

UFRGS
DEPTO. DE FISILOGIA
BIBLIOTECA

EFEITOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS DA DIFENILHIDANTOÍNA (DFH)
EM RATOS HIPONATRÊMICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, concentração
Fisiologia, da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul

Norma Anair Possa Marroni

Porto Alegre, 1980

A meus pais João e Wilma
por tudo que fizeram por mim.

Ao Claudio pelo carinho
e compreensão em todas as horas
e às minhas filhas Christiane,
Sabine e Caroline.

Agradecimento especial

ao Prof. Dr. Mario Tannhauser pe
la orientação, apoio e amizade que pro
piciaram a realização deste trabalho

ã Profa. Dra. Semíramis Lehnemann
Tannhauser pelas inúmeras sugestões e
críticas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos professores e colegas que de uma maneira ou de outra tornaram possível a realização deste trabalho, em especial,

à Profa. Carmen Mundt Britto pela amizade, incentivo e críticas;

ao Prof. Dr. João Palermo Neto pelas sugestões na elaboração do manuscrito;

à Bibliotecária Iara Goulart Guerisoli pela revisão das referências bibliográficas;

à Profa. Sídia Callegari Jacques pela orientação na análise estatística e gráficos;

à Dra. Helena Maria Tannhauser Barros e ao Doutorando Luiz Mário B. Netto pelo auxílio em alguns experimentos;

ao Prof. Paulo Coimbra Guedes pela eficiente revisão do português;

à Lizete Bizarro Cesar e Uiraçara Villarinho da Silva pelo trabalho inicial de datilografia.

ao Dr. Sérgio Goldani, Chefe do Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

ao Dr. João Clóvis Britto do Laboratório Central da Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre;

ao Dr. Marco Aurélio Bocchese do Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Agradecemos por possibilitarem a realização das dosagens bioquímicas

à Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre, onde foi realizado este trabalho.

SUMÁRIO

	Página nº
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Planejamento experimental	13
3.1.1. Animais, alimentação e constituição dos grupos	13
3.1.2. Preparação dos animais	14
3.2. Procedimentos para a avaliação comportamental .	15
3.2.1. Condicionamento de esQUIVA ativa de duas vias	15
3.2.2. Condicionamento de esQUIVA passiva	16
3.2.3. Pseudocondicionamento	17
3.3. Técnica para coleta de sangue	18
3.3.1. Determinação do hematócrito	18
3.3.2. Determinação de Na ⁺ e K ⁺	19
3.3.3. Determinação da glicemia	19
3.3.4. Determinação dos níveis séricos de DFH .	19
3.4. Análise estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Condicionamento de esQUIVA ativa de duas vias .	21
4.2. Condicionamento de esQUIVA passiva	25
4.3. Pseudocondicionamento	25
4.4. Determinações sangüíneas	30
4.4.1. Hematócrito	30
4.4.2. Determinações séricas de Na ⁺ e K ⁺	30
4.4.3. Glicemia	35
4.4.4. Determinação sérica de difenilhidantoína	35
5. DISCUSSÃO	39
6. RESUMO E CONCLUSÕES	50
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página nº
1. Efeito da hiponatremia e da administração de difenilhidantoína (DFH) na aquisição de um condicionamento de esquiva ativa de duas vias em ratos (4 horas)	22
2. Efeito da hiponatremia na aquisição de um condicionamento de esquiva ativa de duas vias em ratos (12 horas)	24
3. Efeito da hiponatremia e da administração de difenilhidantoína (DFH) no condicionamento de esquiva passiva em ratos (4 horas)	26
4. Efeito da hiponatremia no condicionamento de esquiva passiva em ratos (12 horas)	27
5. Efeito da duração da hiponatremia nas respostas pseudocondicionadas em ratos	28
6. Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína no hematócrito de ratos	31
7. Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína na natriúria e potassemia de ratos	33
8. Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína na glicemia de ratos	36
9. Níveis séricos de difenilhidantoína em ratos controles e hiponatrêmicos	38

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página nº
1. Porcentagens de respostas condicionadas de esquiva ativa de ratos controles (C) ou, hiponatrêmicos (H) injetados ou não com difenilhidantoína (DFH)	23
2. Porcentagens de respostas pseudocondicionadas de ratos controles (C) e hiponatrêmicos (H).....	29
3. Porcentagem dos hematócritos de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H), injetados ou não com Difenilhidantoína (DFH)	32
4. Valores de Natremia e Potassemia de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H), injetados ou não com difenilhidantoína (DFH)	34
5. Média de glicemia de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H) injetados ou não com difenilhidantoína (DFH)	37

1. INTRODUÇÃO

A atividade celular está na dependência de água e eletrólitos, uma vez que muitos íons modificam a consistência protoplasmática, a seletividade da membrana e a atividade enzimática celular. Os sais são constituintes obrigatórios das células e do líquido extracelular. A maioria das células tem níveis mais baixos de Na^+ e Cl^- e concentrações intracelulares mais elevadas de K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e fosfatos do que o meio extracelular (PROSSER e BROWN, 1961). As concentrações iônicas conferem aos líquidos orgânicos dos animais uma certa osmolaridade sendo o Na^+ , sem dúvida, o parâmetro mais importante, uma vez que a sua concentração é de 135 a 145 mEq/l. Desvios de Na^+ sérico são corrigidos por adição de água livre, em caso de hipernatremia ou por subtração de água livre em caso de hiponatremia (TRUNIGER, 1977). Água livre refere-se à quantidade de água isenta de solutos que seria adicionada ou subtraída da urina para manter a sua osmolaridade igual à do plasma. Em termos aritméticos a produção de água livre é igual ao volume de urina menos a depuração osmolar. A água livre é gerada no néfron ao nível dos chamados segmentos de diluição, ramo ascendente da alça de Henle e túbulo contornado distal, que tem a propriedade de reabsorver Na^+ sem acompanhamento de água, deixando, na luz tubular, fluido hipotônico (MALNIC e MARCONDES, 1969; MUDGE, 1975). Nas porções terminais do néfron este fluido vai ser alterado pela ação da aldosterona e do hormônio antidiurético, dependendo do equilíbrio hidroeletrólítico do indivíduo.

Entende-se por hiponatremia a depleção acentuada dos eletrólitos

litos extracelulares, que pode ser obtida pela administração de uma solução de glicose isosmolar a 5,5% por via intraperitoneal; uma redução semelhante pode ser conseguida pela administração de água por via oral (SWINYARD, TOMAN e GOODMAN, 1946).

Considerando o organismo como um todo, as funções do sistema nervoso central (SNC) e do sistema neuromuscular parecem ser as mais severamente alteradas pela hipoosmolaridade, aparecendo de fato, nestas condições, sintomas de cansaço, letargia, confusão, delírios, tremores musculares e convulsões, desorientação, náuseas e vômitos, perda de memória e afasia (WYNN, 1956; SWANSON e ISERI, 1958; GRANTHAM, 1977). Esses sintomas são observados com níveis séricos de Na^+ variando de 125 a 110 mEq/l (CATHELINEAU e SURBLED, 1976).

A hiponatremia, que se caracteriza por concentrações diminuídas do íon Na^+ e retenção anormal de água, leva ao aparecimento da intoxicação hídrica. Essa alteração iônica, sem produzir epilepsia, pode levar a uma diminuição do limiar convulsivamente (SWINYARD, 1949). SWINYARD, TOMAN e GOODMAN (1946) observaram uma redução de 56% do limiar convulsivamente ao eletrochoque de 60 Hz em animais com alteração do meio interno, produzida pela administração oral de água ou administração intraperitoneal de glicose isosmolar. A hiponatremia obtida pela combinação da administração de água por via oral e administração de glicose isosmolar intraperitoneal resulta em redução acentuada do limiar convulsivamente, fazendo com que não haja necessidade de eletrochoque de 60 Hz para desencadeá-las, assim as convulsões podem ocorrer espontaneamente. Animais hiponatrêmicos que apresentam essa redução do limiar podem ser considerados como um modelo e foram incluídos no

conjunto de testes para avaliar fármacos antiepilépticos (SWINYARD, 1949; SWINYARD, BROWN e GOODMAN, 1952). Esse procedimento pode ser realizado tanto em camundongos como em ratos. De fato, o estado hiponatrêmico máximo é atingido em camundongos em 2 horas e em ratos em 4 horas. Após 4 a 6 horas a quantidade de líquido presente na cavidade abdominal é aproximadamente igual à administrada, com composição praticamente igual à do plasma (DARROW e YANNET, 1935).

Tem sido enfatizado que a hiponatremia aguda é mais nociva do que quando a concentração de Na^+ sérico é reduzida lentamente a níveis equivalentes, como nos processos crônicos. Assim, parece haver ajustamentos celulares no organismo para compensar esses estados de hiposmolaridade, ajustamentos estes que não ocorrem somente em mamíferos, mas também em animais inferiores e plantas (GRANTHAM, 1977). Nas convulsões devidas à hiponatremia e à intoxicação hídrica foi observada uma relação direta entre a retenção de água e a frequência das crises convulsivas (WEIR, LARSON, ROWN TREE, 1922).

No cérebro, não havendo modificações da água total ou de sua distribuição, ocorre uma diminuição do conteúdo de Na^+ e K^+ que é proporcional ao decréscimo de Na^+ sérico. Desta forma, a liberação de K^+ intracelular é o mecanismo pelo qual as células cerebrais se adaptam à depleção extracelular de eletrólitos e impedem a hidratação de suas células (SWINYARD, TOMAN e GOODMAN, 1946; WOODBURY, 1956; KATZMAN e PAPPUS, 1973).

Na hiponatremia crônica severa, produzida pela administração de água e vasopressina por 3 dias, os níveis de Na^+ sérico foram de 102 mEq/l. Nestas condições, o aumento no conteúdo de água ce

rebral foi mínimo, equivalente a 3%, enquanto que o conteúdo de K^+ diminuiu em cerca de 20% em relação à diminuição do conteúdo de Na^+ (DILA e PAPPUS, 1972). HOLLIDAY, KALAYCI e HARRAH (1968) estudaram os conteúdos cerebrais de água em estados hiponatrêmicos e hipernatrêmicos. A hiponatremia era induzida por carga de água e vasopressina e a hipernatremia por infusão de NaCl a 7,5% ou ingestão de solução salina 0,9% em vez de água. Os resultados mostraram que as alterações agudas na quantidade da água celular relacionam-se com as modificações do conteúdo da Na^+ extracelular. Entretanto, com alterações sustentadas na osmolaridade, esta relação não se mantém; este fato mostra que o cérebro tem mecanismos para o ajustamento do volume ao normal, em ambas as situações pesquisadas. Curiosamente, o mesmo não ocorre em outros órgãos e tecidos como o coração, a pele, o músculo esquelético e o osso (WOODBURY, 1956).

Quando ocorre expansão de volume hipotônico, induzido pela administração de água e vasopressina, há um marcado aumento na secreção de aldosterona que, como se sabe, tem papel crítico na manutenção dos equilíbrios hidro-eletrolítico e ácido-básico do organismo.

No mesmo sentido, mostrou-se também em cães e em pacientes nefrectomizados e submetidos a uma redução aguda de Na^+ plasmático, um marcado aumento na secreção de aldosterona, não participando, portanto, o sistema renina-angiotensina renal; o mesmo não ocorre em animais hipofisectomizados. De fato, há evidências da existência de fatores hipofísarios, não semelhantes ao ACTH, envolvidos na regulação da secreção de aldosterona durante alterações do balanço de Na^+ (MCCAA, YOUNG, GUYTON e MCCAA, 1974). O cérebro

bro parece possuir um sistema renina-angiotensina próprio. Esse sistema opera independente do sistema renal e não é alterado pela nefrectomia. Como a renina está presente nos sinaptosomas mas não no fluido cérebro-espinhal, é provável que a sua síntese seja intraneuronal (RENAUD, PADJEN, 1978).

Convulsões, independente da causa original, parecem ser ocasionadas por modificações das concentrações iônicas nos espaços extracelulares do cérebro (TOWER, 1960, 1969; GLASER, 1964; HILLMAN, 1970). Assim, mudanças do gradiente iônico normal entre os componentes intra e extracelulares do tecido nervoso ocorrem durante a atividade convulsivante induzida por uma variedade de métodos (TOWER, 1960, 1969). Nestas condições, as alterações das concentrações iônicas intra e extracelulares, particularmente de Na^+ e K^+ , podem ser fatores primários da produção de hiperexcitabilidade neuronal em um foco epileptogênico já existente.

Para investigar essas influências, GLASER (1972) desenvolveu um modelo experimental que utiliza uma técnica de perfusão intraventricular localizada. Este método permite fazer uma perfusão intraventricular de concentrações crescentes de K^+ ; o acúmulo desse íon no espaço extracelular seria um fator desencadeante de epilepsia, como já havia sido demonstrado por ZUCKERMANN e GLASER (1968) no hipocampo dorsal, onde a difusão de K^+ extracelular $[(\text{K}^+)_e]$ seria mínima provavelmente devido à morfologia diferenciada dessa área. A estrutura anatômica do hipocampo é relativamente simples com suas células dispostas de uma forma laminar e com um número menor de tipos celulares do que o neocórtex. Os espaços extracelulares desta estrutura são relativamente estreitos, de 100 a 150 Å, e pouco ramificados (GREEN, 1964). De fato, no cé

rebro a concentração extracelular normal de K^+ é da ordem de 3 a 4 mEq/l; a concentração desse íon no líquido cefalorraquidiano do rato é de 3,2 mEq/l (REED, WITHROW e WOODBURY, 1966). Já se verificou que no hipocampo a atividade sináptica atinge maior eficiência no que se refere ao aprendizado e memória quando o $(K^+)_e$ atinge níveis de 11 mEq/l. Descargas epilépticas seriam desencadeadas no nível crítico de 34 mEq/l, ou seja, aproximadamente 10 vezes o nível normal em estado de repouso. Nessa concentração de $(K^+)_e$ não haveria, teoricamente, necessidade de estímulos aferentes para produzir epilepsia (IZQUIERDO e IZQUIERDO, 1971; IZQUIERDO, NASELO e MARICHICH, 1971; IZQUIERDO, 1972).

Estudos onde foram usados microeletrodos de K^+ não determinaram um limiar de $(K^+)_e$ para desencadear a atividade epiléptica; concluiu-se que o aumento de concentração desse íon não é causa mas sim consequência da atividade neuronal alterada. O nível de $(K^+)_e$ parece não ser um fator crítico para iniciar ou terminar a atividade epiléptica, mas desempenha um papel de modulador da atividade neuronal (MOODY, FUTAMACHI e PRINCE, 1974; PEDLEY, FISHER, FUTAMACHI e PRINCE, 1976). De fato, o aumento exagerado de $(K^+)_e$ leva a uma despolarização das células neuronais e gliais com cessação de toda a atividade e pode levar à depressão alastrante (SOMJEN, 1979).

Através desta bibliografia infere-se que tanto na hiponatremia como nas epilepsias humana e experimental ocorre uma distribuição anormal de cátions que diminuem o limiar convulsivo; no líquido extracelular há aumento da concentração de K^+ e diminuição da concentração de Na^+ . Estas alterações seriam responsáveis pelo aumento de excitabilidade cerebral (SWINYARD, 1949; WOODBURY,

1956) e pela iniciação da atividade paroxística repetitiva característica de epilepsia (MISON-CRIGHEL, PINTILIE, FLORESCU, TUDOR e VOLANSCHI, 1973), o que se deve à despolarização parcial da membrana neuronal.

Convulsões epilêpticas experimentais ou clínicas podem ser alteradas por fármacos. As hidantoínas foram descobertas por BAYER em 1861, mas, por serem tóxicas e terem pequena eficácia, poucas substâncias deste grupo têm uso clínico. A difenilhidantoína (DFH) foi sintetizada em 1908 como resultado de pesquisas planejadas de fármacos capazes de suprimir convulsões experimentais por eletrochoque e foi introduzida na clínica por MERRIT e PUTNAM (1938). Em 1939 estes autores relacionaram a síndrome cerebelar aguda, tremores, nistagmo, ataxia, diplopia e disartria como efeitos adversos desse fármaco (WOODBURY e FINGL, 1975).

A DFH modifica as características da convulsão experimental por eletrochoque, abolindo a fase tônico-extensora das patas posteriores do animal de experimentação (TOMAN, SWINYARD e GOODMAN, 1946). Reduz a potenciação pós-tetânica, sugerindo-se que, através desse mecanismo impeça o alastramento da convulsão (ESPLIN, 1957; IZQUIERDO e NASELLO, 1970). A DFH previne a hiperexcitabilidade não só "in vivo" mas também em nervos periféricos isolados (TOMAN, SWINYARD e GOODMAN, 1946). Curiosamente, não eleva o limiar convulsivante em animais normais, mas o eleva, significativamente, após sua redução pela remoção de eletrólitos extracelulares. Estudos foram realizados sobre o efeito desse fármaco no conteúdo de eletrólitos em cérebros normais e hiperexcitados. Da mesma maneira que a hiponatremia, convulsões máximas por eletrochoque produzem alterações marcadas sobre os eletrólitos extracelulares.

res do cérebro (SWINYARD, 1949; SWINYARD, BROWN e GOODMAN, 1952).

WOODBURY (1955), demonstrou que a DFH diminui as concentrações intracelulares de Na^+ no cérebro em animais normais, mantendo inalterada a concentração de Na^+ extracelular; aumenta, pois, a relação extra e intracelular de Na^+ , sem modificar a mesma relação para o K^+ . Também verificou que a DFH aumenta o "turnover" de Na^+ radioativo em animais normais, previne o aumento das concentrações de Na^+ e a diminuição das concentrações de K^+ intracelularmente, o que caracteriza a hiponatremia aguda. O fármaco não só previne o aumento da concentração de Na^+ intracelular nas convulsões máximas por eletrochoque, mas, também, diminui essa concentração em relação a animais do grupo controle. Com essas observações, conclui-se que a DFH estimula os processos metabólicos envolvidos na bomba de sódio/potássio (GROSMAN e JURNA, 1974).

Por outro lado, como o mecanismo íntimo da ação dos fármacos antiepilépticos é complexo e insuficientemente explicado foi feita a hipótese de que a DFH age estabilizando a membrana neuronal (KOREY, 1951).

Um dos sistemas enzimáticos mais importantes no transporte de cátions através de membranas é a ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dependente (SKOU, 1957). MISON-CRIGHEL, PINTILIE, FLORESCU, TUDOR e VOLANSCHI (1973) estudaram a influência da DFH e do fenobarbital nos sistemas envolvidos no transporte de cátions através de membranas e correlacionaram este efeito com a eficácia do tratamento da epilepsia. Esses autores demonstraram que, em pacientes epiléticos não tratados, a atividade da ATPase $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dos eritrócitos era maior do que nos indivíduos controles não epiléticos e que, sob efeito da DFH e do fenobarbital havia uma tendência à restauração da ativi

dade enzimática, numa estreita correlação com os níveis sanguíneos e, conseqüentemente, com a dose administrada dos fármacos. Concomitantemente, o K^+ plasmático dos pacientes epilêpticos estava aumentado.

No mesmo sentido, FESTOFF e APPEL (1968) verificaram, em sinaptosomas isolados de córtice de ratos, que o efeito da DFH sobre a ATPase Na^+K^+ dependente estava relacionada não só com a concentração mas também com as proporções relativas de Na^+ e K^+ . Dependendo desses parâmetros, a DFH pode não só estimular em maior ou menor grau a atividade enzimática como também não ter efeito.

Em adição, vale a pena lembrar que a DFH não atua somente no SNC sendo que seus efeitos iônicos e enzimáticos podem ocorrer em diferentes células do organismo, como nas células beta-pancreâticas, onde alteram o metabolismo hormonal, podendo, mesmo, produzir hiperglicemia. Os mecanismos propostos para explicar esse efeito hiperglicemiante estariam relacionados à inibição da liberação de insulina (KISER, VARGAS-CORDON, BRENDDEL, BRESSLER, 1970; LEVIN, BOOKER, SMITH, GRODSKY, 1970; LEVIN, GRODSKY, HAGURA, SMITH, 1972).

Sobre os prováveis mecanismos de ação e os efeitos antiepilêpticos da DFH existem inúmeros trabalhos na literatura. No entanto, seus efeitos sobre o comportamento só recentemente têm sido pesquisados. O fármaco influencia o comportamento e afeta o processo sensorial, o estado de humor, a motivação e a atividade motora. Nas pesquisas que estudam os efeitos de drogas nesses fenômenos a maior dificuldade conceitual é a de distinguir os efeitos farmacológicos que alterariam o aprendizado e a memória de outros efeitos paralelos que influenciariam o comportamento como um todo (McGAUGH, 1973).

Entre os métodos utilizados para o estudo do comportamento, aprendizado e memória estão os testes de condicionamento de esquiva ativa, esquiva passiva e pseudocondicionamento. A DFH administrada pré-treinamento diminui a aquisição das respostas condicionadas de esquiva ativa de duas vias, efeito, este, dose-dependente, semelhante ao apresentado pelo canabidiol, carbamazepina, mefenitoína e primidona e não apresentados pelo fenobarbital e trimetadiona. Nenhum desses fármacos, no entanto, altera a retenção quando a administração é feita após o treinamento (IZQUIERDO e NASELLO, 1973; TANNHAUSER, 1973; IZQUIERDO, TANNHAUSER e TANNHAUSER, 1973; TANNHAUSER, TANNHAUSER, BARROS e BARROS, 1979). No condicionamento de esquiva ativa de duas vias, o desempenho pode ser devido a efeitos centrais e periféricos. Para excluir essa última possibilidade usa-se o teste do pseudocondicionamento. Assim, alguns anticonvulsivantes que interferem na aquisição de respostas de esquiva ativa de duas vias, como a DFH, carbamazepina e primidona não alteram as respostas pseudocondicionadas que são aumentadas pela mefenitoína; isso sugere que esses fármacos atuam por mecanismos centrais e não periféricos (TANNHAUSER, TANNHAUSER, BARROS e BARROS, 1979). Por outro lado, fármacos que não alteram as respostas de aquisição como o fenobarbital e a trimetadiona alteram as respostas pseudocondicionadas (IZQUIERDO, TANNHAUSER e TANNHAUSER, 1973; IZQUIERDO, 1974a). Um método para avaliar a retenção é o condicionamento de esquiva passiva; dos anti-epilépticos anteriormente citados somente a mefenitoína diminui essas respostas (THOMÉ, BARBISAN, TANNHAUSER e TANNHAUSER, 1977).

Os efeitos comportamentais e periféricos provocados pela hiponatremia, que é considerada um modelo de epilepsia experimental, não foram ainda estudados. A hiponatremia traz modificações iônicas cerebrais que podem levar ao aparecimento de convulsões espontâneas, efeitos esses que podem ser antagonizados pela DFH. Sendo a epilepsia uma patologia que se correlaciona com deficiência de aprendizado e de memória, fato esse que pode ser controlado pelo emprego de fármacos antiepilépticos, seria, a nosso ver, de máxima importância, usar um modelo de hiponatremia para investigar estes fatos. Seria, também, necessário avaliar as alterações fisiológicas que ocorrem nessas situações numa tentativa de correlacioná-la com efeitos centrais e periféricos de fármacos antiepilépticos.

2. OBJETIVOS

São objetivos do presente trabalho

- a. Verificar os efeitos da hiponatremia
 - a.1. na aquisição de respostas condicionadas de esquiva ativa de 2 vias,
 - a.2. no condicionamento de esquiva passiva,
 - a.3. no pseudocondicionamento;

- b. Verificar os efeitos da administração de difenilhidantoína em ratos hiponatrêmicos:
 - b.1. no condicionamento de esquiva ativa de 2 vias,
 - b.2. no condicionamento de esquiva passiva;

- c. Determinar o hematócrito e as concentrações de sódio, potássio e glicose séricos em ratos hiponatrêmicos tratados ou não tratados com difenilhidantoína;

- d. Determinar as concentrações séricas de difenilhidantoína em ratos hiponatrêmicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Planejamento experimental*

3.1.1. *Animais, alimentação e constituição dos grupos*

Foram utilizados 411 ratos Wistar, machos e fêmeas, pesando 150 a 250 gramas, no início dos experimentos, provenientes do Biotério da disciplina de Farmacologia do Departamento de Fisiologia da Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre.

Os animais, marcados individualmente, foram pesados, colocados em gaiolas e alimentados com ração e milho fornecidos "ad libitum"; tanto a alimentação como a água foram retiradas 4 ou 12 horas antes do início do trabalho experimental.

Os grupos experimentais foram organizados ao acaso, sendo constituídos de machos e fêmeas nos diferentes experimentos realizados. As observações de comportamento foram testadas através do condicionamento de esquiva ativa de duas vias, condicionamento passivo e pseudocondicionamento. Além das observações comportamentais foram retiradas amostras de sangue da aorta abdominal para a determinação do hematócrito e para a dosagem de Na^+ , K^+ , glicose e DFH no soro.

Os animais agrupados foram submetidos às seguintes condições experimentais:

a) Controle Intacto (CI) - animais que foram injetados com 0,2 ml de solução fisiológica.

b) Controle (C) - animais que foram injetados com 10 ml/100 g

de peso corporal de solução fisiológica.

c) Controle com Difenilhidantoína (C + DFH) - animais que, 2 horas após a administração de solução fisiológica, recebiam DFH.

d) Hiponatremia (H) - animais que foram injetados com solução de glicose a 5,5%, 10 ml /100 g de peso corporal.

e) Hiponatremia e DFH (H + DFH) - hiponatremia realizada como no item anterior e administração de DFH duas horas após a injeção de glicose.

Os animais controles intactos não foram usados para avaliação de comportamento, mas somente para as determinações do hematócrito e para as dosagens de Na^+ , K^+ e glicose. Todas as administrações foram feitas por via intraperitoneal.

3.1.2. *Preparação dos animais*

A hiponatremia aguda experimental foi obtida pela administração de solução de glicose¹, a 5,5% por via intraperitoneal, na dose de 10 ml/100 g de peso corporal. Para a administração da glicose usava-se seringa de 20 ml (BD Yale, Luer-Lok) e agulha hipodérmica 10/7 (BD, Luer-Lok). A glicose era pesada em balança de precisão (Sartorius-Werke, Göttingen - Mod. J I/200 g). A solução era preparada imediatamente antes de ser utilizada, aquecida até a temperatura de 37°C, sendo administrada 4 horas ou 12 horas antes do início dos experimentos.

Os animais controles recebiam intraperitonealmente uma inje

¹ Dextrose - Anidra, J.T. Baker

ção de solução fisiológica no volume de 10 ml/100 g de peso corporal com seringa de 20 ml (BD Yale, Luer-Lok) e agulha hipodérmica 10/7 (BD, Luer-Lok). A solução fisiológica era preparada imediatamente antes da administração e mantida a 37°C. Após 4 ou 12 horas da administração da solução fisiológica iniciávamos os experimentos.

Os animais tratados com difenilhidantoína sódica (DFH)² eram injetados intraperitonealmente com uma dose de 40 mg/kg de peso corporal de uma suspensão de 40 mg/ml de DFH em solução fisiológica com gotas de Tween 80. Era sempre administrada 2 horas antes do início de cada experimento usando-se para tal uma seringa de 1 ml, (Tuberculina B.D.) e agulha 25/7 (BD, Luer-Lok).

3.2. *Procedimentos para a avaliação comportamental*

3.2.1. *Condicionamento de esquiva ativa de duas vias*

Utilizaram-se 89 ratos de ambos os sexos, pesando em média 180 gramas; foram constituídos 6 grupos que receberam os seguintes tratamentos: solução fisiológica, solução fisiológica + DFH, glicose 5,5% e glicose 5,5% + DFH nos quais o teste foi realizado 4 horas após administração; e solução fisiológica e glicose 5,5% nos quais o teste foi realizado 12 horas após a aplicação dos fármacos.

Cada animal era submetido a 50 sons de uma campainha, duran

² Epelin, Parke-Davis

do a sessão de condicionamento 25 minutos. Antes de cada sessão o animal ficava aproximadamente 10 minutos na caixa de Warner mo dificada para adaptação (FRANK, BOVET e GATTI, 1961). Após este tempo tocava-se a campainha (estímulo condicionado) durante 5 se gundos; o animal levava, depois, um choque através das patas pro veniente do assoalho gradeado da caixa (estímulo incondicionado). O som era repetido de 30 em 30 segundos e era interrompido quando o animal cruzava para o outro lado, antes dos 5 segundos, quando não recebia o choque; este desempenho era considerado como respos ta condicionada de esquiva ativa de duas vias (IZQUIERDO e ORSIN GHER, 1972). É ativa por que o animal tem que se deslocar para esquivar-se ao choque e é de duas vias por ser considerado tanto o deslocamento da direita para esquerda como da esquerda para a direita.

3.2.2. *Condicionamento de esquiva passiva*

Utilizaram-se 89 ratos de ambos os sexos, pesando em média 180 gramas; foram constituídos 6 grupos com os mesmos tratamentos do condicionamento de esquiva ativa. Os animais eram colocados numa caixa própria para condicionamento de esquiva passiva, que tem dois compartimentos separados por uma abertura. Um compartimento claro medindo 18 x 18 x 18 cm com uma lâmpada de 100 watts na sua parte superior e outro escuro medindo 34 x 34 x 34 cm. No teste deixava-se o animal durante um minuto na sala de condicionamento e após colocava-se o animal no compartimento claro por 5 segundos. A seguir, abria-se a comunicação para o compartimento escuro. Quan do o animal entrava neste compartimento, recebia um choque de 1 mA

e de 0,2 segundos de duração. Vinte e quatro horas depois o animal era retestado, seguindo-se o mesmo procedimento; se o animal cruzasse a porta entre os compartimentos não levava choque na sessão reteste. Considerava-se uma resposta condicionada de esquiva passiva quando o animal não cruzava, na sessão de reteste, para o compartimento escuro em até 300 segundos.

3.2.3. *Pseudocondicionamento*

Utilizaram-se 56 ratos de ambos os sexos pesando em média 180 gramas; foram constituídos 4 grupos que receberam solução fisiológica e glicose 5,5% 4 horas antes do teste e solução fisiológica e glicose 5,5% 12 horas antes do teste.

O teste foi realizado em caixa de Warner modificada, igual à usada para o condicionamento de esquiva ativa de duas vias. Os animais permaneciam durante 10 minutos na caixa, para adaptação. Recebiam 50 sons de campainha de 3 segundos de duração e 25 choques elétricos, aleatoriamente, com intervalos de 10 a 60 segundos (som - som ou som - choque), e 5 a 15 segundos (choque - som ou choque - choque). O som e o choque cessavam quando o animal atravessava para o outro lado da caixa. A sessão sempre começava com um choque. Na primeira dezena de sons o animal recebia 8 choques, na segunda dezena 7, na terceira dezena 5, na quarta dezena 3 e na quinta dezena de sons recebia 2 choques. Sempre que recebiam choques, os animais cruzavam para o outro lado da caixa. Quando cruzavam com o som da campainha era considerada resposta pseudocondicionada porque não ocorre pareamento e nem associação temporal do estímulo incondicionado com o condicionado (GATTONI e IZQUIERDO,

1974; IZQUIERDO, 1974a, b).

As sessões tiveram a duração de 18 a 28 minutos, não incluindo os 10 minutos iniciais de adaptação na caixa de condicionamento. A distribuição dos sons e choques utilizados neste método está na proporção média daqueles que o animal recebe ao longo de 50 provas numa sessão de condicionamento de esquivas ativa de 2 vias (IZQUIERDO e NASELLO, 1973).

3.3. Técnica para coleta de sangue

O sangue usado para determinação do hematócrito e para as dosagens de Na^+ , K^+ , glicose e DFH era obtido por punção da aorta abdominal. O animal era anestesiado com éter, fazia-se uma ampla incisão no abdômen o que permitia uma boa visualização do vaso; utilizou-se uma seringa de 10 ml (BD, Yale Luer-Lok) e agulha hipodérmica 20/8 (BD, Luer-Lok) e retirava-se de 1 a 2 ml de sangue, que eram colocados em tubos Coleman 7,25 mm. O tempo para a retirada de sangue de cada animal era aproximadamente de 1 a 2 minutos. Quando se utilizou o soro para as dosagens, os tubos eram centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm (centrífuga FANEM, Ltda.).

3.3.1. Determinação do hematócrito

Foram utilizadas 54 amostras de sangue para a determinação do hematócrito, segundo o método de GUEST, 1934, que emprega tubos capilares heparinizados Yankee nº 1020. Esses tubos capilares, eram colocados em contato com as amostras de sangue, colhidas pre

viamente, através de uma de suas extremidades. Após a extremidade oposta do tubo era fechada num bico de Bunsen. Os tubos capilares, assim preparados, eram centrifugados numa centrífuga para microhematócrito (FANEM, Ltda.) numa velocidade de 6000 rpm por 10 minutos e lidos em tabela especial.

3.3.2. *Determinação de Na⁺ e K⁺*

Para as dosagens de Na⁺ e K⁺ foi utilizado o soro de 59 animais. As amostras eram lidas num fotômetro de chama (Corning 450 Digital) com padrão interno de lítio, segundo método de HALD (1947), e foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.3.3. *Determinação da Glicemia*

Para a dosagem de glicose no soro foram utilizados 66 ratos. A concentração de glicose foi determinada pelo método da Ortotolidina, modificado por DUBOWSKI (1962). As amostras eram lidas em Espectrofotômetro Nic-20, no Laboratório Central da Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre, e os resultados expressos em mg/100 ml.

3.3.4. *Determinação dos níveis séricos de DFH*

Em 17 amostras de soro de ratos injetados com 40mg/kg de DFH determinou-se a concentração da droga 2 horas após sua administração intrapetironeal e 4 horas após a administração de glicose 5,5%

ou solução fisiológica. As dosagens foram feitas pelo método EMIT ("enzyme immunoassay tecnic"), que é uma técnica de imunoensaio homogêneo, utilizada para a microanálise de compostos específicos em líquidos biológicos, no qual a droga em estudo é "marcada" com uma enzima (RUBENSTEIN, SCHNEIDER e ULLMAN, 1972).

As amostras de soro eram mantidas no refrigerador (2 a 8°C) até o momento da dosagem. As determinações foram feitas através do sistema semi-automatizado EMIT Lab. - Modelo Syva CP - 1000 que faz uso de Espectrofotômetro Gilford Stasar III e equipado com uma célula de microfluxo, sendo o volume utilizado para cada determinação de 50 µl. As dosagens foram feitas no Laboratório Servaclin de Porto Alegre.

3.4. *Análise estatística*

As diferenças entre médias de dois tratamentos foram avaliadas pelo teste "t" de Student para amostras independentes. Na comparação entre médias resultantes de mais do que duas condições experimentais, usou-se análise de variância para um critério classificatório. Quando houve valores significativos de F, os contrastes entre as médias foram realizados através do teste da múltipla amplitude de Duncan (SNEDECOR e COCHRAN, 1973; ZAR, 1974). Em todos os testes foram adotados níveis de significância de 0,05, 0,01 e 0,005.

No condicionamento de esQUIVA passiva os resultados foram avaliados pelo teste exato de Fischer (SIEGEL, 1975).

4. RESULTADOS

4.1. *Condicionamento de esquiva ativa de duas vias*

Os dados referentes ao condicionamento de esquiva ativa de duas vias em situação de hiponatremia de 4 horas e de 12 horas e de hiponatremia de 4 horas em animais injetados com DFH estão nas Tabelas I e II e na Figura 1.

A hiponatremia provocada pela injeção intraperitoneal de glicose a 5,5% 4 horas antes do treinamento diminuiu significativamente o desempenho dos animais quando comparados com os controles ($\alpha = 0,005$). O desempenho dos animais controles injetados com DFH foi significativamente menor quando comparado com os do grupo controle ($\alpha = 0,05$).

A Tabela I e a Figura 1 mostram ainda que a administração de DFH nos animais hiponatrêmicos resultou em um aumento significativo da aquisição ($\alpha = 0,05$).

Por outro lado, conforme Tabela II a aquisição de respostas condicionadas de esquiva ativa de duas vias em ratos hiponatrêmicos por 12 horas foi significativamente menor do que a dos animais do grupo controle ($p < 0,05$).

TABELA I

Efeito da hiponatremia e da administração de difenilhidantoína (DFH) na aquisição de um condicionamento de esquiva ativa de duas vias em ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	% DE RESPOSTAS CONDICIONADAS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle	16	50,3 ± 6,2
Controle + DFH	16	30,8 ± 5,9 (1)
Hiponatremia	16	11,5 ± 2,3 (2)
Hiponatremia + DFH	17	29,2 ± 7,0 (3)
Análise de variância	F = 7,933	
	p < 0,005	

Teste de múltipla amplitude de Duncan:

- (1) Difere do grupo controle ao nível $\alpha = 0,05$
- (2) Difere do grupo controle ao nível $\alpha = 0,005$
- (3) Difere do grupo hiponatremia ao nível $\alpha = 0,05$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose em solução a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/kg) 2 horas antes do condicionamento.

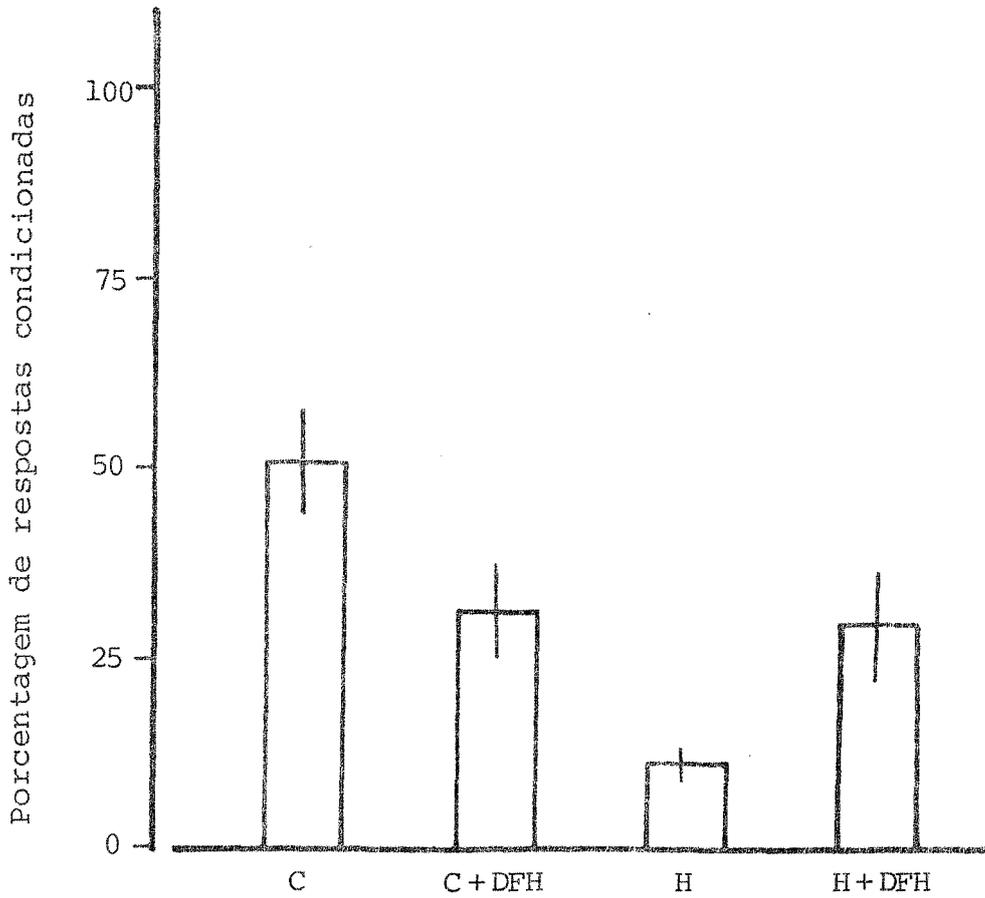


Figura 1. Porcentagens de respostas condicionadas de esQUIVA atIva de ratos controles (C) ou, hiponatremicos (H) injetados ou não com difenilhidantoína (DFH). As colunas rePresentam a média das porcentagens e as barras verticais o erro padrão.

TABELA II

Efeito da hiponatremia na aquisição de um condicionamento de esquiva ativa de duas vias em ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	% DE RESPOSTAS CONDICIONADAS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle	12	48,3 ± 2,0
Hiponatremia	10	29,2 ± 6,1 (1)

(1) Difere do grupo controle ($p < 0,05$)

^a Hiponatremia provocada por administração de glicose a 5,5% in traperitonealmente (10 ml/100 gramas de peso) 12 horas antes do condicionamento.

4.2. *Condicionamento de esquiva passiva*

Os dados referentes ao condicionamento de esquiva passiva em hiponatrêmicos tratados ou não com DFH encontram-se nas Tabelas III e IV.

Pode-se verificar que todos os animais, quando submetidos ao teste, cruzavam para o outro lado da caixa; no entanto, os animais controles e os tratados com DFH, no reteste, não cruzavam, apresentando o mesmo comportamento. Ao se estabelecer a hiponatremia de 4 horas, no reteste, ocorreu uma redução de 50% na resposta, diferindo significativamente daquelas dos demais grupos. Nos animais hiponatrêmicos administrados com DFH o efeito comportamental não diferiu do grupo controle. Ver Tabela III.

A Tabela IV mostra que o comportamento dos animais hiponatrêmicos testados 12 horas após não diferiu daquele apresentado pelos ratos do grupo controle no reteste.

4.3. *Pseudocondicionamento*

Os dados referentes ao pseudocondicionamento em situação de hiponatremia realizada 4 ou 12 horas antes do teste estão expressos na Tabela V e são ilustrados pela Figura 2.

Pode-se observar que as respostas pseudocondicionadas apresentadas pelos ratos hiponatrêmicos não diferiram daquelas dos seus respectivos ratos controles tanto em animais tratados 4 como 12 horas antes.

TABELA III

Efeito da hiponatremia e da administração de difenilhidantoína (DFH) no condicionamento de esquiva passiva em ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	RAZÃO DE RESPOSTA ^b	
	TESTE	RETESTE
Controle	0/11	11/11
Controle + DFH	0/11	10/11 (2)
Hiponatremia	0/12	6/12 (1)
Hiponatremia + DFH	0/12	11/12 (2)

Teste exato de Fisher

- (1) Difere do grupo controle $p < 0,01$ e dos grupos controle + DFH e hiponatremia + DFH $p < 0,05$
 (2) Difere do grupo hiponatremia $p < 0,05$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/kg) 2 horas antes do condicionamento.

^b N° de animais que não cruzam/n° de animais testados.

TABELA IV

Efeito da hiponatremia no condicionamento de esquiva passiva em ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	RAZÃO DE RESPOSTA ^b	
	TESTE	RETESTE
Controle	0/9	8/9
Hiponatremia	0/10	9/10 (1)

Teste exato de Fisher

(1) Não difere significativamente do grupo controle

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 12 horas antes do teste.

^b N° de animais que não cruzam/n° de animais testados.

TABELA V

Efeito da duração da hiponatremia nas respostas pseudocondicionadas em ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	TEMPO APÓS INSTALAÇÃO DA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	% DE RESPOSTAS PSEUDOCONDICIONADAS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle	4h	14	14,0 ± 2,3
Hiponatremia		14	14,5 ± 3,5 (1)
Controle	12h	14	13,4 ± 2,0
Hiponatremia		14	15,4 ± 1,9 (1)

(1) Não difere significativamente do grupo controle

^a Hiponatremia provocada por administração de glicose em solução a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 e 12 horas antes do teste.

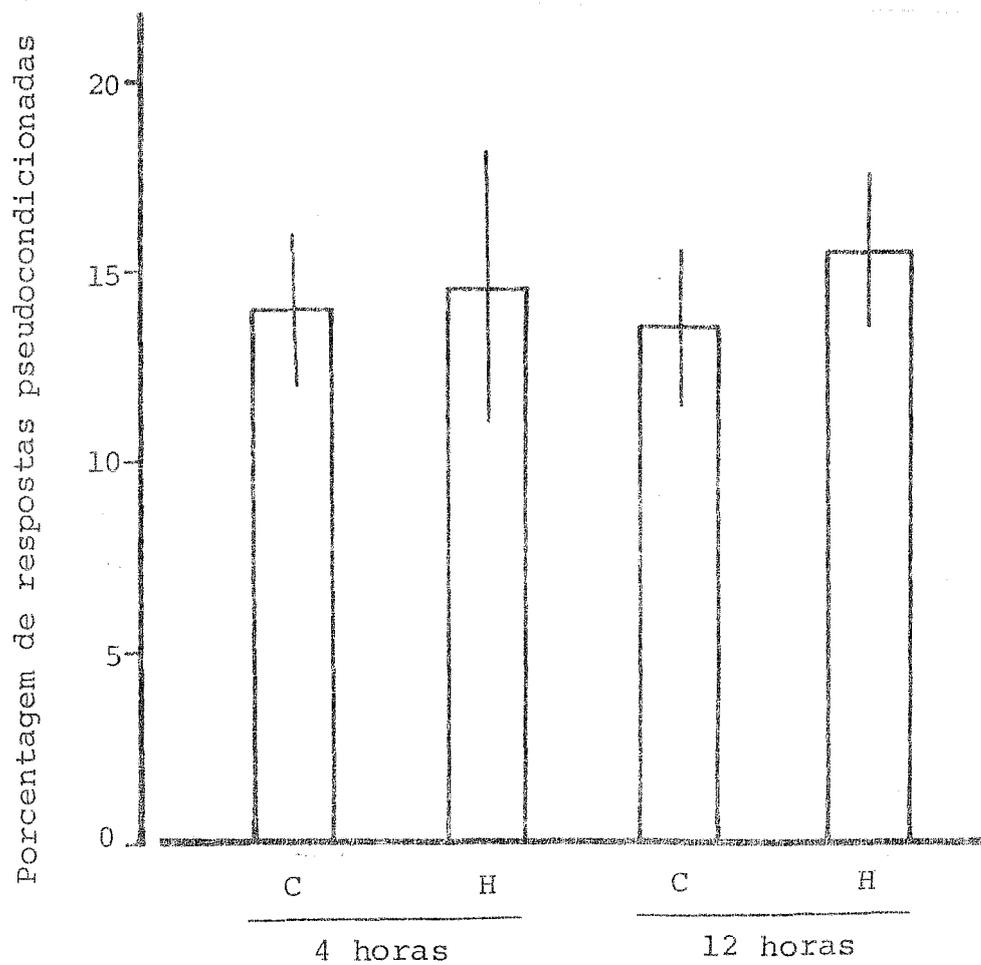


Figura 2. Porcentagens de respostas pseudocondicionadas de ratos controles (C) e hiponatêmicos (H). As colunas representam a média de porcentagens e as barras verticais o erro padrão.

4.4. Determinações sanguíneas

4.4.1. Hematócrito

Pôde-se observar que os hematócritos dos animais dos grupos controles não diferiram significativamente entre si, enquanto que aqueles dos animais do grupo hiponatremia foram significativamente maiores que aqueles dos grupos controles ($\alpha = 0,005$). Da mesma forma os hematócritos dos animais do grupo hiponatremia + DFH foram significativamente maiores do que os dos grupos controles + DFH e hiponatremia ($\alpha = 0,05$). Estes dados estão contidos na Tabela VI e podem ser visualizados na Figura 3.

4.4.2. Determinações séricas de Na^+ e K^+

Os resultados estão na Tabela VII e Figura 4. Pôde-se observar que os níveis séricos de Na^+ dos animais dos grupos controles não diferiram significativamente entre si. Os níveis séricos de Na^+ dos animais do grupo hiponatremia foram significativamente menores do que aqueles do grupo controle ($\alpha = 0,05$). O mesmo fato ocorreu com os dos animais do grupo hiponatremia + DFH que foram significativamente menores do que aqueles dos grupos controle + DFH e hiponatremia ($\alpha = 0,005$).

Em relação aos níveis séricos de K^+ também não houve diferenças entre os dos animais controles; no entanto, a potassemia dos animais dos grupos hiponatremia e hiponatremia + DFH foi significativamente maior do que a dos seus controles a nível de $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$, respectivamente.

TABELA VI

Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína no hematócrito de ra
tos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	HEMATÓCRITO (%) (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle intacto	9	44,2 ± 0,6
Controle	11	44,6 ± 1,2
Controle + DFH	11	41,0 ± 1,2
Hiponatremia	11	53,6 ± 1,8 (1)
Hiponatremia + DFH	12	49,5 ± 1,8 (2)
Análise de variância	F = 11,885	
	p < 0,005	

Teste de múltipla amplitude de Duncan:

- (1) Difere do grupo controle intacto, controle e controle + DFH ao nível $\alpha = 0,005$
- (2) Difere do grupo controle + DFH ao nível $\alpha = 0,05$ e do grupo hiponatremia ao nível $\alpha = 0,05$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose em solução a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/kg) 2 horas antes da obtenção da amostra de sangue.

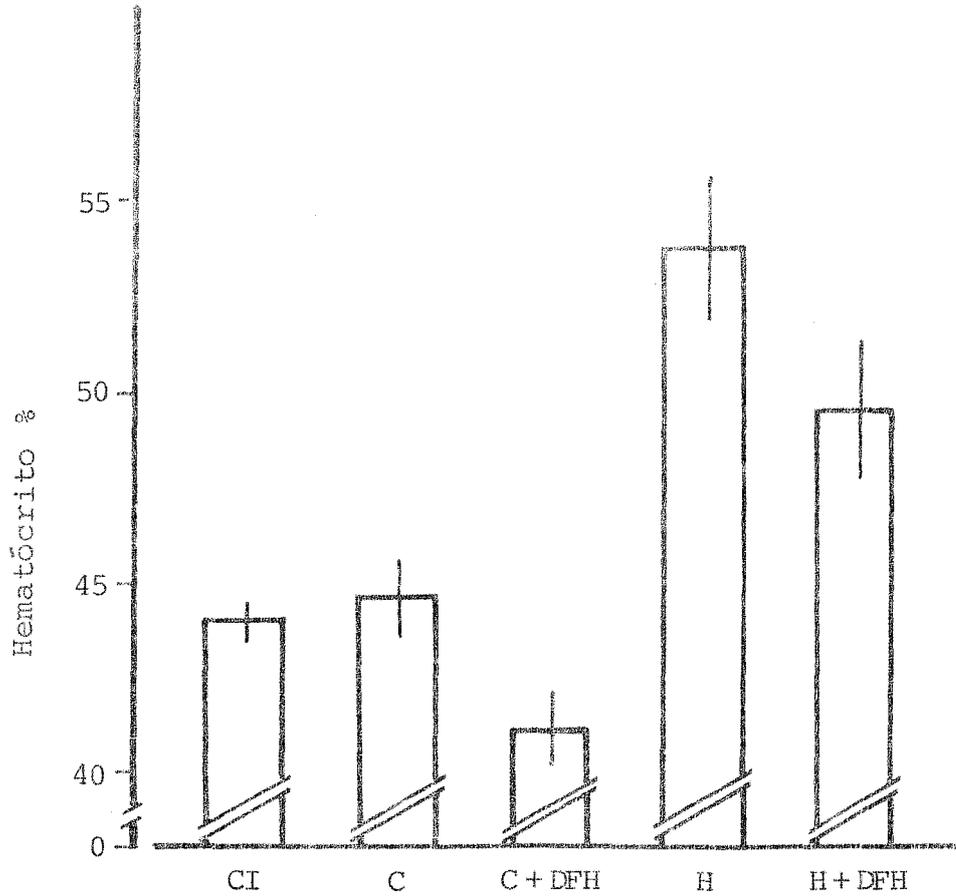


Figura 3. Porcentagem dos hematócritos de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H), injetados ou não com Difenilhidantoína (DFH). As colunas representam a média e as barras verticais correspondem aos erros padrões.

TABELA VII

Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína na natremia e potassemia de ratos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAL	Na ⁺ EM mEq/l (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)	K ⁺ EM mEq/l (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle intacto	10	146,1 ± 0,7	5,4 ± 0,2
Controle	12	144,8 ± 0,8	5,6 ± 0,2
Controle + DFH	10	140,6 ± 1,5	6,1 ± 0,4
Hiponatremia	14	138,1 ± 1,2 (1)	6,8 ± 0,4 (1)
Hiponatremia + DFH	13	118,9 ± 4,3 (2)	7,1 ± 0,4 (3)
Análise da variância		F = 23,034 p < 0,001	F = 4,423 p < 0,01

Teste de múltipla amplitude de Duncan:

- (1) Difere do grupo controle ao nível $\alpha = 0,05$
- (2) Difere do grupo controle + DFH e hiponatremia ao nível $\alpha = 0,005$
- (3) Difere do grupo controle ao nível $\alpha = 0,01$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose em solução a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/1 g) 2 horas antes da obtenção de sangue.

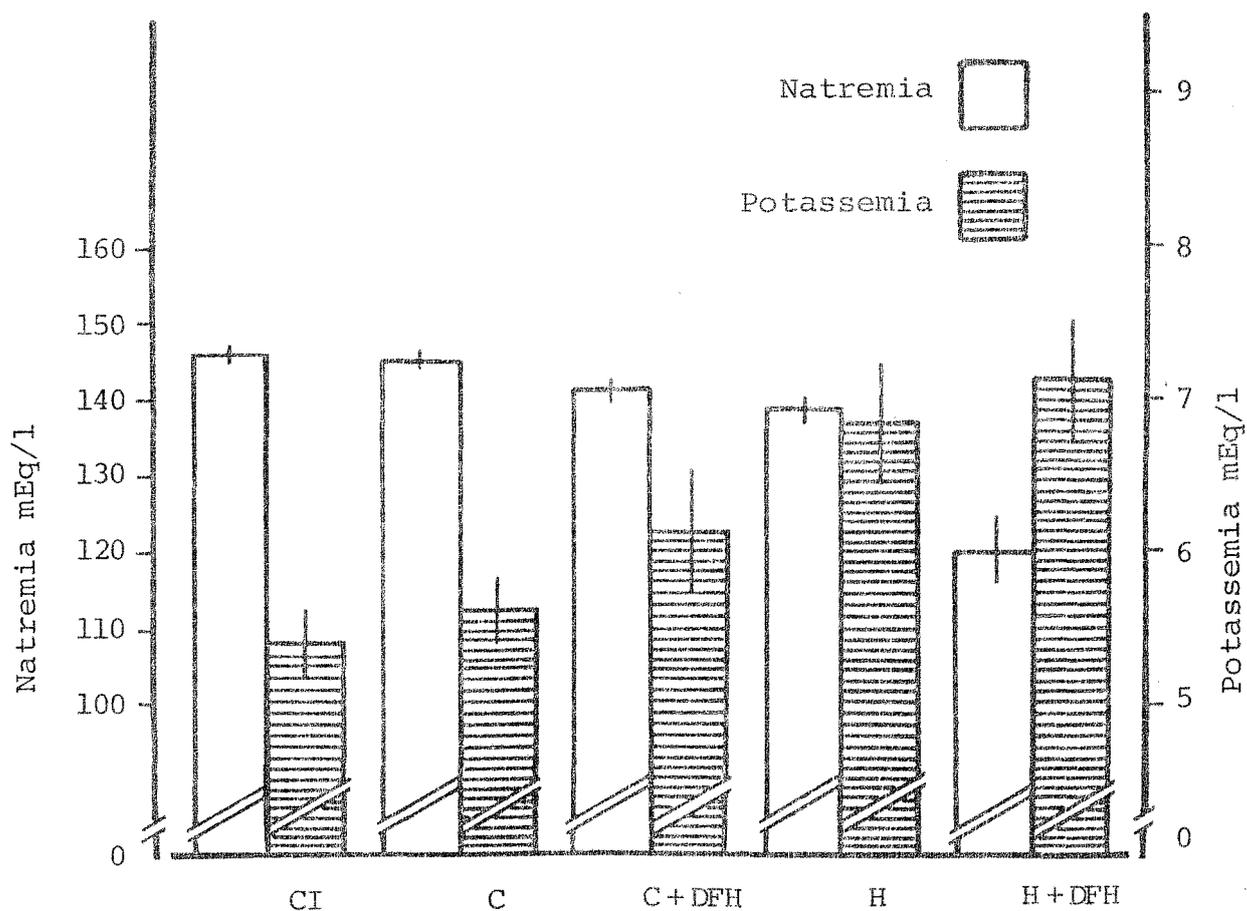


Figura 4. Valores de Natremia e Potassemia de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H), injetados ou não com difenilhidantoína (DFH). As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão.

4.4.3. *Glicemia*

Houve alterações significativas na glicemia somente nos animais hiponatrêmicos tratados com DFH, que apresentaram uma taxa de glicose sangüínea maior do que aquelas dos demais grupos ($\alpha = 0,005$). Ver Tabela VIII e Figura 5.

4.4.4. *Determinação sérica de difenilhidantoína*

A concentração de DFH no soro dos animais do grupo hiponatremia + DFH foi significativamente maior do que aquela apresentada pelos do grupo controle + DFH ($p < 0,02$). Ver Tabela IX.

TABELA VIII

Efeito da hiponatremia e da difenilhidantoína na glicemia de ra
tos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	GLICEMIA (mg/100 ml) (MÉDIA ± ERRO PADRÃO)
Controle intacto	10	95,1 ± 4,0
Controle	14	80,9 ± 9,2
Controle + DFH	11	85,3 ± 7,1
Hiponatremia	17	119,8 ± 16,3
Hiponatremia + DFH	14	570,6 ± 94,5 (1)
Análise de variância	F = 22,044	
	p < 0,005	

Teste de múltipla amplitude de Duncan:

(1) Difere dos demais grupos ao nível $\alpha = 0,005$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose em solução a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/kg) 2 horas antes da obtenção da amostra de sangue.

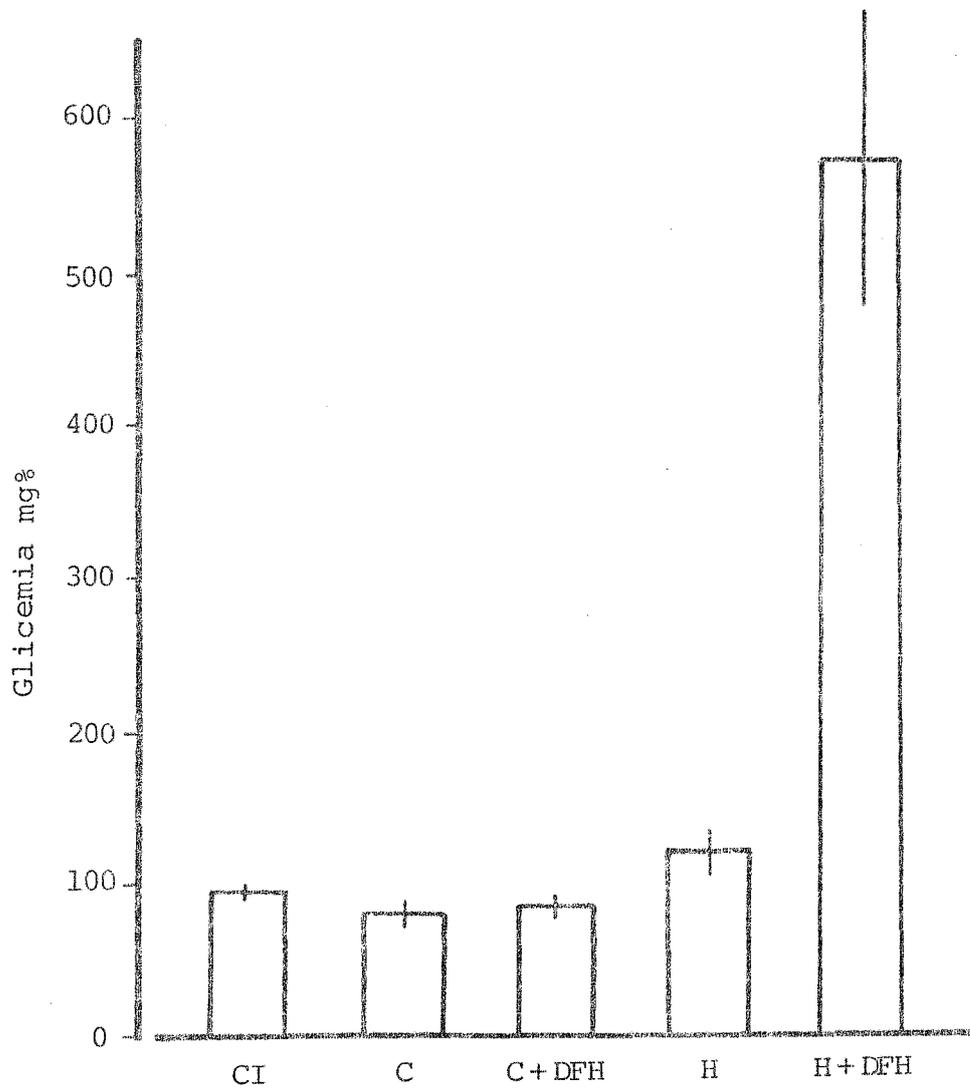


Figura 5. Média de glicemia de ratos controles intactos (CI), controles (C) e hiponatrêmicos (H) injetados ou não com difenilhidantoína (DFH). As colunas representam as médias e as barras verticais o erro padrão.

TABELA IX

Níveis séricos de difenilhidantoína em ratos controles e hiponatremicos^a.

CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	Nº DE ANIMAIS	DFH ($\mu\text{g/ml}$) (MÉDIA \pm ERRO PADRÃO)
Controle + DFH	9	13,5 \pm 0,86
Hiponatremia + DFH	8	22,3 \pm 2,95 (1)

(1) Difere do grupo controle $p < 0,02$

^a Hiponatremia provocada por administração intraperitoneal de glicose a 5,5% (10 ml/100 gramas de peso) 4 horas antes e a DFH (40 mg/kg) e horas antes da obtenção da amostra de sangue.

5. DISCUSSÃO

Os antiepilépticos têm grande importância em clínica. A epilepsia pode ser acompanhada por alterações psíquicas, podendo as convulsões levar à alteração do humor, confusão mental e distúrbios comportamentais com pequeno componente motor. O controle da epilepsia no entanto, pode levar a uma melhora do comportamento, efeito este que pode ser independente do efeito antiepiléptico do fármaco. A maioria das evidências dos efeitos psicotrópicos destes fármacos são na sua grande maioria subjetivos ou acidentais durante o tratamento e quase sempre conflitantes. É, pois, surpreendente que fármacos tão usados na clínica tenham sido tão pouco pesquisados em psicofarmacologia.

Na hiponatremia experimental ou clínica bem como na epilepsia há uma diminuição do limiar convulsivante, ocorrendo um aumento da atividade neuronal e paroxística, podendo ou não ocorrer convulsões; é também comprovado que a excitabilidade neuronal varia inversamente com as concentrações extracelulares de Na^+ (SWINYARD, 1949). Como a hiponatremia experimental é considerada um modelo para a pesquisa de fármacos anticonvulsivantes, poderia, também, ser empregada na pesquisa de comportamento.

Em nossos experimentos, os animais hiponatrêmicos apresentaram uma diminuição da aquisição das respostas condicionadas de esquiwa ativa de duas vias. O efeito da hiponatremia foi maior 4 horas após a indução mas ainda estava presente 12 horas após a mesma. Esses dados concordam com as observações em relação à queda do limiar ao eletrochoque produzida pela hiponatremia, sendo que o efeito máximo desta era observado 4 horas após sua indução, ha

vendo uma normalização depois de transcorridas 24 horas (SWINYARD, 1949).

Os efeitos observados não parecem ser periféricos pois não houve alterações nas respostas pseudocondicionadas tanto nas 4 como nas 12 horas. A simples distensão abdominal não pode ser responsabilizada pelo efeito observado, uma vez que os animais controles, que receberam igual volume de solução fisiológica intraperitonealmente, mostraram um desempenho compatível com animais normais sem nenhum tratamento (IZQUIERDO, 1974a). Por outro lado WOODBURY e DAVENPORT (1949) mostraram que a administração de uma solução isotônica de NaCl produz um aumento do limiar convulsivante ao eletrochoque.

Em relação ao condicionamento passivo observamos que a hiponatremia diminui o desempenho dos animais nas 4 horas, mas não nas 12 horas, sugerindo que as alterações iônicas também alteram esse teste, que envolve memorização. Na hiponatremia ocorrem não só na periferia mas também no SNC alterações iônicas, que podem induzir esses efeitos sobre o aprendizado e a memória. Foi verificado que no plasma há uma diminuição de Na^+ e Cl^- . O K^+ pode permaner normal ou aumentado, e a quantidade de água permanecer inalterada. No cérebro total há não só diminuição de Na^+ , K^+ e Cl^- , mas também aumento de Na^+ e diminuição de K^+ intracelulares (WYNN, 1956; WOODBURY, 1955; 1956). Os resultados do presente trabalho em relação aos níveis séricos de Na^+ e K^+ confirmam estes dados.

A diminuição do K^+ intracelular ou o aumento do K^+ extracelular ocasionam hiperexcitabilidade que pode ser devida à despolarização pré-sináptica, aumento da liberação de neurotransmissores e, portanto, ativação da transmissão sináptica, podendo ocorrer dede

pressão posterior se os estímulos são excessivos (GRANTHAM, 1977; KATZMAN e PAPPYUS, 1973). Este fato é importante uma vez que foi demonstrado que a capacidade de aprender por condicionamento de esquiva ativa de duas vias está relacionada com a habilidade de liberação de K^+ do hipocampo (IZQUIERDO, ORSINGER e LEVIN, 1972).

A DFH diminui o número de respostas condicionadas de esquiva ativa na aquisição, e não altera as respostas no condicionamento passivo. Esses resultados confirmam dados já existentes na literatura (IZQUIERDO e NASELLO, 1973; TANNHAUSER, 1973; TANNHAUSER, 1975; THOMÉ, BARBISAN, TANNHAUSER e TANNHAUSER, 1977).

A DFH antagonizou o efeito da hiponatremia na aquisição das respostas no condicionamento da esquiva ativa de duas vias, permanecendo o seu efeito próprio. Também antagonizou o efeito da hiponatremia no condicionamento passivo.

Sabe-se que a DFH atuando sobre a ATPase Na^+K^+ dependente, favorece o efluxo de Na^+ e o influxo de K^+ quando os níveis extracelulares de K^+ estão aumentados (MISON-CRIGHEL, PINTILIE, VOLANSCHI, FLORESCU e TUDOR, 1973), confirmando os achados de PINCUS (1972), que demonstrou que este antiepiléptico, além de bloquear o influxo de Na^+ e o efluxo de K^+ , bloqueia também o influxo de Ca^{++} , aumentando o limiar por hiperpolarização estabilizando a membrana. Sabe-se que a liberação de neurotransmissor é dependente de Ca^{++} extracelular, sendo que um dos primeiros experimentos que sugeriram esta importância foram os de HOUSSAY e MOLINELLI (1928); foram, no entanto DOUGLAS e RUBIN (1961) que conceberam a idéia de que o Ca^{++} desempenha um papel geral nos eventos envolvidos na secreção e liberação de neurotransmissor, no acoplamento estímulo-secreção ã semelhança de sua importância no acoplamento excitação

ção-contracção no músculo (DOUGLAS, 1968). Foi também demonstrado que a DFH é mais eficaz quando a atividade neuronal está aumentada, sendo menos ativa à medida que essa diminui (LIPICKY, GILBERT e STILLMAN, 1972; RAINES e NINER, 1975).

Assim pode ser sugerido o mecanismo pelo qual a DFH poderia antagonizar os efeitos da hiponatremia não só aumentando o limiar convulsivante (SWINYARD, TOMAN e GOODMAN, 1946) como também melhorando o desempenho nas situações comportamentais estudadas. Por outro lado, a ação da DFH sobre os eletrólitos leva a uma menor atividade sináptica, explicando-se, assim, possivelmente, seus efeitos sobre a aquisição e a retenção (WEINREICH, 1971; TANNHAUSER, 1975).

Os efeitos da DFH observados neste trabalho sobre o comportamento, diminuindo a aquisição e interferindo com a retenção, estão de acordo com observações clínicas em epilépticos ou indivíduos normais, onde há menor desempenho intelectual e de aprendizado do fato revertido quando a administração de DFH é interrompida ou quando ela é substituída por outro antiepiléptico (VALLARTA, BELL e REICHERT, 1974; STORES, 1975; TRIMBLE, 1979).

Os efeitos tóxicos e comportamentais da DFH estão relacionados com as suas concentrações sangüíneas. De fato, com níveis sé-ricos acima de 20 µg/ml já começam a aparecer alterações como nis-tagmo, letargia, disartria, sendo que níveis superiores a 40 µg/ml levam a estados agudos de confusão mental (STORES, 1975). Por outro lado foi relatado, ainda, que os efeitos comportamentais podem estar presentes com concentrações sangüíneas menores do que 20 µg/ml (REYNOLDS e TRAVERS, 1974; TRIMBLE, 1979).

Em presença da hiponatremia, além das alterações iônicas sê

ricas, ocorre também diminuição da volemia e aumento do hematócrito (FERREYRA e CHIARAVIGLIO, 1977), fatos correlacionados. A diminuição da volemia pode ser explicada pela redistribuição da água no organismo, ocorrendo hidratação celular principalmente do músculo estriado, que é a maior massa tecidual, bem como no músculo cardíaco (WOODBURY, 1956). Por outro lado, pode haver também aumento da diurese. O hematócrito elevado pode ser devido à diminuição de água total no sangue ou, o que é mais provável, por aumento do volume do eritrócito, manifesto pela diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular (WYNN, 1956), o que pode levar à hemólise. Como ocorre uma diminuição do Na^+ sérico, mesmo em presença da hipovolemia, há uma hipoosmolaridade. O eritrócito, através de difusão passiva e transporte ativo de Na^+ e K^+ , mantém as concentrações catiônicas dentro de limites muito estreitos quando o meio intra e extracelulares são isosmóticos. Em presença da hiposmolaridade vai ocorrer uma hidratação do eritrócito à semelhança do que ocorre no músculo estriado e no músculo cardíaco, levando a um aumento do volume eritrocitário e conseqüentemente a aumento relativo do hematócrito. Este dado foi também confirmado no presente trabalho.

A hidratação leva a uma distensão da membrana, podendo ocorrer alterações na sua função de controle catiônico. Ocorre um efluxo de Na^+ e um influxo de K^+ por aumento da atividade da ATPase Na^+K^+ dependente, como foi descrito por MISON-CRIGHEL, PINTILIE, FLORESCU, TUDOR e VOLANSCHI (1973) em eritrócitos de pacientes epiléticos não tratados que também apresentaram um aumento na volemia, acentuando-se assim as semelhanças entre epilepsia e hiponatremia. A DFH não ocasiona alterações no hematócrito e nos ní

veis séricos de Na^+ e K^+ dos animais controles; nos hiponatrêmicos a DFH diminui o hematócrito apesar de aumentar significativamente a hiponatremia e a hipercalemia. Ela apresenta maior efeito na condução de íons através de membranas quando há atividade aumentada, como foi observado nos efeitos depressores sobre o coração (RAINES e NINER, 1975), na medula espinhal (ESPLIN, 1957), na junção neuro-muscular (RAINES e STANDAERT, 1966) e no cérebro (WOODBURY, 1955, 1956). Como as membranas apresentam as mesmas propriedades, pode-se deduzir que a DFH diminui o hematócrito por ação na membrana levando a sua estabilização por diminuição da condutância ao Na^+ e ao K^+ (PINCUS, 1972). No entanto, a DFH pode também ter diminuído o hematócrito dos animais hiponatrêmicos devido a seu efeito sobre as células β das ilhotas de Langerhans, o que também explica o aumento da hiponatremia e da hipercalemia pois o fármaco aumentou significativamente a glicemia dos hiponatrêmicos apesar de não ter alterado a dos controles.

A respeito disso desde a metade da década de 1960 há relatos de que a DFH pode ocasionar hiperglicemia tanto em animais como em seres humanos. Este efeito foi demonstrado por administração endovenosa de DFH em cães (SANBAR, CONWAY, ZWEIFLER, SMET, 1967) e em pacientes em que ocorreram hiperglicemia e glicosúria, com alterações neurológicas e convulsões (KLEIN, 1966; GOLDBERG e SANBAR, 1969). PETERS e SAMAN (1969) descreveram liberação retardada de insulina com carga de glicose em pacientes com uso de DFH, sendo demonstrado em pâncreas perfundido que este antiepiléptico bloqueia a sua liberação (LEVIN, BOOKER, SMITH e GRODSKY, 1970). A hiperglicemia leva a um aumento da osmolaridade sangüínea que ativa vários sistemas fisiológicos salientando-se a passagem de água

dos compartimentos intracelulares para o compartimento sangüíneo com o objetivo de manter a osmolaridade; em presença da DFH os animais hiponatrêmicos que apresentaram um aumento do hematócrito tiveram uma tendência à normalização de seus valores o que pode ser devido à perda de água dos eritrócitos ou, alternativamente, ao efeito da DFH sobre as membranas, como foi descrito anteriormente.

É comum a hiponatremia em pacientes diabéticos com coma hiperglicêmico. GOLDBERG e SANBAR (1969) descreveram o efeito hiperglicemiante e conseqüente hiponatremia com uso de DFH em pacientes não diabéticos. A compensação da hiperosmolaridade por hiperglicemia é feita através da entrada de água no compartimento vascular às expensas do compartimento intracelular com diluição dos componentes sangüíneos. Nossos resultados estão de acordo com KATZ (1973) que descreve que, para cada incremento de 100 mg% de glicose, ocorre uma perda de 2,8 mEq/l de Na^+ . Portanto, para explicar a hiponatremia que se acentuou com a administração de DFH pode-se postular que a queda do Na^+ sérico não é um efeito direto do antiepiléptico, mas é um efeito indireto através da hiperglicemia.

Dã-se muita ênfase ao papel da aldosterona no controle do K^+ sangüíneo, sendo que o sistema renina-angiotensina seria estimulado não só pela hiponatremia mas também pela presença de hipercalemia (COHEN, HULTER, SMITHLINE, MELBY e SCHWARTZ, 1976). No entanto, um dos principais mecanismos de controle do K^+ corporal é feito pela insulina. Este hormônio tem como principal função a captação de glicose, aminoácidos e K^+ pelos tecidos, principalmente no músculo e no fígado (TEPPERMAN, 1977). Foi verificada uma es

treita correlação entre K^+ e insulina; assim, na deficiência absoluta ou relativa de insulina há hipercalemia (HALES e MILNER, 1968; DEFRONZO, SHERWIN, DILLINGHAM, HENDLER, TAMBORLANE, FELIG, 1978); por outro lado, a administração de K^+ favorece a liberação de insulina (KISER, VARGAS-CORDON, BRENDEL e BRESSLER, 1970). O mecanismo pelo qual a DFH bloqueia a liberação é ainda muito discutido; este efeito foi demonstrado "in vitro" (KISER, VARGAS-CORDON, BRENDEL e BRESSLER, 1970; LEVIN, BOOKER, SMITH e GRODSKY, 1970; LEVIN, GRODSKY, HAGURA e SMITH, 1972) e "in vivo", tanto em animais (DEFRONZO, SHERWIN, DILLINGHAM, HENDLER, TAMBORLANE e FELIG, 1978) como em seres humanos (FARISS e LUTCHER, 1971; MALHERBE, BURRILL, LEVIN, KARAM e FORSHAM, 1972; CUDWORTH e CUNNINGHAM, 1974). A DFH em concentrações que não excedem $10 \mu\text{g/ml}$ bloqueia a liberação de insulina do compartimento lábil sem afetar o compartimento de reserva enquanto concentrações de $25-75 \mu\text{g/ml}$ inibem não só este compartimento como também a síntese de precursores (LEVIN, GRODSKY, HAGURA e SMITH, 1972). A inibição da liberação não é revertida por tolbutamida, alta concentração de glicose nem por aumento do Ca^{++} extracelular, mas é revertida pelo K^+ que, dependendo da concentração, não só restaura a resposta à glicose mas também estimula aditivamente a secreção de insulina em presença de DFH (KISER, VARGAS-CORDON, BRENDEL e BRESSLER, 1970). MALAISSE, SENER, HERCHUELZ e HUTTON (1979) acreditam que os eventos metabólicos desencadeiam uma série de movimentos catiônicos. A glicose provoca uma diminuição do efluxo de K^+ rápido, sustentado e reversível, aumentando as concentrações intracelulares de K^+ nas células β do pâncreas; sobre o Na^+ exerce um efeito duplo: aumenta, inicialmente, o efluxo do mesmo e, posteriormente, o influ

xo, resultando, no final, uma diminuição de Na^+ intracelular. Salienta-se que a concentração de Na^+ nas células β do pâncreas é maior do que em outras células do organismo. A glicose aumenta o acúmulo de Ca^{++} nas ilhotas, não sendo claro se através de bloqueio do efluxo, se favorecendo o influxo ou se alterando sua distribuição dentro da célula. Conclui-se que, para ocorrer a liberação de insulina após o estímulo de glicose, é necessário não só um aumento de K^+ e Ca^{++} como também uma diminuição de Na^+ intracelular.

A DFH diminui a condutância ao Na^+ bloqueando o influxo deste íon, bloqueando o efluxo de K^+ e o influxo de Ca^{++} , interferindo desta forma no acoplamento excitação-secreção por hiperpolarização da membrana (LIPICKY, GILBERT e STILLMAN, 1972; PINCUS, 1972; PERRY, MCKINNEY, DE WEER, 1978). Assim a DFH diminui os níveis de Na^+ intracelulares porque bloqueia o influxo que está aumentado pela glicose, atuando no principal mecanismo de liberação de insulina (HALLES e MILNER, 1968; LEVIN, BOOKER, SMITH e GRODSKY, 1970; LEVIN, GRODSKY, HAGURA e SMITH, 1972). Em nossos experimentos, o efeito hiperglicemiante ocorreu em hiponatremia, onde os níveis séricos de Na^+ são muito baixos e os níveis de K^+ são altos, havendo, portanto, um desequilíbrio catiônico que provavelmente perturbou a fisiologia das células β . A hipercalemia poderia estimular as células β , mas o efeito da DFH é mais potente, bloqueando a liberação de insulina e diminuindo a captação de K^+ pelas células β , músculo e fígado.

As concentrações terapêuticas de DFH para controle de epilepsia são de 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de plasma (KUTT e McDOWELL, 1968). No presente trabalho, as concentrações séricas de DFH foram de 13,5 e 22,3 $\mu\text{g/ml}$ nos animais controles e hiponatrêmicos, respectiva

mente. Com a dose de 40 mg/kg, ocorreu hiperglicemia somente aos animais do último grupo. Ponto bastante discutido na literatura é o de haver relação entre a concentração sanguínea de DFH e o aparecimento do efeito inibidor sobre o pâncreas. Estudos "in vitro", com perfusão de pâncreas demonstraram que concentrações entre 5 e 15 µg/ml de DFH plasmática ocasionam um bloqueio pancreático parcial da secreção e que a partir de 25 µg/ml ocorre inibição total, não havendo alterações adicionais posteriores a esta dose mesmo com concentrações tão altas como de 75 µg/ml (KISER, VARGAS-CORDON, BRENDEL e BRESSLER, 1970; LEVIN, GRODSKY, HAGURA e SMITH, 1972); portanto, há uma relação dose-efeito com o efeito máximo sendo atingido com a dose de 25 µg/ml.

Em seres humanos sadios, foi verificado que a DFH, apesar de não alterar a glicemia de jejum, altera os testes de tolerância à glicose, à tolbutamida e pós-prandial, sendo que a intolerância é proporcional às concentrações plasmáticas do fármaco (FARISS e LUTCHER, 1971). Estes dados foram confirmados por CUDWORTH e CUNNINGHAM (1974) ao verificarem que concentrações crescentes de DFH (7,7-22,7 µg/ml) diminuíram a resposta de liberação de insulina por carga de glicose proporcional. Por outro lado, foi verificado que a DFH diminui a resposta das células β à glicose, inibindo a liberação precoce e retardada de insulina, em forma não dose-dependente (MALHERBE, BURRILL, LEVIN, KARAM e FORSHAM, 1972). Estes resultados podem ser comparados uma vez que usaram a mesma dose e, com níveis sanguíneos de DFH acima de 15 µg/ml, já ocorre inibição total de secreção de insulina. Da análise desses trabalhos conclui-se que os efeitos inibitórios da insulina pela DFH são dose-dependentes. Assim explica-se o fato de, que enquanto a concentração sérica de

13,5 µg/ml não ocasiona hiperglicemia, a concentração de 22,3 µg/ml do fármaco induz ao efeito.

As concentrações séricas diferentes obtidas com a mesma dose de DFH poderiam estar relacionadas às alterações da farmacocinética da droga nas condições de hiponatremia, fatos que, sem dúvida merecerão pesquisas posteriores.

Portanto, foi verificado que a hiponatremia alterou o comportamento avaliado pela diminuição de aquisição das respostas condicionadas de esquiva ativa de duas vias e das respostas de esquiva passiva, não alterando as respostas pseudocondicionadas. A DFH antagonizou os efeitos da hiponatremia, mas manteve seus efeitos sobre o comportamento, isto é, diminuiu a aquisição das respostas condicionadas de duas vias e não alterou as respostas condicionadas de esquiva passiva. Avaliando os efeitos periféricos de hiponatremia, verificou-se que este estado aumenta o hematócrito, diminui os níveis séricos de Na^+ e aumenta os níveis séricos de K^+ mas não altera a glicemia. A DFH não afeta nenhum desses parâmetros, mas, quando administrada nos ratos hiponatrêmicos, tende a normalizar o hematócrito, aumentando a hiponatremia e a hipercalemia e ocasionando hiperglicemia. Pode-se, pois, sugerir, de uma maneira geral, que os efeitos ocasionados pela DFH estariam, basicamente, relacionados à estabilização das membranas ocasionada pela alteração do transporte de eletrólitos como foi amplamente discutido.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho estudaram-se as alterações do comportamento de ratos hiponatrêmicos e administrados com DFH, através da avaliação da aquisição no condicionamento de esQUIVA ativa de duas vias, condicionamento de esQUIVA passiva e pseudocondicionamento. Foram determinados os hematócritos em ratos hiponatrêmicos e/ou injetados com DFH, níveis séricos de Na^+ e K^+ , glicemia e concentração de DFH no soro.

Utilizaram-se 411 ratos albinos, machos e fêmeas, com peso corporal entre 150 a 250 gramas.

Os animais foram submetidos as seguintes condições experimentais:

- 1) Controle Intacto (CI) - animais que foram injetados com 0,2 ml de solução fisiológica;
- 2) Controle (C) - animais que foram injetados com 10 ml/100 g de peso corporal de solução fisiológica;
- 3) Controle com Difenilhidantoína (C + DFH) - animais que, 2 horas após a administração de solução fisiológica, recebem DFH;
- 4) Hiponatremia (H) - animais injetados com solução de glicose a 5,5%, 10 ml/100 g de peso corporal;
- 5) Hiponatremia e DFH (H + DFH) - hiponatremia realizada como no item anterior e administração de DFH duas horas após a injeção de glicose.

Através dos resultados, analisados estatisticamente, pode-se concluir:

a. Efeitos da hiponatremia sobre o comportamento

a.1. A hiponatremia diminui as respostas condicionadas de esquiva ativa de duas vias na aquisição, tanto nas 4 horas como nas 12 horas.

a.2. A hiponatremia diminui as respostas condicionadas de esquiva passiva nas 4 horas não alterando estas respostas nas 12 horas.

a.3. A hiponatremia não altera as respostas pseudocondicionadas.

b. Efeitos da DFH sobre o comportamento

b.1. A DFH antagoniza o efeito da hiponatremia na aquisição das respostas condicionadas de duas vias, nas 4 horas, sem, no entanto, normalizar estas respostas mantendo o seu efeito próprio.

b.2. A DFH antagoniza o efeito da hiponatremia nas respostas de esquiva passiva, sendo que este fármaco não tem efeito sobre estas respostas nos animais controles.

c. Hematócrito e níveis séricos de Na^+ , K^+ e glicose

c.1. Os ratos hiponatrêmicos apresentaram um aumento do hematôcrito, sendo que este é parcialmente revertido pela DFH.

c.2. Os ratos hiponatrêmicos apresentaram diminuição dos níveis de sódio sérico e hipercalemia, efeitos estes que foram acentuados pela DFH.

c.3. Os ratos hiponatrêmicos tratados com DFH apresentaram hiperglicemia.

d. Níveis séricos de DFH

d.1. Os ratos hiponatrêmicos tratados com DFH apresentaram níveis séricos deste fármaco significativamente mais elevados do que os dos controles.

Estes resultados nos levam a sugerir que os efeitos centrais e periféricos da DFH, em hiponatremia e epilepsia, basear-se-iam no mesmo mecanismo de ação.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the present work we studied behavior alterations of hyponatremic and Dyphenylhydantoin (DFH) treated rats by measuring their acquisition of two-way active avoidance conditioning, passive avoidance conditioning and pseudoconditioning. Hematocrit, Na^+ , K^+ , glucose and DFH serum levels were also determined in these animals.

411 albino female and male rats were used weighing between 150 and 250 g. These animals were submitted to the following experimental conditions:

- 1) Intact control (IC) - rats injected with 0,2 ml saline.
- 2) Control (C) - rats injected with saline, 10 ml/100 g body weight.
- 3) Control and DFH (C + DFH) - rats that received DFH 2 hours after saline administration.
- 4) Hyponatremia (H) - rats injected with 5,5% glucose, 10 ml/100 g body weight.
- 5) Hyponatremia and DFH (H + DFH) - same treatment as Hyponatremia. Two hours after glucose injection the animals received DFH.

The statistically analysed results permit the following conclusions:

- a. Effects of hyponatremia on behavior
 - a.1. After 4 or 12 hs of hyponatremia the acquisition two-way active avoidance was reduced.
 - a.2. After 4, but not 12 hs of hyponatremia passive avoidance conditioning was impaired.

- a.3. Hyponatremia did not modify pseudoconditioning responses.
- b. Effects of DFH on behavior
 - b.1. DFH antagonized the effects of 4 hs hyponatremia on acquisition of active avoidance ; performance, however, was not normalized and DFH maintained its own effects.
 - b.2. DFH antagonized the effects of hyponatremia on passive avoidance responses, and had no effects on control rat responses.
- c. Hematocrit and Na^+ , K^+ and glucose serum levels
 - c.1. Hyponatremic rats showed increased hematocrit values and this effect was partially reversed by DFH.
 - c.2. Hyponatremic rats showed a reduction in Na^+ serum levels and hyperkalemia; this effect was enhanced by DFH.
 - c.3. Hyponatremic rats treated with DFH showed hyperglycemia.
- d. DFH serum levels
 - d.1. Hyponatremic rats showed statistically significant increased DFH serum levels when compared to controls.

The present results suggest that central and peripheral DFH effects, both in hyponatremia and epilepsy, have the same mechanism of action.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CATHELINEAU, G. & SURBLED, B. Deux cas d'hyponatrémie iatrogène dues au chlorpropamide et à la carbamazépine. *Annales de Médecine Interne*, Paris, 127(8/9):660-5, Août/Sep. 1976.
- COHEN, J.J.; HULTER, H.N.; SMITHLINE, N.; MELBY, J.C.; SCHWARTZ, W.B. The critical role of the adrenal gland in the renal regulation of acid-base equilibrium during chronic hypotonic expansion; evidence that chronic hyponatremia is a potent stimulus to aldosterone secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 58(5):1201-8, Nov. 1976.
- CUDWORTH, A.G. & CUNNINGHAM, J.L. The effect of diphenylhydantoin on insulin response. *Clinical Science and Molecular Medicine*, London, 46(1):131-6, Jan. 1974.
- DARROW, D.C. & YANNET, H. The changes in the distribution of body water accompanying increase and decrease in extracellular electrolyte. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 14(2):266-75, Mar. 1935.
- DEFRONZO, R.A.; SHERWIN, R.S.; DILLINGHAM, M.; HENDLER, R.; TAMBORLANE, W.V.; FELIG, P. Influence of basal insulin and glucagon secretion on potassium and sodium metabolism: studies with somatostatin in normal dogs and in normal and diabetic human beings. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 61(2):472-9, Feb. 1978.
- DILA, C.J. & PAPPUS, H.M. Cerebral water and electrolytes: an experimental model of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Archives of Neurology*, Chicago, 26(1):85-90, Jan. 1972.
- DOUGLAS, W.W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology*, London, 34(3):451-74, Nov. 1968. The first Gaddum Memorial Lecture, Cambridge: September. 1967.
- DOUGLAS, W.W. & RUBIN, R.P. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *Journal of Physiology*, London, 159(1):40-57, Nov. 1961.
- DUBOWSKI, K.M. An a toluidine method for body fluid glucose determination. *Clinical Chemistry*, New York, 8(3):215-35, 1962.

- ESPLIN, D.W. Effects of diphenylhydantoin on synaptic transmission in cat spinal and stellate ganglion. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, 120(3):301-23, July. 1957.
- FARISS, B.L. & LUTCHER, C.L. Diphenylhydantoin-induced hyperglycemia and impaired insulin release. *Diabetes*, New York, 20(3):177-81, Mar. 1971.
- FERREYRA, M. Del C. & CHIARAVIGLIO, E. Changes in volemia and natremia and onset of sodium appetite in sodium depleted rats. *Physiology and Behavior*, Oxford, 19(2):197-201, Aug. 1977.
- FESTOFF, B.W. & APPEL, S.H. Effect of diphenylhydantoin on synaptosome sodium-potassium ATPase. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 47(12):2752-8, Dec. 1968.
- FRANK, M.; BOVET, D.; GATTI, G.L. An autonomic device for the study of conditioned escape reactions in the rat. II. Characteristics for the programmer and the modified Warner cage for studying the barrier crossing responses. *Scientific Reports of the Instituto Superiore di Sanità*, Roma, 1:139-52, Jan. 1961.
- GATTONI, R.C. & IZQUIERDO, I. Post-trial time course of the effect of conditioning and pseudoconditioning on hippocampal and neocortical RNA. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 26(2):169-71, Fev. 1974.
- GLASER, G.H. Sodium and Seizures. *Epilepsia*, New York, 5:97-111, 1964.
- GLASER, G. Experimental derangements of extracellular ionic environment. In: PURPURA, D.P.; PENRY, J.K.; TOWER, D.; WOODBURY, D.M.; WALTER, R., eds. *Experimental models of epilepsy; a manual for the laboratory worker*. New York, Raven, 1972, cap.13, p.317-45.
- GOLDBERG, E.M. & SANBAR, S.S. Hyperglycemic, nonketotic coma following administration of Dilantin (diphenylhydantoin). *Diabetes*, New York, 18(2):101-6, Feb. 1969.
- GRANTHAM, J.J. Patophysiology and hyposmolar conditions: a cellular perspective. In: ANDREOLI, T.; GRANTHAM, J.J.; RECTOR, F. *Disturbances in body fluid osmolality*. Bethesda, American Physiological Society, 1977. cap.10, p.217-25.
- GREEN, J.D. The hippocampus. *Physiological Reviews*, Bethesda, 44(4):561-608, Oct. 1964.
- GROSSMANN, W. & JURNA, I. The effects of diphenylhydantoin on the membrane potentials of rat sensory nerve fibre bundles. *Neuropharmacology*, Oxford, 13(9):819-27, 1974.

- GUEST, G. A centrifuge method for the determination of the volume of cells in blood. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, St. Louis, 19(7):757-68, Apr. 1934.
- HALD, P.M. The flame photometer for the measurement of sodium and potassium in biological materials. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 167(2):499-510, 1947.
- HALES, C.N. & MILNER, R.D.G. The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas. *The Journal of Physiology*, London, 194(3):725-43, Feb. 1968.
- HILLMAN, H. Chemical basis of epilepsy. *The Lancet*, London, 2 (7662):23-4, July 4, 1970.
- HOLLIDAY, M.A.; KALAYCI, M.N.; HARRAH, J. Factors that limit brain volume changes in response to acute and sustained hyper- and hyponatremia. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 47(8):1916-28, Aug. 1968.
- HOUSSAY, B.A. & MOLINELLI, E.A. Excitabilidad de las fibras adrenalino-secretorias del nervio esplanchnico mayor. *Revista de la Sociedad Argentina de Biologia*, Buenos Aires, 4(1/2):5-26, Mayo 1928.
- IZQUIERDO, I. Hippocampal physiology: experiments on regulation of its electrical activity, on the mechanism of seizures, and on a hypothesis of learning. *Behavioral Biology*, New York, 7: 669-98, 1972.
- IZQUIERDO, I. Effect on pseudoconditioning of drugs with known central nervous activity. *Psychopharmacologia*, Berlin, 38(3): 259-66, 1974a.
- IZQUIERDO, I. Possible peripheral adrenergic and cholinergic mechanisms in pseudoconditioning. *Psychopharmacologia*, Berlin, 35(3):189-93, 1974b.
- IZQUIERDO, I. & IZQUIERDO, J.A. Effects of drugs on deep brain centers. *Annual Review of Pharmacology*, Palo Alto, 11:189-208, 1971.
- IZQUIERDO, I. & NASELLO, A.G. Pharmacological evidence that hippocampal facilitation, posttetanic potentiation and seizures may be due to a common mechanism. *Experimental Neurology*, New York, 27(3):399-409, June 1970.
- IZQUIERDO, I. & NASELLO, A.G. Effects of cannabidiol and of diphenylhydantoin on the hippocampus and learning. *Psychopharmacologia*, Berlin, 31(2):167-75, 1973.
- IZQUIERDO, I.; NASELLO, A.G.; MARICHICH, E.S. The dependence of hippocampal function on extracellular potassium levels. *Currents in Modern Biology*, Amsterdam, 4(1):35-46, 1971.

- IZQUIERDO, I. & ORSINGHER, O.A. A physiological difference in the hippocampus of rats with a low inborn learning ability. *Psychopharmacologia*, Berlin, 23(4):386-96, 1972.
- IZQUIERDO, I.; ORSINGHER, O.A.; LEVÍN, L.E. Hippocampal potassium release upon stimulation and performance in a shuttle box. *Behavioral Biology*, New York, 7(3):867-71, 1972.
- IZQUIERDO, I.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.L. Phenobarbital and trimethadione: two anticonvulsant agents with no effect on hippocampal potassium release and on learning. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 25(12):1163-5, dez. 1973.
- KATZ, M.A. Hyperglycemia-induced hyponatremia-calculation of expected serum sodium depression. *The New England Journal of Medicine*, Boston, 289(16):843-4, Oct. 18, 1973.
- KATZMAN, R. & PAPPUS, H.M. Hyponatremia and water intoxication. In:____, *Brain electrolytes and fluid metabolism*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1973. cap. 14, p.291-303.
- KISER, J.S.; VARGAS-CORDON, M.; BRENDDEL, K.; BRESSLER, R. The in vitro inhibition of insulin secretion by diphenylhydantoin. *The Journal of Clinical Investigation*, Boston, 49(10):1942-8, Oct. 1970.
- KLEIN, J.P. Diphenylhydantoin intoxication associated with hyperglycemia. *The Journal of Pediatrics*, St. Louis, 69(3):463-5, Sept. 1966.
- KOREY, S.R. Effects of dilantin and mesantoin on the giant axon of the squid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, New York, 76(2):297-9, Feb. 1951.
- LEVIN, S.R.; BOOKER, JR. J.; SMITH, D.F.; GRODSKY, G.M. Inhibition of insulin secretion by diphenylhydantoin in the isolated perfused pancreas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Philadelphia, 30(3):400-1, Mar. 1970.
- LEVIN, S.R.; GRODSKY, G.M.; HAGURA, R.; SMITH, D. Comparison of the inhibitory effects of diphenylhydantoin and diazoxide upon insulin secretion from the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, New York, 21(8):856-62, Aug. 1972.
- LIPICKY, R.J.; GILBERT, D.L.; STILLMAN, I.M. Diphenylhydantoin inhibition of sodium conductance in squid giant axon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, 69(7):1758-60, July 1972.

- McCAA, R.E.; YOUNG, D.B.; GUYTON, A.C.; McCAA, C.S. Evidence for a role of an unidentified pituitary factor in regulating aldosterone secretion during altered sodium balance. *Circulation Research*, New York, 34(Suppl. 1):I15-I25, 1974.
- McGAUGH, J.L. Drug facilitation of learning and memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Palo Alto, 13:229-41, 1973.
- MALHERBE, C.; BURRILL, K.C.; LEVIN, S.R.; KARAM, J.H.; FORSHAM, P.H. Effect of diphenylhydantoin on insulin secretion in man. *The New England Journal of Medicine*, Boston, 286(7):339-42, Feb. 17, 1972.
- MALLAISSE, W.J.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J.C. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*, New York, 28(4):373-86, Apr. 1979.
- MALNIC, G. & MARCONDES, M. *Fisiological renal*. 2.ed. São Paulo, EDART, 1977. 236p.
- MERRITT, H.H. & PUTNAM, T.J. Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders. *The Journal of the American Medical Association*, Chicago, 111(12):1068-73, Sept. 17, 1938.
- MISON-CRIGHEL, N.; PINTILIE, C.; FLORESCU, D.; TUDOR, S.; VOLANSCHI, D. The influence of phenobarbital and diphenylhydantoin on some blood cation transport systems in epileptics. *Revue Roumaine de Neurologie*, Bucaresti, 10(5):451-9, 1973.
- MISON-CRIGHEL, N.; PINTILIE, C.; VOLANSCHI, D.; FLORESCU, D.; TUDOR, S. The action of antiepileptic drugs - diphenylhydantoin and phenobarbital on enzymatic systems involved in the active transport of cations. *Revue Roumaine de Neurologie*. Bucaresti, 10(5):441-9, 1973.
- MOODY, Jr., W.J.; FUTAMACHI, K.J.; PRINCE, D.A. Extracellular potassium activity during epileptogenesis. *Experimental Neurology*, New York, 42(2):248-63, Feb. 1974.
- MUDGE, G.H. Substâncias que afetam a função renal e o metabolismo eletrolítico. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., eds. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. Seq. 8, p.722-729.
- PEDLEY, T.A.; FISCHER, R.S.; FUTAMACHI, K.J.; PRINCE, D.A. Regulation of extracellular potassium concentration in epileptogenesis. *Federation Proceedings*, Bethesda, 35(6):1254-9, May 1976.

- PERRY, J.G.; MCKINNEY, L.; DE WEER, P. The cellular mode of action of the anti-epileptic drug 5,5-diphenylhydantoin. *Nature*, London, 272(5650):271-3, Mar./Apr. 1978.
- PETERS, B.H. & SAMAAAN, N.A. Hyperglycemia with relative hypoinsulinemia in diphenylhydantoin toxicity. *The New England Journal of Medicine*, Boston, 281(2):91-2, July 10, 1969
- PINCUS, J.H. Diphenylhydantoin and ion flux in lobster nerve. *Archives of Neurology*, Chicago, 26(1):4-10, Jan. 1972.
- PROSSER, C.L. & BROWN, Jr., F.A. Inorganic ions. In: ____. *Comparative animal physiology*. 2.ed. Philadelphia, Saunders, 1961. Cap. 3, p.57-80.
- RAINES, A. & NINER, J.M. Blockade of a sympathetic nervous system reflex by diphenylhydantoin. *Neuropharmacology*, Oxford, 14(1):61-6, 1975.
- RAINES, A. & STANDAERT, F.G. Pre- and postjunctional effects of diphenylhydantoin at the cat soleus neuromuscular junction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, 153(2):361-6, Aug. 1966.
- REED, D.J.; WITHROW, C.D.; WOODBURY, D.M. Electrolyte and acid-base parameters of rat cerebrospinal fluid. *Experimental Brain Research*, Berlin, 3(3):212-9, 1966.
- RENAUD, L.P. & PADJEN, A. Electrophysiological analysis of peptide actions in neural tissue. In: HUGHES, J. ed., *Centrally acting peptides*. London, MacMillan, 1978. Cap. 5, p.59-84.
- REYNOLDS, E.H. & TRAVERS, R.D. Serum anticonvulsant concentrations in epileptic patients with mental symptoms. A preliminary report. *British Journal of Psychiatry*, London, 124:440-5, May 1974.
- RUBENSTEIN, K.E.; SCHREIDER, R.S.; ULLMAN, E.F. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochemical Biophysical Research Communications*, New York, 47(4):846-51, 1972.
- SANBAR, S.S.; CONWAY, F.J.; ZWEIFLER, A.J.; SMET, G. ~~X~~ Diabetogenic effect of dilantin (diphenylhydantoin). *Diabetes*, New York, 16(7):533, July 1967.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento*. São Paulo, McGraw-Hill, 1975. 350p.
- SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 23(2):394-401, Feb. 1957.

- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*. 5.ed. Ames, The Iowa State University Press, 1973. 534p.
- SOMJEN, G.G. Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Physiology*, Palo Alto, 41: 159-77, 1979.
- STORES, G. Behavioral effects of anti-epileptic drugs. *Development Medicine and Child Neurology*, London, 17(5):647-58, Oct. 1975.
- SWANSON, A.G. & ISERI, O.A. Acute encephalopathy due to water intoxication. *The New England Journal of Medicine*, Boston, 258(17):831-4, Apr. 24, 1958.
- SWINYARD, E.A. Effect of extracellular electrolyte depletion on brain electrolyte pattern and electroshock seizure threshold. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 156(2):163-9, Feb. 1949.
- SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, 106(3): 319-30, Nov. 1952.
- SWINYARD, E.A.; TOMAN, J.E.P.; GOODMAN, L.S. The effect of cellular hydration on experimental electroshock convulsions. *Journal of Neurophysiology*, Bethesda, 9(1):47-54, Jan. 1946.
- TANNHAUSER, M. *Farmacologia dos anticonvulsivantes: Efeitos sobre a concentração de RNA no hipocampo e sobre o aprendizado*. Tese apresentada à Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor.
- TANNHAUSER, S.L. *Efeitos dos anticonvulsivantes sobre o aprendizado e a agressividade induzida por extrato de Cannabis sativa e anfetamina*. Porto Alegre, 1975. Tese para Concurso à Livre Docência em Farmacologia. Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica. Instituto de Biociências. UFRGS. 95p.
- TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, M.; BARROS, H.M.T.; BARROS, E.G. Efeitos de anticonvulsivantes sobre o condicionamento de esqui-va ativa e sobre o pseudocondicionamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 31(4):411-4, abr. 1979.
- TEPPERMAN, J. *Fisiologia endócrina e metabólica*. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. 274p.
- THOMÉ, F.; BARBISAN, J.N.; TANNHAUSER, M.; TANNHAUSER, S.L. Efeito da mefenitoína sobre um condicionamento aversivo passivo. In: REUNIÃO ANUAL DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS, 9º. Corrientes, Argentina, 10-12 nov. Universidade Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Farmacologia, 1977. [RESUMES] p.95.

- TOWER, D.B. *Neurochemistry of epilepsy*. Springfield, Thomas, 1960.
- TOWER, D.B. Neurochemical mechanism. In: JASPER, M.; WARD, A.; POPE, A., eds. *Basic mechanisms of the epilepsies*. Boston, Little Brown, 1969. cap.22, p.611-38.
- TRIMBLE, M. The effect of anti-convulsant drugs on cognitive abilities. *Pharmacology and Therapeutics* [B] Oxford, 4(3): 677-85, 1979.
- TRUNIGER, B. *Equilíbrio hidro-eletrolítico: diagnóstico e terapêutica*. São Paulo, EPU, 1977. 233p.
- VALLARTA, J.M.; BELL, D.B.; REICHERT, A. Progressive encephalopathy due to chronic hydantoin intoxication. *American Journal of Diseases of Children*, Chicago, 128(1):27-34, July 1974.
- WEINREICH, D. Ionic mechanism of post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, London, 212(2):431-46, Jan. 1971.
- WEIR, J.F.; LARSON, E.E.; ROWNTREE, L.G. Studies in diabetes insipidus, water balance and water intoxication. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, 29(2):306-30, Feb. 1922.
- WOODBURY, D.M. Effect of diphenylhydantoin on electrolytes and radiosodium turnover in brain and other tissues of normal, hyponatremic and postictal rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, 115(1):74-95, Sept. 1955.
- WOODBURY, D.M. Effect of acute hyponatremia on distribution of water and electrolytes in various tissues of the rat. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 185(2):281-6, May 1956.
- WOODBURY, D.M. & DAVENPORT, V.D. Brain and plasma cations and experimental seizures in normal and desoxycorticosterone-treated rats. *American Journal of Physiology*, Bethesda, 157(2):234-40, May 1949.
- WOODBURY, D.M. & FINGL, E. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: GOODMAN, L.S. & GILMAN, A., eds., *The Pharmacological basis of therapeutics*. 5.ed. New York, Macmillan, 1975. Cap.13, p.201-26.
- WYNN, V. Water intoxication and serum hypotonicity. *Metabolism* New York, 5(4):490-9, July 1956. (Symposium: water and electrolytes).
- ZAR, J. *Biostatistical Analysis*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 1974. 620p.

ZUCKERMANN, E.C. & GLASER, G.H. Hippocampal epileptic activity induced by localized ventricular perfusion with high-potassium cerebrospinal fluid. *Experimental Neurology*, New York, 20(1):87-110, Jan. 1968.