade exploratória. Os mecanismos através dos quais tais efeitos se processam são ainda tema de investigação.

◆ Não houve efeito significativo das intervenções sobre o desempenho no teste de retirada da cauda e na tarefa do labirinto aquático.

◆ Houve diversas interações entre estresse, lítio e estrógeno bem como entre estresse e estrógeno, e estrógeno e lítio isoladamente, o que sugere que as três intervenções possam, ao menos em parte, exercer efeito sobre alvos bioquímicos comuns – e aponta para questões de relevância clínica na medida em que o sexo do paciente pode influenciar na resposta a fármacos e na vulnerabilidade ao estresse.

◆ As três intervenções reduziram o peso dos animais, o que precisa ser melhor compreendido.

◆É possível que as tarefas do labirinto em cruz e campo aberto sejam úteis para o rastreamento de atividade neuroprotetora, embora isso também necessite ser melhor documentado. Mais estudos são necessários para que se compreenda o exato mecanismo através do que estrógenos, lítio e estresse interagem e exercem seus efeitos individuais sobre o comportamento animal.

7. REFERÊNCIAS

Abraham IM, Todman MG, Korach KS, Hermison AE. Critical in Vivo Roles for Classical Estrogen Receptors in Rapid Estrogen Actions on Intracellular Signaling in Mouse Brain. *Endocrinology* 2004;45:3055-61.

Amsterdam JD, Marinelli DL, Arger P, et al. Assessment of adrenal volume by computed tomography in depressed patients and healthy volunteers: a pilot study. *Psychiatry Res* 1987;21:189-197.

Angelucci F, Aloe L, Jimenez-Vasquez P, Mathe AA. Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2003;6:225-31.

Arana GW, Baldessarini RJ, Ornstein M. The dexametasone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 1985;42:1193-1204.

Arana GW, Rosenbaum JF. *Handbook of psychiatric drug therapy*. 4th ed. Philadelphia, 2000: Lippincott Williams & Wilkins.

Arato M, Banki CM, Nemeroff CB, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and suicide. *Ann N Y Acad Sci* 1986;487:263-270.

Arato M, Manki CM, Bissette G, et al. Elevated CSF CRF in suicide victims. *Biol Psychiatry* 1989;25:355-359.

Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* 1999a;20:445-50.

Asarian L, Geary N. Estradiol increases the satiating potency of intraduodenal infusions of intralipid, but not of L-phenylalanine, in ovariectomized rats. *Abstr-Soc Neurosci* 1999b;25:1556.

Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. Weight gain and serum leptin levels in patients on lithium treatment. *Neuropsychobiology* 2002;46:67-9.

Aulakh CS, Zohar J, Wozniak KM, Hill JL, Murphy DL. Long-term lithium treatment in rats attenuates m-chlorophenylpiperazine-induced decreases in food intake but not locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;98:448-52.

Bachmann RF, Schloesser RJ, Gould TD, Manji HK. Mood stabilizers target cellular plasticity and resilience cascades: implications for the development of novel therapeutics. *Mol Neurobiol* 2005;32:173-202.

Banki CM, Bissette G, Arato M, et al. Cerebrospinal fluid corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1987;144:873-877.

Banki CM, Karmacsi L, Bissette G, Nemeroff CB. CSF corticotropin-releasing hormone and somatostatin in major depression: response to antidepressant treatment and relapse. *Eur Neuropsychopharmacol* 1992;2:107-113.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências. Desvendando o Sistema Nervoso*. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre: 2002.

Bech P. Tratamento farmacológico dos transtornos depressivos: uma revisão. In: Maj M, Sartorius. *Transtornos Depressivos*. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Berggren U. The effect of chronic lithium administration and withdrawal on locomotor activity and apomorphine-induced locomotor stimulation in rats. *Journal of Neural Transmission* 1988;71:65-72.

Bischoff F, Bryson G. Long-term estrogenization in mammals. II. Environmental influences of housing conditions upon estrogen-induced polydipsia and food intake in Marsh mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1980;27:339-52.

Bischoff F, Bryson G. Long-term estrogenization in mammals. IV. Body, adrenal, and testes weights; polydipsia; food intake; vasopressin administration; and serum corticosterone levels in estrogenized male Evans rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1981;32:335-54.

Blaustein JD, Wade GN. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* 1976;17:201-8.

Bodnoff SR, Hunphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 1995;15:61-9.

Bowden CL. Efficacy of lithium in mania and maintenance therapy of bipolar disorder. *Journal of Clinical Psychiatry* 2000;61:35-40.

Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 2002;113:401-10.

Bowman RE, Zrull MC, Luine VN. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res* 2001;904:279-89.

Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water-maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 1989;48:29-69.

Burvill PW. Recent progress in the Epidemiology of Major Depression. *Epidemiologic Reviews* 1995;17:21-31.

Cade, JFJ. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 1949;2:349-52.

Calvo-Torrent A, Brain PF, Martinez M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology and Behavior* 1999;67:189-196.

Cappelliez P. Comparing oral lithium carbonate and intraperitoneal lithium chloride chronic administrations on rats' activity levels. *Neuropsychopharmacology* 1986;16:103-8.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:1193-205.

Carpenter W, Bunney W. Adrenal cortical activity in depressive illness. *Am J Psychiatry* 1971;128:31-40.

Carrol BJ. Use of the dexamethasone test in depression. *J Clin Psychiatry* 1982;43:44-50.

Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by Lithium. *J Neurochem* 2000; 75:1729-34.

Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem* 1999;274:6039-42.

Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chuang DM. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain

neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem* 2003; 84:566-75.

Chen Y, Goodall E, Silverstone T. The effects of lithium on body weight and food intake in normal subjects – a pilot study. *Int Clin Psychopharmacol* 1992;7:51-4.

Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 2001;53:25-71.

Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci* 1996;110:1321-34.

Christensen S, Agner T. Effects of lithium on circadian cycles in food and water intake, urinary concentration and body weight in rats. *Physiol Behav* 1982;28:635-40.

D'Aquila PS, Brain P, Willner P. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav* 1994;56:861-7.

D'Aquila PS, Peana AT, Carboni V, Serra G. Exploratory behavior and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. *European Journal of Pharmacology* 2000;399:43-47.

Davis JM, Janicak PG, Hogan DM. Mood stabilizers in the prevention of recurrent affective disorders: a meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand* 1999;100:406-17.

DeBellis MD, Gold PW, Geraciotti TD, et al. Fluoxetine significantly reduces CSF and AVP concentrations in patients with major depression. *Am J Psychiatry* 1993;150:656-657.

De Leo V, la Marca A, Morgante G, Lanzetta D, Florio P, Petraglia F. Evaluation of combining kava extract with hormone replacement therapy in the treatment of postmenopausal anxiety. *Maturitas* 2001;39:185-8.

De Roos NM, de Vries JH, Katan MB. Serum lithium as a compliance marker for food and supplement intake. *Am J Clin Nutr* 2001;73:75-9.

De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 β phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 2002; 43:1158-64.

Deuschle M, Schwieger U, Weber B, et al. Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:234-8.

Diamond DM, Fleshner M, Ingersoll N, Rose GM. Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. *Behav Neurosci* 1996;110:661-672

Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen reduces acute striatal dopamine responses in vivo to the neurotoxin MPP⁺ in female, but not male rats. *Brain Res* 2000;868:95-104.

Disshon KA, Dluzen DE. Use of in vitro superfusion to assess the dynamics of striatal dopamine clearance: influence of estrogen. *Brain Res* 1999;842:399–407.

Dixon DP, Rivera HM, Eckel LA. Fenfluramine-induced hypophagia is increased during estrus in female rats. *Appetite Abstr* 2002;39:73.

Dixon JF, Los GV, Hokin LE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8358-62.

Dixon JF, Hokin LE. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8363-8.

Drewett RF. The meal patterns of the oestrous cycle and their motivational significance. *Q J Exp Psychol* 1974;26:489-94.

Dunigan CD, Shamoo AE. Li^+ stimulates ATP-regulated dopamine uptake in PC12 cells. *Neuroscience* 1995;65:1-4.

Eckel LA. Estradiol: a rhythmic, inhibitory, indirect control of meal size. *Physiology & Behavior* 2004;82:35-41.

Eckel LA, Geary N. Endogenous cholecystokinin's satiating actions increase during estrus in female rats. *Peptides* 1999;20:451-6.

Espeland MA, Stefanick ML, Kritz-Silverstein D, Fineberg SE, Waclawiw MA, James MA, James MK, et al. Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. Postmenopausal Estrogen-Progestin Interventions Study Investigators. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1549-56.

Evans DL, Nemeroff CB. Use of dexametasone suppression test using DSM III criteria on an inpatient psychiatric unit. *Biol Psychiatry* 1983;18:505-11.

Fahrbach SE, Meisel RL, Pfaff DW. Preoptic implants of estradiol increase wheel running but not the open field activity of female rats. *Physiol Behav* 1985;35:985-92.

Ferreti C, Blengio M, Gamalero SR, Ghi P. Biochemical and behavior changes induced by acute stress in a chronic variate stress model of depression: the effect of amitriptyline. *European Journal of Pharmacology* 1995;280:19-26.

File S. Recent developments in anxiety, stress and depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1996;54:3-12.

Foy MR, Stanton ME, Levine S, Thompson RF. *Behavioral and Neural Biology* 1987;48:138-49.

France RD, Urban B, Krishnan KRR, et al. CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in chronic pain patients with and without major depression. *Biol Psychiatry* 1988;23:86-88.

Frye CA, Walf AA. Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci* 2004;118:306-13.

Fuchs E, Flügge G. Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 1998;23:295-300.

Galanopoulou AS, Alm EM, Velísková J. Estradiol reduces seizure-induced hippocampal injury in ovariectomized female but not in male rats. *Neuroscience Letters* 2003;342:201-5.

Gale SK, Van Itallie TB. Genetic obesity: estrogenic influences on the body weight and food intake of lean and obese adult Zucker (fa/fa) rats. *Physiol Behav* 1979;23:111-20.

Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variable stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int* 2003a;42:107-14.

Gamaro GD, Michalowsky MB, Catelli DH, Xavier MH, Dalmaz C. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999;32:341-7.

Gamaro GD, Prediger ME, Lopes JB, Dalmaz C. Interaction between estradiol replacement and chronic stress on feeding behavior and on serum leptin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2003b;76:327-33.

Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse ATS, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res* 2003c;28:1339-44.

Gamaro GD, Xavier MH, Denardin JD, Pilger JA, Ely DR, Ferreira MB, Dalmaz C. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol Behav* 1998;63:693-7.

Gambarana C, Ghiglieri O, Mais F, Scheggi S, Tagliamonte A, De Montis MG. The effects of long-term administration of rubidium or lithium on reactivity to stress and on dopamine output in nucleus accumbens in rats. *Brain Res* 1999;826:200-9.

Gambarana C, Scheggi S, Tagliamonte A, Tolu P, De Montis MG. Animal models for the study of antidepressant activity. *Brain Res Prot* 2001;7:11-20.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 2001;63:29-60.

Geary N, Asarian L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1999;67:141-7.

Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 2001;22:1251-63.

Geary N, Trace D, Smith GP. Estradiol interacts with gastric or postgastric food stimuli to decrease sucrose ingestion in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 1995;57:155-8.

Geddes JR, Burgess S, Hawton K, Jamison K, Goodwin GM. Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Psychiatry* 2004;161:217-22.

Gibbons JL, McHugh PR. Plasma cortisol in depressive illness. *J Psychiatr Rs* 1962;1:162-71.

Gilad GM, Gilad VH. Brain polyamine stress response: recurrence after repetitive stressor and inhibition by lithium. *J Neurochem* 1996;67:1992-6.

Gillies G, Lowry P. Corticotropin releasing factor may be modulated by vasopressin. *Nature* 1979;278:463-64.

Goodwin FK, Jamison KR. *Manic-Depressive Illness*. New York, 1990: Oxford University Press.

Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* 2000;48:715-20.

Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 1999;46:1472-9.

Gould PW, Chrousos GP, Kellner C, et al. Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am J Psychiatry* 1984;141:619-27.

Gould PW, Loriaux DL, Roy A, et al. Responses to corticotropin releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease: pathophysiologic and diagnostic implications. *N Engl J Med* 1986;314:1329-35.

Gray P, Solomon J, Dunphy M, Carr F, Hession M. Effects of lithium on open field behavior in "stressed" and "unstressed" rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1976;48:277-81.

Greenberg RL. Transtorno do pânico e agorafobia. In: Scott J, Williams JMG, Beck A e cols. *Terapia cognitiva na prática clínica: um manual prático*. Porto Alegre, 1994: Artmed.

Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3B and facilitated by lithium. *J Neurochem* 2001;78:1219-32.

Harwood AJ, Agam G. Search for a common mechanism of mood stabilizers. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:179-89.

Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM. Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology* 2002;43:1173-9.

Hata T, Nishikawa H, Itoh E, Funakami Y. Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Japanese Journal of Pharmacology* 2001;1:175-82.

Hawk T, Zhang Q, Rajakumar G, Day AL, Simpkins JW. Testosterone increase and estradiol decrease middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res* 1998;796:296-8.

Hayden-Hixon DM, Nemeroff CB. Role(s) of neuropeptides in responding and adaptation to stress: a focus on corticotrofin-releasing factor and opioid peptides. In: Stanford SC, Salmon P (ed.) *Stress: From synapse to syndrome*. London, 1993: Academic Press.

Heisler LK, Chu HM, Tecott LH. Epilepsy and obesity in serotonin 5HT_{2C} mutant mice. *Ann NY Acad Sci* 1998;861:74-8.

Hermus AR, Pieters GF, Smals AG et al. Plasma adrenocorticotropin, cortisol, and aldosterone responses to corticotropin-releasing factor: modulatory effect of basal cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:187-91.

Himmerich H, Koethe D, Schuld A, Yassouridis A, Pollmacher T. Plasma levels of leptin and endogenous immune modulators during treatment with carbamazepine or lithium. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:447-51.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 1996;54:21-30.

Holsboer F, Von Bardeleben U, Gerken A, et al. Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression (letter). *N Engl J Med* 1984;311:1127.

Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 1997;272:25326-32.

Hrupka BJ, Smith GP, Geary N. Ovariectomy and estradiol affect postingestive controls of sucrose licking. *Physiol Behav* 1997;61:243-7.

Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:631-52.

Husum H, Mathe AA. Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes. *Neuropsychopharmacology* 2002;27:756-64.

Imwalle DB, Gustafsson JA, Rissman EF. Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav* 2005;84:157-63.

Izquierdo I, Dias RD, Souza DO, Perry ML, Carrasco MA, Volkmer N, Netto CA. Effect of various behavioral training and testing procedures on brain: β -endorphin-like immunoreactivity and the possible role of β -endorphin in behavioral regulation. *Psychoneuroendocrinology* 1984;9:381-9.

Jahkel M, Oehler J, Schumacher HE. Influence of nootropic and antidepressive drugs on open field and running wheel behavior in spontaneously high and low active mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1994;49:263-9.

Joop RS. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Molecular Psychiatry* 1999;4:117-28.

Jorda EG, Verdaguer E, Canudas AM, Jimenez A, Garcia de Arriba S, Allgaier C, Pallas M, Camins A. Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the neuroprotective properties of lithium. *Neuroscience* 2005;134:1001-11.

Kathol RG, Jaeckle RS, Lopez JR, et al. Consistent reduction of ACTH responses to stimulation with CRH, vasopressin and hypoglycaemia in patients with depression. *Br J Psychiatry* 1989;155:468-478.

Katz RJ. Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1982;16:965-8.

Katz RJ, Roth KA, Carrol BJ. Animal models and human depressive disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 1981;5:231-46.

Kerr DS, Campbell LW, Applegate MD, Brodish A, Landfield PW. Chronic stress-induced acceleration of electro physiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *J Neurosci* 1991;11:1316-24.

Kittner H, Hoffmann E, Krugel U, Illes P. P2 receptor-mediated effects on the open field behaviour of rats in comparison with behavioural responses induced by the stimulation of dopamine D2-like and by the blockade of ionotropic glutamate receptors. *Behav Brain Res* 2004;149:197-208.

Klein DA, Walsh BT. Eating disorders: clinical features and pathophysiology. *Physiol Behav* 2004;81:359-74.

Kleindienst N, Engel RR, Greil W. Psychosocial and demographic factors associated with response to prophylactic lithium: a systematic review for bipolar disorders. *Psychol Med* 2005;35:1685-94.

Kofman O, Belmaker RH, Grisaru N, Alpert C, Fuchs I, Katz V, Rigler O. Myo-inositol attenuates two specific behavioral effects of acute lithium in rats. *Psychopharmacology Bulletin* 1991;27:185-90.

Konarska M, Stewart RE, McCarty R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. *Behav Neural Biol* 1990;53:231-43.

Kopnisky KL, Chalecka-Franaszek E, Gonzalez-Zulueta M, Chuang DM. Chronic lithium treatment antagonizes glutamate-induced decrease of phosphorylated CREB in neurons via reducing protein phosphatase 1 and increasing MEK activities. *Neuroscience* 2003;116:425-5.

Krishnan KRR, Doraiswamy PM, Lurie SN, et al. Pituitary size in depression. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:256-9.

Krishnan KRR, France RD, Pelton S, et al. What does the dexamethasone suppression test identify? *Biol Psychiatry* 1985;20:987-64.

Kuchar S, Mozes S, Boda K, Koppel J. The effect of androgen and estrogen on food intake and body weight in rats – age dependency. *Endokrinologie* 1982;80:294-8.

Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disorders* 2002;4:117-28.

Lenox RH, Manji HK. Lithium. In.: Schatzberg AF, Nemeroff CB. *Textbook of Psychopharmacology*. 2nd ed. Washington, 1998: The American Psychiatric Press.

Liau HP, Peng MT. Suppressive effects of estrogen on food intake and body weight in senile female rats. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 1982;81:848-56.

Linden AM, Baez M, Bergeron M, Schoepp DD. Increased c-Fos expression in the centromedial nucleus of the thalamus in metabotropic glutamate 8 receptor knockout mice following the elevated plus maze test. *Neuroscience* 2003;121:167-78.

Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 1994;639:167-70.

Lyman MM, Okey R. Food intake and estrogenic hormone effects on serum and tissue cholesterol. *J Nutr* 1956;60:65-74.

Machinal-Quelin F, Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y. Direct in vitro effects of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue. *Endocrine* 2002;18:179-84.

Magarinos AM, Verdugo JM, McEwen BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14002-8.

Manoli LP, Gamaro GD, Silveira PP, Dalmaz C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res* 2000;25:915-21.

McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999;20:279-307.

McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:105-22.

McKittrick CR, Magarinos AM, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 2000;36:85-94.

McLay RN, Freeman SM, Zadina JE. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes Maze. *Physiol Behav* 1998;63:933-7.

Meites J. Relation of food intake to growth-depressing action of natural and artificial estrogens. *Am J Physiol* 1949;159:281-6.

Mikics E, Barsy B, Barsvari B, Haller J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm Behav* 2005;48:152-62.

Moore GJ, Bebchuk JM, Wilds IB, Chen G, Menji HK. Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet* 2000;356:1241-2.

Moosman B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effect of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8867-72.

Morgan MA, Pfaff DW. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Horm Behav* 2001;40:472-82.

Morgan MA, Pfaff DW. Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. *Behav Brain Res* 2002;132:85-93.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.

Munemura M, Agui T, Sibley DR. Chronic estrogen treatment promotes a functional uncoupling of the D2 dopamine receptor in rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 1989;124:346-55.

Munoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 1997;411:183-8.

Murphy M, Barranco J, Eckel LA. Time course of estradiol's inhibitory effect on meal size in female rats. *Appetite Abstr* 2001;37:154.

Murua VS, Molina VA. Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. *Behav Neural Biol* 1992;57:87-9.

Musselman DL, DeBattista C, Nathan KI, Kilts, CD, Schatzberg AF, Nemeroff CB. Biology of Mood Disorders. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, editors. *Textbook of psychopharmacology*. 2nd ed. Washington, 1998: American Psychiatric Press.

Myint AM, Kim YK. Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses* 2003;61:519-25.

Nemeroff CB, Bissette G, Akil H, et al. Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy: corticotropin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatin. *Br J Psychiatry* 1991;158:59-63.

Nemeroff CB, Krishnan KKR, Reed D, et al. Adrenal gland enlargement in major depression: a computed tomographic study. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49:384-7.

Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 1984;226:1342-4.

Nielsen CK, Arnt J, Sánchez C. Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: Interstrain and interindividual differences. *Behav Brain Res* 2000;107:21-33.

Nishimura JI, Endo Y, Kimura F. A long term stress exposure impairs maze learning performance in rats. *Neurosci Lett* 1999;273:125-8.

Nonaka S, Chuang DM. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats. *Neuroreport* 1998;9:2081-4.

Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2642-7.

Oliveira JM, Lima RP. *O Exame do Estado Mental*. Pelotas, 2000: Ed. Universitária – UFPel.

Oliveira JM; Magalhães PV; Magalhães LV. O uso de estrógenos na esquizofrenia: uma revisão sistemática de aplicações clínicas. *Rev Bras Psiquiat* 2004;26 (Sulp II):83

Opitz K, Schafer G. The effect of lithium on food intake in rats. *Int Pharmacopsychiatry* 1976;11(4):197-205.

Padovan CM, Del Bel EA, Guimarães FS. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2000;67:325-30.

Park CR, Campbell AM, Diamond DM. Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biological Psychiatry* 2001;50:994-1004.

Pascual T, Gonzales JL. A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Research* 1995;695:289-92.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-67.

Pinto-Ribeiro F, Almeida A, Pego JM, Cerqueira J, Sousa N. Chronic unpredictable stress inhibits nociception in male rats. *Neurosci Lett* 2004;359:73-6.

Plucino N, Genazzani AD, Bernardi F, Casarosa E, Pieri M, Palumbo M, Picciarelli G, Gabbanini M, Luisi M, Genazzani AR. Tibolone, transdermal estradiol or oral estrogen-progestin therapies: Effects on circulating allopregnanolone, cortisol and dehydroepiandrosterone levels. *Gynecological Endocrinology* 2005;20:144-9.

Prange AJ Jr, Wilson IC, Rabon AM, Lipton MA. Enhancement of imipramine antidepressant activity by thyroid hormone. *Am J Psychiatry* 1969;126:457-69.

Prange AJ Jr, Lara PP, Wilson IC, Alltop LB, Breese GR. Effects of thyrotropin-releasing hormone in depression. *Lancet* 1972;2:999-1002.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 2003;463:3-33.

Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav* 1993;54:1215-20.

Purba JS, Hoogendijk WJG, Hofman MA, et al. Increased number of vasopressin- and oxytocin-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in depression. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:137-43.

Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF. Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 1994;60:436-44.

Redrobe JP, Bourin M. The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. *Fundamental Clinical Pharmacology* 1999;13:293-9.

Reghunandanan V, Badgaiyan RD, Marya RK, Reghunandanan R, Maini BK. Lithium chloride SCN injection alters the circadian rhythm of food intake. *Chronobiol Int* 1989;6:123-9.

Ren M, Senatorov VV, Chen RW, Chuang DM. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia / reperfusion model. *Neuroscience* 2003;100:6210-15.

Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 1998;19:3-17.

Ridet JL, Malhotra A, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *TINS* 1997;20:570-7.

Rivera HM, Eckel LA. Estradiol increases fenfluramine-induced hypophagia in ovariectomized rats. *Abstr-Soc Neurosci* 2003;830-18.

Rocha, E. Efeitos do tratamento crônico com cloreto de lítio, produzindo litemia terapeuticamente relevante, sobre parâmetros neuroquímicos, comportamentais e morfologia de astrócitos em ratos. Dissertação de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, 1996.

Rocha E, Achaval M, Santos P, Rodnight R. Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. *Neuroreport* 1998; 9:3971-4.

Rossler AS, Joubert C, Chapouthier G. Chronic mild stress alleviates anxious behaviour in female mice in two situations. *Behav Processes* 2000;49:163-5.

Rubin RT, Phillips JJ, Sadow TF, et al. Adrenal gland volume in major depression: increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:213-8.

Rusa R, Alakayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus J, Hurn PD. 17-beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen deficient female animals. *Stroke* 1999;30:1665-9.

Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;280:720-5.

Sachar E, Hellman L, Fukushima D, et al. Cortisol production in depressive illness. *Arch Gen Psychiatry* 1970;23:289-298.

Sak K, Everaus H. Nongenomic effects of 17 β -estradiol – diversity of membrane binding sites. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2004;88:323-35.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications of aging. *J Neurosci* 1985;5:1222-7.

Sapolsky RM, Krey LC, MacEwen BS. The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid hypothesis. *Endocr Rev* 1986;7:284-301.

Sapolsky RM. Stress, glucocorticoids, damage to the nervous system: Current state of confusion. *Stress* 1996;1:1-19.

Sapolsky RM. *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death*. Cambridge, 1992: MIT Press.

Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry* 2000;48:755-65.

Saunders-Pullman R, Godon-Elliott J, Parides M, Fahn S, Saunders HR, Bressman S. The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology* 1999;52:1417-21.

Schatzberg AF, Nemeroff CB. *Textbook of psychopharmacology*. 2nd ed. Washington, 1998: American Psychiatric Press.

Schatzberg AF, Rothschild AJ, Bond TC, et al. The DST in psychotic depression: diagnostic and pathophysiologic implications. *Psychopharmacol Bull* 1984;20:362-4.

Shou M. Artistic productivity and lithium prophylaxis. *Br J Psychiatry* 1979;135:97-103.

Silva RH, Frussa-filho R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. *Journal of Neuroscience Methods* 2000;102:117-25.

Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O' Donnell L, Davis S, Jones M. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:131-7.

Smith DF. Lithium and carbamazepine: effects on learned taste aversion and open field behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18:483-8.

Smith GP. Animal models of human eating disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1989;575:63-74.

Smith GP. The direct and indirect controls of meal size. *Neurosci Biobehav Rev* 1996;20:41-6.

Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Sapolsky RM, Phares C, Craddock SD, Brooke SM, Mattson MP. Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:585-98.

Stefanis CN, Stefanis NC. Diagnóstico dos transtornos depressivos: uma revisão. In: Maj M, Sartorius. *Transtornos Depressivos*. 2ed. Porto Alegre, 2005: Artmed.

Sullivan LW, Smith TC. Influence of estrogens on body growth and food intake. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;96:60-4.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 2005;4:141-94.

Swartz CM, Wilcox J. Characterization and prediction of lithium blood levels and clearances. *Arch Gen Psychiatry* 1984;41:1154-8.

Tabajara AS, Fontella FU, Torres IL, Dalmaz C. Gender differences in oxidative stress in spinal cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochem Res* 2003;28:1315-20.

Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. 1998;16:235-9.

Tarttelin MF, Gorski RA. The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *Acta Endocrinol* 1973;72:551-68.

Thompson BL, Erickson K, Schulkin J, Rosen JB. Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala. *Behav Brain Res* 2004;149:209-15.

Thompson TL. Attenuation of dopamine uptake in vivo following priming with estradiol benzoate. *Bain Res* 1999;834:164-7.

Thompson TL, Certain ME. Estrogen mediated inhibition of dopamine transport in the striatum: regulation by G alpha i/o. *Eur J Pharmacol* 2005;511:121-6.

Thompson TL, Moore CC, Smith B. Estrogen priming modulates autoreceptor-mediated potentiation of dopamine uptake. *Eur J Pharmacol* 2000;401:357-63.

Tinelli A, Menis T, Brotto F, Tinelli R, Tinelli FG. Depression, menopause and hormonal replacement therapy (HRT). *Minerva Ginecol* 2003;55:221-31.

Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 1985;9:203-22.

Van Seumeren I. Weight gain and hormone replacement therapy: are women's fears justified? *Maturitas* 2000;34:S3.

Vasconcellos APS, Tabajara AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaz C. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiology & Behavior* 2003;79:143-9.

Vasconcellos APS. Tratamento Crônico com Lítio em um modelo de estresse crônico variável: efeitos sobre a nocicepção, a ansiedade, a memória espacial, e sobre o imunocontéudo de beta-tubulina III e proteína glial fibrilar ácida. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, 2002.

Vasconcellos APS, Zugno AI, Dos Santos AH, Nietto FB, Crema LM, Goncalves M, Franzon R, de Souza Wyse AT, da Rocha ER, Dalmaz C. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:102-10.

Viguera AC, Tondo L, Baldessarini RJ. Sex differences in response to lithium treatment. *Am J Psychiatry* 2000;157:1509-11.

Vollmann-Honsdorf GK, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in the shrew hippocampus. *Neuroscience Letters* 1997;233:121-124.

Wade GN. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol Behav* 1972;8:523-34.

Wade GN, Gray JM, Bartness TJ. Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 1985;9:83-92.

Wade GN, Gray JM. Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* 1979;22:583-93.

Walden J, Grunze H. *Bipolar affective disorder*. Germany, 2000: Georg Thieme Verlag.

Watson SJ, Lopez JF, Young EA, et al: Effects of low dose ovine corticotropin-releasing hormone in humans: endocrine relationships and beta-endorphin/beta-lipotrophin responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;66:10-15.

Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D. β -Amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol* 2000;392:117-23.

Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, Chuang DM. Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of huntington's disease. *Neuroscience* 2001;106:603-12.

Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:131-6.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 1992;16:525-34.

Wise PM. Estrogens and neuroprotection. *Trends Endocrinol* 2002;13:229-30.

Wooley CS, Gould E, McEwen BS. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 1990;531:225-31.

Wurtman JJ, Baum MJ. Estrogen reduces total food and carbohydrate intake, but not protein intake, in female rats. *Physiol Behav* 1980;24:823-7.

Yates FE, Maran JW: Stimulation and inhibition of adrenocorticotropin release. In *Handbook of Physiology*. Vol 4. Knobil e Sawyer WH Ed. Washington, 1974: American Physiology Society.

Yatham LN, Kennedy SH, O'Donovan C, Parikh S, MacQueen G, McIntyre R, Sharma V, Silverstone P, Alda M, Baruch P, Beaulieu S, Daigneault A, Milev R, Young LT, Ravindran A, Schaffer A, Connolly M, Gorman CP; Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disord*. 2005;7 Suppl 3:5-69.

Yazici K, Pata O, Yazici A, Aktas A, Tot S, Kanik A. The effects of hormone replacement therapy in menopause on symptoms of anxiety and depression. *Turk Psikiyatri Derg* 2003;14:101-5.

Young EA, Watson SJ, Kotun J, et al. Beta-lipotropin-beta-endorphin response to low-dose ovine corticotropin releasing factor in endogenous depression. *Arch Gen Psychiatry* 1990;47:449-57.

Zamin LL. Neuroprotective effect of 17 beta-estradiol in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no curso de Ciências-Biológicas Ênfase Molecular, Celular e Funcional na UFRGS, agosto de 2003.

Zhou R, Gray NA, Yuan P, Li X, Chen J, Chen G, Damschroder-Williams P, Du J, Zhang L, Manji HK. The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers. *J Neurosci* 2005;25:4493-502.

Zis KD, Zis A: Increased adrenal weight in victims of violent suicide. *Am J Psychiatry* 1987;144:1214-5.

Zuo DY, Zhang YH, Cao Y, Wu CF, Tanaka M, Wu YL. Effect of acute and chronic MK-801 administration on extracellular glutamate and ascorbic acid release in the prefrontal cortex of freely moving mice on line with open-field behavior. *Life Sci* 2005; Nov 6; [Epub ahead of print]

8. DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram apresentados parcialmente na forma de pôsteres nos seguintes eventos:

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ESTRESSE, LÍTIO E ESTRADIOL SOBRE PARÂMETROS DE ANSIEDADE E ATIVIDADE LOCOMOTORA Mai, N.; Oliveira, J.M.; Gonçalves, M.; Lagranha, L.D.; Vasconcellos, A.P.S.; Dalmaz, C.; Rocha, ER.

Salão de Iniciação Científica, UFRGS – 2004

INGESTÃO DE ALIMENTO PALATÁVEL POR RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO E TRATADOS COM LÍTIO E ESTRADIOL.

Oliveira, J.M.; Gonçalves, M.; Lagranha, L.D.; Mai, N.; Vasconcellos, A.P.S.; Pilla C.; Dalmaz, C.; Rocha, ER. Departamento de Bioquímica e PPG Neurociências, ICBS - UFRGS.

FeSBE – 2005

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO E ESTRADIOL SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Oliveira, J.M.; Gonçalves, M.; Lagranha, L.D.; Mai, N.; Vasconcellos, A.P.S.; Pilla C.; Dalmaz, C.; Rocha, ER. Departamento de Bioquímica e PPG Neurociências, ICBS - UFRGS.

FeSBE – 2005

EFEITOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO E ESTRADIOL EM RATAS SUBMETIDAS A ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Lagranha, L.D.; Oliveira, J.M.; Gonçalves, M.; Mai, N.; Vasconcellos, A.P.S.; Pilla C.; Dalmaz, C.; Rocha, ER. Departamento de Bioquímica e PPG Neurociências, ICBS - UFRGS.

Salão de Iniciação Científica, UFRGS – 2005