

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

**TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO EM UM
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL:
EFEITOS SOBRE A NOCICEPÇÃO, A ANSIEDADE, A MEMÓRIA
ESPACIAL, E SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DE
BETA-TUBULINA III E PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA.**

ANA PAULA SANTANA DE VASCONCELLOS

Profa. Dra. Carla Dalmaz
Orientadora

Profa. Dra. Elizabete Rocha da Rocha
Co-Orientadora

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

Porto Alegre, fevereiro de 2002.

*Para o Jean.
Por ter me proporcionado descobrir a
grandiosidade do ser humano.*

“Y si soñamos, fue con realidades.”

Juan Cunha

“...É necessário, pois, a propósito disso, fazer uma das coisas seguintes: não perder a ocasião de instruir-se, ou procurar aprender por si mesmo, ou então, se não se for capaz nem de uma nem de outra dessas ações, ir buscar em nossas antigas tradições humanas o que houver de melhor e menos contestável, deixando-se assim levar como sobre uma jangada, na qual nos arriscaremos a fazer a travessia da vida, uma vez que não a podemos percorrer, com mais segurança e com menos riscos, sobre um transporte mais sólido: quero dizer, uma revelação divina.”

“Uma vida sem investigação não é digna de ser vivida.”

Platão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, e por dispormos de Sua obra para realização de nosso trabalho.

À minha mãe, Sônia Santana, por ser um exemplo de força e dignidade. Por ser a mãe que ela é, me protegendo quando preciso, me expondo quando necessário, por ser, muitas vezes, o “dedo de minha consciência”... Enfim, por ser a pessoa mais próxima da perfeição que eu conheço.

À minha avó, Dorvalina Santana, minha “segunda mãe”, por ter brigado tanto, ralhado tanto, e ao mesmo tempo torcido e rezado tanto durante todos estes anos.

A meu irmão, Émerson Vasconcellos, que nunca entendeu meu trabalho mas sempre apoiou minha luta.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carla Dalmaz, por uma confiança que, muitas vezes, nem me julguei merecedora. Por ter sido sempre presente, sempre disponível, sempre disposta a ajudar, e principalmente, por ter sido tão compreensiva, solidária e amiga nos momentos em que mais precisei. Por tudo isto, minha eterna gratidão.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Elizabete Rocha, com quem estabeleci laços que transcendem em muito os profissionais, pela disponibilidade em ajudar e esclarecer todas as dúvidas, pela sinceridade marcante que me ajudou tanto a crescer, e pela amizade e apoio incondicionais sempre que me foi preciso. Meus sinceros agradecimentos e desejo de que nossa relação – profissional e pessoal – mantenha sempre este brilho.

Ao Alex “Man” Tavares, a pessoa mais de verdade que eu conheço, por ele ser quem ele é... E, mais que isso, por ser a personificação de tudo o que um amigo pode ser.

À maior concentração de mocréias por metro quadrado que existe: o laboratório de Estresse e Isquemia Cerebral, palco de tantas brigas e maus humores, mas também de tantas alegrias e amizades. Em especial à Iraci, por minha iniciação neste meio tão fantástico, à Nice, pelo humor por vezes cáustico (mas sempre sincero) e pela presença tão marcante neste grupo, à Ionara e à Fernanda, por ensinarem que rir é sempre o melhor remédio, à Verônica, pela parceria nas disciplinas e por ter o dom de estar sempre sorrindo, e à dupla dinâmica “Giovana + Álvaro”, pela companhia em muitas das intermináveis horas escrevendo a dissertação.

Ao Otemar, vulgo “Nego Véio (ton-ton-ton)”, pela amizade e parceria em tantas horas de trabalho, e por tantos galhos quebrados neste ano de convivência.

Ao grupo de Neuroproteção, pela calorosa acolhida.

Ao Dioguinho, por me ajudar a domesticar o computador.

A todos os bolsistas que me ajudaram em algum momento deste trabalho – Ângela, Rodrigo, Gib, Max, Leo, Márcio, Jana – mas muito em especial à Claudinha, que foi meu braço direito durante tanto tempo.

Ao Prof. Dr. Jorge Quillfeldt, pela “assessoria para assuntos aleatórios”, pelo apoio no estágio didático, e por demonstrar que ensinar é uma arte.

Ao PPG-Neurociências, pela vaga.

Ao Departamento de Bioquímica, pelo espaço.

À CAPES, pelo sustento.

Por fim, um agradecimento muito especial ao Jean... Lembro-me agora de uma música que dizia:

“Onde vá, vá para ser estrela...
As coisas se transformam, e isto não é bom – nem mal...
E onde quer que esteja
O nosso amor tem brilho
Vou ver o teu sinal.”

Não sei que rumo nossas vidas tomarão agora – quem o sabe?

Sei apenas que termos estado juntos até hoje me trouxe até aqui, e serei eternamente grata a isto.

SUMÁRIO:

| | |
|---|------|
| Índice de Figuras..... | vii |
| Índice de Tabelas..... | x |
| Abreviaturas..... | xi |
| Resumo..... | xiii |
| Abstract | xiv |
| | |
| I – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| Neuroendocrinologia da Resposta ao Estresse..... | 5 |
| Estresse Crônico e Neurotoxicidade..... | 9 |
| a - Depleção energética e diminuição da captação de glicose..... | 13 |
| b - Toxicidade glutamatérgica e acúmulo de cálcio..... | 14 |
| c - Diminuição das defesas neuronais..... | 17 |
| d - Alterções eletrofisiológicas..... | 18 |
| e - Alterações na síntese e liberação de fatores neurotróficos..... | 19 |
| Estresse e Depressão..... | 21 |
| Lítio..... | 25 |
| | |
| II – OBJETIVOS..... | 33 |
| | |
| III – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 37 |
| Reagentes..... | 38 |
| Animais Experimentais..... | 39 |
| Desenho Experimental..... | 40 |
| Tarefas Comportamentais..... | 44 |
| Medidas Neuroquímicas..... | 56 |
| Análise Estatística..... | 62 |
| | |
| IV – RESULTADOS..... | 64 |
| Monitoramento de Peso Corporal e Consumo de Água..... | 65 |
| Litemia..... | 65 |
| Tarefas Comportamentais..... | 68 |
| a - Medida de latência para retirada da cauda..... | 68 |
| b - Exposição ao Campo Aberto..... | 70 |
| c - Exposição ao Labirinto em Cruz Elevado..... | 75 |
| d - Medida de latência na Esquiva Inibitória..... | 78 |
| e - Medida de memória espacial no Labirinto Aquático..... | 80 |

| | |
|---|-----|
| Medidas Neuroquímicas..... | 87 |
| a - Medida da imunorreatividade ao anticorpo anti- β -tubulina..... | 87 |
| b - Medida da imunorreatividade ao anticorpo anti-GFAP..... | 94 |
| V – DISCUSSÃO..... | 100 |
| Tarefas Comportamentais..... | 102 |
| a - Medida de Latência para Retirada da Cauda..... | 102 |
| b - Campo Aberto..... | 105 |
| c - Labirinto em Cruz Elevado..... | 108 |
| d - Esquiva Inibitória..... | 111 |
| e - Labirinto Aquático..... | 112 |
| Imunodeteccção..... | 116 |
| a - Imunorreatividade ao anticorpo anti- β -tubulina..... | 116 |
| b - Imunorreatividade ao anticorpo anti-GFAP..... | 118 |
| VI – CONCLUSÕES..... | 123 |
| VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 127 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 3.1: Modelo de Estresse Crônico Variável | 43 |
| Figura 3.2: Aparelho de <i>Tail Flick</i> | 47 |
| Figura 3.3: Campo Aberto | 49 |
| Figura 3.4: Labirinto em Cruz Elevado | 51 |
| Figura 3.5: Esquiva Inibitória | 53 |
| Figura 3.6: Labirinto Aquático | 55 |
| Figura 4.1: Curva de evolução do peso corporal de ratos submetidos a tratamentos crônicos com estresse e lítio..... | 66 |
| Figura 4.2: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o consumo médio de água..... | 67 |
| Figura 4.3: Efeitos dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a Latência para Retirada da Cauda com exposição à novidade..... | 69 |
| Figura 4.4: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de cruzamentos (“Crossings”) na tarefa do Campo Aberto..... | 71 |
| Figura 4.5: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de respostas de orientação (“Rearings”) na tarefa do Campo Aberto..... | 72 |
| Figura 4.6: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a latência para deixar o primeiro quadrado na tarefa do Campo Aberto..... | 73 |
| Figura 4.7: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de bolos fecais na tarefa do Campo Aberto | 74 |
| Figura 4.8: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados no Labirinto em Cruz Elevado..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.9: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de entradas nos braços abertos, fechados, e número total de entradas no Labirinto em Cruz Elevado..... | 77 |
| Figura 4.10: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre as latências para descer da plataforma na Esquiva Inibitória..... | 79 |
| Figura 4.11: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a curva de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris..... | 82 |
| Figura 4.12: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre a latência para atingir o local onde se localizava a plataforma... | 83 |
| Figura 4.13: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre o número de cruzamentos no local onde se localizava a plataforma..... | 84 |
| Figura 4.14: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre o tempo de permanência nos quadrantes alvo e oposto..... | 85 |
| Figura 4.15: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a memória de trabalho no Labirinto Aquático..... | 86 |
| Figura 4.16: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em córtex cerebral (hemisfério direito) de ratos..... | 88 |
| Figura 4.17: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em córtex cerebral (hemisfério esquerdo) de ratos..... | 89 |
| Figura 4.18: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em amígdala de ratos..... | 90 |
| Figura 4.19: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em giro denteado de ratos..... | 91 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.20: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em CA1 de ratos..... | 92 |
| Figura 4.21: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em CA3 de ratos..... | 93 |
| Figura 4.22: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP em córtex cerebral de ratos..... | 95 |
| Figura 4.23: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP em amígdala de ratos..... | 96 |
| Figura 4.24: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP em giro denteado de ratos..... | 97 |
| Figura 4.25: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP em CA1 de ratos..... | 98 |
| Figura 4.26: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP em CA3 de ratos..... | 98 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Cronograma de Agentes Estressores..... | 42 |
| Tabela 2: Meio de Krebs Ringer | 56 |
| Tabela 3: Solução A (Solução de Lise para Eletroforese Unidimensional) | 57 |
| Tabela 4: Solução B (Solução de Lise para eletroforese Unidimensional) | 57 |
| Tabela 5: Gel de Poliacrilamida – SDS | 58 |
| Tabela 6: Tampão de Eletroforese | 58 |
| Tabela 7: TTS, L-TTS, T-TTS | 60 |
| Tabela 8: Tampão Bjerrum | 60 |

ABREVIATURAS

- 5HT – 5-hidroxi-triptamina (Serotonina)
ACTH – Hormônio adreno-cortico-trófico
AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AMPc – Adenosina Monofosfato cíclica
ANOVA – Análise de Variância
ATP – Adenosina Trifosfato
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE – Barreira Hemato-encefálica
CA1 – Corno de Amon 1
CA3 – Corno de Amon 3
CREB – Proteína Ligante de Elemento Responsivo ao AMP-cíclico
CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina
DB – Distúrbio Bipolar
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
GABA – Ácido Gama-aminobutírico
GC – Glicocorticóides
GD – Giro Denteado
GFAP – Proteína Glial Fibrilar Ácida
HEPES – Ácido Etanosulfônico-2-hidroxietil-piperazina
Hsp72 – Proteína de Choque Térmico 72
LHPA – Eixo límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal
LTP – Potenciação a Longo Prazo
L-TTS – Tampão Tris-salino com Leite
Na⁺/K⁺-ATPase – Bomba sódio-fosfato-ATPase
NGF – Fator de Crescimento Nervoso
NMDA – N-metil-D-aspartato
NPV – Núcleo paraventricular do Hipotálamo
NT – Neurotrofina

PKC – Proteína Cinase C
RNAm – Ácido Ribonucleico mensageiro
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SNV – Sistema neuro-vegetativo
TEMED – Tetrametil-etilenodiamina
Tris – Tris(hidroximetil)-aminometano
TrkB – Tirosina Cinase B
TTS – Tampão Tris-salino
T-TTS – Tampão Tris-salino com Tween 20

RESUMO

O termo estresse é utilizado para definir o conjunto de alterações adaptativas do organismo, que objetivam a reação a estímulos nocivos e restabelecimento da homeostase. O principal evento da resposta ao estresse é a síntese e liberação de glicocorticóides, devido à ativação do sistema límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal (LHPA), o que, por tempo prolongado, pode levar a perda neuronal ou atrofia dendrítica. A hiperativação do eixo LHPA também ocorre na depressão, o que leva a sugerir que as duas patologias tenham mecanismos de ação semelhantes, e ainda que a terapia antidepressiva poderia ser utilizada no tratamento ou prevenção dos efeitos do estresse crônico. Uma das alternativas terapêuticas na depressão é o tratamento com sais de lítio, utilizado principalmente nos distúrbios bipolares. Estes sais atuam por diversos mecanismos, que vão de transdução de sinal à expressão gênica, e recentes estudos sugerem um novo aspecto do tratamento com lítio: a neuroproteção.

Para testar a hipótese de efeito neuroprotetor do lítio sobre o estresse, utilizamos um modelo de estresse crônico variável previamente estabelecido em nosso laboratório, que consiste na aplicação de sete diferentes agentes estressores (imobilização, imobilização mais frio, luz piscante, inclinação, barulho, nado forçado e isolamento, aplicados aleatoriamente e com duração variável) durante quarenta dias, durante os quais metade dos animais foram tratados com ração contendo cloreto de lítio. Ao final do tratamento, foram realizadas as seguintes tarefas comportamentais: Medida de Latência de Retirada da Cauda com exposição à novidade, onde todos os animais apresentaram efeito da novidade; Exposição ao Campo Aberto, em que todos os animais apresentaram efeito da sessão, havendo diferença apenas na latência para sair do primeiro quadrado; Labirinto em Cruz Elevado, onde o tratamento com lítio induziu efeito ansiolítico; Esquiva Inibitória, em que todos os animais apresentaram memória adequada; e Labirinto Aquático, onde o efeito prejudicial do estresse sobre a memória de referência foi revertido pelo tratamento crônico com lítio.

Na tentativa de avaliar os correlatos neuroquímicos destes resultados, foram realizadas medidas de imunoconteúdo de duas proteínas cerebrais – beta-tubulina e GFAP – no córtex cerebral, amígdala e três diferentes regiões do hipocampo – CA1, GD e CA3 – dos animais. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças significativas em nenhum destes parâmetros, excetuando uma alteração dos níveis de beta-tubulina encontrada no córtex do hemisfério direito de todos os grupos, sugerindo que as alterações neuronais responsáveis pelos efeitos verificados no comportamento sejam muito sutis para determinação por imunorreatividade, e que o lítio tenha atuado por mecanismos outros que não a gliose reativa.

ABSTRACT

The word "stress" is used to define the adaptive alterations of an organism, aimed to react against nocive stimuli and reestablish the homeostasis. The main event of the stress response is the synthesis and release of glucocorticoids, due to the activation of the limbic-hypothalamus-pituitary-adrenal axis (LHPA), which may lead to neuronal loss or dendritic atrophy, when the exposure to stress is prolonged. An increased activation of the LHPA axis occurs also in the depression, what suggests that both pathologies have similar mechanisms of action, and that antidepressive therapy may be used in the treatment or prevention of chronic stress effects. One of the therapeutic possibilities in treating depression is the treatment with lithium salts, which are used mainly in bipolar disorders. These salts act by different mechanisms, from signal transduction to gene expression, and recent studies suggest a new aspect of this lithium treatment: neuroprotection.

To test the hypothesis of a neuroprotective effect of lithium under stress conditions, we used a model of chronic variable stress, previously established in our laboratory, which consists in the exposure to seven different stressors (restraint, cold restraint, flashing light, inclination of the cages, noise, force swimming, isolation, used in a random way, and during different periods) during forty days. During this period, half of the animals were treated with lithium chloride in the chow. At the end of the treatment, the animals were submitted to the following behavioral tasks: measurement of the latency to tail-flick after exposure to novelty, in which all the groups presented a novelty-induced effect; habituation to the open field, in which all the animals presented habituation to the open field, and there was only a difference in the latency to leave the first square; plus-maze, in which lithium treatment presented an anxiolytic effect; inhibitory avoidance, with all the animals presenting adequate memory; and water maze, with the chronically stressed animals presenting a decreased performance (impaired spatial memory), and this effect was reverted by chronic lithium treatment.

Trying to evaluate the neurochemical correlates of these results, we measured the immunocontent of two brain proteins – beta-tubulin and GFAP – in cerebral cortex, amygdala and in three different regions of the hippocampus – CA1, CA3 and dentate gyrus - in these animals. The results presented no significant differences in these parameters, except for an alteration observed in all groups in beta-tubulin levels in the right cerebral cortex, suggesting that the neuronal alterations responsible for the behavioral changes are not easily observed by these immunoreactive evaluations, and that lithium may have act by other mechanisms not involving reactive gliosis.

INTRODUÇÃO

Quando referimo-nos ao estresse, a linguagem é praticamente universal. Não é exagero dizer que o termo "stress" rompe as barreiras da língua, cultura, ou classe social. No decorrer dos últimos anos, este termo foi utilizado com cada vez maior frequência, independentemente de idade ou sexo, para denominar, quase que invariavelmente, as sensações que sucedem eventos de alguma forma desagradáveis, seja pelo evento *per se*, seja por suas consequências. Estes eventos fatalmente implicam uma reação adaptativa do organismo, e observando bem, os seres vivos estão constantemente em contato com situações que lhes exigem adaptação em nível físico e/ou psicológico. Exemplos disso são as alterações climáticas, que exigem um reequilíbrio térmico do organismo, alterações no estado nutricional, que levam o organismo a mobilizar-se para armazenar ou liberar energia, ou também, para seres que vivem em comunidade, alterações sócio-político-econômicas, que levam o indivíduo à necessidade de reestruturar-se para se integrar melhor à sociedade. Contudo, não são apenas eventos desagradáveis que desencadeiam uma resposta adaptativa: sentimentos de exultação, excitação, provocam no organismo a mesma série de reações, o que é denominado por alguns autores como um "bom estresse" (McEwen, 2000a). Considerando então esta gama de respostas adaptativas como causadas por eventos estressantes, podemos dizer, enfim, que o estresse é um aspecto constante de nosso dia-a-dia.

A resposta ao estresse induz alterações que são cruciais para a adaptação e sobrevivência do organismo, e são responsáveis por sua

resistência às modificações do meio ambiente. Segundo Chrousos & Gold (1995), organismos unicelulares adaptam-se com mudanças apropriadas em sua bioquímica, organismos multicelulares adaptam-se através de complexas mudanças neurais, humorais e celulares, e organismos sociais, cuja sobrevivência depende da cooperação da comunidade, também desenvolvem ligações sociais com esta comunidade, e a manutenção destas ligações é crucial para a sobrevivência. Tais alterações geram distúrbios no complexo equilíbrio orgânico conhecido como “homeostasia”, que corresponde à manutenção dos níveis ótimos de pH, oxigênio e temperatura corporal, vitais ao organismo (McEwen, 2000a). Pode-se dizer, portanto, que a resposta ao estresse, sendo uma resposta adaptativa, é desencadeada visando restabelecer este fino equilíbrio, e ainda que os hormônios liberados durante o estresse tem um intuito protetor quando a curto prazo, tornando-se lesivos quando produzidos a longo prazo, em grandes quantidades ou desnecessariamente (Sapolsky, 2000).

Difícil, no entanto, é formular uma definição fiel ao termo “estresse”. Trata-se de um conceito complexo e multidimensional, por ter inerente diversos componentes que podem ser enumerados, tais como o estímulo estressante, os sistemas de processamento deste estímulo, o que inclui a experiência subjetiva do estresse, a resposta ao estresse, e ainda as experiências e atribuições sensoriais do indivíduo frente ao estímulo estressante (Ursin e Olf, 1993). O cérebro responde ao estresse de maneira complexa e orquestrada, e esta resposta requer ativação de estruturas envolvidas com estímulos sensoriais e

motores, bem como as funções autônomas, cognitivas e emocionais (Jessop, 1999; Lopez *et al.*, 1999). No entanto, a resposta ao estresse não envolve apenas elementos cerebrais, mas também outros sistemas, como o endócrino, o autônomo e o imunológico – de fato, são as ligações entre os circuitos cerebrais e os sistemas mais “periféricos” que formam as bases para as respostas adaptativas ao estímulo estressante (López *et al.*, 1999).

Em 1936, o cientista e médico austríaco Hans Selye, em meio a seus experimentos pioneiros no assunto, definiu o estresse como “Síndrome da Adaptação Geral”, ou seja, a resposta adaptativa de um organismo à ação de agentes nocivos - os chamados agentes estressores. Ele postulou, ainda, que a resposta ao estresse seria dividida em três estágios: um primeiro de alarme, onde o agente estressor seria notado; um segundo de resistência, no qual o organismo estaria combatendo o agente estressor com sucesso; e, por fim, um estado de exaustão, onde o organismo esgotaria sua capacidade de resposta ao estresse, daí advindo os seus efeitos deletérios (Selye, 1936, *apud* Kopin, 1995). De fato, várias alterações - ou desordens - estão associadas à hiperexposição a agentes estressores, o que denominamos Estresse Crônico (McEwen & Magariños, 1997). Exemplos disso são disfunções hormonais, que vão desde alterações no crescimento a problemas reprodutivos, hipertensão, diabetes induzida por esteróides, etc. No entanto, são poucas as evidências que indiquem esta “falência” apontada por Selye. O estresse crônico não é patogênico em função das falhas nas defesas do organismo, mas em função das próprias defesas tornarem-se patogênicas (Sapolsky, 1992). Para entender

isto, contudo, é necessário relembrar quais sistemas estão envolvidos na resposta ao estresse, e os mecanismos pelos quais atuam sobre o organismo.

Neuroendocrinologia da Resposta ao Estresse:

Os sistemas fisiológicos responsivos ao estresse mais comumente estudados são o eixo límbico-hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo LHPA) e o sistema neuro-vegetativo (SNV, em especial a resposta simpática da medula adrenal), sendo ambos controlados pelos neurônios da região periventricular do hipotálamo, chamados “neurônios neurosecretórios parvocelulares” (López *et al.*, 1999). O componente simpático da reação ao estresse pode ser visto como a primeira fase desta resposta, e a ativação do eixo LHPA como a segunda: as catecolaminas secretadas pelo SNV induzem cascatas de segundos mensageiros nos tecidos alvo em poucos segundos, enquanto os glicocorticóides, produto final da ativação do eixo, são secretados após uma latência de minutos, sendo que seus efeitos podem levar horas para surgir, pois tipicamente envolvem eventos transcricionais (McEwen e Sapolsky, 1995).

Frente ao estímulo estressante, as aferências sensoriais, oriundas do tronco cerebral e de diversas regiões da medula espinal, e/ou estímulos oriundos do Sistema Nervoso Central (SNC, e.g. a recordação de um momento estressante, ou a antecipação de um evento de mesma característica), atingem a região periventricular do hipotálamo. Este, por vias do sistema simpático,

estimula a medula das glândulas adrenais, levando à liberação de catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina), o que constitui uma resposta imediata inicial ao estresse (Ursin & Olf, 1993; Zigmond *et al.*, 1995; Bear *et al.*, 1996). Esta descarga catecolaminérgica tem como função principal a mobilização de energia e supressão de todos os sistemas “desnecessários” na situação de alarme, como digestão, crescimento, reprodução e imunidade (Sapolsky, 2000; Leonard & Song, 1996), e é responsável pelos sintomas descritos por Walter Cannon no início do século (Cannon, 1929 *apud* Pacák & Palkovits, 2001) e que foram imortalizadas pelo paradigma da “luta ou fuga”.

Historicamente, contudo, o sistema biológico que tem sido associado mais diretamente à resposta ao estresse em mamíferos é o eixo LHPA, que possui componentes tanto cerebrais quanto endócrinos, constituindo, então, o circuito neuroendócrino de resposta ao estresse (Herman *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 2001). Diversas estruturas do prosencéfalo, incluindo o córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e septo, juntamente com as fibras nervosas transportadoras dos estímulos sensoriais, lançam aferências mono e polissinápticas que convergem para o núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV), o qual age como um integrador final da resposta ao estresse (López *et al.*, 1999). Os neurônios do NPV expressam importantes peptídeos, como arginina-vasopressina, ocitocina e, neste caso especialmente, o hormônio liberador da corticotrofina (CRH, do inglês *corticotrophin releasing hormone*) (Stratakis & Chrousos, 1995), que são liberados em resposta a estressores fisiológicos e psicológicos. Os axônios destes neurônios projetam-se para a

zona externa da eminência média do hipotálamo, o que leva à liberação dos peptídeos no sistema porta - uma estrutura vascular especializada que liga o SNC à porção anterior da hipófise (Hayden-Hixson & Nemeroff, 1993). Isto resulta na síntese e liberação hipofisária de diversos outros peptídeos derivados de um precursor comum: a pró-opiomelanocortina. Entre estes peptídeos, estão incluídos os opióides endógenos, como a β -endorfina, e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Akil & Morano, 1995), que, ao ser lançado na circulação sistêmica, é carregado até o córtex das glândulas adrenais, onde é ativada a produção e liberação de glicocorticóides (Lupien & Meaney, 1998).

O CRH exerce o papel principal na liberação de ACTH induzida pelo estresse (Kalin *et al.*, 1994). Entretanto, animais com lesões no núcleo paraventricular hipotalâmico ainda respondem a agentes estressores, sugerindo que a hipófise ainda permanece funcional após a destruição dos neurônios liberadores de CRH. De fato, a secreção de ACTH é controlada por fatores estimulatórios além do CRH, como arginina-vasopressina, peptídeo intestinal vasoativo, adrenalina e serotonina, e fatores inibitórios incluindo somatostatina e glicocorticóides (Delbende *et al.*, 1992).

Os glicocorticóides (GC) - principalmente o cortisol em humanos e a corticosterona em ratos (Bhatnagar *et al.*, 1997; Fuchs e Flügge, 1998) - são parte de uma grande família de hormônios esteróides, sendo sintetizados nas células da zona fasciculata adrenocortical a partir de uma série de reações enzimáticas utilizando o colesterol como precursor. As células adrenocorticais

não armazenam grande quantidade de glicocorticóides, e a secreção destes está associada à síntese “de novo”. Ao serem liberados, 90 a 95% dos glicocorticóides ficam ligados à proteína plasmática corticosteróide-globulina, com a qual apresentam uma relação linear de concentração, e apenas a fração livre (cerca de 5%), altamente lipofílica, penetra livremente a barreira hematoencefálica (BHE) (Herbert, 1998). Em situações de estresse, os níveis de corticosteróide-globulina disponíveis para ligação tornam-se saturados pelos altos níveis de GCs, provocando um marcado aumento em sua fração livre (Campeau *et al.*, 1998; Herbert, 1998). Estes hormônios exercem seus efeitos sobre vários tecidos, e sua ação está relacionada em grande parte à interação com receptores citosólicos, regulando eventos genômicos e alterando a transcrição de determinados genes (Sapolsky, 1992).

O nome “glicocorticóide” é devido à habilidade destes hormônios em promover a conversão de proteínas e lipídeos a fontes de carboidratos prontamente utilizáveis pelo organismo (McEwen, 2000a). São, portanto, hormônios hiperglicemiantes, que participam da regulação energética e da atividade metabólica corpórea estimulando a ingestão de alimentos e inibindo o armazenamento periférico de energia (Strack *et al.*, 1995). Em condições normais de homeostasia, estes hormônios são liberados no organismo em ciclos alternados, obedecendo a um relógio biológico que prevê um aumento da demanda de energia do animal (Martí *et al.*, 1993; Campeau *et al.*, 1998), com altos níveis pela manhã em humanos e no início da noite em ratos, que são animais noturnos (Endo *et al.*, 1999). energia.

Parece claro que a ativação do eixo LHPA, e consequente liberação de glicocorticóides, é adaptativa e essencial para a sobrevivência imediata do organismo quando em resposta a estímulos agudos. Contudo, o estresse crônico pode levar a alterações específicas na atividade deste circuito, que podem ser consideradas patológicas, ou resultantes de uma adaptação inadequada, gerando a situação deletéria denominada estresse crônico.

Estresse Crônico e Neurotoxicidade:

A regulação das ações do eixo LHPA é feita, em grande parte, por retroalimentação (“*feed-back*”) dos glicocorticóides sobre componentes do SNC, aumentando ou diminuindo sua atividade de acordo com as necessidades fisiológicas (Marti *et al.*, 1999). Várias estruturas cerebrais estão envolvidas nos processos de retroalimentação, dentre as quais incluem-se o hipotálamo, componente do eixo LHPA, e a amígdala, o córtex cerebral pré-frontal e o hipocampo (Campeau *et al.*, 1998), sendo esta última estrutura uma das mais fortemente relacionadas à regulação do eixo devido a sua alta concentração de receptores glicocorticóides.

Estes hormônios possuem dois tipos básicos de receptores: (1) os mineralocorticóides, ou receptores Tipo I, os quais respondem a níveis hormonais basais e no SNC encontram-se distribuídos principalmente no hipocampo, e (2) os receptores glicocorticóides, ou Tipo II, que são ativados em

resposta a níveis elevados de glicocorticóides e apresentam distribuição mais ampla, e.g., estruturas como córtex cerebral, septo lateral e ventromedial e núcleo arqueado hipotalâmico, além do próprio hipocampo (Magariños *et al.*, 1989, Sapolsky, 1992; Smith, 1996).

Lesões no hipocampo estão relacionadas ao desligamento defeituoso da resposta ao estresse e ao aumento do CRH e da vasopressina, com consequente hipersecreção de glicocorticóides. Por outro lado, a exposição prolongada a altos níveis de glicocorticóides lesa os neurônios hipocampais, reduzindo de modo permanente a sensibilidade à retroação e perpetuando o excesso de glicocorticóides e suas repercussões sobre o hipocampo (Halbe *et al.*, 1996).

Diversos dados da literatura vêm apontando os efeitos neurotóxicos da exposição prolongada a glicocorticóides. De todas as estruturas cerebrais, parecem ser as camadas de células piramidais das regiões CA3 e CA4 do hipocampo as mais sensíveis a injúrias mediadas por glicocorticóides (McEwen, 1999; McKittrick, 2000). Estas injúrias podem se manifestar em diversos níveis, que incluem desde atrofia dendrítica e retração celular até morte neuronal (Watanabe *et al.*, 1992; Sapolsky, 2000). Evidentemente, o nível da lesão provocada é dependente da intensidade e duração da exposição aos glicocorticóides, e aqui é importante ressaltar que as quantidades destes hormônios liberadas durante situações de estresse crônico são suficientes para causar atrofia dendrítica e perda celular (McEwen *et al.*, 1999; McKittrick, 2000; Sapolsky, 2000). Este tipo de dano às células hipocampais também é

observado em humanos: diversos estudos constataram que o hipocampo sofre atrofia após situações como estresse traumático, depressão recorrente e síndrome de Cushing, patologias estas que apresentam como característica comum um aumento da atividade do eixo LHPA (Magariños *et al.*, 1997). Indivíduos idosos também apresentam uma aumentada atividade do eixo LHPA, o que pode provocar atrofia de neurônios hipocampais, e nesta linha de raciocínio foram desenvolvidos trabalhos com ratos velhos que demonstraram uma resposta exacerbada a situações de estresse agudo, justamente pela impossibilidade do hipocampo em ativar os processos de retroação negativa (Sapolsky, 1983; Smith, 1995).

Embora o dano celular nas regiões CA1 e Giro Denteado (GD) do hipocampo, mediado por altos níveis de GCs, não seja tão evidenciado quanto na região CA3, estes hormônios têm a propriedade de aumentar a vulnerabilidade destas estruturas frente a insultos induzidos por outros agentes lesivos (Stein-Behrens *et al.*, 1992, 1994a e 1994b), ou também inibir o funcionamento normal dos neurônios destas regiões. Exemplos disso são a potencialização dos danos provocados na região CA1 por processos isquêmicos (Adachi *et al.*, 2001; DeVries *et al.*, 2001), e o aumento da vulnerabilidade de suas células frente a insultos induzidos por drogas convulsivantes, como o ácido caínico (Smith-Swintosky *et al.*, 1996; Sapolsky 2000).

Nos últimos anos, tem-se evidenciado um outro efeito da exposição a níveis alterados de GC, tais quais os observados em situações de estresse: a

diminuição na proliferação de células granulares do GD. Esta região do hipocampo é rica em células-tronco, que apresentam a propriedade de diferenciar-se em novas células nervosas ao longo do desenvolvimento do SNC e também na fase adulta (Biebl *et al.*, 2000; Ambrogini *et al.*, 2000). As células-tronco adquirem o fenótipo de neurônio, enviando prolongamentos axonais para a região CA3, integrando-se às fibras musgosas e estabelecendo contatos sinápticos com as células desta região, tornando-se, portanto, funcionalmente incorporadas aos circuitos neurais pré-existentes (Hastings & Gould, 1999; Hastings *et al.*, 2001). O processo de diferenciação das novas células a neurônios e o equilíbrio entre a gênese e morte apoptótica destas células é denominado neurogênese, e as reais implicações destes novos neurônios não são ainda bem descritas (Scharff, 2000). Contudo, há indícios de que estes neurônios estejam envolvidos nos mecanismos de aprendizagem e memória, e também que façam parte dos processos de plasticidade neural (Gould *et al.*, 1999; Hastings *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2001). Diversos trabalhos apontam uma diminuição da neurogênese em hipocampo de animais submetidos a diferentes modelos de estresse, bem como à administração de GC, e esta diminuição é observada tanto nos cérebros em desenvolvimento (Tanapat *et al.*, 1998) quanto na fase adulta (Gould & Tanapat, 1999; Gould *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais os glicocorticóides prejudicam as células nervosas são constante fonte de estudos, já tendo sido apontados diversos fatores que podem estar envolvidos nos processos de lesão. São eles:

a) Depleção Energética e Diminuição da Captação de Glicose

Este efeito faz parte das alterações clássicas do organismo em resposta ao estresse, i.e., a inibição da utilização de glicose por sistemas “desnecessários” na resposta de alarme. De fato, os glicocorticóides inibem em torno de 75% o transporte de glicose em células do sistema imune, fibroblastos e adipócitos (Munck, 1971 *apud* Sapolsky, 1998). Estes efeitos parecem ser dependentes de síntese protéica (Giaume *et al.*, 1995): em poucos minutos os GCs estimulam a síntese de uma proteína sequestradora de transportadores de glicose, carreando-os para sítios intracelulares ou redistribuindo-os para locais outros que não os seus sítios ativos; além disso, em questão de horas ou dias, os GCs inibem a transcrição dos genes para os transportadores de glicose, ou desestabilizam os níveis de RNAm para estes transportadores. Isto resulta, enfim, num decréscimo no transporte de glicose para o meio intracelular.

Nos últimos tempos, têm-se evidenciado estes mesmos efeitos inibitórios em estruturas do SNC, especialmente no hipocampo. Estudos indicam a possível atuação dos GCs via eventos genômicos lentos, uma vez que os insultos não são aparentes após exposição de culturas celulares a períodos de poucos minutos (Xavier, 1995; Chipkin, 1998; Sapolsky, 1998). Comparando, contudo, com os tecidos periféricos, este efeito é bem mais reduzido, localizando-se na faixa dos 25% (Sapolsky, 1992). Esta redução por si só não é suficiente para provocar perda celular, mas é capaz de exacerbar as lesões induzidas por outros insultos.

b) Toxicidade Glutamatérgica e Acúmulo de Cálcio

O glutamato, que é um aminoácido essencial, é também o principal neurotransmissor excitatório do SNC, perfazendo cerca de 60% do total de sinapses nele existentes. Altas concentrações de glutamato, contudo, podem ser deletérias às células nervosas, por provocar a denominada excitotoxicidade glutamatérgica, ou seja, uma situação de hiperestimulação destas células. Para evitar esta excitotoxicidade, existe um fino equilíbrio entre a liberação e a recaptação de glutamato: ele é liberado na fenda sináptica mediante estímulo, e rapidamente recaptado, a maior parte pelos astrócitos adjacentes, via cotransporte com sódio por transportadores acoplados a uma bomba sódio-potássio-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) (Smith, 1995; Anderson & Swanson, 2000). É lógico, portanto, que há a necessidade de uma alta concentração de sódio extracelular como coadjuvante para este cotransporte, o que não ocorre num período pós-excitatório extenso, em que o influxo neuronal de sódio é elevado (Sapolsky, 2000). Justamente neste ponto a ação dos GCs pode ser deletéria: ao diminuir a captação de glicose, diminui a fonte de substrato energético para o funcionamento das Na^+/K^+ -ATPases, o que tende a diminuir a captação de glutamato (Reagan & McEwen, 1997). Somando-se a isto, em situações de depleção energética severa, a despolarização da membrana neuronal leva a uma maior concentração de sódio intracelular, e conseqüente efeito reverso da bomba: não só haverá falha na remoção do glutamato, como também aumento no efluxo das reservas citosólicas deste neurotransmissor (Rossi *et al.*, 2000).

A hipótese de que os GCs exerçam seus efeitos deletérios em parte por excitotoxicidade glutamatérgica tem já inúmeras comprovações, e os dados já citados, que indicam uma exacerbação dos danos provocados por situações em que sabidamente há dano mediado por excesso de glutamato, i.e., isquemia cerebral e convulsões, vêm de encontro a isto. Paralelamente, a atrofia dendrítica observada nas células da região CA3 é bem mais acentuada nas células apicais, que recebem o maior número de aferências excitatórias das fibras musgosas oriundas do GD (Smith, 1996; McEwen, 2000a), dados que também combinam com a hipótese de que a toxicidade dos GC seja mediada por aumento na liberação de glutamato.

A elevação nos níveis de glutamato induz efeitos neurotóxicos basicamente pelo aumento dos níveis de cálcio intracelular, o que ocorre em parte pela ligação aos receptores ionotrópicos (i.e., NMDA e AMPA), permitindo a entrada de cálcio. Contudo, em experimentos utilizando culturas de células em condições basais, i.e., em que não há aumento nas concentrações extracelulares de glutamato, a adição de GCs provocou aumento do cálcio citosólico livre (Elliot & Sapolsky, 1993), o que indica que estes hormônios podem exercer alguns de seus efeitos influenciando o transporte vesicular de cálcio.

O aumento exacerbado nos níveis intracelulares de cálcio desencadeia uma série de reações que poderão levar a danos ou mesmo morte neuronal. Exemplos disso são a gênese de radicais livres mediada por cálcio, o que é evidenciado pela indução de síntese de óxido nítrico, geração de xantina

oxidase, ativação de fosfolipases que liberam ácido araquidônico das membranas e prejuízo da atividade mitocondrial (Sapolsky, 2000). Outro mecanismo pelo qual o cálcio pode ser lesivo é através da ativação de proteases como a calpaína, responsável pela destruição da proteína espectrina, uma das proteínas componentes do citoesqueleto (Vanderklisch & Bahr, 2000). A atuação destas proteases pode ser uma das responsáveis pela atrofia dendrítica observada frente a situações de estresse (Rajkowska, 2000; Souza et al, 2000; McEwen, 2000b).

Resumindo: o estresse estimula a liberação de glicocorticóides, que por sua vez inibem a captação de glicose em tecidos periféricos e no SNC. A diminuição de glicose, principal substrato energético para o funcionamento cerebral, leva a uma diminuição da atividade das ATPases existentes no sistema nervoso. Um grupo destas ATPases está associado a transportadores de glutamato – logo, sem combustível para seu funcionamento, haverá um acúmulo de glutamato nas fendas sinápticas, o que implica também em aumento das concentrações de cálcio intracelular, tanto pela ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos quanto pela mobilização das reservas intracelulares de cálcio.

Contudo, conforme citado anteriormente, apenas a diminuição na captação de glicose mediada pela hiperexposição a situações de estresse não seria suficientemente potente para provocar perda celular. Além disso, há situações em que a simples administração de GCs não é suficiente para mimetizar os efeitos do estresse crônico, o que indica que fatores cerebrais

adicionais devem estar envolvidos nas alterações observadas após a exposição ao estresse (Smith, 1996; Sapolsky, 1998). Estudos correntes tem demonstrado que existem outros mecanismos envolvidos na ação deletéria do estresse crônico, como a diminuição nas defesas contra insultos neurológicos, alterações eletrofisiológicas mediadas por GCs, e a alteração na mobilização de fatores neurotróficos.

c) Diminuição das Defesas Neurais

Diversos estudos tem relatado que o estresse crônico induz uma diminuição em diversos tipos de defesas neuronais. Como exemplo disso pode-se citar a marcante diminuição de enzimas antioxidantes, e.g. diminuição da atividade das enzimas Cu/Zn-superóxido dismutase e glutathione peroxidase (McIntosh & Sapolsky, 1996; McIntosh *et al.*, 1998), provocada pela exposição a níveis supra-fisiológicos de GCs. Outro exemplo é a diminuição na mobilização extracelular do ácido gama-aminobutírico (GABA, do inglês *gamma-aminobutyric acid*) e da adenosina durante insultos (Ravindran et al. 1994 *apud* Sapolsky, 1998), bem como a redução do potencial inibitório pós-sináptico gabaérgico, que funciona como uma resposta protetora aos insultos glutamatérgicos (McEwen, 2000b). Além disso, o estresse parece induzir alterações na síntese e eficácia da proteína de choque térmico hsp72 (hsp, do inglês *Heat Shock Protein*), cuja expressão é neuroprotetora em uma variedade de insultos (Sapolsky, 2000).

d) Alterações Eletrofisiológicas

Os glicocorticóides também podem causar alterações eletrofisiológicas em células hipocâmpais e, curiosamente, os efeitos são diferenciados de acordo com o tipo de receptor estimulado: baixas doses de GCs, com consequente ligação aos receptores de alta afinidade Tipo I (ou mineralocorticóides), provocam aumento na excitabilidade neuronal da região CA1. Este efeito se dá provavelmente via inibição da hiperpolarização lenta pós-potencial, a qual atua como um mecanismo intrínseco de atenuação da aferência excitatória (Joels & Kloet, 1991; Smith, 1996). Paralelamente, altas doses de GCs, as quais estimulam os receptores do Tipo II, provocam o efeito inverso, aumentando a hiperpolarização pós-potencial (provavelmente por aumentar a condutância de cálcio) e, consequentemente, diminuindo a excitabilidade hipocâmpal (Joels & Kloet, 1991; Smith, 1996). Uma das consequências desta diminuição é o prejuízo provocado sobre a potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *Long-term Potentiation*), um correlato de memória e aprendizagem, que tem sido apontado como envolvido na formação e memória espacial no hipocampo (Pavlidis *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Garcia, 2001). De fato, diversos estudos tem apontado prejuízos na memória espacial provocados pelo estresse crônico ou pela administração crônica de GCs, conforme será mencionado posteriormente.

e) Alteração da Síntese e Liberação de Fatores Neurotróficos

Fatores neurotróficos são substâncias humorais que promovem o crescimento e a diferenciação de neurônios, e sua remoção causa, senão morte neuronal, atrofia e perda do fenótipo de neurônio (Altar, 1999; McAllister *et al.*, 1999). Existem diversos tipos de fatores neurotróficos, como o Fator de Crescimento Nervoso (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*), Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF, do inglês *Brain-derived Neurotrophic Factor*), e as Neurotrofinas (NT). Classicamente, os fatores neurotróficos são liberados pelo neurônio pós-sináptico, ligando-se a receptores acoplados a tirosina-cinase existentes na superfície do neurônio pré-sináptico, e então transportados por fluxo retrógrado ao núcleo, onde influenciarão a expressão gênica (Thoenen, 1995; Duman *et al.*, 2000; Goldberg & Barres, 2000).

Os dados referentes ao efeito do estresse sobre a produção de fatores neurotróficos são ainda bastante confusos. Sabe-se que o estresse diminui a expressão do RNAm para o BDNF em todas as regiões do hipocampo. Esta diminuição é mais pronunciada no Giro Denteado, onde uma única exposição ao estresse é suficiente para provocar diminuição no RNAm, o que ocorre em pouco menos de 45 minutos (Smith *et al.*, 1995; Smith, 1996). Há ainda evidências de diminuição nesta expressão em outras áreas do sistema límbico, tais como amígdala basolateral e claustró (Smith, 1996). Contudo os resultados referentes à administração de corticosteróides, sem exposição ao estresse, não

apresentam a mesma ampla diminuição, sendo esta mais localizada no Giro Denteado.

Em função dos prejuízos neurais observados em situações de estresse, seria de se esperar que os demais fatores neurotróficos também se apresentassem diminuídos. No entanto, não é isto que ocorre: estudos pioneiros já indicavam que os níveis séricos de NGF apresentam-se aumentados em resposta ao estresse tanto em humanos quanto em roedores (Lakshmanan, 1987), e trabalhos posteriores demonstraram aumento dos níveis séricos de NGF em camundongos submetidos a um modelo de estresse social (Alleva, 1993), bem como aumento nos níveis do RNAm para este peptídeo em hipocampo de animais submetidos a estresse por frio (Foreman et al., 1993). Curiosamente, estes efeitos foram dependentes do tempo de duração do estresse: enquanto uma exposição aguda ao frio provocou aumento do RNAm, cinco dias seguidos de estresse não surtiram efeito algum. Em nenhum dos casos a administração isolada de corticosterona induziu os mesmos aumentos, e tampouco eles foram evitados por adrenalectomia, sugerindo que os efeitos do estresse sobre o NGF se dão por mecanismos outros que não o aumento de GCs circulantes.

Estresse Crônico e Efeitos Sobre o Comportamento Animal:

Os dados até aqui mencionados demonstram um claro efeito lesivo do estresse sobre diferentes estruturas cerebrais, especialmente estruturas do

sistema límbico ou a ele relacionadas. Conforme já citado, estes efeitos lesivos podem se manifestar tanto com atrofia dendrítica, o que pode tornar os neurônios hipofuncionais, como, em menor escala, perda neuronal.

Estes efeitos deletérios do estresse também se manifestam em tarefas comportamentais: exposição de ratos adultos e primatas a elevadas concentrações de GCs, tais quais as observadas em situações de estresse crônico, resulta em danos cognitivos em diversas tarefas cujo desempenho está relacionado à função hipocampal, tais como exposição ao Labirinto Aquático (Bodnoff *et al.*, 1995), ao Labirinto Radial de Oito Braços (Luine *et al.*, 1993; Nishimura *et al.*, 1999), ao Labirinto em Y (Conrad *et al.*, 1996), e ao labirinto de Barnes (McLay *et al.*, 1998).

Diversos estudos têm demonstrado um efeito ansiogênico do estresse na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado (File, 1996; Zurita *et al.*, 2000; Padovan *et al.*, 2000), o que é evidenciado por um comportamento de “congelamento” e diminuição do número de entradas nos braços abertos. Paralelamente, a atividade exploratória na tarefa de Exposição ao Campo Aberto também encontra-se alterada em animais cronicamente estressados (D’Aquila *et al.*, 2000).

Em nosso laboratório, foi estabelecido um modelo de Estresse Crônico Variável (Gamaro, 1998a; Manoli *et al.*, 2000) baseado em modelos pré-existentes de estresse e depressão (Willner *et al.*; 1987; Echandía *et al.*, 1988; Konarska *et al.*, 1990; Papp *et al.*, 1991; Willner & Muscat, 1991; Murua e Molina, 1992; Jordan *et al.*, 1994), que apresenta efeitos sobre diversos

parâmetros bioquímicos e comportamentais. Por exemplo, demonstrou-se alterações de comportamento alimentar, com diminuição da ingestão de alimento doce por animais cronicamente estressados, e alterações na nocicepção, em que os animais submetidos a estresse crônico responderam com hiperalgesia (Gamaro, 1998).

Estresse e Depressão:

A depressão é uma desordem que chega a atingir um percentual de 5% da população, e pode ser classificada em dois tipos básicos: a Depressão Maior, ou unipolar, que é caracterizada pela total anedonia e estado de constante melancolia do paciente, e Desordem Maníaco-Depressiva, ou distúrbio bipolar, que intercala os períodos depressivos com surtos de mania, i.e., elevação do humor, irritabilidade, inquietação, etc. Cerca de 25% dos paciente depressivos sofrem também de acessos de mania (Kandel, 1991). A patofisiologia destas desordens tem sido bastante estudada, e cada vez mais são descobertos mecanismos envolvidos na gênese e sustentação de estados depressivos. Os recém citados fatores neurotróficos são exemplos de recentes descobertas acerca de mecanismos de ação da depressão: postula-se que a modulação destes fatores esteja envolvida na depressão, em função de estudos que têm apontado um aumento nos níveis de BDNF e de seus receptores tirosina cinase B (trkB, do inglês *Tyrosine Kinase B*), especialmente no

hipocampo de pacientes submetidos à terapia anti-depressiva (Duman *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001). Aliados a isto, estudos reportam que o BDNF atua como antidepressivo em dois modelos animais de depressão – nado forçado e desesperança aprendida (Siuciak *et al.*, 1997).

Os dados que concernem a modulação do BDNF em casos de depressão concordam com o que se sabe a respeito da relação destes fatores com estresse: parece que em ambos os casos a diminuição desta neurotrofina pode ser em parte responsável pelos efeitos deletérios observados nas patologias. Não obstante, a relação entre os efeitos do estresse e da depressão é muito mais próxima. Sabe-se, por exemplo, que em grande parte dos pacientes deprimidos existe uma hiperatividade do eixo LHPA e consequente hipersecreção de cortisol, tal qual em situações de estresse. Reforçando esta idéia, 50% das pessoas que sofrem de Síndrome de Cushing, a qual apresenta hipercortisolemia como característica marcante, sofrem de depressão, o que também ocorre com mais de 75% das pessoas submetidas a tratamento crônico com corticóides. Estes dados estabelecem uma forte relação entre a depressão e os níveis de glicocorticóides circulantes. E, concordando com isto, observa-se também nesta patologia uma acentuada atrofia dendrítica, especialmente nos neurônios piramidais apicais da região CA3 do hipocampo (Duman *et al.*, 1997, 1999, 2000; Sapolsky, 2000), semelhante à observada em situações de estresse. Além da atrofia dendrítica, estudos *postmortem* em pacientes com transtornos de humor revelaram alterada densidade de células gliais e

neuronal, bem como alterações no volume de estruturas como hipocampo e córtex pré-frontal (Rajkowska, 2000; Cotter *et al.*, 2001).

Existem ainda outros fatores de semelhança entre a patogenia da depressão e do estresse crônico. Exemplos importantes são as alterações nos sistemas neurotransmissores. De fato, outros sistemas neurotransmissores, além do glutamatérgico, encontram-se alterados após situações de estresse. Estudos têm demonstrado que os receptores gabaérgicos, por exemplo, têm sua afinidade alterada mediante exposição crônica a glicocorticóides (Orchinik *et al.*, 1995, 2001), e Magariños *et al.* (1999) demonstraram que drogas benzodiazepínicas, como o Adnizolam, são capazes de reverter a atrofia dendrítica provocada pelo estresse, o que é mais um indicativo do prejuízo provocado ao sistema gabaérgico já citado anteriormente. Nos últimos anos, surgiram diversas evidências reforçando a idéia de que o prejuízo na neurotransmissão gabaérgica possa estar envolvido na patogenia da depressão (Shiah & Yatham, 1998). Uma vez que o GABA tem efeito inibitório sobre as aminas biogênicas neurotransmissoras, e que esta inibição pode estar envolvida em circuitos locais e interneurônios, tem sido sugerido que a diminuição de GABA não compita, e sim complementa o já bem estabelecido efeito das alterações nas funções serotoninérgicas e noradrenérgicas em casos de depressão (Shiah & Yatham, 1998).

O sistema serotoninérgico é outro que encontra-se prejudicado em função do estresse: experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os glicocorticóides têm a propriedade de diminuir a expressão dos receptores

5HT_{1A} pós-sinápticos, que são de especial interesse por estarem envolvidos em estados de ansiedade e depressão, em estruturas como hipocampo e córtex cerebral (Flügge, 1995; Nishi & Azmitia, 1996; Meijer *et al.*, 1997). Estes experimentos demonstraram ainda que os efeitos encontrados, aparentemente, devem-se à estimulação dos receptores mineralocorticóides, uma vez que se dão sob concentrações basais destes hormônios (Meijer *et al.*, 1997).

Além destes, outros estudos indicam a relação entre serotonina e os danos observados no hipocampo de animais cronicamente estressados, uma vez que o tratamento com tianeptina – uma droga estimuladora da captação de serotonina – inibe a atrofia dendrítica da região CA3 desta estrutura (McEwen *et al.*, 1997). Postula-se ainda que a serotonina atue sinergisticamente com o glutamato, interagindo pré- ou pós-sinápticamente com o glutamato liberado pelo estresse ou pelos glicocorticóides, potencializando a ligação aos receptores NMDA, bem como sua atividade (McEwen, 2000a). Curiosamente, a serotonina, juntamente com a noradrenalina, é o neurotransmissor mais fortemente relacionado à depressão, tanto que muitas drogas utilizadas como tratamento para esta patologia modulam a atividade serotoninérgica. Além disso, o aumento da função serotoninérgica dos receptores 5HT_{1A} pós-sinápticos parece ser requerido para a atividade da terapia antidepressiva (Duman *et al.*, 1999, 2000).

Interessante também salientar os dados apontados por diversos estudos demonstrando que o tratamento crônico com antidepressivos é capaz de induzir um aumento na neurogênese (Malberg *et al.*, 2000; Manev *et al.*,

2001), o que também ocorre após tratamento com terapia eletroconvulsiva (Madsen et al., 2000).

Algumas teorias têm postulado que a ação terapêutica dos antidepressivos se dá a longo prazo em função de sua ação sobre os mecanismos de transdução de sinal, muitas vezes modulando a síntese de proteínas e expressão gênica (Duman et al., 1997). Exemplos disso são as descobertas de que o fator de transcrição *proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc* (CREB, do inglês *cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein*), estimulado pela ação tanto da serotonina quanto da noradrenalina, é uma alvo intracelular da ação de antidepressivos, e que um de seus genes alvo é o que expressa o BDNF (Duman et al., 1997). Estes dados colocam os fatores intracelulares de transdução de sinal como potenciais agentes mediadores da terapia antidepressiva, e também abrem precedentes para a pesquisa de novos tratamentos contra a depressão.

Lítio:

O lítio (Li^+) foi introduzido na terapêutica por Alexander Ure por volta de 1840, primeiramente para o tratamento da gota, que ele acreditava estar relacionada aos sintomas afetivos de mania e depressão. Foi somente em 1880, com os estudos de dois médicos americanos chamados John Aulde e Carl Lange, que o Li^+ passou a ser utilizado para o tratamento da depressão,

independentemente da gota. Contudo, após alguns anos de uso indiscriminado em tônicos ou mesmo como substituto do sal, o conseqüente alto índice de toxicidade fez com que este sal entrasse em desuso (Lenox et al., 1998).

Em 1949, John Cade, um psiquiatra australiano, publicou um estudo sobre o efeito do Li^+ no tratamento da fase maníaca da psicose maníaco-depressiva, ou distúrbio bipolar (DB), o que abriu novamente as portas da terapêutica para este sal. Em 1952, Mogens Schou reinvestigou a ação do Li^+ , comprovando a eficiência do mesmo para aplacar a agitação maníaca. O efeito profilático do Li^+ sobre o DB foi descrito entre 1959-1960, simultânea e independentemente, por um psiquiatra inglês, G.P. Hartigan, e um psiquiatra dinamarquês, P.C. Baastrup, e vários ensaios clínicos confirmaram a eficácia do Li^+ em prevenir tanto os episódios de mania como os de depressão no DB. A partir de 1969 (quando foi aprovado para uso clínico nos E.U.A.), o Li^+ começou a ser largamente utilizado no mundo inteiro para o tratamento e profilaxia da PMD (Schou, 1980). Estima-se que cerca de 0,1% da população mundial faça tratamento com Li^+ , que atualmente é também utilizado como adjuvante no tratamento da Depressão Maior, além de ser a droga de escolha para o tratamento do distúrbio bipolar (Manji et al., 1995; Schou et al., 1998).

Os mecanismos de ação deste cátion monovalente são fontes de constantes estudos, o que é compreensível: a cada ano descobrem-se mais vias pelas quais se dá a sua ação. Sabe-se, por exemplo, que o Li^+ atua sobre a maioria dos mecanismos de transdução de sinal (Manji et al., 1995, 2000a; Jope, 1999) dentre os quais pode-se dar uma ênfase especial ao ciclo do

fosfatidilinositol: o Li^+ inibe a reciclagem dos fosfatos de inositol através da inibição da enzima inositol monofosfatase, o que tem como consequência o acúmulo de diacilglicerol e inositol-trifosfato. Os níveis elevados de diacilglicerol, por sua vez, levam à ativação de proteínas cinases C (PKC), que são responsáveis por mediar as alterações a longo prazo nas funções celulares, alterando inclusive a expressão gênica (Berridge *et al.*, 1989; Lenox *et al.*, 1998; Shaldubina *et al.*, 2001).

Outro efeito marcante do Li^+ é sobre a modulação de muitos dos sistemas neurotransmissores (Lenox *et al.*, 1998). Um exemplo disto são os efeitos inibitórios do Li^+ sobre os auto-receptores serotoninérgicos pré-sinápticos, os quais têm como função diminuir a disponibilidade de serotonina por mecanismos de retroação negativa (Shaldubina *et al.*, 2001). Inibindo estes auto-receptores, haverá uma maior disponibilidade de serotonina, bem como aumento das quantidades deste neurotransmissor liberadas por impulso (Lenox *et al.*, 1998). Postula-se que este efeito do Li^+ seja responsável pela sua eficácia em acelerar os efeitos da terapia antidepressiva em pacientes com Depressão Maior. Esta interferência do Li^+ nos mais diferentes processos ocorre em regiões relativamente específicas do sistema nervoso, como o sistema límbico e estruturas a ele associadas, que estão relacionadas às emoções e ao comportamento (Manji & Lenox, 2000).

Nos últimos anos tem-se dado uma atenção especial aos possíveis efeitos neuroprotetores do Li^+ , especialmente em função da descoberta de seus efeitos reguladores sobre proteínas pró- e anti-apoptóticas. Estudos recentes têm

demonstrado que o tratamento crônico com Li^+ provoca aumento nos níveis da proteína citoprotetora bcl-2 em estruturas como hipocampo, córtex frontal e estriado (Chen *et al.*, 1999; Manji *et al.*, 1999, 2000b; Chen & Chuang, 1999). Esta proteína, expressa no sistema nervoso de mamíferos, localiza-se em diversas estruturas celulares, como a membrana mitocondrial externa, o retículo endoplasmático e a membrana nuclear, o que lhe permite atuar de maneira protetora nos mais diversos níveis, pela ação antioxidante, inibição dos efeitos da ação das caspases, inibição da liberação de cálcio e recaptção do mesmo, etc. Sabe-se que estas proteínas atuam inibindo tanto a morte celular apoptótica quanto a necrose celular, e estudos mais recentes apontam as bcl-2 como promotoras de regeneração celular.

Paralelamente, estudos têm demonstrado o efeito inibidor do tratamento com Li^+ sobre a expressão da proteína pró-apoptótica p53 em células granulares do cerebelo bem como em células de neuroblastoma humano (Lu *et al.*, 1999; Chen & Chuang, 1999). Além disso, o Li^+ regula negativamente a expressão da proteína Glicogênio Sintase Cinase -3β , uma enzima diretamente relacionada à regulação dos níveis das proteínas *tau* e β -catenina fosforiladas, que estão envolvidas, por exemplo, na neurodegeneração observada na doença de Alzheimer, bem como na desestruturação do citoesqueleto de células nervosas mediante algum processo de lesão (Lovestone *et al.*, 1998; Manji *et al.*, 1999; Muñoz-Montaño *et al.*, 1999; Mora *et al.*, 2001).

Acredita-se que a soma destes mecanismos seja responsável pelos efeitos neuroprotetores do Li^+ em diferentes modelos de patologias do sistema nervoso, que têm sido apontados por diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Nonaka e Chuang (1998) demonstraram o efeito neuroprotetor do Li^+ em ratos submetidos à isquemia cerebral focal, e este efeito neuroprotetor sobre células submetidas à isquemia também foi demonstrado *in vitro* por Cimarosti *et al.* (2001), através da utilização de cultura organotípica hipocampal. Outros estudos, realizados por Volonte *et al.* (1994), demonstraram que o tratamento de culturas primárias de neurônios cerebelares e corticais com Li^+ promove a sobrevivência de neurônios GABAérgicos (é interessante aqui lembrar o prejuízo observado na neurotransmissão GABAérgica mediante estados depressivos, conforme mencionado anteriormente). Curiosamente, o tratamento crônico de ratos com Li^+ também tem a propriedade de aumentar a expressão do BDNF (o qual encontra-se reduzido em situações de estresse e na depressão) em estruturas como o hipocampo e os córtices temporal e frontal (Fukumoto *et al.*, 2001).

Por fim, convém salientar que o efeito neuroprotetor do Li^+ também é observado em cérebro de humanos *in vivo*: Moore *et al.* (2000b) demonstraram, por ressonância magnética tri-dimensional, que o tratamento de pacientes bipolares com Li^+ aumenta o volume total da massa cinzenta encefálica. Estes mesmos autores apontaram por espectroscopia magnética por ressonância de prótons que o tratamento com Li^+ aumenta a concentração de N-acetil-aspartato, um marcador de viabilidade e funcionamento neuronal, em diversas estruturas

cerebrais humanas (Moore et al, 2000a). Estes dados são de importância extrema por demonstrarem a aplicabilidade e os efeitos terapêuticos do Li⁺ na clínica.

* * *

Conforme já citado anteriormente, o estresse crônico, bem como a depressão, são capazes de induzir uma retração – ou atrofia – da arborização dendrítica de estruturas suscetíveis, como (e especialmente) a região CA3 do hipocampo. Estas alterações parecem se dar especialmente via efeitos dos GCs sobre as concentrações de cálcio intracelular, uma vez que elevados níveis deste íon são capazes de ativar proteases que atuarão sobre o citoesqueleto, o qual é responsável pela estruturação do neurônio saudável (Vanderklis & Bahr, 2000). Uma das proteínas constituintes do citoesqueleto é a β -tubulina, que é tomada muitas vezes como marcadora da integridade neural (Kimonides *et al.*, 1999). Paralelamente, estudos têm demonstrado uma integração cada vez maior entre neurônios e células gliais, bem como a importância destes “sistemas” gliais para o bom funcionamento do SNC. Diversas fontes da literatura indicam uma alteração no número e funcionalidade destas células mediante lesões ao SNC (Cotter *et al.*, 2001), e acredita-se que a ativação da astroglia seja benéfica em situações de lesão

(Eddleston & Muck, 1993). Complementando, por fim, dados anteriores de nosso laboratório indicaram que o Li^+ produz uma gliose suave e modifica a morfologia dos astrócitos hipocampais (Rocha & Rodnight, 1994; Rocha *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

Considerando os já bem estabelecidos efeitos do estresse sobre os parâmetros comportamentais e sobre a estrutura do SNC mencionados, considerando as similaridades entre a patogenia do estresse crônico e a da depressão, bem como o fato de que o modelo de estresse crônico estabelecido em nosso laboratório é também considerado um modelo de depressão, capaz de induzir diversas alterações no funcionamento do SNC, e considerando ainda os emergentes dados acerca dos efeitos terapêuticos do lítio no tratamento do distúrbio bipolar e da depressão maior, bem como as descobertas em torno do seu potencial neuroprotetor, o objetivo geral deste trabalho é verificar um possível efeito neuroprotetor do tratamento crônico com lítio em ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variável.

Para tanto, o trabalho será desenvolvido em duas etapas: num primeiro momento, serão avaliados os efeitos dos tratamentos citados sobre diferentes parâmetros comportamentais. Assim, os objetivos específicos dessa primeira parte são:

1. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre o desempenho dos animais em uma tarefa de Exposição ao Campo Aberto;
2. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a nocicepção através da Medida de Latência para Retirada da Cauda, avaliando também os efeitos da exposição à novidade sobre esse parâmetro;

3. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre o desempenho no Labirinto em Cruz Elevado;
4. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a memória na tarefa de Esquiva Inibitória;
5. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a memória espacial na tarefa do Labirinto Aquático de Morris;
6. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a memória de trabalho em um Labirinto Aquático.

A segunda parte deste trabalho tem como objetivo avaliar correlatos neuroquímicos, considerando possíveis alterações neuronais e gliais através de proteínas marcadoras. Para tal, teremos como objetivos específicos:

7. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a imunodeteção de β -tubulina (cuja medida será tomada como marcadora neuronal) em três diferentes estruturas cerebrais: córtex cerebral, amígdala e e regiões CA1, DG e CA3 do hipocampo;

8. avaliar os efeitos da exposição crônica ao estresse variável, concomitante a um tratamento com lítio sobre a imunodeteção da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), uma marcadora da reatividade astrocítica, em três diferentes estruturas cerebrais: córtex cerebral, amígdala e regiões CA1, DG e CA3 do hipocampo.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Tratamento dos animais:

Para o tratamento dos animais foi utilizada a ração Nuvilab CR-1 (Nuvital), adicionadas ou não de cloreto de sódio (NaCl) da Merck e cloreto de lítio (LiCl) da Synth.

Preparação das amostras:

A preparação das amostras para eletroforese foi feita utilizando os seguintes reagentes: NaCl, KCl, CaCl₂, Glicerol, HEPES e Glicose da Merck, MgSO₄ da Riedel, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) da Sigma, e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da Reagen.

Eletroforese:

Foram utilizados os seguintes reagentes para realização das eletroforeses: acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amônio, tetrametil-etilenodiamina (TEMED), Tris e glicina da Sigma, e glicerol e HCl da Merck.

Eletrotransferência e imunodeteção:

Foram utilizados Tris, Glicina, Tween-20, SDS e anticorpos primários anti- β -tubulina III e anti-GFAP da Sigma; metanol, NaCl e ácido acético da Merck; leite em pó desnatado da Nestlé; membrana de nitrocelulose da Bio-Rad; reagentes para deteção do luminol (ECL), anticorpos secundários, contra anticorpos de camundongo e de coelho (*anti-mouse* e *anti-rabbit*) conjugados à peroxidase, da Amershan; e filmes raio-X (13 x 18cm, X-Omat), soluções reveladora e fixadora da Kodak.

Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com 60 (sessenta) dias de idade ao início do tratamento. Os animais foram mantidos em suas caixas moradia confeccionadas em plexiglass, medindo 42 x 34 x 16cm, tendo o assoalho recoberto com maravalha, e acondicionados em grupos de 5 (cinco) ratos por caixa, sendo submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas e com ração e água *ad libitum*. Durante todo o tratamento, foi realizado o monitoramento do consumo de água e peso corporal dos animais.

Desenho Experimental

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle, que sofreu apenas a manipulação necessária à manutenção de suas habitações em boas condições de higiene, e Grupo Estressado, que foi submetido a um tratamento de Estresse Crônico Variável por um período mínimo de quarenta dias. Estes grupos foram subdivididos em dois outros grupos: tratados cronicamente ou não com cloreto de lítio. Os dois tratamentos (estresse X lítio) foram aplicados concomitantemente, por um período mínimo de 40 (quarenta) dias.

Modelo de Estresse Crônico Variável:

Foi utilizado o modelo de Estresse Crônico Variável já estabelecido no laboratório com algumas modificações, consistindo então na aplicação alternada de 7 (sete) diferentes agentes estressores, uma vez por dia com duração e horários alternados (figura 3.1). A utilização de agentes variados em horários e por períodos diferentes é uma tentativa de minimizar a previsibilidade da aplicação do estressor. Pela mesma razão, houve dias em que nenhum agente foi utilizado. Os agentes estressores utilizados foram:

- Imobilização (imobilização dos animais em cilindros plásticos de diâmetro regulável, por períodos de até 2 horas);

- Imobilização mais frio (imobilização com posterior exposição à temperatura de 4° Celsius);
- Inclinação (inclinação das caixas-moradia a um ângulo de 45° por período mínimo de 4 horas);
- Barulho (exposição dos animais a um ruído de forte intensidade, a intervalos regulares, por um período de 10 minutos);
- Luz piscante (exposição a luz de forte intensidade piscando a intervalos regulares por períodos de até 6 horas);
- Nado forçado (realizado em aquário de 50x47x40cm, com 30 cm de água a temperaturas alternadas entre 15 e 24° Celsius);
- Isolamento dos animais em caixas separadas, por períodos de até três dias.

A tabela 1 corresponde ao cronograma de estressores aplicados durante os primeiros quarenta dias de tratamento.

Tabela 3.3.1: Cronograma de Agentes Estressores

| DIA | AGENTE ESTRESSOR | DURAÇÃO |
|------------|-------------------------|---------------------|
| Dia 1 | nado forçado a 15°C | 3 minutos |
| Dia 2 | isolamento | 24 horas |
| Dia 3 | isolamento | 24 horas |
| Dia 4 | isolamento | 24 horas |
| Dia 5 | imobilização | 1 hora e 30 minutos |
| Dia 6 | barulho | 10 minutos |
| Dia 7 | inclinação | 6 horas |
| Dia 8 | nenhum | |
| Dia 9 | nenhum | |
| Dia 10 | nenhum | |
| Dia 11 | barulho | 5 minutos |
| Dia 12 | luz piscante | 3 horas |
| Dia 13 | imobilização | 1 hora |
| Dia 14 | imobilização + frio | 1 hora e 30 minutos |
| Dia 15 | nado forçado a 22°C | 10 minutos |
| Dia 16 | barulho | 7 minutos |
| Dia 17 | inclinação | 4 horas |
| Dia 18 | isolamento | 24 horas |
| Dia 19 | isolamento | 24 horas |
| Dia 20 | nenhum | |
| Dia 21 | nenhum | |
| Dia 22 | imobilização + frio | 2 horas |
| Dia 23 | nado forçado a 15°C | 5 minutos |
| Dia 24 | luz piscante | 2 horas |
| Dia 25 | inclinação | 5 horas |
| Dia 26 | imobilização | 1 hora e 30 minutos |
| Dia 27 | barulho | 5 minutos |
| Dia 28 | nado forçado a 24°C | 10 minutos |
| Dia 29 | imobilização | 1 hora |
| Dia 30 | luz piscante | 3 horas |
| Dia 31 | nenhum | |
| Dia 32 | nenhum | |
| Dia 33 | inclinação | 6 horas |
| Dia 34 | isolamento | 24 horas |
| Dia 35 | isolamento | 24 horas |
| Dia 36 | isolamento | 24 horas |
| Dia 37 | barulho | 7 minutos |
| Dia 38 | nado forçado a 15°C | 3 minutos |
| Dia 39 | imobilização | 1 hora e 30 minutos |
| Dia 40 | luz piscante | 4 horas |

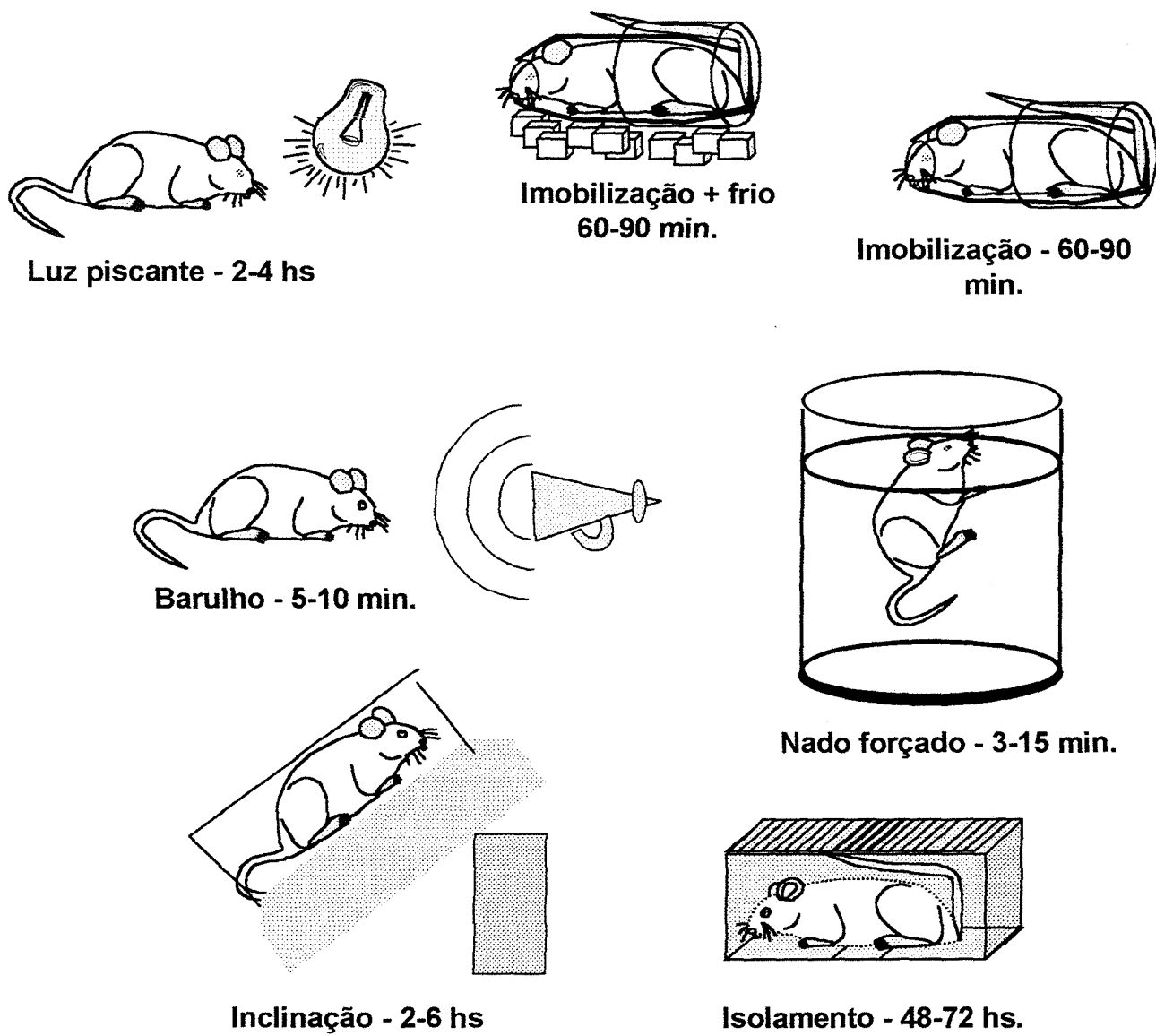


FIGURA 3.1: Agentes estressores utilizados no Modelo de Estresse Crônico Variável

Tratamento Crônico com Lítio:

O lítio foi administrado através da ração: a ração padrão era triturada e a ela eram adicionados cloreto de sódio e de cloreto de lítio, atingindo concentrações finais de 282 mmol/kg e 60 mmol/kg, respectivamente. A concentração de lítio na ração foi calculada para obterem-se, nos ratos, níveis plasmáticos dentro da faixa terapêutica utilizada em humanos, i.e., entre 0,4 e 1,2 meq/l, e o cloreto de sódio era adicionado a fim de minimizar as perdas de sódio decorrentes da filtração glomerular do lítio, o qual é trocado por Na⁺ nos rins, evitando uma intoxicação por este sal. Devido à diurese elevada, os animais tratados com lítio tinham suas caixas moradia trocadas com periodicidade diária, muitas vezes duas vezes por dia.

Tarefas Comportamentais

Após os quarenta dias de tratamento, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais. Foram eles:

- Medida de Latência para Retirada da Cauda (“*TAIL FLICK*”);
- Exposição ao Campo Aberto (“*OPEN FIELD*”);
- Comportamento no Labirinto em Cruz Elevado (“*PLUS MAZE*”);
- Exposição à Esquiva Inibitória;
- Exposição ao Labirinto Aquático (“*WATER MAZE*”).

Medida da latência de retirada da cauda após exposição à novidade:

Com esta tarefa, em que se avalia a medida da latência para retirada da cauda do animal quando exposto a um estímulo doloroso, é possível fazer uma análise do nível de algesia (nocicepção) do animal. Para tanto, utiliza-se um aparelho (figura 3.2) que possui uma fonte luminosa de intensidade ajustável, sobre a qual é colocada a cauda do animal. O acionamento da lâmpada aciona também um cronômetro, e a deflexão da cauda do animal, que é uma ação reflexa à sensação térmica provocada pela lâmpada, desobstrui o feixe luminoso e ativa uma fotocélula que encerra a medida. Toma-se, portanto, a latência para retirada da cauda como índice de nocicepção.

A avaliação da latência de retirada da cauda com exposição à novidade foi utilizada para avaliação de dois fatores:

- resposta do animal a um estímulo doloroso,
- integridade da ativação do sistema de resposta à novidade, o qual por uma série de mecanismos provoca analgesia no animal.

O experimento foi realizado em duas sessões: na primeira, o animal foi submetido a uma medida basal para habituação ao aparelho (para que este não funcionasse como uma novidade posteriormente). Na segunda sessão, realizada 24 horas após, os animais foram submetidos a uma primeira medida de nocicepção, que é denominada “Medida Pré-novidade”, e após esta medida eles foram expostos a um ambiente novo. Esta exposição foi feita por um período de dois minutos, após os quais os animais foram transferidos para uma “caixa de

espera” (caixa moradia vazia) por mais dois minutos para, então, realizarem-se as “Medidas Pós-novidade”. Foi utilizado um teto máximo de 15 segundos para a retirada da cauda, após os quais a medida era encerrada para evitar danos teciduais. A potência utilizada foi de $0,7 \text{ mW/mm}^2$ e o ambiente novo utilizado foi o Labirinto Radial de oito braços.

Campo Aberto (“OPEN FIELD”):

Esta tarefa objetiva analisar diferentes parâmetros comportamentais, como atividade motora, ansiedade e também memória, uma vez que é uma tarefa realizada em duas sessões (treino e teste) e pode-se comparar as diferenças no comportamento do animal de uma sessão para a outra. Para isto, utiliza-se como aparato uma caixa retangular com paredes altas, sendo uma delas de vidro para permitir a observação do comportamento do animal, e com tampa, para que não haja influência de ruídos externos. Essa caixa apresenta as seguintes dimensões: 40 x 60cm, com 50cm de altura. O assoalho desta caixa é dividido em doze quadrados de igual tamanho (figura 3.3).

Os animais foram colocados no canto esquerdo da caixa, com a face voltada para a parede, e expostos a este “campo aberto” por cinco minutos. As sessões treino e teste, de mesma duração, foram realizadas com um intervalo de 24 horas. Os parâmetros analisados foram:

- Latência para deixar o primeiro quadrado (tempo, em segundos, que o animal levou para se deslocar da posição inicial, saindo do primeiro

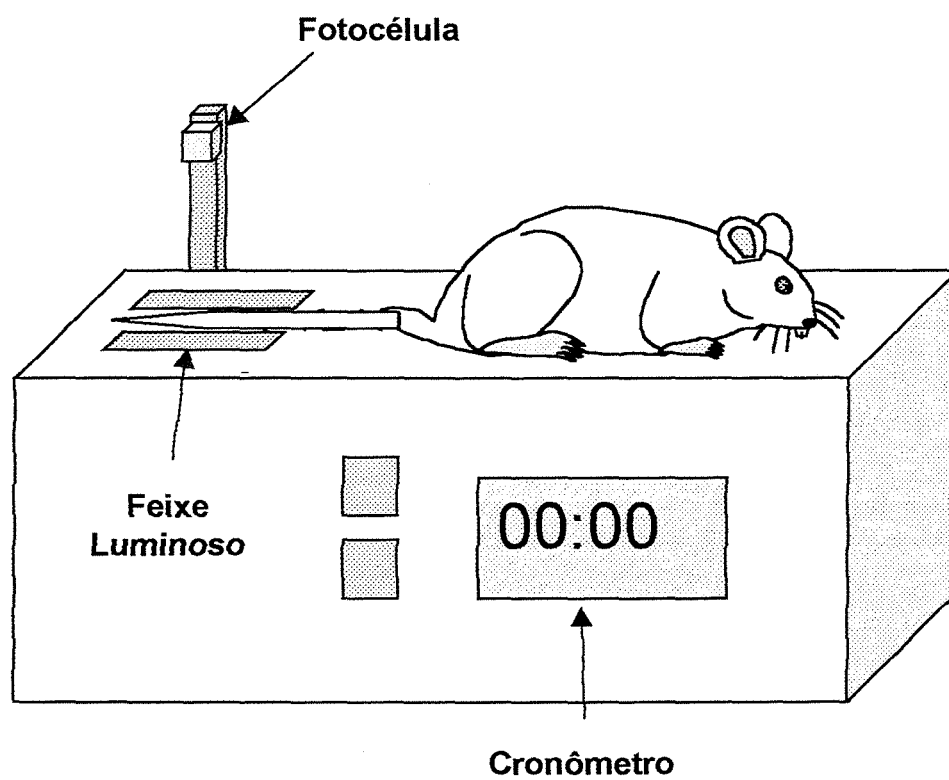


FIGURA 3.2: Desenho esquemático do aparelho de *TAIL FLICK* -
Medida de Latência para Retirada da Cauda

quadrado com as quatro patas). Pode ser utilizado como índice de ansiedade do animal.

- Número de cruzamentos – (“CROSSINGS”) (número de vezes que o animal transpôs as marcações no assoalho da caixa). Esta medida pode ser utilizada como índice de atividade motora e também como índice de memória entre as sessões treino e teste.
- Número de respostas de orientação – (“REARINGS”) (número de vezes que o animal se ergueu sobre as patas traseiras para se orientar no ambiente). Comportamento exploratório cuja redução pode ser tomada como medida de memória entre as sessões treino e teste.
- Número de bolos fecais excretados pelo animal durante a exposição, o que pode ser visto como parâmetro de ansiedade.

Labirinto em Cruz Elevado (PLUS MAZE):

Através desta tarefa é possível a avaliação de dois parâmetros comportamentais: atividade locomotora e, principalmente, o grau de ansiedade do animal (Hogg, 1996). Utiliza-se, para tanto, um labirinto em cruz elevado, que possui dois braços com paredes altas (denominados braços fechados) e dois outros braços “sem paredes” (denominados braços abertos, figura 3.4).

Os animais foram colocados no centro do labirinto (cruzamento entre os braços), com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o seu comportamento foi avaliado por um período de 5 minutos.

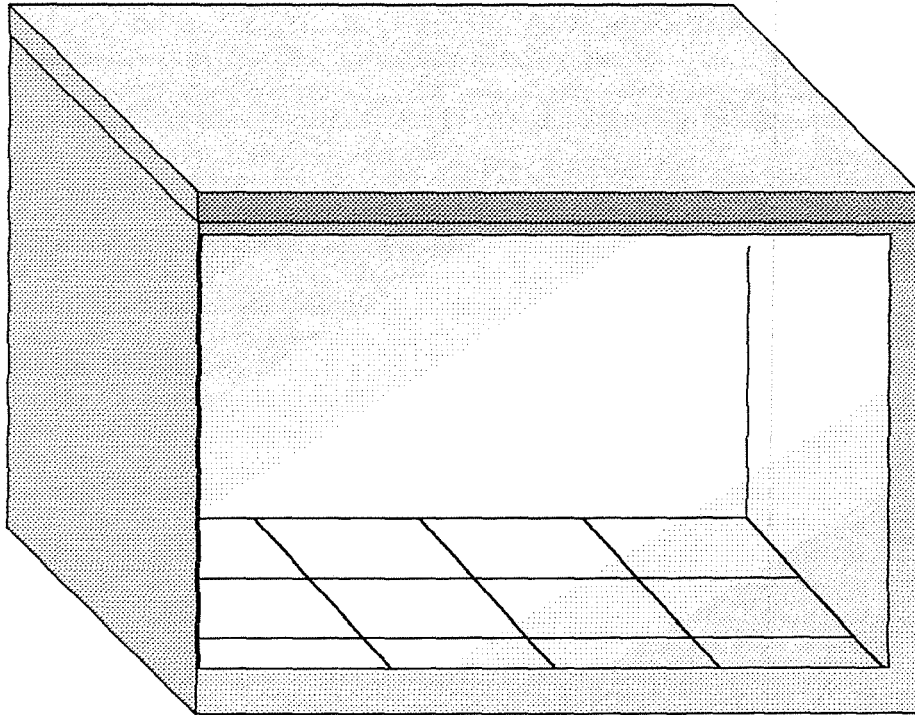


FIGURA 3.3: Desenho esquemático da caixa de habituação ao Campo Aberto (*OPEN FIELD*), demonstrando o assoalho dividido em quadrados de igual tamanho e a frente de vidro da caixa.

Durante a exposição a este labirinto, as variáveis observadas foram:

- tempo total de permanência nos braços abertos e frequência de entradas nesses braços, considerando-se menos ansioso o animal que mais tempo ali permanecer;
- tempo total de permanência nos braços fechados e frequência de entradas nesses braços, tomando-se a preferência do animal por este braço como parâmetro de ansiedade.

Na avaliação comportamental no labirinto em cruz, foram também considerados:

- porcentagem do número de vezes que o rato entra nos braços abertos em relação ao total de entradas;
- porcentagem do tempo que o rato permanece nos braços abertos em relação ao total de tempo em que permanece nos quatro braços (tempo nos braços abertos mais tempo nos braços fechados);
- número total de entradas em braços abertos e fechados, que refletem a atividade locomotora.

Considerava-se que o animal havia entrado em um dos braços quando ele colocava as quatro patas no braço em questão.

Esquiva Inibitória:

Esta tarefa é utilizada para medida de memória condicionada por um estímulo aversivo. Utiliza-se uma caixa de condicionamento automatizada (Albarsch), de formato retangular e com a face frontal em vidro. O assoalho é

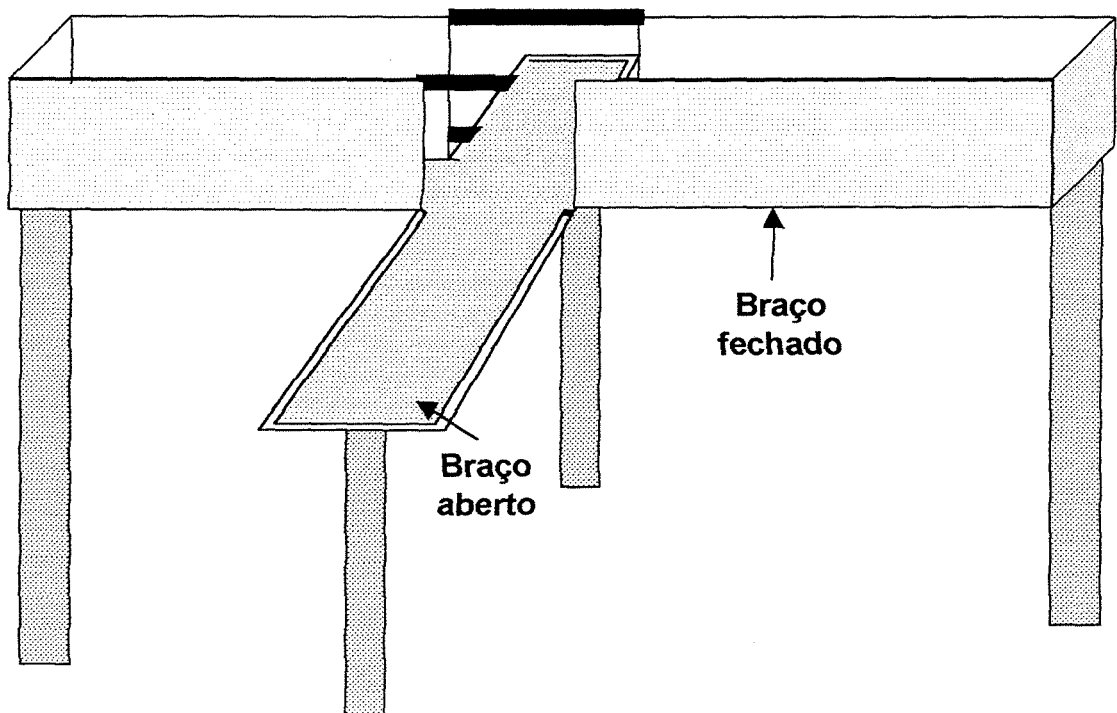


Figura 3.4: Labirinto em Cruz Elevado, para medida dos tempos de permanência e número de entradas em cada braço.

constituído de uma grade de barras de bronze, espaçadas 1 cm umas das outras, através da qual é possível aplicar uma diferença de potencial elétrico de intensidade variável. No canto esquerdo do assoalho há uma plataforma de madeira a uma altura de 5cm da grade (figura 3.5).

O experimento se deu em duas sessões: na sessão de treino, o animal foi gentilmente colocado de frente para o canto posterior esquerdo da caixa de condicionamento, sobre a plataforma. Cronometrou-se a latência até a descida completa do animal (com as quatro patas na grade de bronze), após o quê ele recebeu choques de 0,5 mA nas patas, de forma intermitente, por 6 s. Na sessão de teste, 24 h após o treino, o animal foi recolocado na caixa de condicionamento, sobre a plataforma, e a latência até a descida para a grade foi medida novamente. A diferença de latência entre treino e teste foi tomada como medida de retenção de memória, tendo sido estabelecido um limite superior (teto) de 300 s para a permanência do animal na plataforma no dia do teste.

Labirinto Aquático (WATER MAZE):

Esta tarefa foi descrita por Morris *et al.* em 1984, e objetiva avaliar a memória espacial dos animais. Para tanto, os animais são submetidos a diversas sessões de treino em um labirinto aquático, que consiste em um tanque preto circular medindo 180 cm de diâmetro por 60 de altura, preenchido com 30cm de água a $24 \pm 1^\circ$ C, e contendo uma plataforma submersa (1,5 cm abaixo da superfície). Externamente ao tanque, são colocadas diversas dicas espaciais

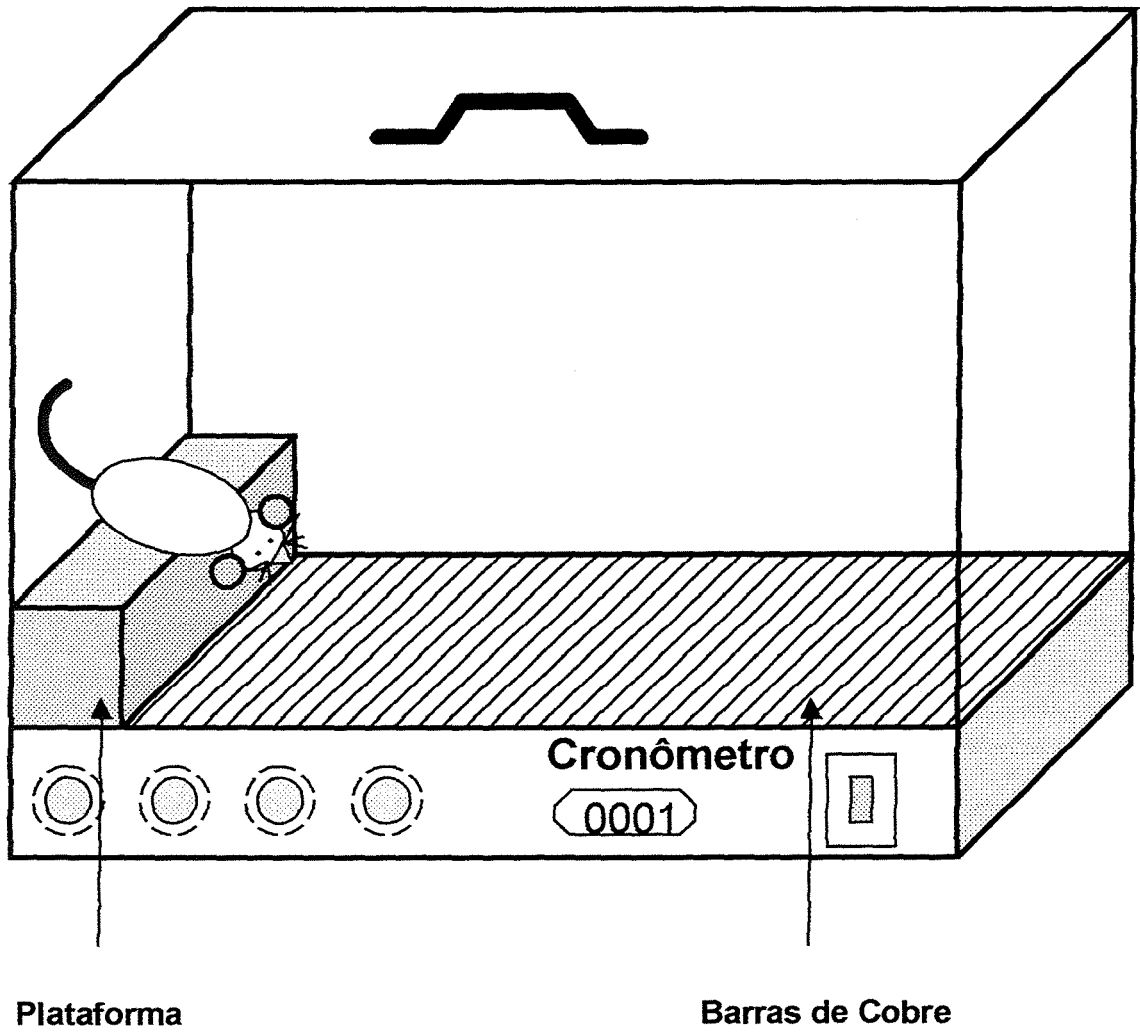


Figura 3.5: Esquiva Inibitória

visíveis ao animal, permitindo sua orientação (figura 3.6). Durante os treinos, os animais são colocados no tanque em 4 diferentes posições, que dividem o tanque em 4 quadrantes, e são forçados a nadar até encontrar a plataforma ou até atingir um teto de 60s, após os quais eles são gentilmente conduzidos à plataforma. Com o decorrer das sessões de treino, os animais tendem a localizar a plataforma mais rapidamente, o que denota seu aprendizado.

Foram realizados dois tipos de medida utilizando este mesmo tanque: Memória Espacial de Referência e Memória Espacial de Trabalho.

Memória Espacial de Referência: Neste modelo, os animais foram submetidos a cinco dias consecutivos de sessão treino, sendo largados em quatro diferentes posições em ordem alternada a cada dia. No dia do teste (sexto dia), a plataforma foi retirada, e os animais largados de uma única posição. Os testes foram filmados para posterior análise. Mediram-se então os seguintes parâmetros:

- Latência para realizar o primeiro cruzamento sobre o local exato em que estava a plataforma;
- Número de cruzamentos realizados sobre o local exato da plataforma;
- Tempo de permanência no quadrante em que estava a plataforma;
- Tempo gasto no quadrante oposto.

Memória Espacial de Trabalho: Esta medida foi realizada utilizando-se o mesmo procedimento citado acima, com a diferença de que foram realizadas apenas quatro sessões diárias de quatro tentativas cada, e a plataforma era mudada de posição a cada sessão. Como nesta tarefa não há sessão de teste, toma-se como

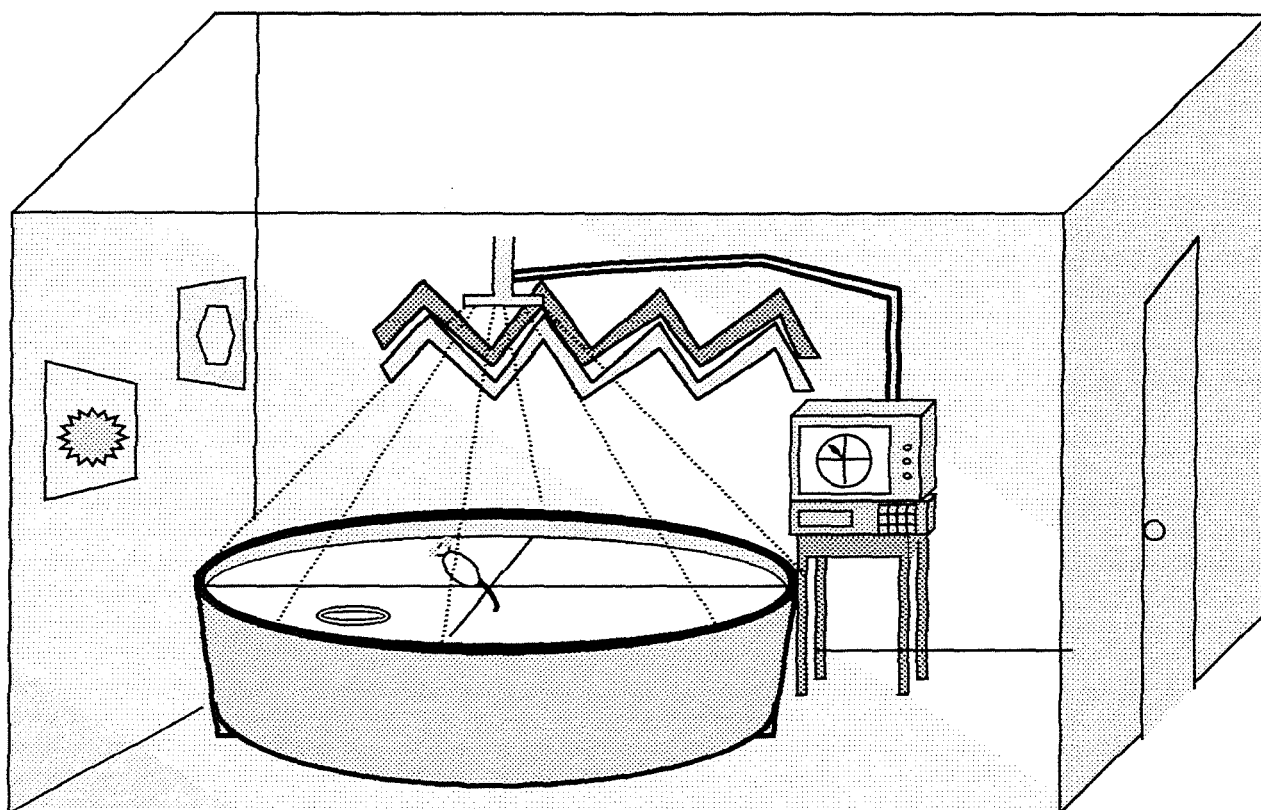


FIGURA 3.6a: Desenho esquemático do Labirinto Aquático para medida de memória espacial

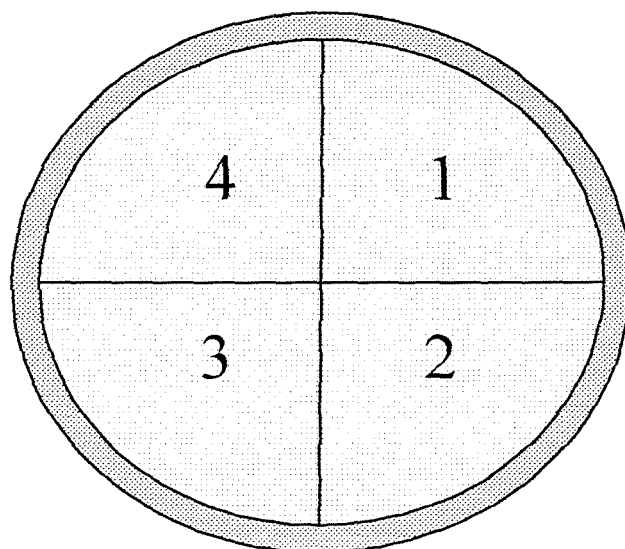


FIGURA 3.6b: Desenho esquemático dos 4 quadrantes do Labirinto Aquático
1. Quad. adjacente; 2. Quad. Alvo; 3. Quad. adjacente 2; 4. Quad. oposto

medida de memória as diferenças na latência para achar a plataforma entre diferentes medidas dentro da mesma sessão (tentativas ou “*trials*”).

Durante o período de testagens comportamentais, os animais continuaram sendo submetidos aos dois tratamentos (estresse e lítio).

Medidas Neuroquímicas

Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros totais retirados para obtenção das amostras. Imediatamente após, os encéfalos eram adicionados de tampão-HEPES salina (Meio de Krebs Ringer, tabela 2), objetivando mimetizar seu meio fisiológico, e transferidos para um fatiador “McIlwain chopper”, através do qual cortavam-se secções coronais do cérebro com 0,4 mm de espessura. Foram retiradas microfatias de 5 estruturas cerebrais (córtex, amígdala, e 3 diferentes regiões do hipocampo: CA1, CA3 e giro denteado) através da utilização de um “punch” metálico com 1,5 mm de diâmetro, num número de 4 microfatias/estrutura/hemisfério.

Tabela 2: Meio de Krebs Ringer

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|-------------------|---------------------|
| NaCl | 124 mM |
| KCl | 4 mM |
| MgSO ₄ | 1,2 mM |
| NaHEPES (pH 7,4) | 25 mM |
| Glicose | 12 mM |
| CaCl ₂ | 1 mM |

As estruturas (de microfatias) obtidas foram homogeneizadas em 100 μ l de solução de lise proteica (Solução A, tabela 3) . Retiraram-se 20 μ l de amostra para dosagem de proteínas, feita espectrofotometricamente a 700 nm pelo método de Peterson, o qual é baseado no método de Lowry com algumas alterações para permitir a presença de SDS, melhorando a solubilização de proteínas (Peterson, 1977). Ao homeogeneizado restante, foi adicionado um volume de 20 μ l de Solução B, cuja composição é apontada na tabela 4, acrescida de 5% de β -mercaptoetanol. Ao fim destes procedimentos, as amostras foram incubadas em banho-maria fervente por 10min, após o quê estavam prontas para aplicação em eletroforese unidimensional.

Tabela 3: Solução A (solução de lise para Eletroforese Unidimensional)

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|-------------------|--------------|
| SDS | 4% |
| EDTA | 2,1 mM |
| Tris-HCl (pH 6,8) | 50 mM |

Tabela 4: Solução B (solução de lise para Eletroforese Unidimensional)

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|--------------------|--------------|
| Glicerol | 40% |
| Tris-HCl (pH 6,8) | 50 mM |
| Água (Milli-Q) | q.s. |
| Azul de Bromofenol | q.s. |

Eletroforese Unidimensional:

As separações eletroforéticas foram realizadas em mini-géis SDS-PAGE (poliacrilamida - acrilamada / bisacrilamida), com concentração final de 12% para o gel de separação e 4,5% para o gel de entrada (tabela 5). As placas de mini-gel foram separadas com espaçadores de 1mm, aplicando-se oito diferentes amostras por gel. Os volumes de amostra foram calculados para a aplicação de uma quantidade final de 50 µg de proteínas totais, e as amostras foram aplicadas com o auxílio de uma pipeta Hamilton. Utilizou-se um tampão SDS-glicina (tabela 6) para proceder a separação das proteínas, que foi realizada utilizando-se o sistema Gibco (sistema de eletroforese vertical Mini-V 8-10). As corridas foram realizadas em voltagens entre 80 e 120 mV, e eram encerradas quando a linha de frente atingia o limite final da placa (aproximadamente 2 horas de duração).

Tabela 5: Gel de Poliacrilamida-SDS

| COMPOSTO | SEPARAÇÃO | ENTRADA |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| Acrilamida/Bisacrilamida (39/1) | 12 % | 4,5 % |
| Tampão Tris-HCl | 17 % (1,5 M, pH 8,8) | 25 % (500mM, pH 6,8) |
| SDS | 0,1 % | 0,1 % |
| Glicerol | 6,0 % | --- |
| TEMED | 0,06 % | 0,08 % |
| Persulfato de Amônio | 0,45 % | 0,1 % |

Tabela 6: Tampão de Eletroforese

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|----------|--------------|
| Tris | 495 mM |
| Glicina | 1,05 M |
| SDS | 36,5 mM |

Eletrotransferência (Western-Blotting):

Ao final da eletroforese, as proteínas separadas nos géis foram submetidas a uma transferência para membranas de nitrocelulose, a qual foi realizada através do sistema semi-seco (*semidry electroblotter*, Trans-blot RD® , Bio Rad). Para tanto, montou-se o sistema obedecendo à seguinte disposição: duas folhas de papel filtro Whatman N° 3, a membrana de nitrocelulose, o gel contendo as proteínas separadas através da corrida eletroforética e novamente duas folhas de papel filtro. Todos os componentes foram previamente embebidos em tampão Bjerrum (tabela 8), sendo que as membranas permaneceram neste tampão por um período de 15 minutos para promover sua hidratação, e os géis foram apenas lavados com o tampão para retirada do excesso de SDS. A transferência se deu a uma voltagem de 15V, com corrente de 1,5 mA/cm² por um período de 60 minutos.

Ao final da transferência, os papéis-filtro e os géis foram descartados, e as membranas de nitrocelulose lavadas com uma solução fixadora por alguns minutos, sendo posteriormente submetidas a sucessivas lavagens com água destilada para retirada do excesso de fixador. Por fim, as membranas foram incubadas com aproximadamente 10 ml de tampão Tris salino com adição de leite em pó (L -TTS, tabela 7) durante toda a noite. Este procedimento tem a função de bloquear sítios não específicos inibindo, assim, a ligação de

anticorpos a regiões não desejadas, após o quê as membranas estavam prontas para os procedimentos de imunodeteccção.

Convém destacar que as amostras eram sempre corridas com seus respectivos controles, para que fosse possível a comparação dos resultados como porcentagem do controle.

Tabela 7: TTS, L-TTS e T-TTS

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|-----------------------|--------------|
| TTS | |
| Tris | 20 mM |
| NaCl | 500 mM |
| pH (ajustado com HCl) | 7,5 |
| L-TTS | |
| Leite em Pó desnatado | 5 % |
| TTS | q.s. |
| T-TTS | |
| Tween 20 | 0,05 % |
| TTS | q.s. |

Tabela 8: Tampão Bjerrum

| COMPOSTO | CONCENTRAÇÃO |
|----------|--------------|
| Tris | 48 mM |
| Glicina | 39 mM |
| Metanol | 20 % |

Imunodeteccção:

Após o período de bloqueio, as membranas foram submetidas a duas lavagens com 10 ml de T-TTS (tabela 7), por um período de 5 min cada. O procedimento seguinte consistia na incubação com os primeiros anticorpos

(anti- β -tubulina III ou anti-GFAP), diluídos em L-TTS a uma concentração de 1:400, por um período de 2 horas, sob agitação suave e constante. Em seguida, as membranas eram novamente submetidas a lavagens com T-TTS (3 lavagens de 5 minutos cada), para então serem submetidas à incubação com os segundos anticorpos (anticorpo acoplado à peroxidase contra anticorpo de camundongo - *anti-mouse* peroxidase - para as membranas incubadas previamente com β -tubulina e anticorpo acoplado à peroxidase contra anticorpo de coelho - *anti-rabbit* - para GFAP). Os segundos anticorpos foram diluídos a uma concentração de 1:2000, também em L-TBS, e as incubações se deram por um período de 2 horas.

Quando retiradas da incubação com o segundo anticorpo, as membranas foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos com T-TTS, seguidas por 2 lavagens com TTS, ao fim do quê estavam prontas para o ensaio de ECL. Este foi feita expondo-se as membranas a um agente luminescente (luminol), que reage com a peroxidase acoplada ao segundo anticorpo, provocando emissão de luz. Ao expor-se as membranas a filmes autorradiográficos, a luz emitida pela reação ECL-Peroxidase provoca uma impressão que é proporcional a sua intensidade. Após revelados, os filmes foram escaneados e quantificados pelo programa computacional "OptiQuant".

Após o ECL, as membranas foram submetidas ao procedimento denominado "stripping", que consiste na aplicação de sucessivas lavagens com água destilada e NaOH 2N para retirada de quaisquer resíduos protéicos (de

anticorpos ou do bloqueio) aderidos à membrana, estando esta pronta, então, para novo bloqueio e reação com novo anticorpo.

Análise Estatística

Os dados referentes à análise da evolução do peso corporal e do consumo de água foi feita utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) de medida repetida, seguida, quando indicada, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A análise estatística das tarefas comportamentais foi feita da seguinte forma: para as tarefas em que os resultados tinham uma distribuição normal, ou paramétrica, e.g., Exposição ao Labirinto em Cruz Elevado e Memória Espacial de Referência no Labirinto Aquático, foi utilizada uma ANOVA de duas vias, seguido, quando indicado, pelo teste de Student-Newman-Keuls. A curva de aprendizado, os resultados de Memória de Trabalho no Labirinto Aquático e os resultados da Exposição ao Campo Aberto (ou seja, tarefas com medidas realizadas em mais de uma sessão, também de resultados com distribuição normal), foram avaliados por ANOVA de medida repetida (seguida, quando indicado, pelo teste de Student-Newman-Keuls). O mesmo teste foi feito para os resultados obtidos com o Tail Flick, uma vez que poucos animais atingiram o teto estipulado. Nesta tarefa, utilizou-se ainda o teste t de Student pareado na avaliação do efeito da novidade para cada grupo individualmente.

Os resultados da tarefa de Esquiva Inibitória (dados não paramétricos) foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, e a diferença dos grupos entre as sessões treino e teste foram avaliadas pelo teste de WILCOXON.

Por fim, a análise estatística dos resultados de imunodeteção foi feita através de Teste t de Student pareado.

RESULTADOS

Monitoramento de Peso Corporal e Consumo de Água:

Todos os grupos apresentaram pesos semelhantes no início do tratamento (dia zero). Nas duas primeiras semanas, os animais dos grupos controle e estressado apresentaram evolução normal no ganho de peso, enquanto os grupos tratados com lítio tiveram pouca diferença no seu peso corporal. A partir da segunda semana, todos os animais apresentaram ganho regular de peso, contudo, os tratados com lítio (controles e estressados) permaneceram com menor peso que os demais até o final do tratamento (figura 4.1).

Os animais tratados com cloreto de lítio também apresentaram diferença no volume de água consumida, chegando este a ser cinco vezes maior que o volume consumido pelos animais controle. Isto deve-se provavelmente à ingestão de maiores quantidades de cloreto de sódio, uma vez que este era adicionado à ração padrão (figura 4.2).

Litemia:

Todos os animais apresentaram litemia dentro da faixa terapêutica utilizada em humanos, ou seja, entre 0,4 e 1,2 mEq/litro de plasma.

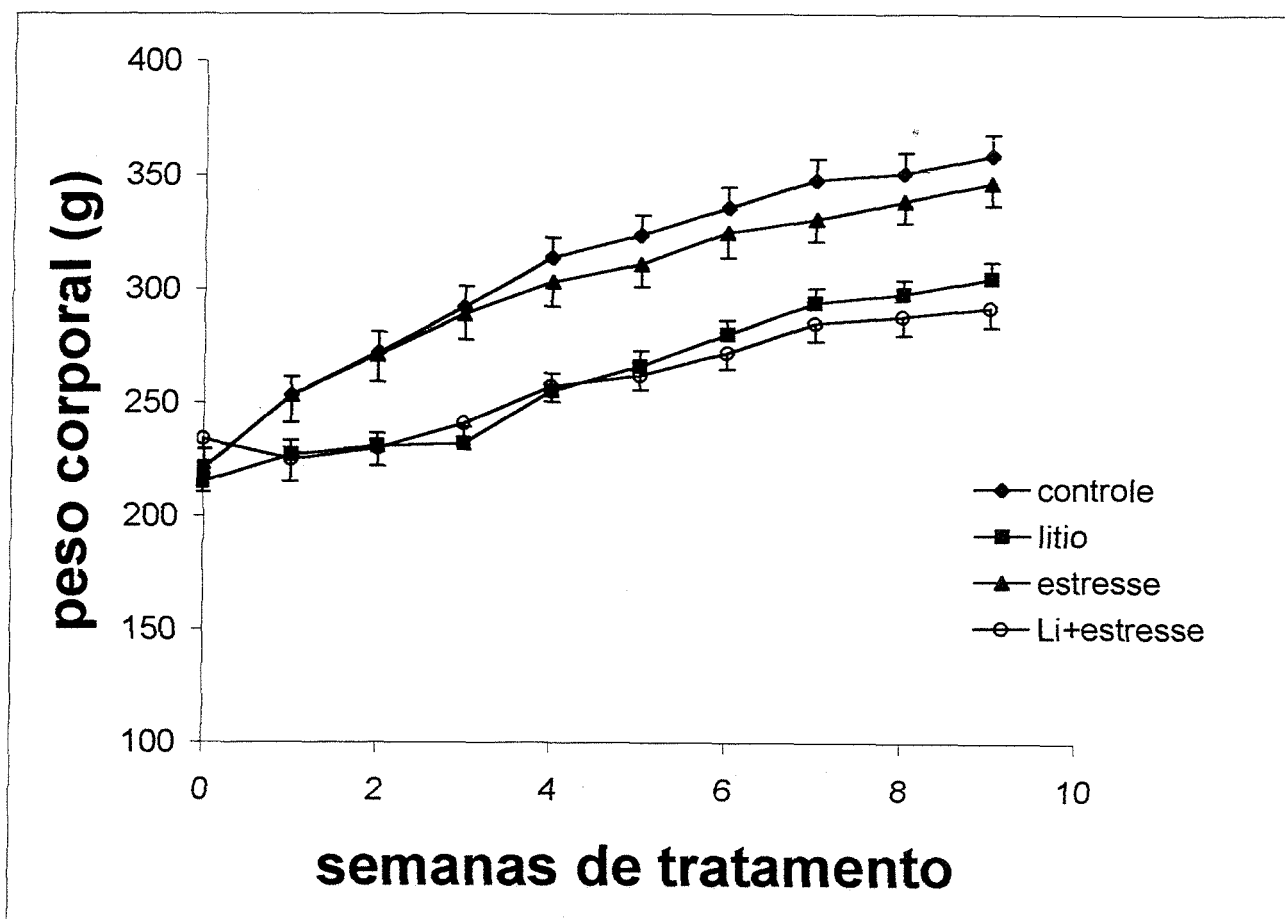


Figura 4.1: Curva de evolução do peso corporal de ratos submetidos a tratamentos crônicos com estresse e lítio. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo

Houve efeito do lítio, com retardo do ganho de peso (ANOVA de medida repetida, $P < 0,001$); houve efeito do tempo, pois os animais ganham peso com o tempo ($P < 0,001$); houve interação significativa entre lítio e tempo ($P < 0,001$) e entre estresse e tempo ($P < 0,01$), pois os animais tratados cronicamente ganham peso mais lentamente. Uma ANOVA de duas vias mostrou as seguintes diferenças: semana 1: $P = 0,007$; semana 2: $P < 0,001$. Diferença entre os grupos até o final do tratamento: $P < 0,001$. O teste de Student-Newman-Keuls mostrou diferença entre os grupos tratados com lítio e os demais grupos a partir da semana 1.

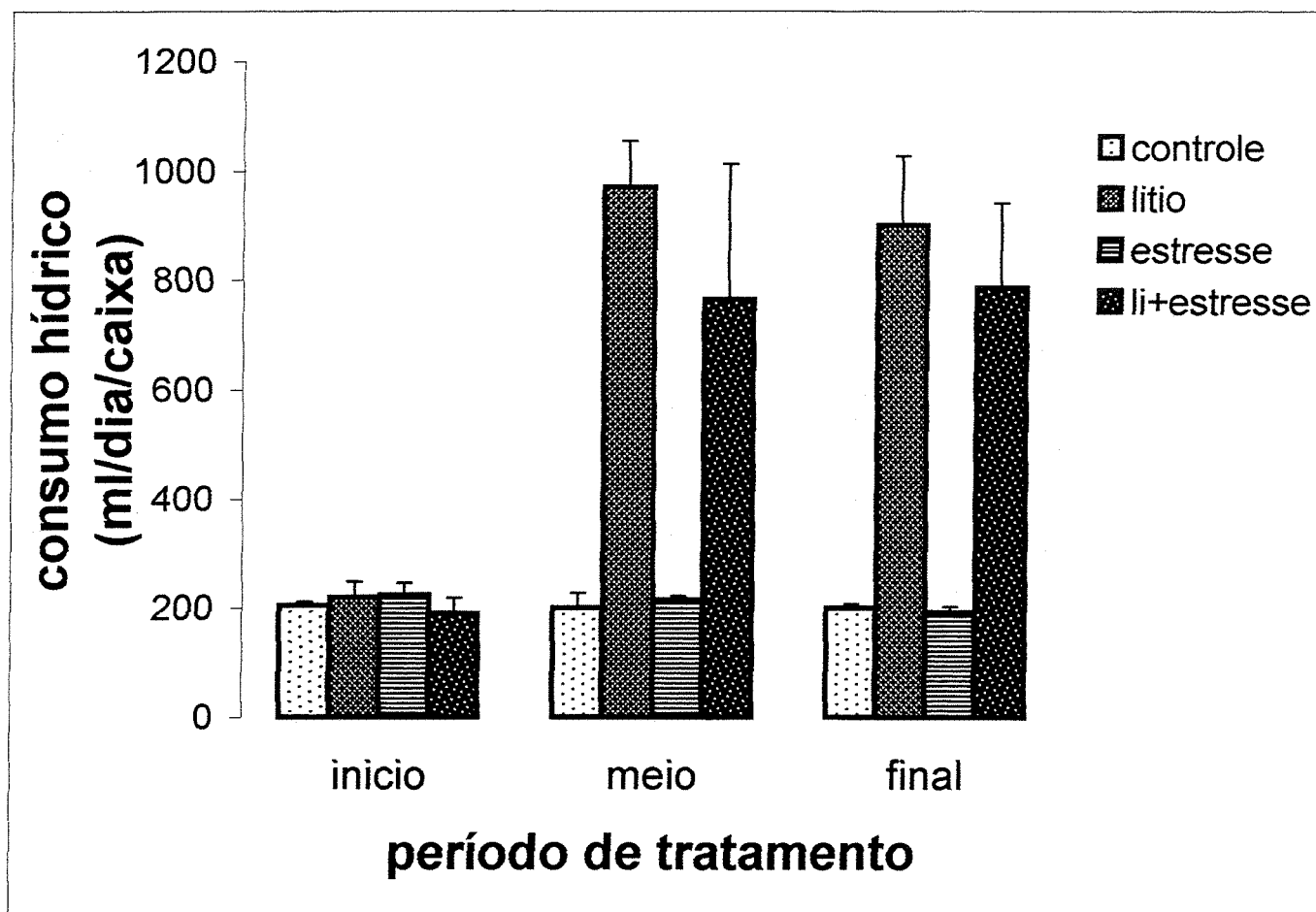


Figura 4.2: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o consumo médio de água. Dados expressos como média \pm erro padrão, animais dispostos em 5 ratos/caixa (duas caixas/grupo).

O tratamento com lítio aumentou o consumo hídrico (ANOVA de medida repetida, $P < 0,01$ para o lítio; $P < 0,01$ para o tempo e $P < 0,01$ para interação entre tempo e tratamento com lítio).

Tarefas comportamentais:

a) Medida da Latência para Retirada da Cauda (TAIL FLICK) com Exposição à Novidade

Todos os animais apresentaram efeito da novidade, mostrando analgesia após exposição a um ambiente novo (ANOVA de medida repetida, $P < 0,001$ para o efeito da sessão). Houve também interação estresse-lítio ($P < 0,05$), sendo que os animais tratados com lítio apresentaram-se hiperalgésicos em relação aos controles e os animais dos grupos estressados, tratados ou não com lítio, não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação aos controles (figura 4.3).

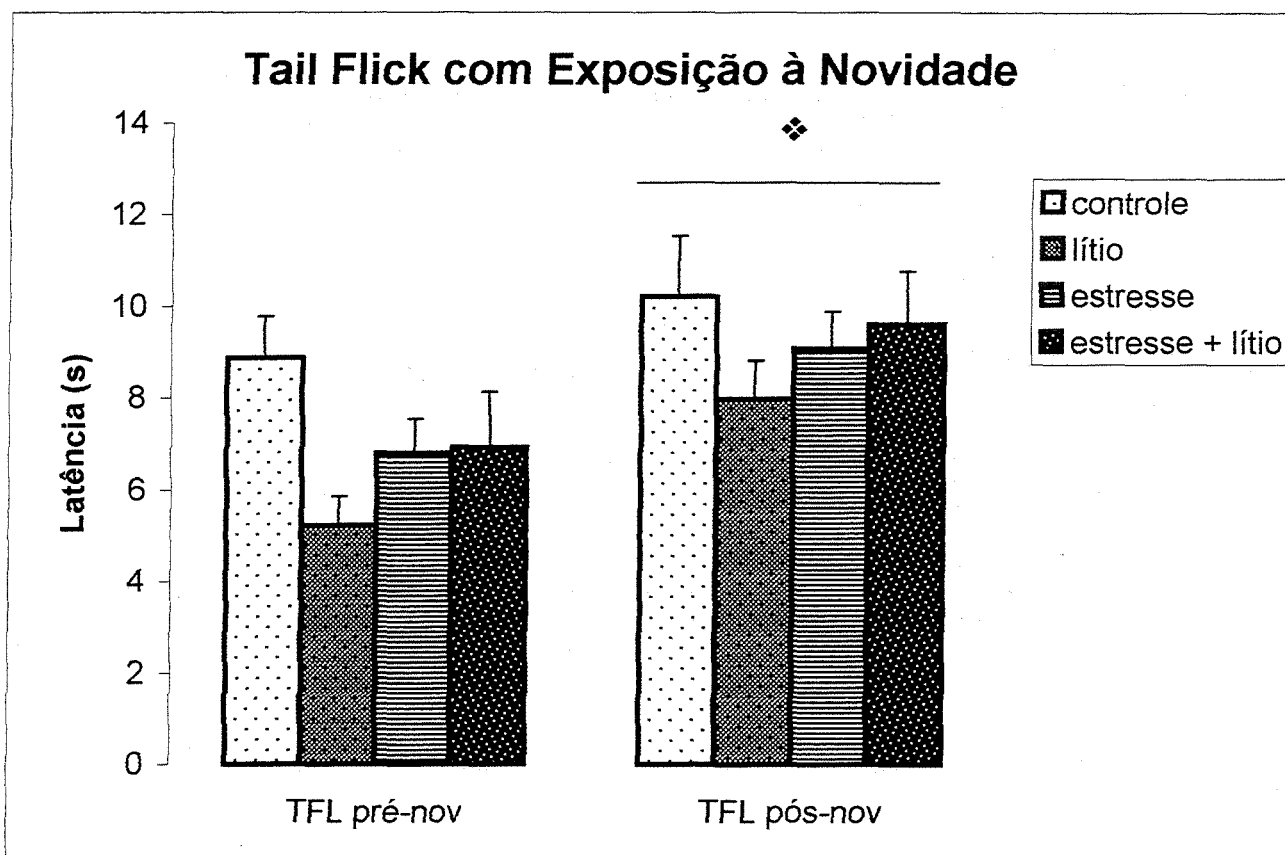


Figura 4.3: Efeitos dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a Latência para Retirada da Cauda com exposição à novidade. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

❖ – Houve efeito significativo da novidade (ANOVA de medida repetida, $P < 0,001$), todos os grupos apresentando tal efeito (teste t de Student para amostras dependentes, $P < 0,05$). Houve ainda interação estresse x lítio ($P < 0,05$).

b) Exposição ao Campo Aberto (OPEN FIELD):

Nesta tarefa, todos os animais apresentaram efeito da sessão, ou seja, houve uma habituação da sessão treino para a sessão teste, o que é evidenciado pela diminuição no número de cruzamentos (“*crossings*”, figura 4.4) e no número de respostas de orientação (“*rearings*”, figura 4.5). Estes resultados foram estatisticamente significativos ($P < 0,001$ para ambos os parâmetros), e podem ser interpretados como consolidação de memória por parte de todos os animais. Não houve diferença significativa entre os grupos tanto para o número de cruzamentos quanto para o número de respostas de orientação.

Na latência para deixar o primeiro quadrado, durante a sessão treino, houve efeito significativo do grupo, com aumento da latência dos animais do grupo estressado ($P < 0,001$), e do lítio, também com aumento da latência destes animais ($P = 0,001$). Na sessão teste, houve interação entre os tratamentos estresse e lítio ($P < 0,05$, figura 4.6). Não houve diferença estatisticamente significativa no número de bolos fecais excretados em nenhum dos grupos analisados, independentemente da sessão (figura 4.7).

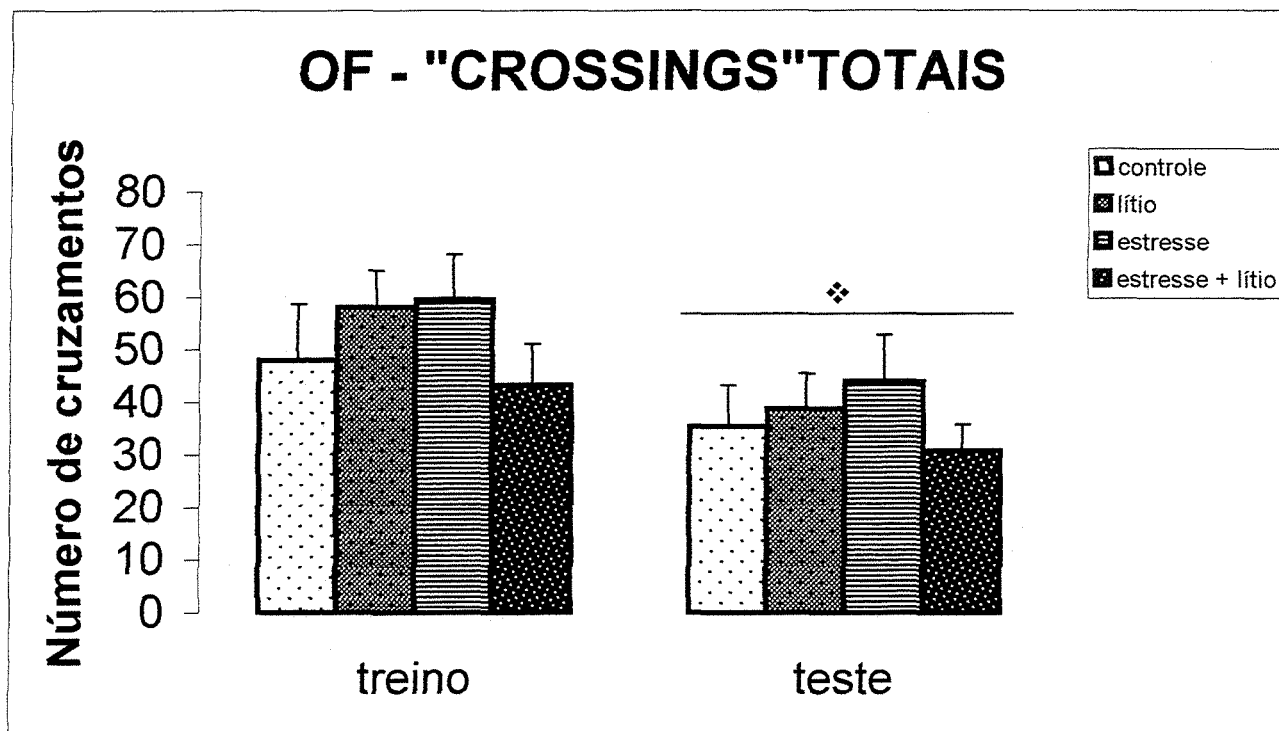


Figura 4.4: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de cruzamentos ("Crossings") na tarefa do Campo Aberto. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

❖ – Todos os grupos apresentaram efeito da sessão (ANOVA de medida repetida, $P < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

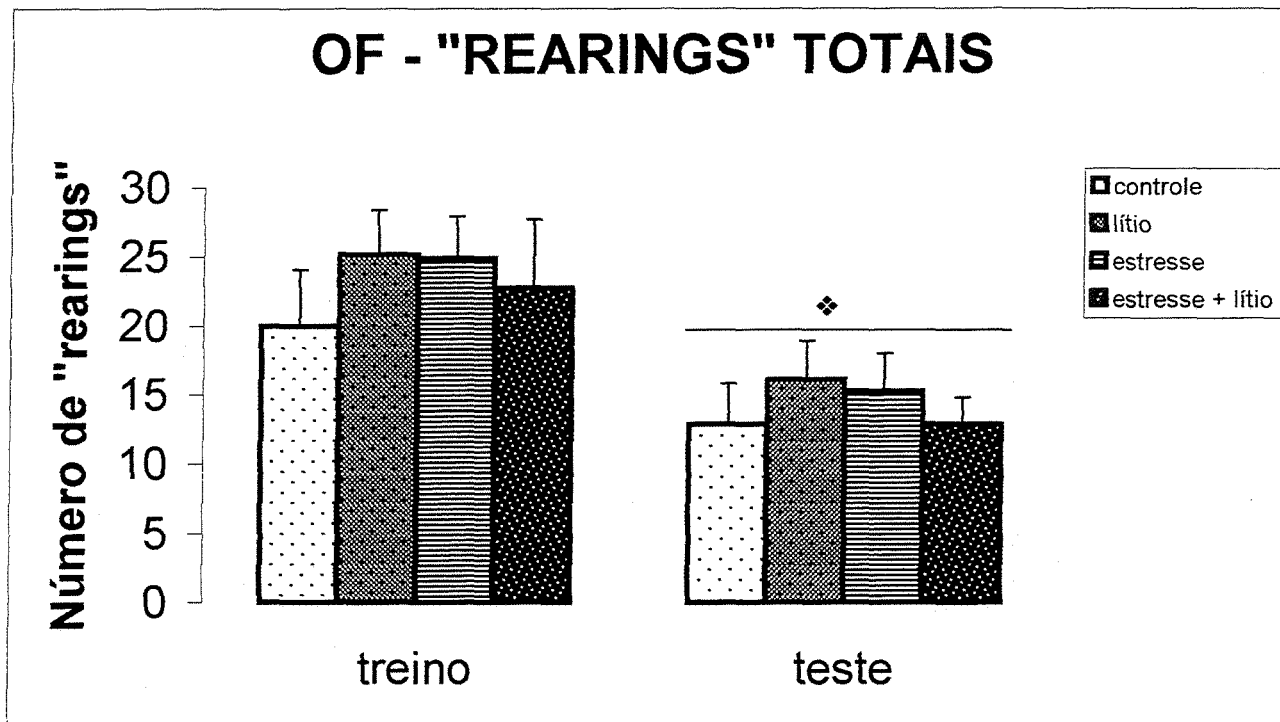


Figura 4.5: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de respostas de orientação ("Rearings") na tarefa do Campo Aberto. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

❖ – Todos os grupos apresentaram efeito da sessão (ANOVA de medida repetida, $P < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

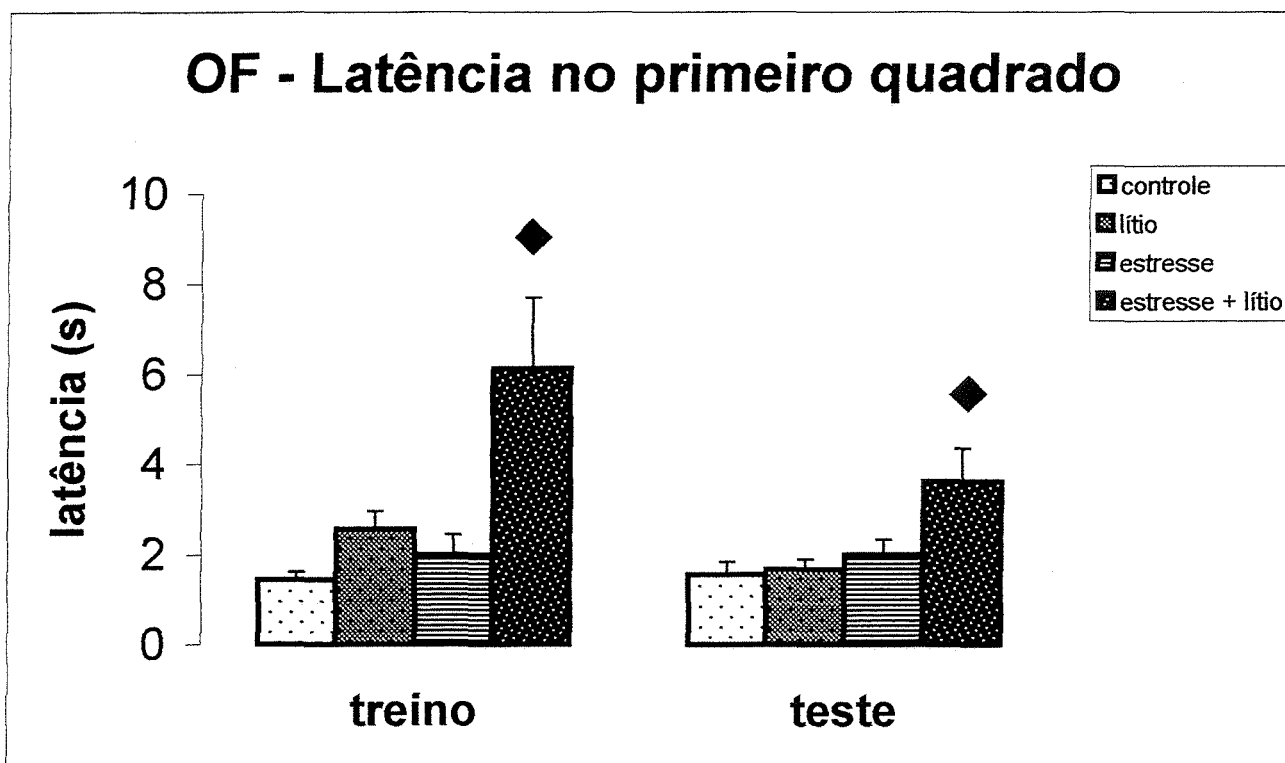


Figura 4.6: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a latência para deixar o primeiro quadrado na tarefa do Campo Aberto. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

Uma ANOVA de medida repetida mostrou efeito geral do estresse ($P = 0,001$) e do lítio ($P < 0,001$), assim como interação entre estresse e lítio ($P < 0,02$). Uma comparação entre os grupos nas sessões isoladamente mostrou ser o grupo estresse + lítio diferente dos demais ($\blacklozenge - P < 0,05$, teste de Student-Newman-Keuls).

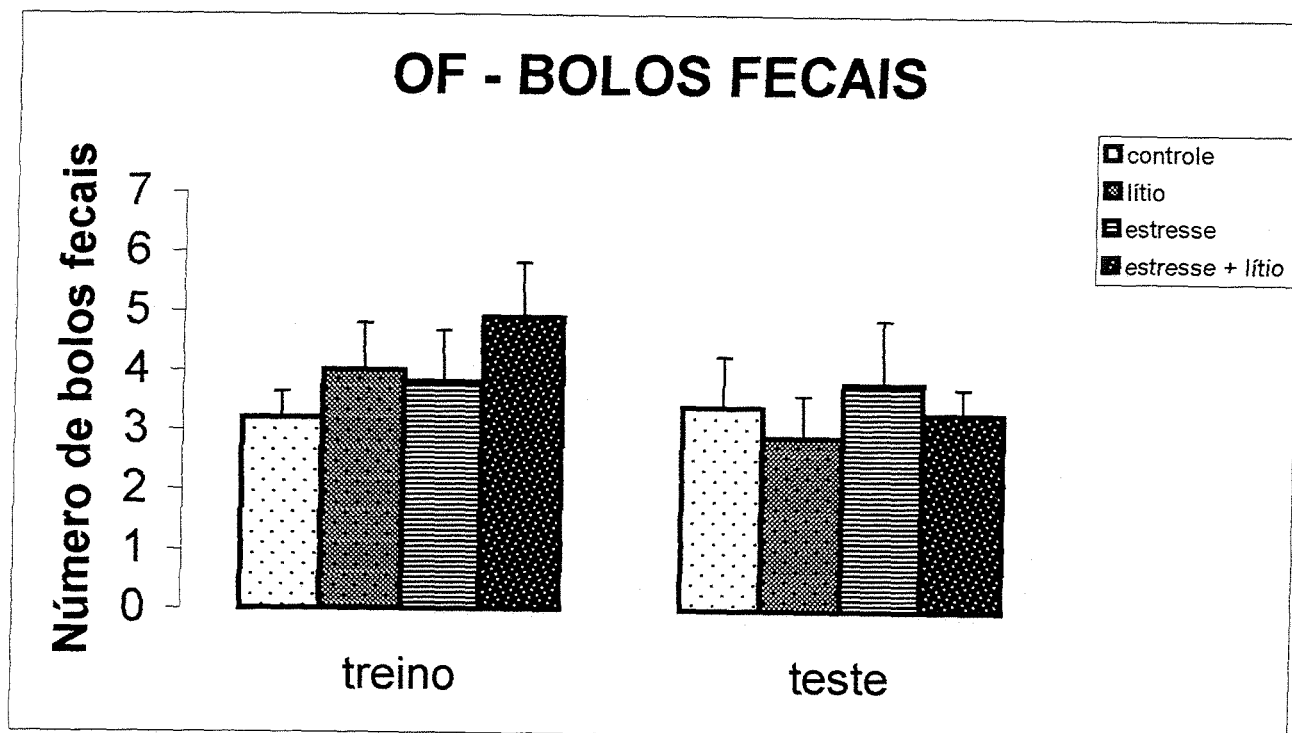


Figura 4.7: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de bolos fecais na tarefa do Campo Aberto. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

Não houve efeito da sessão ou dos tratamentos (ANOVA de medida repetida, $P > 0,05$ para todas as variáveis).

c) Exposição ao Labirinto em Cruz Elevado (PLUS MAZE)

Os resultados obtidos com esta tarefa demonstraram claro efeito do tratamento com lítio sobre o tempo de permanência no braço aberto: os animais tratados com lítio permaneceram bem mais tempo no braço aberto quando comparados com os controles, da mesma forma que os estressados tratados com lítio quando comparados ao grupo estressado ($P = 0,001$, figura 4.8).

Na medida do número de entradas no braço aberto, houve efeito significativo do estresse ($P < 0,05$) e do lítio ($P < 0,001$): os animais tratados com lítio apresentaram aumento no número de entradas no braço aberto; além disso, o lítio reverteu a diminuição das mesmas provocada pelo estresse. Não houve diferença significativa no número de entradas no braço fechado, e a soma total de entradas foi diferente entre os grupos, tratados ou não com lítio ($P < 0,05$, figura 4.9).

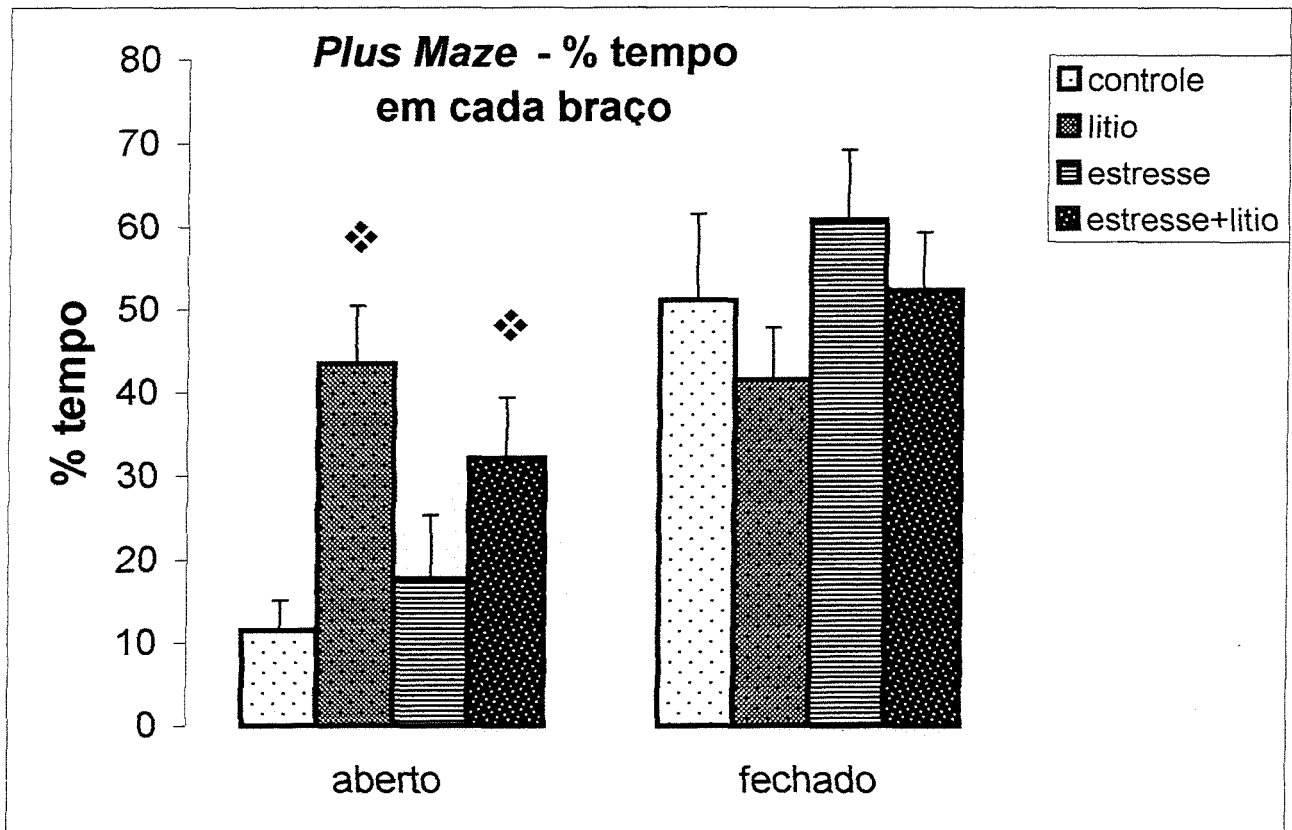


Figura 4.8: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados no Labirinto em Cruz Elevado. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo. \diamond - Houve efeito significativo do lítio sobre o tempo de permanência no braço aberto (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $P = 0,001$). Não houve efeito do estresse (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$).

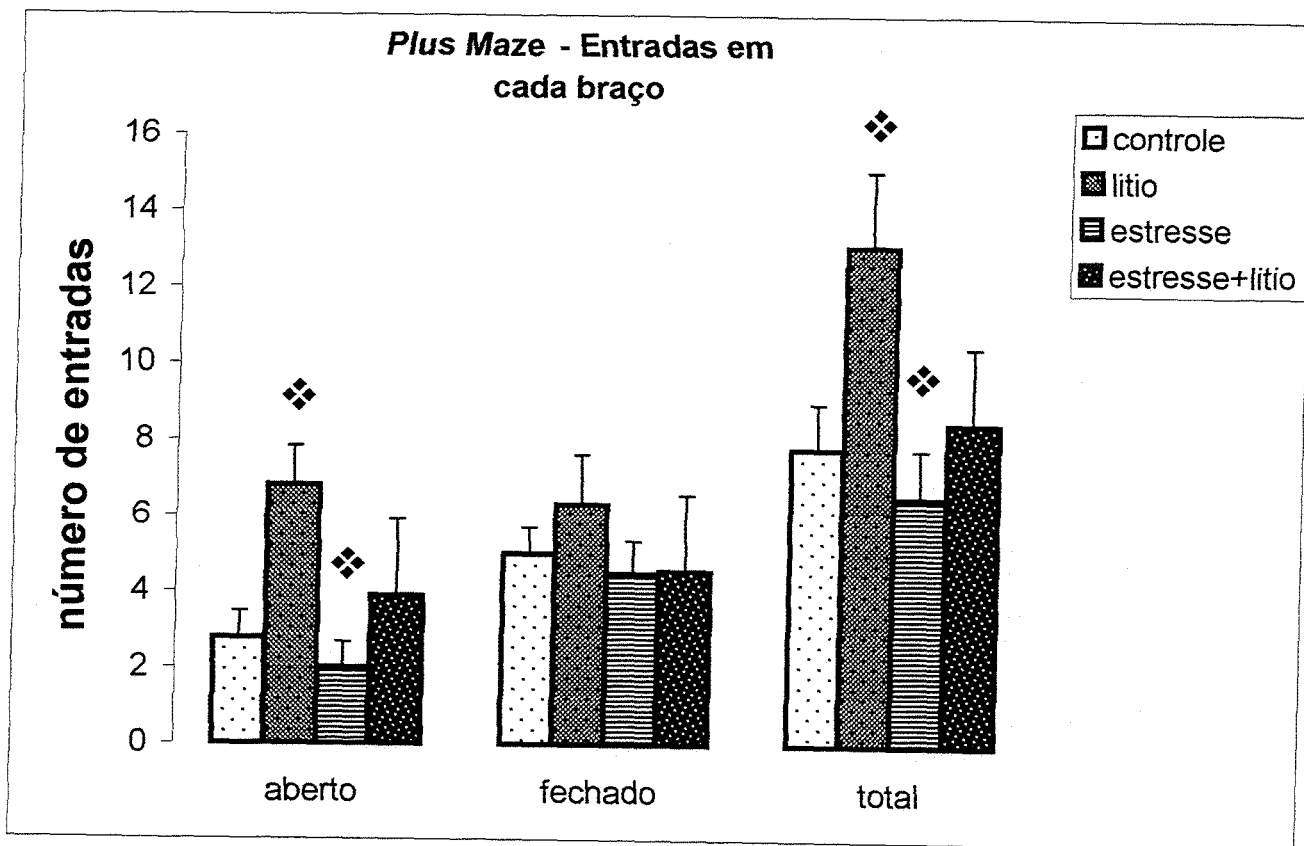


Figura 4.9: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o número de entradas nos braços abertos, fechados, e número total de entradas no Labirinto em Cruz Elevado. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

❖ - Houve efeito significativo do lítio e do estresse sobre o número de entradas no braço aberto (ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$ para o estresse e $P < 0,001$ para o lítio) e sobre o número total de entradas ($P < 0,05$ para ambos os tratamentos). Não houve efeito sobre o número de entradas no braço fechado (ANOVA de duas vias, $P > 0,05$).

d) Medida de Latência na Esquiva Inibitória

Os resultados obtidos com esta tarefa demonstraram não haver diferença no índice de retenção de memória entre os grupos (figura 4.10). Quando comparadas as sessões treino e teste isoladamente, os animais do grupo tratado com lítio não tiveram diferença significativa no índice de retenção ($P = 0,0745$), ao contrário dos demais grupos ($P < 0,01$ para todos os demais).

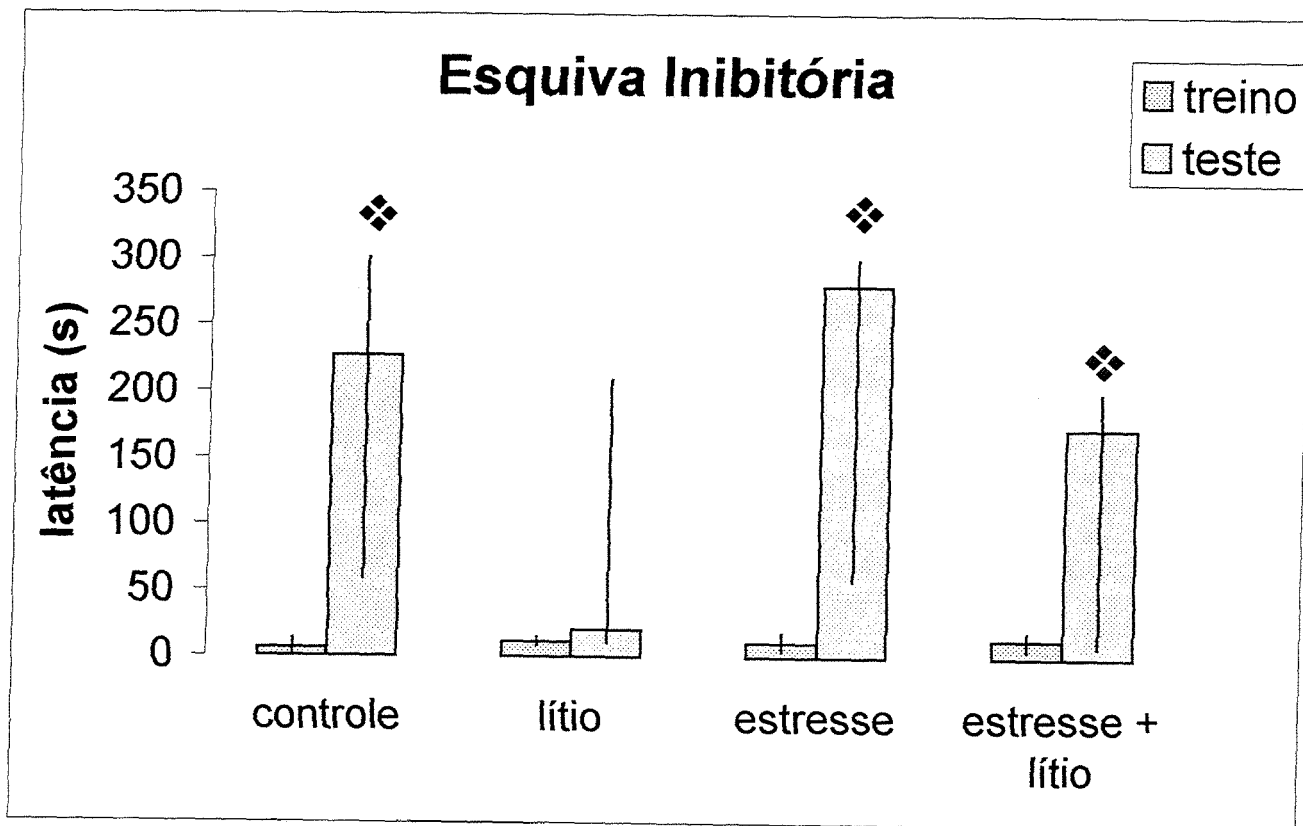


Figura 4.10: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre as latências para descer da plataforma na Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalo interquartis). Não houve diferença significativa entre os grupos (teste Kruskal-Wallis). N = 10 animais por grupo.

❖ - Houve efeito significativo entre as sessões treino e teste (teste de Wilcoxon; $P < 0,01$). Não houve diferença significativa entre as sessões no grupo tratado com lítio ($P = 0,08$).

e) Medida de Memória Espacial no Labirinto Aquático (WATER MAZE)

Memória Espacial de Referência:

Os animais de todos os grupos apresentaram curvas de aprendizado estatisticamente iguais, o que indica que tiveram aprendizado semelhante durante as sessões treino (figura 4.11).

Na sessão de teste, os efeitos dos tratamentos aplicados sobre os diferentes parâmetros desta tarefa foram bastante significativos. Os resultados obtidos demonstraram que 1 - o estresse aumentou a latência para o primeiro cruzamento ($P < 0,001$), o que pode ser interpretado como déficit de memória. Por sua vez, o tratamento com lítio reverteu o efeito do pelo estresse, não provocando por si só efeito significativo neste parâmetro, apesar de apresentar uma certa tendência para tal ($P = 0,068$, figura 4.12); 2 - o tratamento com lítio aumentou o número de cruzamentos dos animais sobre o local exato da plataforma, e reverteu a diminuição provocada pelo estresse neste parâmetro, (efeito do estresse: $P < 0,001$; efeito do lítio: $P = 0,003$; fig. 4.13); 3 - houve interação dos efeitos no tempo de permanência no quadrante alvo, com os animais estressados tratados com lítio apresentando performance semelhante aos controles e tratados somente com lítio ($P = 0,006$) e 4 - o estresse provocou aumento no tempo de permanência no quadrante oposto ($P = 0,017$), o que é um índice da desorientação do rato, e houve interação estresse-lítio nesse parâmetro ($P = 0,017$), com reversão desta medida de desorientação (figura 4.14).

Memória Espacial de Trabalho:

Como nesta tarefa não há sessão treino, toma-se como medida de memória as diferenças na latência para achar a plataforma entre diferentes medidas dentro da mesma sessão (*trials*). Os resultados obtidos com esta tarefa indicam aprendizado semelhante para todos os grupos, à exceção do grupo estressado que apresentou maior latência na primeira tentativa (*trial*) ($P = 0,037$; figura 4.15).

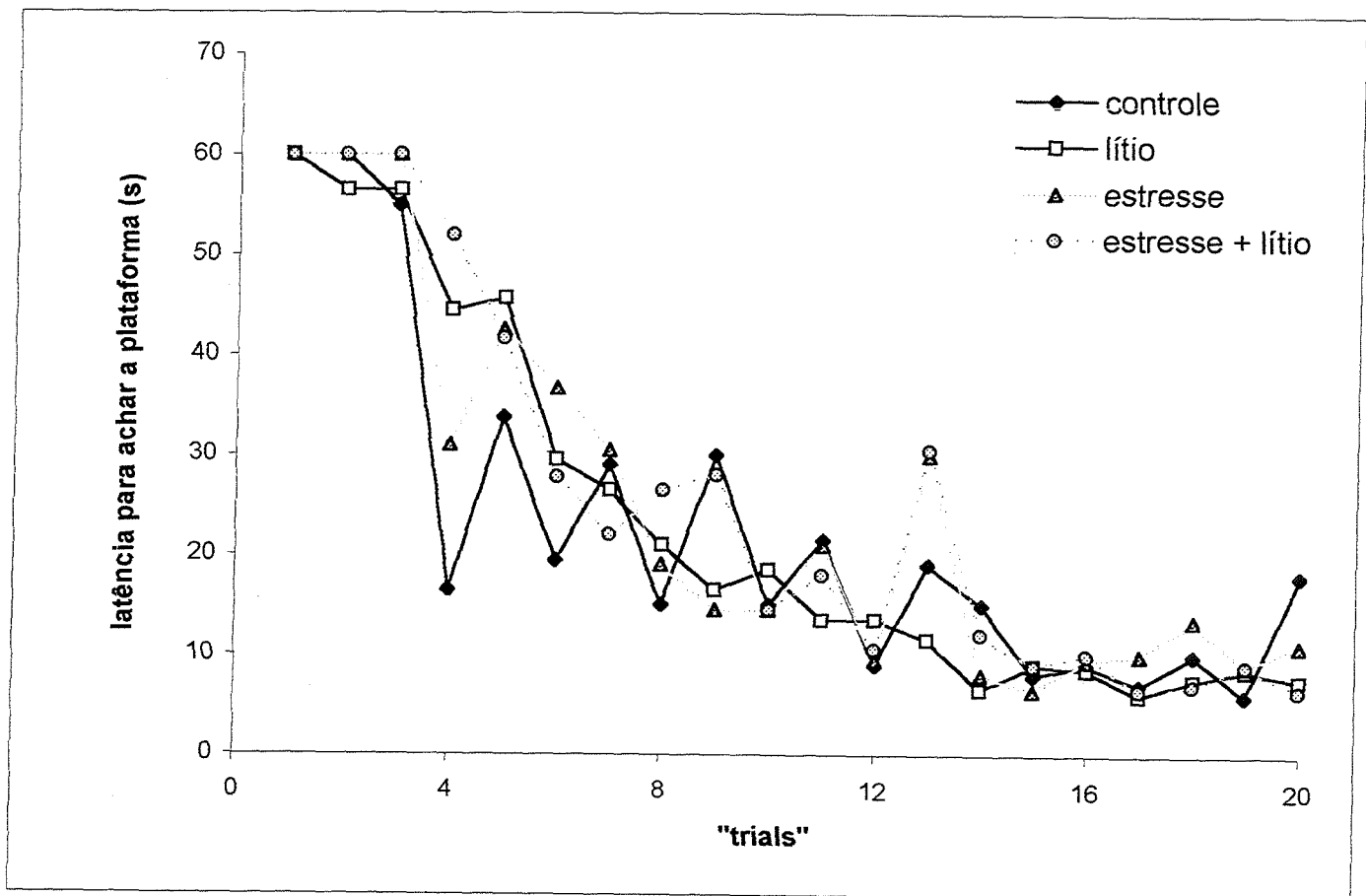


Figura 4.11: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a curva de aprendizado no Labirinto Aquático de Morris. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

Houve aprendizado (ANOVA de medida repetida, $P < 0,01$ para as sessões) e não houve efeito dos tratamentos ($P > 0,05$). Todos os grupos apresentaram aprendizado estatisticamente igual.

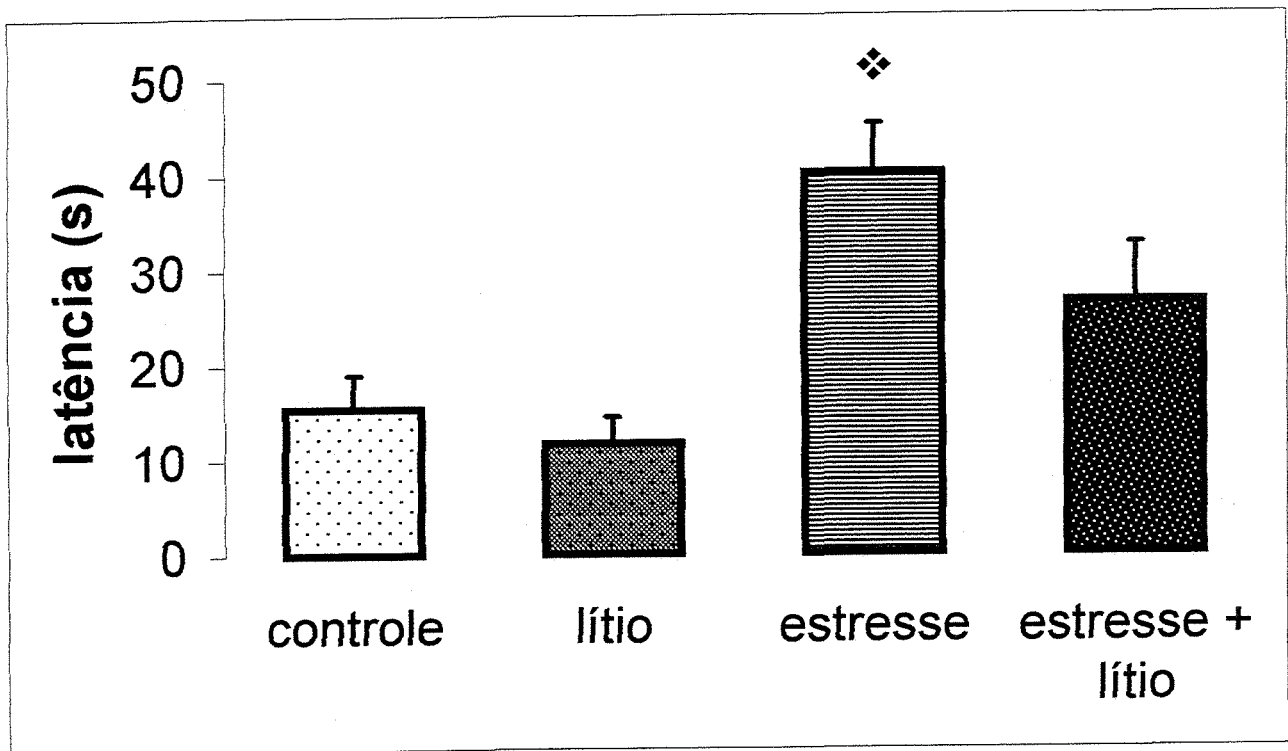


Figura 4.12: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre a latência para atingir o local onde se localizava a plataforma. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

Houve efeito do estresse (ANOVA de duas vias, $P < 0,001$).

❖ - Significativamente diferente dos demais grupos (Teste de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$)

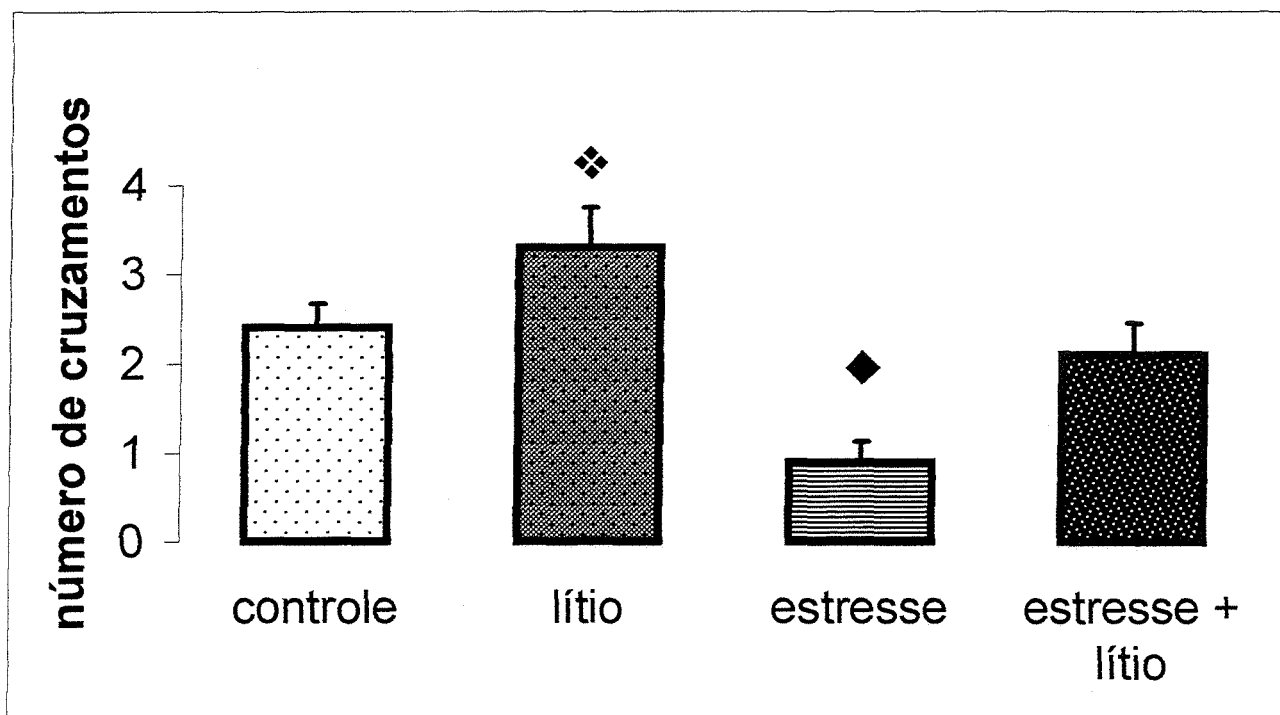


Figura 4.13: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre o número de cruzamentos no local onde se localizava a plataforma. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

◆ Houve efeito do estresse (ANOVA de duas vias, $P < 0,001$).

❖ Houve efeito do lítio (ANOVA de duas vias, $P = 0,003$).

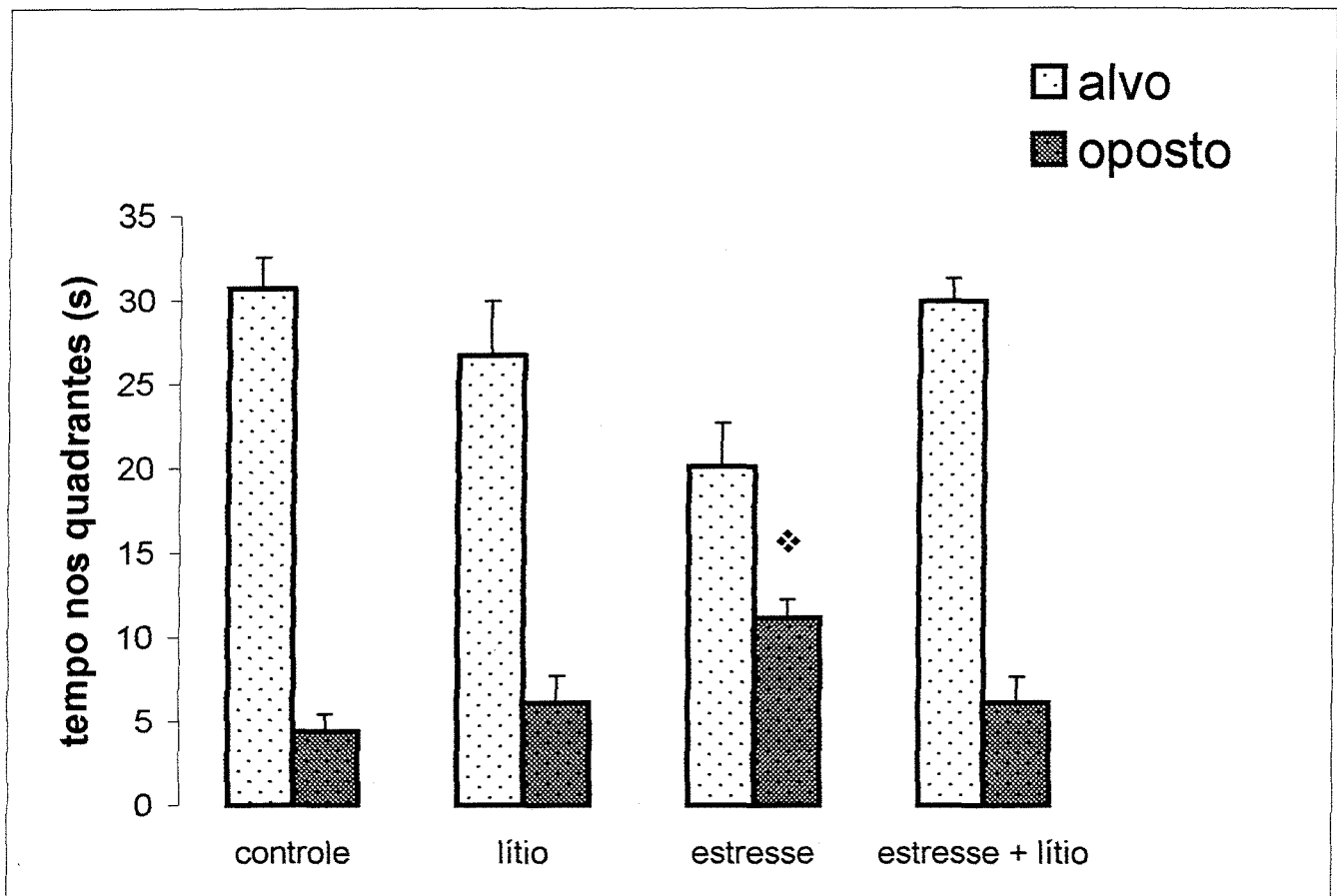


Figura 4.14: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o desempenho na sessão de teste da tarefa de Labirinto Aquático de Morris: efeito sobre o tempo de permanência nos quadrantes alvo e oposto. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 10 animais por grupo.

Houve interação entre estresse e lítio tanto para o tempo no quadrante alvo quanto para o tempo no quadrante oposto ($P < 0,02$).

❖ Houve efeito do estresse (ANOVA de duas vias, $P < 0,02$).

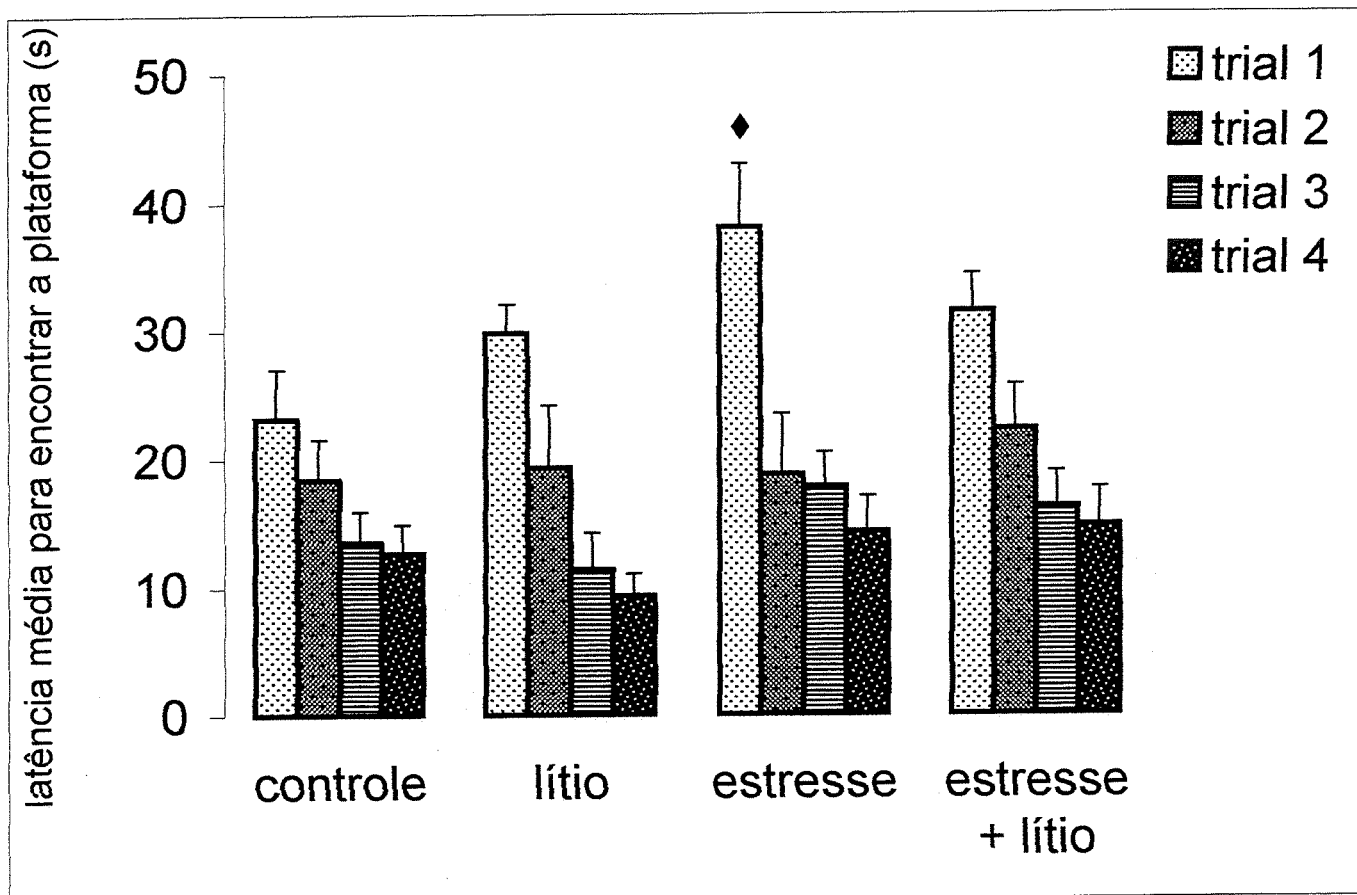


Figura 4.15: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre a memória de trabalho no Labirinto Aquático. Foi calculada a média da primeira tentativa (*trial*) durante as quatro sessões, assim como das tentativas subseqüentes. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média para cada grupo. Uma ANOVA de medida repetida mostrou efeito do estresse ($P < 0,05$) e efeito da tentativa (*trial*) ($P < 0,001$). $N + 10$ animais por grupo.

◆ Significativamente diferente dos demais grupos na primeira tentativa (*trial*) (ANOVA de duas vias, $P < 0,05$).

Medidas Neuroquímicas:

As medidas neuroquímicas foram realizadas de forma lateralizada, para possibilitar a comparação entre os dois hemisférios cerebrais. Contudo, quando não foi apresentada qualquer diferença entre estes, os resultados foram analisados conjuntamente.

a) Medida da Imunoreatividade ao Anticorpo Anti- β -tubulina III

Na maioria das estruturas analisadas, não houve diferença estatisticamente significativa no imunoconteúdo de β -tubulina III (figuras 4.18, 19, 20 e 21). No córtex cerebral, contudo, todos os grupos apresentaram diminuição significativa na reatividade deste anticorpo quando comparados com o grupo controle, indicando também diminuição em seu imunoconteúdo nesta estrutura. Contudo, ao analisarmos separadamente os hemisférios, ficou claro que esta diminuição é bem mais acentuada no hemisfério direito, especialmente no grupo estressado ($P < 0,0001$ para o grupo estressado e $P < 0,03$ para os demais grupos, figura 4.16), ao passo que, no hemisfério esquerdo, a diferença é apenas marginalmente significativa para o grupo estressado ($P < 0,1$ para o grupo estressado, e $P > 0,1$ para os demais grupos, figura 4.17).

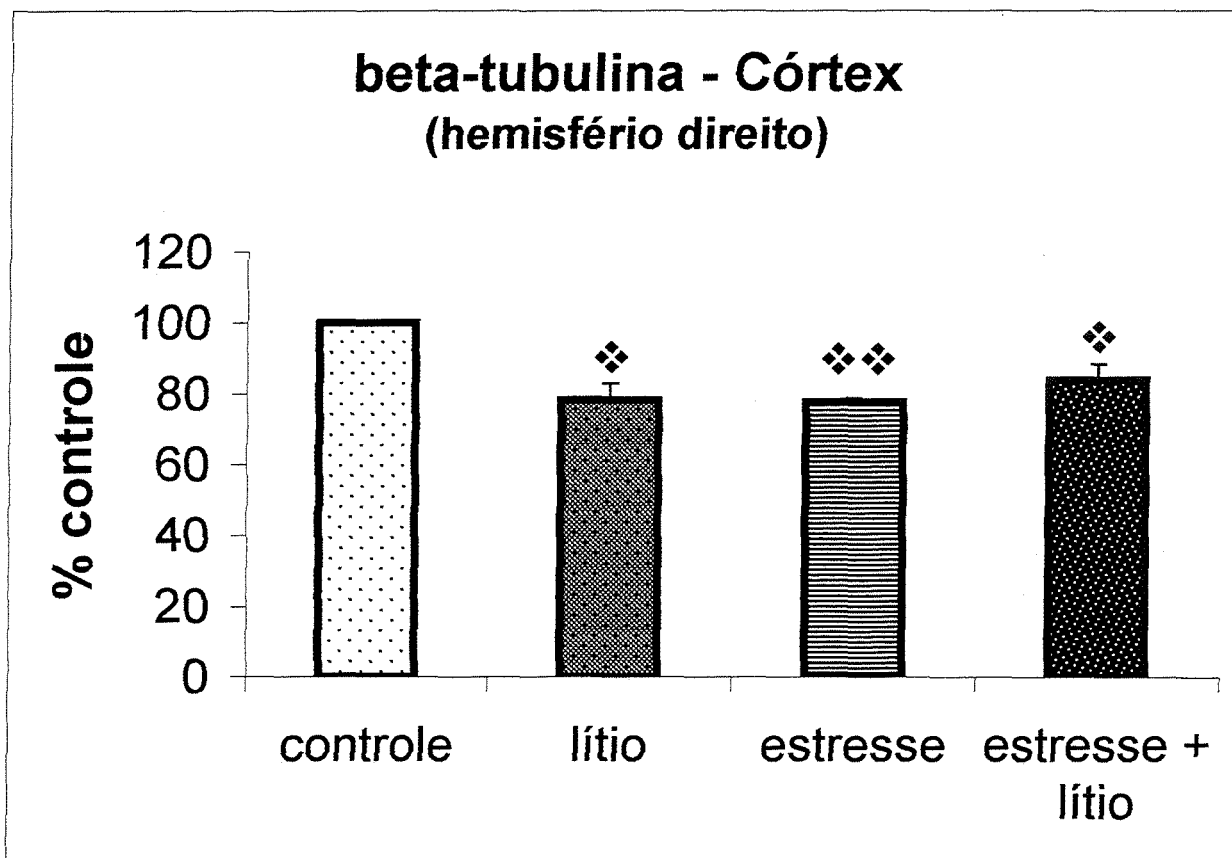


Figura 4.16: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em córtex cerebral (hemisfério direito) de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

♦ Significativamente diferente do controle (teste t de Student para amostras dependentes, $P < 0,03$).

♦♦ Significativamente diferente do controle (teste t de Student para amostras dependentes, $P < 0,0001$).

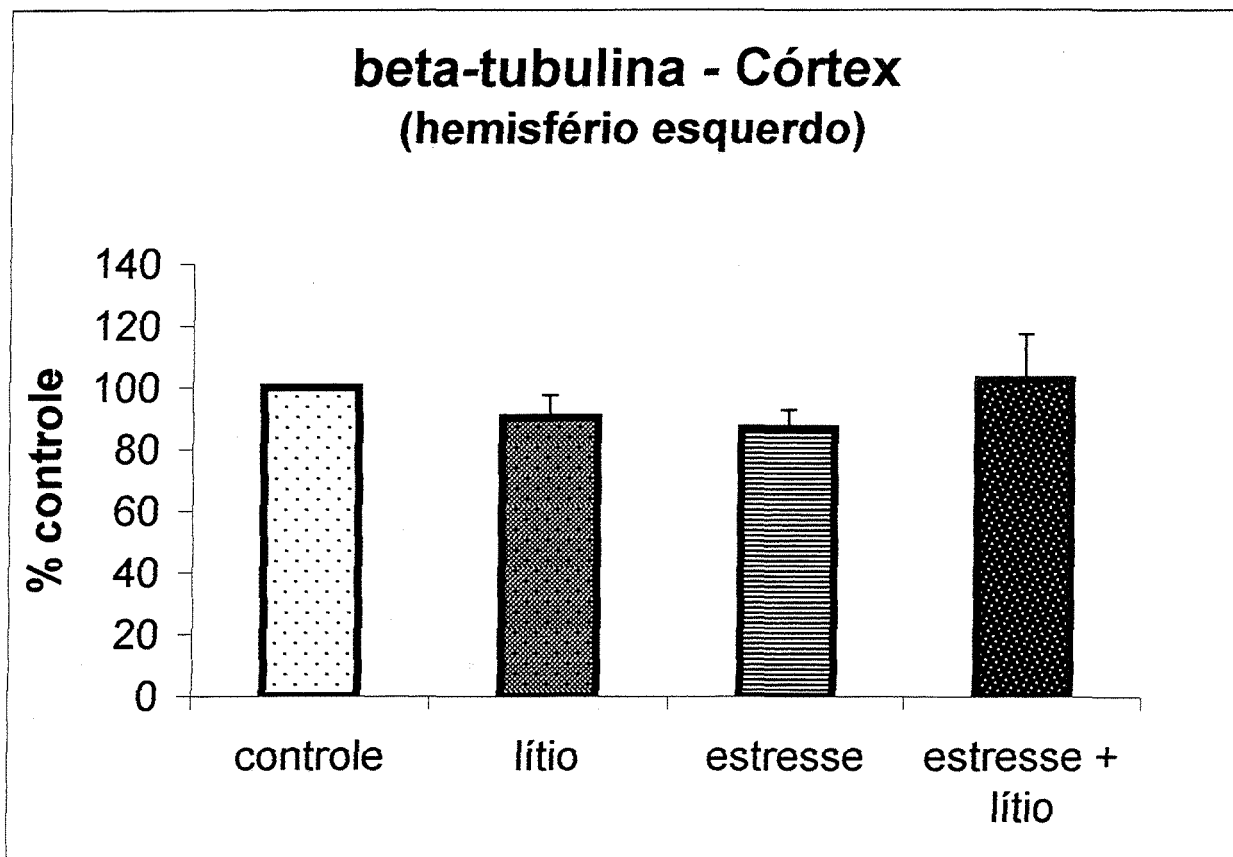


Figura 4.17: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em córtex cerebral (hemisfério esquerdo) de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

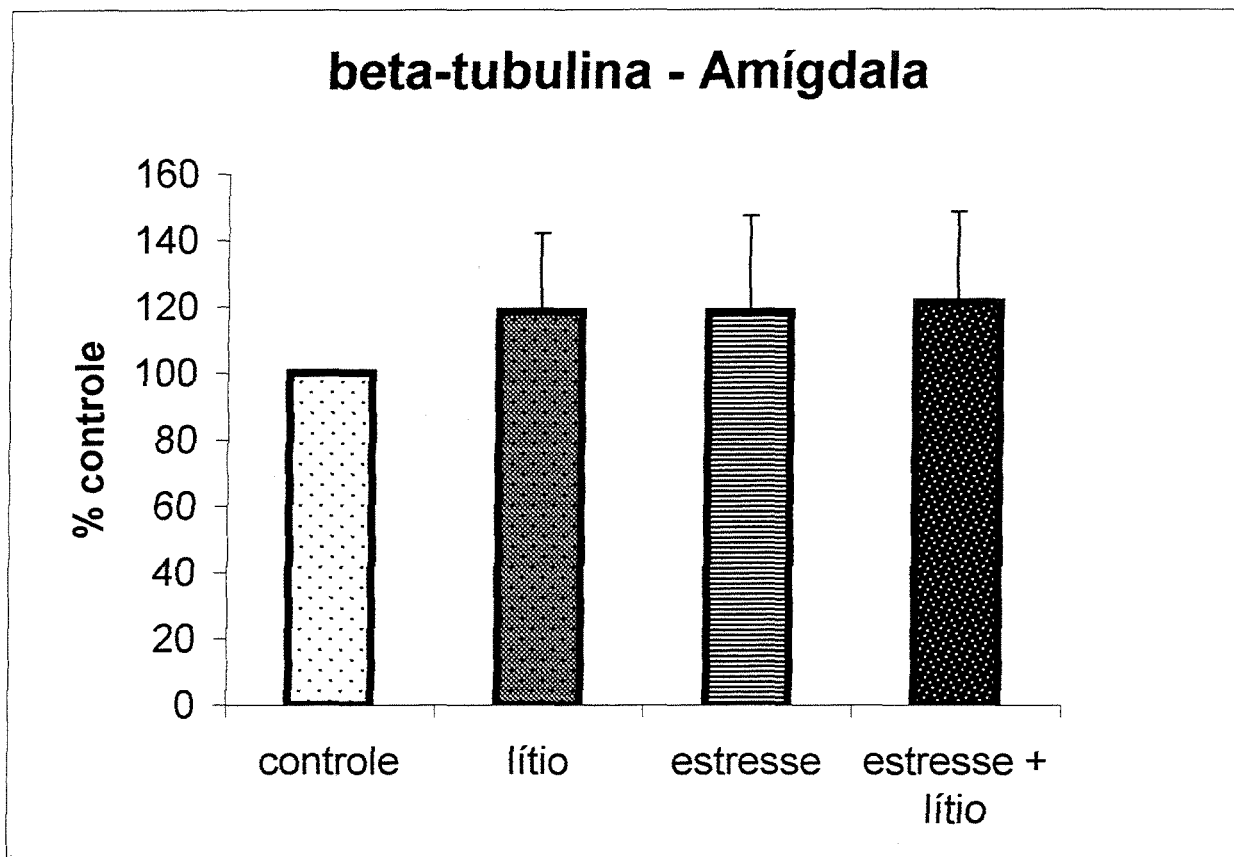


Figura 4.18: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em amígdala de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

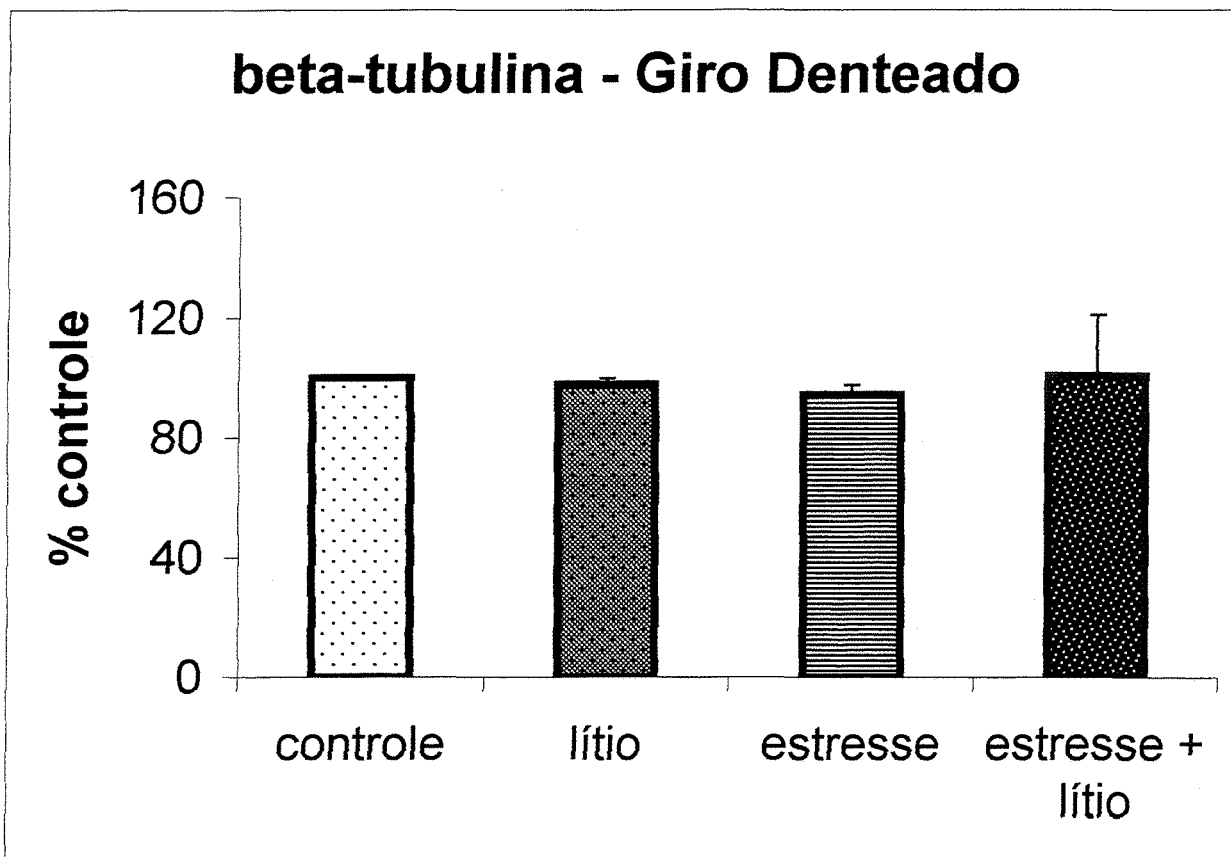


Figura 4.19: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III em giro denteado de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

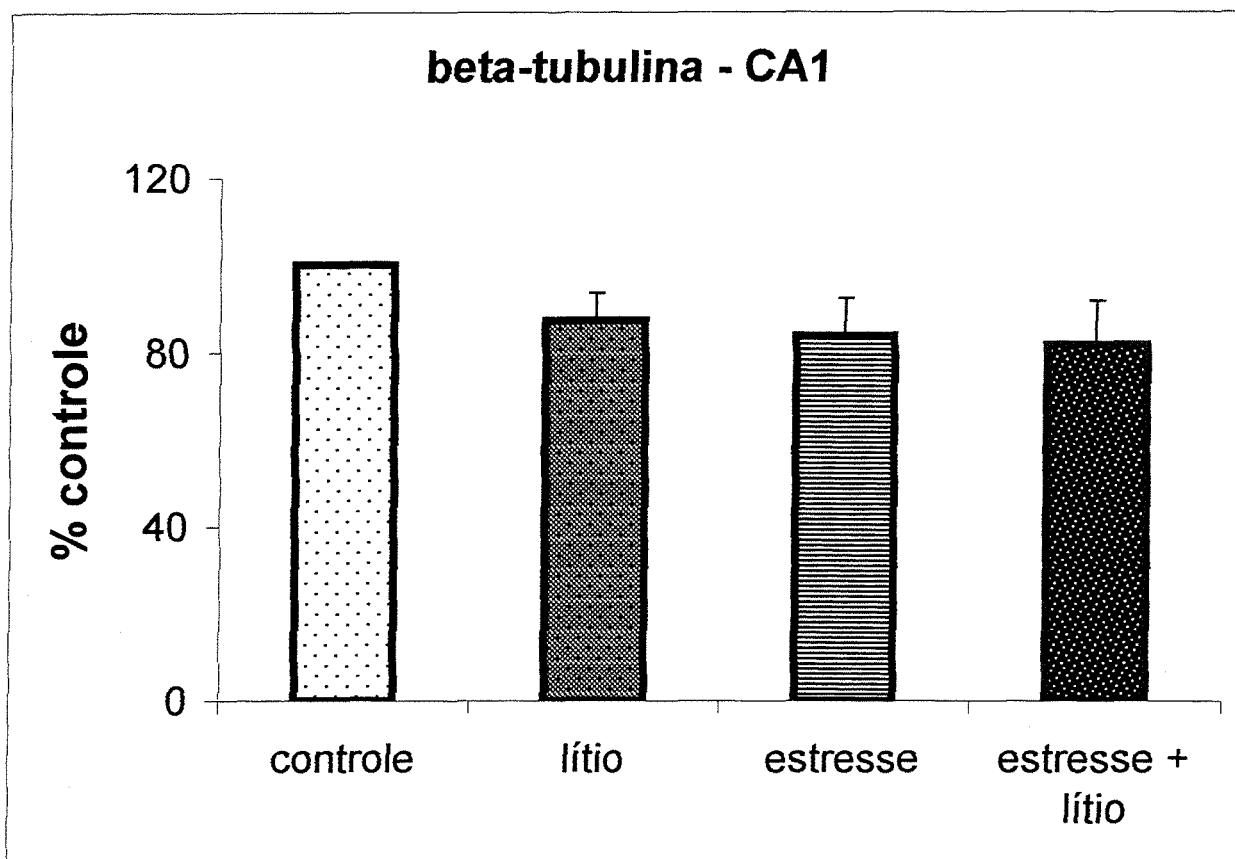


Figura 4.20: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III na região CA1 de hipocampo de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo. Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

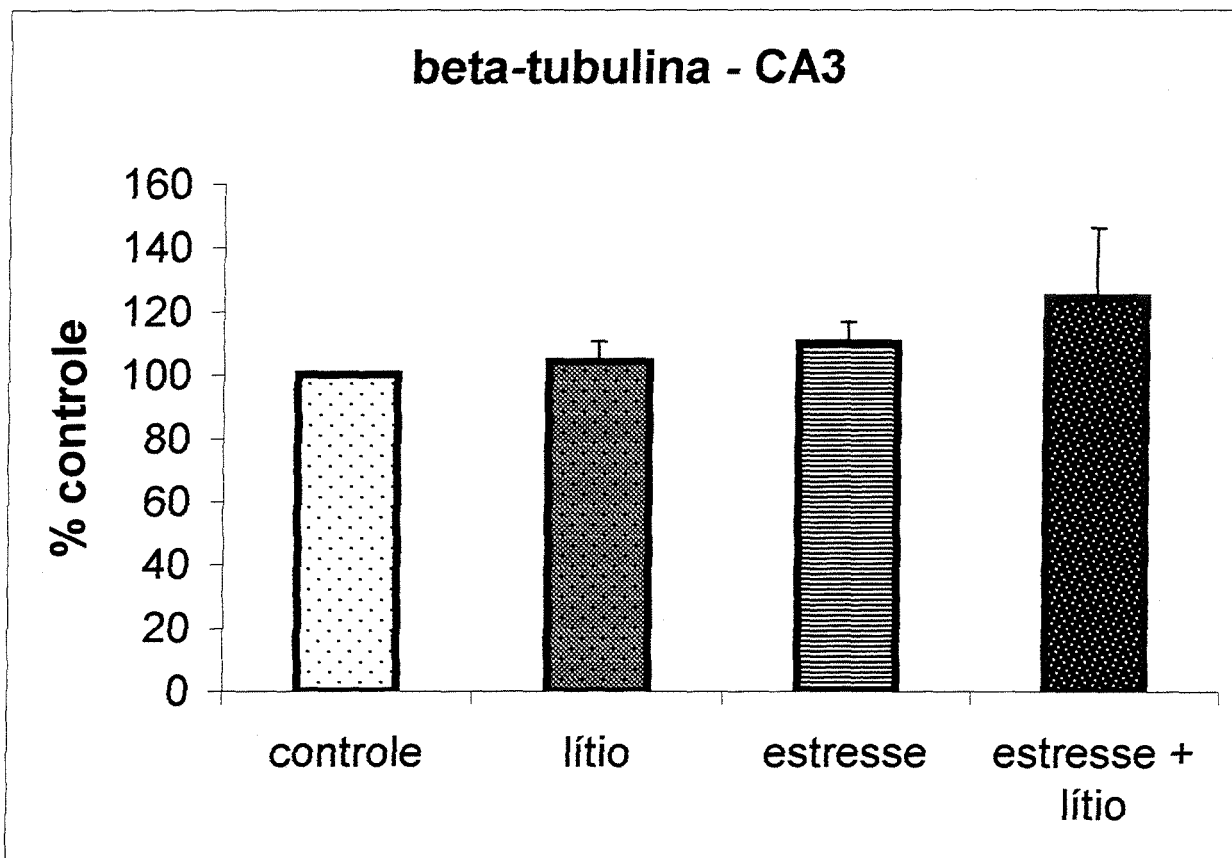


Figura 4.21: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de beta-tubulina III na região CA3 de hipocampo de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

b) Medida da Imunorreatividade ao Anicorpo Anti-GFAP

Não houve diferença estatisticamente significativa no imunoconteúdo de GFAP em nenhuma das estruturas analisadas. Contudo, em algumas delas, foi observada uma tendência a aumento da reatividade a este anticorpo: no córtex cerebral, houve uma tendência a aumento provocado pelo lítio, uma vez que os dois grupos tratados com este sal apresentaram uma diferença com $P = 0,08$ quando comparados com o grupo controle (figura 4.22). Na amígdala, esta tendência foi apresentada por todos os grupos quando comparados com o controle ($P = 0,1$ para o grupo lítio, $P = 0,055$ para o grupo estressado e $P = 0,0505$ para o grupo estresse + lítio, figura 4.23). Por fim, houve ainda uma tendência a aumento no giro denteado, em que os animais do grupo estressado apresentaram uma diferença com $P = 0,08$ quando comparados com os controles (figura 4.24). Nas demais estruturas, não houve qualquer tendência a diferenças no imunoconteúdo de GFAP (figuras 4.25 e 4.26).

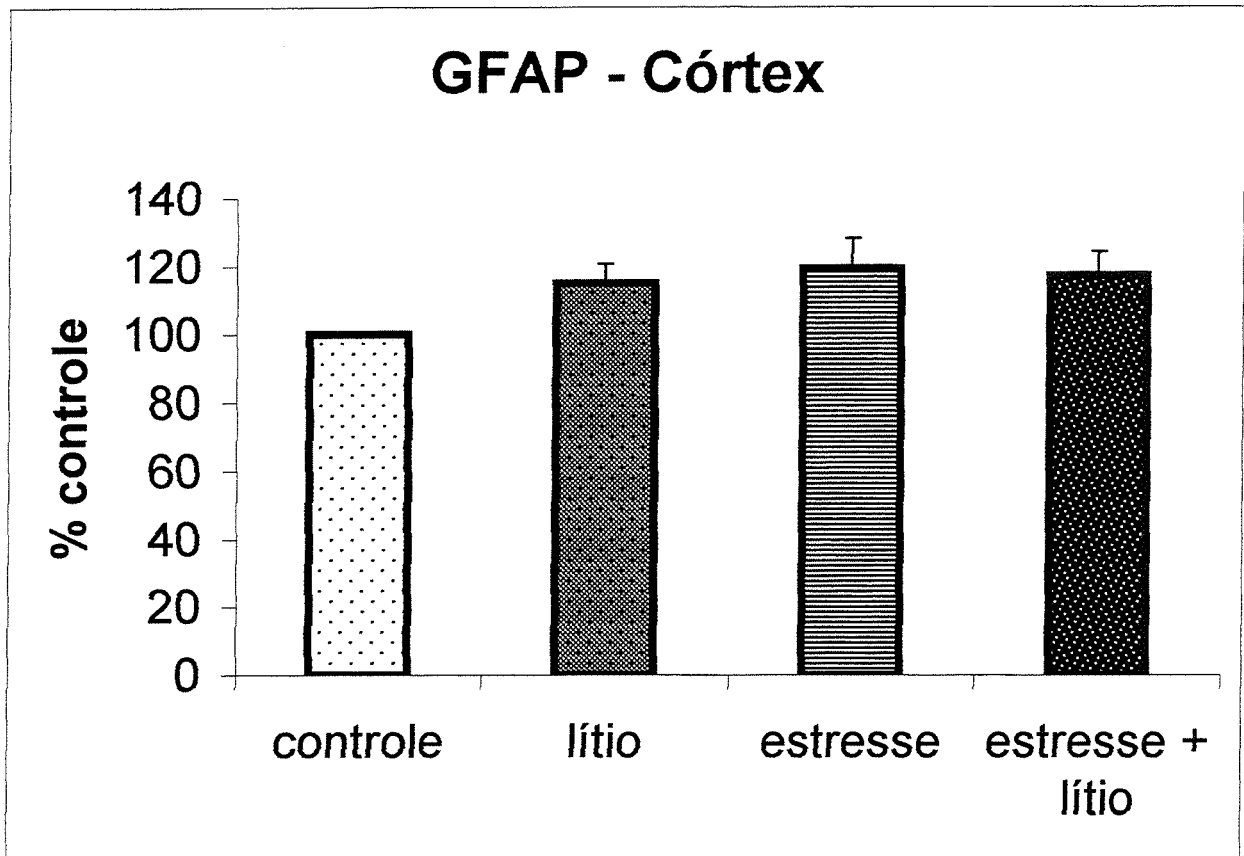


Figura 4.22: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP no córtex cerebral de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

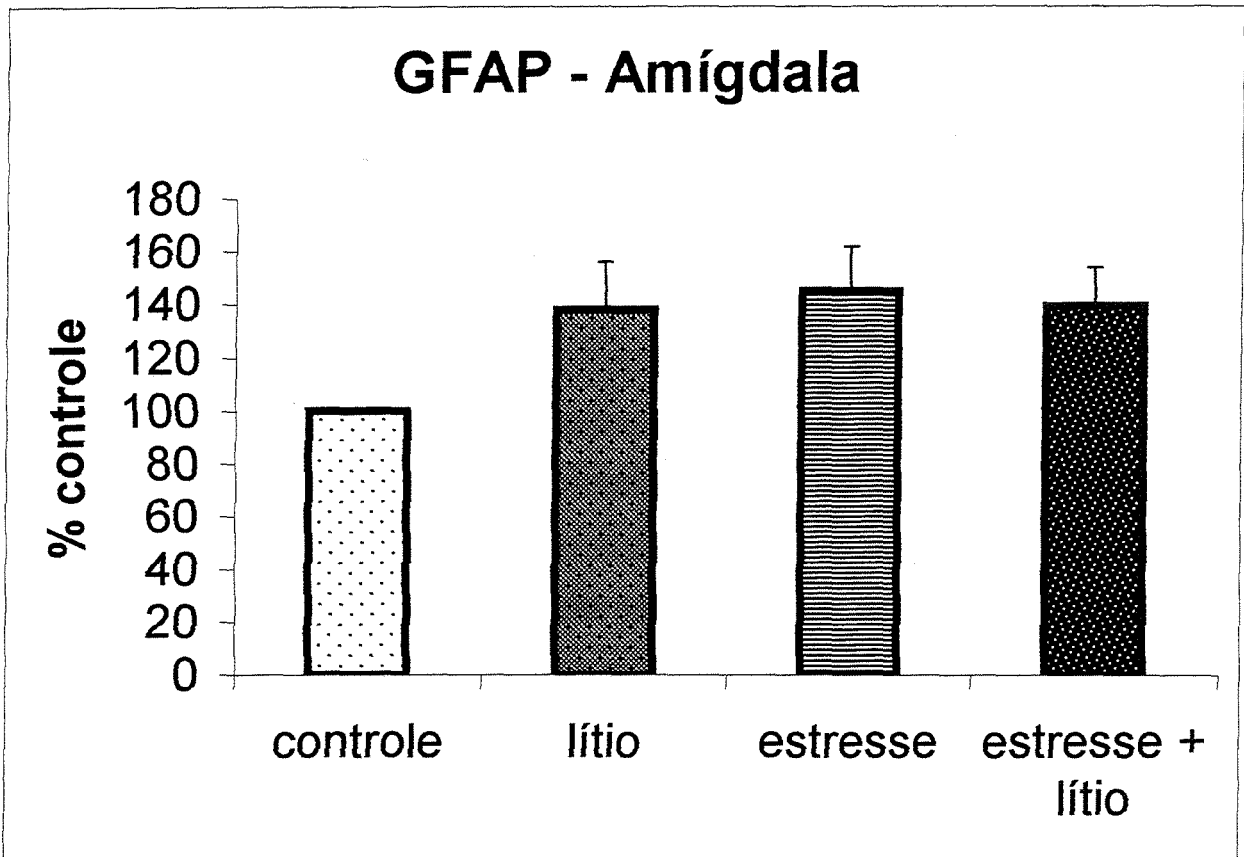


Figura 4.23: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP na amígdala de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Houve um efeito marginal do estresse ($P = 0,055$, teste t de Student para amostras dependentes) e do tratamento conjunto estresse + lítio ($P = 0,0505$, teste t de Student para amostras dependentes).

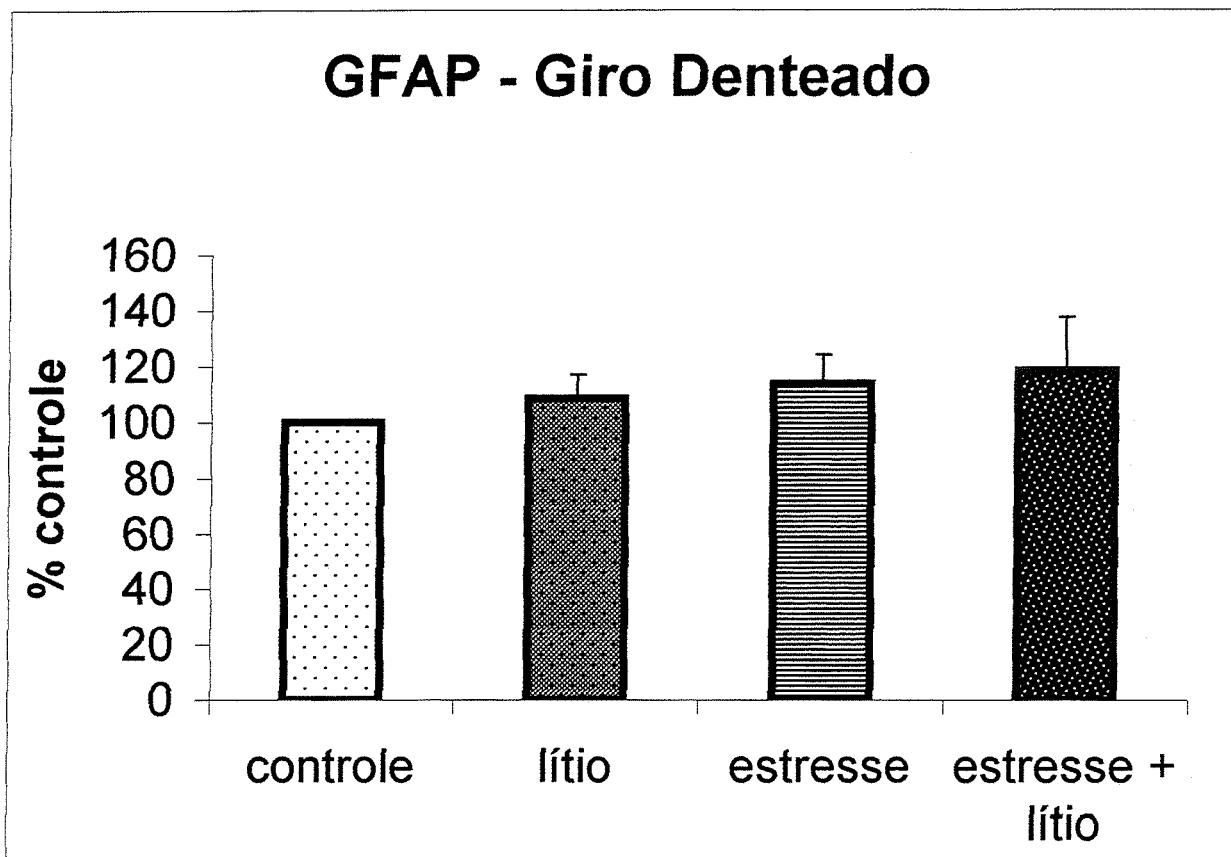


Figura 4.24: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP no giro denteado de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

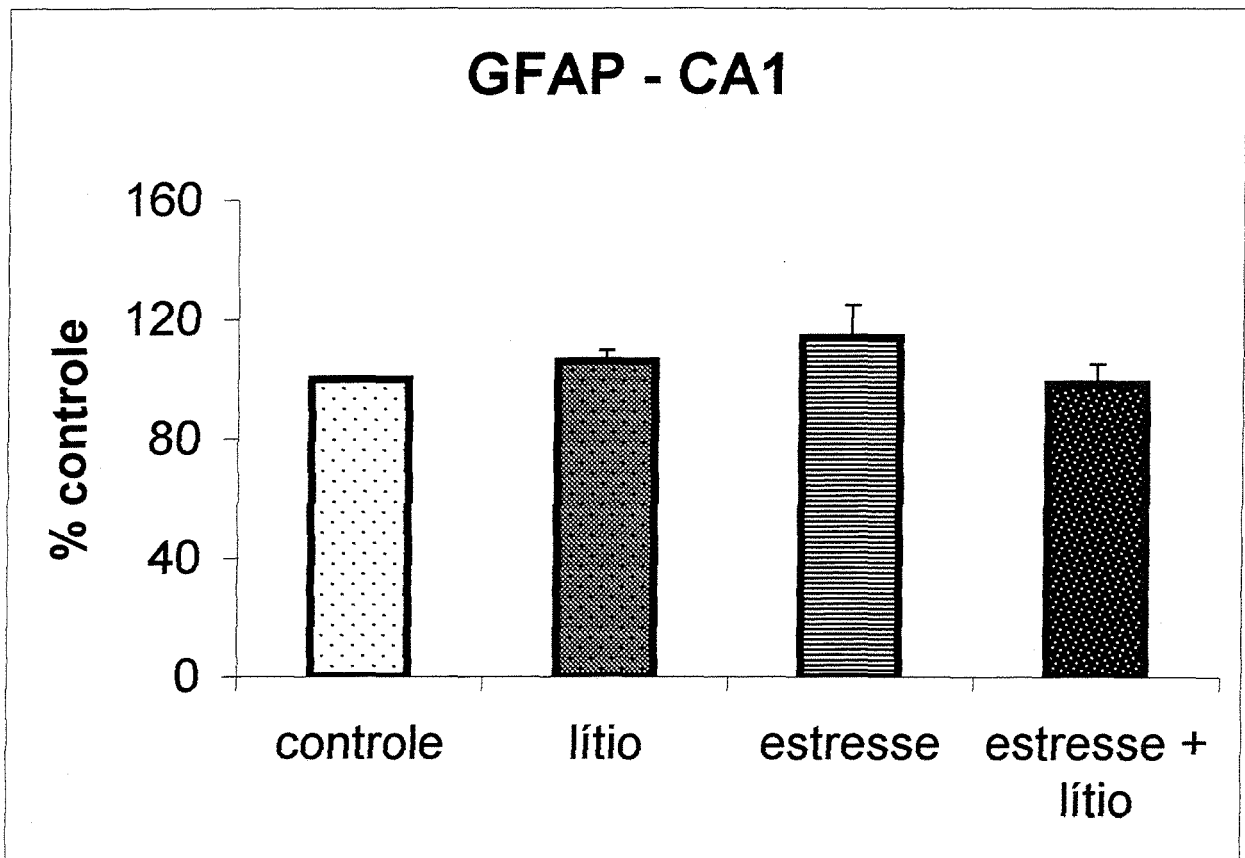


Figura 4.25: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP na região CA1 do hipocampo de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

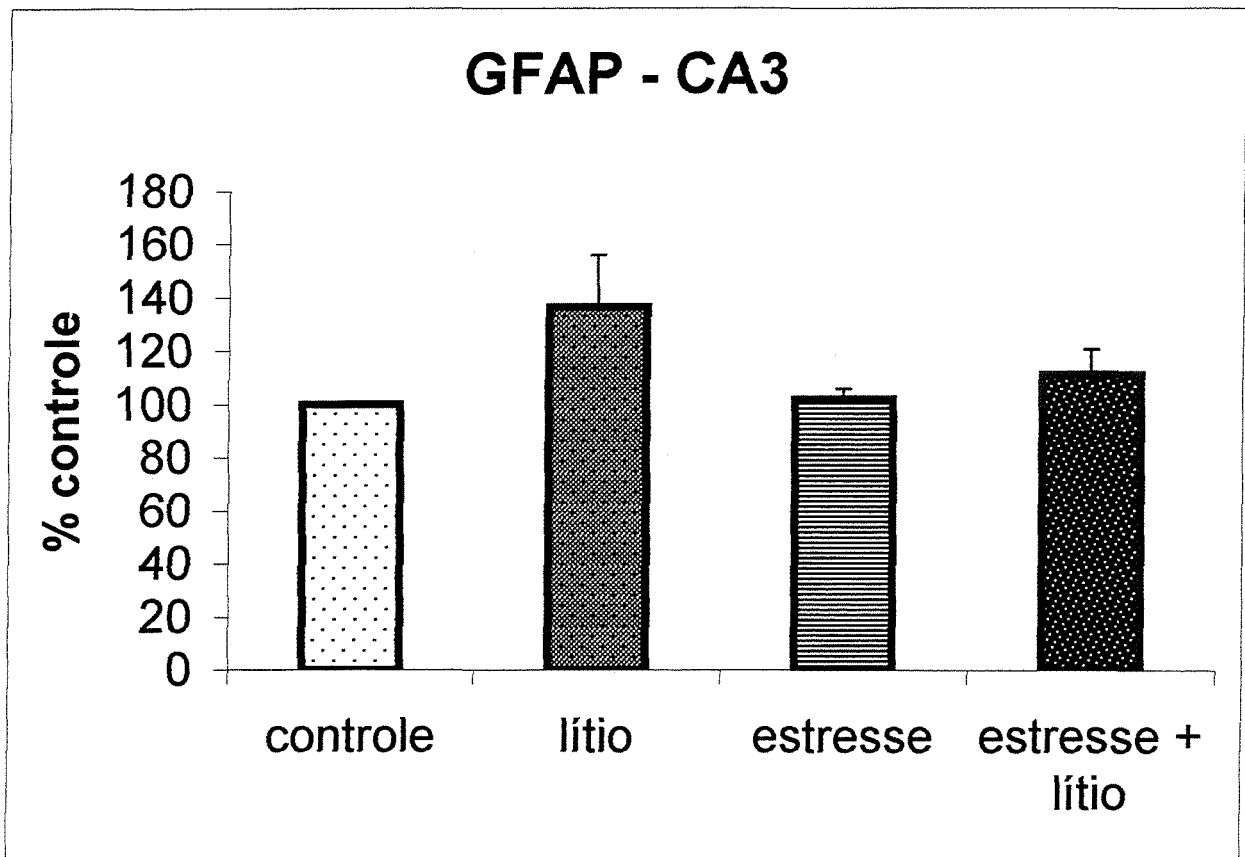


Figura 4.26: Efeito dos tratamentos crônicos com estresse e lítio sobre o imunoconteúdo de GFAP na região CA3 do hipocampo de ratos. Dados expressos como média \pm erro padrão, N = 5 animais por grupo.

Não houve diferença entre os grupos (teste t de Student para amostras dependentes, $P > 0,05$).

DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi o de estabelecer um tratamento crônico de estresse concomitante a um tratamento com lítio, e avaliar os possíveis efeitos protetores do lítio sobre diferentes parâmetros bioquímicos e comportamentais dos ratos cronicamente estressados.

O modelo de estresse crônico variável aqui utilizado já apresentava-se bem estabelecidos por trabalhos prévios, onde foi constatada hipertrofia da glândula adrenal dos animais estressados cronicamente, o que é um indicativo de hiperatividade do eixo LHPA (Gamero, 1998). Também já bem padronizado estava o tratamento crônico com lítio, o que foi reproduzido neste trabalho, pois a adição deste sal à ração proporcionou a obtenção de níveis séricos dentro da faixa terapêutica adequada a humanos (Rocha, 1996).

O aumento no consumo de água observado nos animais tratados com lítio é explicado pela concentração de sal (NaCl) presente na ração, a qual era necessária para evitar as perdas acentuadas desta substância decorrentes da filtração glomerular do lítio, além da compensação do efeito diurético provocado pelo tratamento com lítio (Christensen et al., 1985; Goodman & Gilman, 1996). Estes dois fatores provocaram elevação da diurese dos animais, pelo que suas caixas moradia eram trocadas com maior periodicidade.

A perda de peso inicial observada nos animais tratados com lítio também era esperada, uma vez que durante a habituação à nova ração os animais apresentavam diminuição no consumo de comida. Com o decorrer do tratamento, os animais passaram a ter ganho normal de peso, o que indica

aumento gradativo na ingestão de ração adicionada de cloreto de lítio e de sódio.

TAREFAS COMPORTAMENTAIS:

a) Medida de Latência de Retirada da Cauda

Através da medida de latência para retirada da cauda, ou *tail-flick*, é possível fazer uma avaliação da reatividade do animal frente a um estímulo nocivo, ou seja, uma avaliação de sua nocicepção, ou percepção da dor.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a resposta nociceptiva é profunda e diferenciadamente afetada pelo estresse. Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que enquanto animais submetidos a uma única sessão de estresse por imobilização apresentam aumento nas latências no teste de retirada da cauda (ou seja, apresentam-se analgésicos), animais estressados cronicamente apresentam diminuição neste limiar (o que também é chamado de hiperalgesia) (Gamaro *et al.*, 1998). Os mecanismos pelos quais estas alterações se dão são fonte de constantes estudos. Sabe-se que em situações de estresse há hiperativação do eixo LHPA, o que induz a síntese e a liberação de diversos peptídeos. Um destes peptídeos é o opióide endógeno β -endorfina, que é liberada pela hipófise em resposta ao estresse (Heyden-Hixon

& Nemeroff, 1993), o que dá indícios de que o sistema opióide endógeno pode ser alterado por situações de estresse. Contudo, outras situações também induzem a liberação de β -endorfina, como, por exemplo, exposição a situações de novidade, que estimulam a liberação hipotalâmica deste peptídeo (Izquierdo *et al.*, 1984; Izquierdo & Netto, 1985).

Dados anteriores de nosso laboratório demonstraram que o estresse crônico por imobilização, além de diminuir a latência dos animais no teste de retirada da cauda, induz uma alteração na resposta a situações de novidade, i.e., animais estressados cronicamente não apresentaram a analgesia característica quando expostos a uma situação nova (Torres *et al.*, 2001b).

Neste trabalho, contudo, todos os animais apresentaram-se responsivos à novidade, ou seja, houve um aumento característico nas latências para retirada da cauda após exposição ao ambiente novo independentemente dos grupos, o que pode ser avaliado como um bom funcionamento do sistema endorfínico-hipotalâmico responsivo à novidade. Esta diferença com relação aos dados anteriormente citados pode ser devida aos diferentes modelos de estresse crônico aplicados, visto que a reatividade dos animais em cada modelo é diferenciada. Magariños e McEwen sugeriram em 1995 que o estresse crônico por imobilização produz uma habituação significativa a partir do 21^o dia de tratamento, o que foi também evidenciado por redução na liberação de corticosterona após imobilização em ratos cronicamente estressados (Torres *et al.*, 2001a). Talvez uma menor habituação

nos animais submetidos ao estresse crônico variável também se reflita na atividade β -endorfínica, o que permitiria a resposta adequada à novidade.

Estretanto, os animais tratados cronicamente com lítio apresentaram-se hiperalgésicos quanto submetidos ao teste de retirada da cauda, quando comparados com os animais dos grupos controle, estressado e estressado + lítio. Os efeitos da administração aguda de cloreto de lítio, intraperitonealmente, já estão bem estabelecidos como indutores de hiperalgesia, tanto que este é um modelo de estudo para condicionamento a estímulos aversivos (McNally & Westbrook, 1998). Contudo, poucos estudos foram conduzidos para elucidar os efeitos do tratamento crônico com lítio sobre a dor. Em sua maioria, os trabalhos existentes apontam que o lítio atuaria potencializando os efeitos hipoalgésicos de outras drogas e/ou situações, como é o caso da prolongação da hipoalgesia induzida por choques, demonstrada por Teixeira *et al.* (1995), e também pela potencialização do aumento na latência de escape da placa quente em animais submetidos à administração de morfina (Staunton *et al.*, 1982). Algumas hipóteses são formuladas para entender os mecanismos pelos quais se dá esta ação, como a atuação sobre os níveis de encefalinas (Staunton *et al.*, 1982) e os efeitos sobre os níveis de fosfatidilinositol intracelular (Shimizu *et al.*, 2000). Além disso, estudos demonstraram que a administração de lítio em doses relevantemente terapêuticas induz um leve mas significativo aumento na captação de glutamato, que é um dos mediadores das respostas a estímulos dolorosos (Dixon & Hokin, 1998). Cabe ressaltar que os

dados recém mencionados foram obtidos em animais tratados por um período de três semanas, ou seja, metade do tempo de tratamento aplicado neste trabalho, e em nenhum deles foi utilizada a medida de latência para retirada da cauda. Seria necessário, portanto, fazer um exame curso-temporal da influência do lítio sobre esta resposta, para verificação da existência (ou não) de alteração da nocicepção com o passar do tempo de tratamento.

b) Campo Aberto

Nesta tarefa, conforme citado anteriormente, são avaliados quatro parâmetros: o número de cruzamentos, de respostas de orientação, a latência para deixar o primeiro quadrado e o número de bolos fecais excretados pelo animal durante o teste.

O número de cruzamentos e de respostas de orientação servem tanto como medida de atividade motora quanto medida de memória, neste último caso avaliando-se as diferenças entre as sessões treino e teste. Os resultados obtidos nestes parâmetros indicam que todos os grupos apresentam efeito da sessão, ou seja, na sessão teste houve diminuição no número de cruzamentos e no número de respostas de orientação, provavelmente porque o ambiente do campo aberto não apresentava-se mais como uma novidade para os animais. Estes dados concordam com dados anteriores de nosso laboratório, em que o estresse não produziu alterações no comportamento do animal frente ao campo aberto (Gamero *et al.*, 1999). Contudo, os dados apontados na literatura são

pouco uniformes: Ferreti *et al.* (1995) demonstraram que animais tratados cronicamente por 20 dias apresentam diminuição na atividade locomotora. No entanto, em um modelo de estresse psicossocial em ratos (35 dias de exposição ao predador natural - o gato), Park *et al.* (2001) encontrou um efeito relacionado apenas com a sessão, não havendo diferença entre controles e estressados na primeira exposição, e verificando ausência de habituação do grupo estressado entre as sessões treino e teste, o que representaria mais um efeito sobre a memória do animal do que propriamente sobre sua atividade motora. Em um trabalho comparativo realizado em 2000, D'Áquila *et al.* verificaram que o estresse crônico variável, com duração de 8 semanas, levou a uma diminuição da atividade exploratória, ao passo que o estresse crônico por imobilização não surtiu qualquer efeito sobre este parâmetro. Estes dados indicam que a resposta do animal frente ao campo aberto é bastante dependente do modelo de estresse utilizado, podendo também ser dependente da duração do tratamento.

Os dados relacionados aos efeitos do lítio sobre a atividade locomotora e exploratória também são ambíguos: enquanto alguns autores demonstraram que o tratamento com este sal pode induzir diminuição nestes parâmetros (Cappelliez, 1986; Berggren, 1988; Jahkel *et al.*, 1994; Bowden, 2000), o que parece ser mediado pela diminuição do inositol, uma vez que a administração de mio-inositol é capaz de revertê-lo (Kofman *et al.*, 1991), outros estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com lítio é capaz de reverter a hipocinesia observada após exposição aguda ao estresse (Redrobe & Bourin,

1999). Talvez a ação do tratamento com lítio seja de alguma forma dependente do estado fisiológico do animal, i.e., talvez em condições normais de homeostasia os animais respondam ao tratamento com lítio de uma forma, e de forma diferente quando submetidos a situações de estresse.

Na medida de latência para deixar o primeiro quadrante, houve um aumento marcante, tanto em função do estresse quanto do lítio, com soma destes dois aumentos no grupo estressado tratado com lítio, quando avaliando a sessão de treino. Estes resultados concordam com alguns dos relatos anteriormente expostos, de que tanto o estresse quanto o lítio induziriam um efeito no sentido de reduzir a locomoção do animal, havendo um efeito interativo dos dois tratamentos na sessão teste. O tempo gasto pelo animal na periferia da caixa de campo aberto tem sido utilizado como um parâmetro de ansiedade (Morgan e Pfaff, 2001; Bert et al., 2001), de modo que poderíamos também imaginar que esses grupos tratados apresentassem um maior nível de ansiedade em relação aos grupos controle. Um teste mais amplamente utilizado para avaliar ansiedade, porém, é o teste de labirinto em cruz elevado (*plus maze*), que será discutido logo mais.

Por fim, houve ausência de qualquer efeito sobre o número de bolos fecais excretados pelos animais. Esta medida, tomada por alguns como medida de ansiedade, pode ser avaliada como um tanto subjetiva, visto que o estado alimentar do animal no momento do teste (o que não foi controlado) é fator obviamente determinante neste parâmetro, especialmente considerando que os

grupos apresentavam diferenças nas dietas que lhes eram fornecidas e no consumo de água.

c) Comportamento no labirinto em cruz elevado

Esta tarefa é baseada na preferência natural dos roedores pelos braços fechados do labirinto, postulando-se que os índices exploratórios dos braços abertos estejam inversamente relacionados à ansiedade (File, 1996; Padovan et al., 2000), o que é reforçado pelo fato de que drogas classicamente conhecidas como ansiolíticas (e.g. benzodiazepínicos) aumentem a permanência nestes braços (Silva & Frussa-Filho, 2000). Acredita-se, ainda, que a aversão do animal aos braços abertos provavelmente se deva à então impossibilidade de orientação por suas vibrissas (Dr. Francisco Guimarães, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram um claro efeito ansiolítico do lítio, pois os animais dos grupos tratados com este sal, tanto controles quanto estressados, permaneceram mais tempo nos braços abertos quando comparados com os demais grupos. Além disso, houve também um aumento no número de entradas no braço aberto, o que poderia ser decorrente de um aumento na atividade locomotora. Contudo, acreditamos que esta não seja a causa deste aumento em função dos resultados obtidos no Campo Aberto, já anteriormente citados, que demonstraram atividades locomotoras iguais para todos os grupos. Além disso, o aumento do número de entradas

ocorreu especificamente para os braços abertos, e não para o número de entradas nos braços fechados.

É necessário um estudo mais aprofundado para explicar os mecanismos pelos quais se dá a ação do tratamento crônico com lítio nesta tarefa. O lítio parece capaz de normalizar os níveis do neurotransmissor GABA – o principal neurotransmissor inibitório do SNC – em pacientes bipolares, bem como de elevá-los no estriado e no mesencéfalo, elevando também o seu turnover no hipocampo (Lenox *et al.*, 1998). Sabidamente o sistema gabaérgico está inibido em indivíduos ansiosos, tanto que a grande maioria das drogas ansiolíticas são estimuladoras do sistema GABAérgico, e os receptores GABA responsivos aos benzodiazepínicos estão altamente concentrados no sistema límbico, especialmente na amígdala que, como já citado, é uma estrutura intrinsecamente relacionada às emoções e ao comportamento (Kandel, 1991). É possível, portanto, que parte do efeito ansiolítico do tratamento com lítio seja mediado por este neurotransmissor.

Estão já também bem descritos os efeitos do lítio sobre o sistema serotoninérgico, conforme já citado anteriormente. Muraki *et al.* (1999) demonstraram que drogas que têm a propriedade de diminuir o efeito ansiogênico da exposição a um estímulo aversivo (no caso, choque inescapável), tais como inibidores da recaptção de serotonina e agonistas 5-HT_{1A}, têm seu efeito potencializado pelo tratamento concomitante com lítio, o que confere mais um possível mecanismo para a ação ansiolítica deste sal.

Também já foram mencionados aqui os efeitos do lítio sobre os níveis intracelulares de inositol. Diversos trabalhos têm evidenciado que a administração crônica de inositol é capaz de interferir no comportamento dos animais em situações de nível acentuado de ansiedade. Contudo, estes dados indicam um efeito ansiolítico sobre os animais quando expostos ao labirinto em cruz elevado (Kofman et al., 2000; Einat & Belmaker, 2001). Visto que o lítio provoca diminuição sobre os níveis de inositol, pode-se supor que o seu efeito ansiolítico se dê por mecanismos outros que não a ação sobre o ciclo do fosfatidil-inositol.

O modelo de estresse aqui aplicado não produziu efeito sobre o tempo de permanência nos braços abertos. Contudo, houve uma diminuição no número de entradas nestes mesmos braços, podendo isto ser um indicativo do comportamento de congelamento dos animais quando entravam nos braços abertos, o que também é visto como um efeito do alto nível de ansiedade (Hogg, 1996). Diversos trabalhos têm apontado para os efeitos ansiogênicos da exposição crônica ao estresse, ou a níveis elevados de corticosteróides, no comportamento no labirinto em cruz elevado (Calvo-Torrent *et al.*, 1999; Zurita *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2001; Korte, 2001). Muitos destes estudos têm demonstrado, também, que a exposição a uma experiência aversiva prévia modifica o comportamento do animal quando este confronta-se com uma situação nova, alterando, por exemplo, a sua característica exploratória inclusive nos braços fechados do labirinto (Padovan *et al.*, 2000).

Por fim, o fato dos animais estressados e tratados com lítio apresentarem um número de entradas nos braços abertos semelhante ao dos controles, o que indica uma soma dos resultados obtidos com os dois tratamentos individualmente, sugere a possibilidade de que a ação do estresse e a ação do lítio sobre o nível de ansiedade do animal se dêem por vias semelhantes, porém em sentidos opostos.

d) Esquiva Inibitória

Os resultados obtidos com a esquiva inibitória demonstraram não haver diferença na consolidação da memória entre os grupos, ou seja, todos os animais apresentaram diferenças adequadas nas latências entre as sessões treino e teste. Estes resultados combinam com resultados anteriores de nosso laboratório obtidos com a mesma tarefa, em que animais submetidos a um modelo de estresse crônico por imobilização apresentaram consolidação de memória semelhante à dos controles (Gamaro *et al.*, 1999). Efeitos semelhantes foram encontrados por outros grupos: Cabib e Castellano (1997) demonstraram que animais estressados cronicamente por um modelo de restrição de comida não apresentam diferenças de comportamento em relação aos controles na esquiva inibitória.

Sabidamente, tanto o estresse quanto a administração crônica de glicocorticóides podem influenciar muitos processos cognitivos, em especial aqueles estreitamente relacionados ao hipocampo. Contudo, por envolver uma

situação de conflito, a esquiva inibitória possui um componente emocional muito forte. Conforme já citado, a estrutura cerebral mais fortemente relacionada às emoções é a amígdala, a qual é também conhecida por desempenhar um importante papel nos sistemas neuromodulatórios ativados por experiências de aprendizado (McGaugh *et al.*, 1993). A esquiva inibitória é muitas vezes a tarefa de escolha para análise de aquisição, modulação e evocação da memória, embora sendo considerada por alguns autores como uma tarefa pouco específica (Slangen *et al.*, 1990) por haver a presença de um estímulo aversivo muito forte, o que dificultaria a observação de alterações mais sutis no comportamento do animal.

Por fim, enquanto todos os demais grupos apresentaram latências significativamente diferentes entre as sessões treino e teste (i.e., $P < 0,01$), o grupo tratado com lítio apresentou um $P = 0,08$ para este parâmetro. Embora marginalmente significativo, este resultado poderia indicar uma menor consolidação da memória nestes animais. Contudo, em uma revisão realizada em 1990, Mathews sugeriu que um certo nível de ansiedade possui função cognitiva, uma vez que indivíduos ansiosos apresentam maior nível de vigilância. Conforme observado no Labirinto em Cruz Elevado, os animais tratados com lítio apresentaram-se menos ansiosos que os demais. Pode-se sugerir, portanto, que esta diminuição na diferença entre as latências na esquiva inibitória seja devida a um menor nível de ansiedade e, conseqüentemente, menor conflito do animal frente ao estímulo aversivo.

e) Labirinto Aquático

Os efeitos lesivos do estresse sobre a memória espacial, que têm sido demonstrados por diversos autores (Bodnoff *et al.*, 1995; Conrad *et al.*, 1996; McLay *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1999), também foram observados neste trabalho, o que foi denotado pelo aumento da latência para achar o local exato da plataforma, diminuição no número de cruzamentos sobre este local, e diminuição da razão entre o tempo gasto no quadrante alvo e o tempo gasto no quadrante oposto. Somando-se a estes resultados, foi observada a eficiência da administração crônica de lítio na prevenção dos efeitos do estresse, bem como aumento do número de cruzamentos pelos animais tratados exclusivamente com este sal. Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado uma diminuição da atividade exploratória em animais cronicamente estressados (Garcia-Marquez & Armario, 1987), acreditamos que esta não seja a causa dos resultados aqui encontrados, uma vez que o desempenho dos animais no Campo Aberto foi semelhante em todos os grupos, conforme já citado. Além disso, os animais apresentaram desempenho adequado tanto nas sessões treino para a memória de referência quanto na memória de trabalho.

Na memória de trabalho, o aumento nas latências para achar a plataforma observado nos ratos cronicamente estressados durante as sessões de aquisição da memória (i.e., a primeira sessão do dia) pode se dar em função de uma dificuldade de extinguir a informação adquirida previamente, ou seja, possivelmente haveria interferência da experiência prévia, uma vez que apenas

nesta sessão os animais estressados apresentaram uma maior latência quando comparados com os demais. Todos os grupos apresentaram retenção adequada, uma vez que as latências nas sessões de retenção (i.e., sessões subsequentes à de aquisição), bem como a diferença nas latências entre as duas sessões, foram semelhantes. Estes resultados concordam com uma série de outros trabalhos que demonstram que os processos de memória são diferentemente afetados pelo estresse. Sabidamente, o hipocampo é intimamente relacionado a processos de memória espacial de referência (Jarrard, 1993; Oitzl *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2000). Logo, é esperado que animais estressados apresentem prejuízo neste tipo de memória, o que concorda com trabalhos que apontam este tipo de efeito mediado por estresse crônico ou por administração crônica de glicocorticóides (Sapolsky *et al.*, 1985, 1988; Armanini *et al.*, 1990; Horner *et al.*, 1990). Por sua vez, a memória de trabalho, necessária para manter informações armazenadas por períodos temporários, é mediada pelas funções do córtex pré-frontal medial, não envolvendo o hipocampo (Ohl & Fuchs, 1999).

Uma série de trabalhos tem sugerido que os glicocorticóides podem aumentar a vulnerabilidade de neurônios hipocampais, que desempenham um importante papel tanto na função neuroendócrina quanto em processos cognitivos (Sapolsky *et al.*, 1985, 1988; Sapolsky, 1986; Izquierdo, 1989, 1994; Zola-Morgan *et al.*, 1993). Além disso, sabe-se que o hipocampo desempenha importante papel na consolidação de memória em diferentes tarefas, inclusive as estudadas neste trabalho (Izquierdo, 1992; Fin *et al.*, 1994; Jerusalinsky *et*

al., 1994), e muitas hipóteses já foram aventadas para explicar os efeitos do estresse sobre esta estrutura, muitas delas já citadas na introdução deste trabalho.

Duman et al. (1997) demonstraram que os efeitos do estresse sobre as células piramidais hipocâmpais podem ser prevenidos (ou revertidos) pelo tratamento com fármacos antidepressivos, os quais aumentam a expressão de fatores neurotróficos como o BDNF, que é também afetado pelo estresse. Neste trabalho, os efeitos lesivos do estresse sobre a memória foram marcadamente revertidos pela administração de lítio em doses equivalentes as utilizadas na terapêutica em humanos. Estes dados concordam com os dados anteriormente citados de que o lítio aumenta a viabilidade e funcionalidade das células nervosas *in vitro* e *in vivo*, sugerindo ainda que alguns dos efeitos do lítio a longo prazo sejam mediados por fatores neurotróficos (e.g. BDNF) e neuroprotetores (e.g. bcl2).

Somando-se a isto, estudos recentes demonstraram que o tratamento com lítio é capaz de aumentar a neurogênese em cérebros de ratos adultos (Chen *et al.*, 2000). Alguns autores acreditam que a neurogênese hipocâmpal, e a sobrevivência destas novas células, estejam envolvidas nos processos de aprendizado (Gould et al., 1999; Ambrogini et al., 2000). Curiosamente, o estresse diminui a gênese de novos neurônios nesta mesma estrutura (Gould & Tanapat, 1999), sugerindo que o lítio possa exercer alguns de seus efeitos benéficos via regulação da neurogênese hipocâmpal.

IMUNODETECCÃO:

a) Imunoreatividade ao Anticorpo Anti- β -tubulina III

A beta tubulina III é uma das tubulinas mais especializadas, especificamente usada para marcar neurônios. Estas proteínas formam a estrutura do corpo celular de neurônios, bem como dos dendritos, e o aumento de sua expressão está relacionado com o desenvolvimento e a regeneração celular, também podendo significar sobrevivência neuronal (Kimonides *et al.*, 1999), uma vez que seu imunoconteúdo encontra-se diminuído após alguns processos de lesão (Mink & Johnston 2000). Devido a especificidade destas proteínas como marcadoras neuronais, a imunoquantidade das mesmas poderá refletir plasticidade neural.

Os dados obtidos com a imunodeteccção desta proteína não demonstraram diferenças entre os grupos nas regiões do hipocampo e na amígdala. Ao analisarmos o córtex, observamos uma diferença restrita ao hemisfério direito, em que todos os grupos apresentaram valores diminuídos quando comparados aos controles.

Estudos de contagem de células realizados anteriormente, com animais submetidos ao mesmo tratamento com Li⁺, mas por um período de 30 dias, demonstraram não haver diferenças no número de neurônios em córtex e hipocampo, quando avaliado pelas técnicas de Nissl e Hematoxilina-Eosina

(Gehlen, 2002). Estes resultados concordam com os encontrados neste trabalho, uma vez que níveis inalterados de beta-tubulina poderiam ser interpretados como resultantes de também inalteradas densidades neuronais. Cabe salientar, contudo, que o estudo neuroquímico das diferentes áreas foi realizado depois de 70 dias do início do tratamento com Li+, devido ao período em que foram desenvolvidas as tarefas comportamentais. Para equiparar estes resultados, devemos analisar os mesmos grupos de animais após 30 e 70 dias de tratamento com Li+, utilizando-se as técnicas necessárias para a contagem de células.

A diminuição do imunoconteúdo de beta tubulina III encontrada no córtex cerebral poderia significar uma diminuição da arborização dendrítica, e a diferença entre morte celular e hipotrofia de neurônios pode ser realizada por técnicas de imunocitoquímica, utilizando o mesmo anti-corpo. Contudo, deve-se considerar com cuidado qualquer interpretação do efeito do estresse e tratamento crônico com lítio nesta estrutura, pois, como demonstramos, as respostas dos dois hemisférios foram diferentes. Outros estudos já demonstraram que o córtex cerebral do hemisfério direito é bem mais envolvido na resposta ao estresse do que a mesma porção do hemisfério esquerdo, uma vez que lesões bilaterais, ou apenas no córtex direito, induzem uma resposta atenuada a agentes estressores (Diamond, 1991; Sullivan & Gratton, 1999). Contudo, existem poucos dados na literatura que evidenciem um efeito lateralizado mediado por lítio. Thau *et al.* (1989) demonstraram que o perfil eletroencefalográfico de pacientes tratados com lítio difere entre os hemisférios,

o que não necessariamente significaria dano celular. Estudos mais aprofundados seriam necessários para confirmar esta lateralização na encontrada nos níveis de beta-tubulina cortical.

Por fim, deve-se salientar que a ausência de mudanças no conteúdo de beta-tubulina III nas demais estruturas analisadas não exclui a possibilidade de alterações neuronais mais especificamente relacionadas com as sinapses envolvidas nas respostas aos tratamentos com estresse e lítio.

b) Imunorreatividade ao Anticorpo Anti-GFAP

A GFAP é uma proteína marcadora de astrócitos maduros e também da reatividade astrocitária. No entanto, apesar de sua hiperexpressão em resposta a diferentes insultos, o preciso papel da GFAP é desconhecido, e sugere-se que ela pode ser necessária para a formação de processos gliais estáveis em resposta a estímulos neuronais (Eddleston & Mucke, 1993). Além disso, sabe-se que os astrócitos desempenham um importante papel na “reorganização e plasticidade” morfológica no encéfalo de ratos adultos, através de uma gliose reativa que ocorre em resposta aos mais diversos insultos, como lesões mecânicas, químicas, e alguns modelos de isquemia, assim como processos fisiológicos, tais como a lactação e a exploração de ambientes ricos (Calvo *et al.*, 1991; Norenberg, 1994; Louw *et al.*, 1998).

Injúrias dos mais diferentes tipos, causadas por diversos agentes e

doenças do SNC, produzem variadas respostas astrogliais, provocando glioses com variadas características que dependem do agente indutor e da região do SNC afetada. Estas respostas em geral são benéficas e estão relacionadas com as funções desempenhadas pelos astrócitos e sua íntima relação com os neurônios. As propriedades da neurotransmissão e a excitabilidade neuronal dependem da colaboração entre os neurônios e as células gliais, em particular os astrócitos. Estas células apresentam um papel importante na regulação da concentração iônica do microambiente celular, regulando principalmente a homeostase do K^+ (Wenzel *et al.*, 1991; Nixdorf-Bergweiler *et al.*, 1994), tão necessária para a manutenção da excitabilidade neuronal adequada às funções destas células. Os astrócitos removem neurotransmissores como GABA e glutamato para metabolizá-los e devolver os precursores para os neurônios (Sutherland *et al.*, 1991), e através de seus sistemas enzimáticos podem inativar uma série de outros neurotransmissores, como acetilcolina, adenosina, ATP, aspartato, dopamina, glicina, histamina, noradrenalina e serotonina (Eddleston & Mucke, 1993; Vernadakis, 1996; Anderson & Swanson, 2000). Somando-se a isto, as células astrogliais expressam um grande número de fatores neurotróficos e fatores que promovem o crescimento neurítico, como fatores peptídicos de crescimento, neurotransmissores, moléculas de adesão celular, proteínas de matriz extracelular (Müller *et al.*, 1995; Ridet *et al.*, 1997; Rutka *et al.*, 1997).

Além de todas estas funções, os astrócitos estão diretamente envolvidos com o metabolismo energético cerebral, captando glicose dos

capilares, transformando-a em glicogênio, e produzindo lactato, que será captado e utilizado pelos neurônios (Tsacopoulos & Magistretti, 1996), sendo que muitos dos metabólitos intermediários do glutamato recaptado pelos astrócitos (tais como lactato, alanina e glutamina) podem também ser utilizado como substrato energético pelos neurônios (Magistretti, 1999).

É importante salientar que nem sempre a gliose reativa é benéfica, uma vez que astrócitos reativos podem secretar moléculas que são inibitórias do crescimento neurítico. O inchamento glial está associado a um aumento excessivo na liberação de glutamato, o que pode ser tóxico aos neurônios (Stoll *et al.*, 1998). Um exemplo disto é o que ocorre na encefalopatia hepática, na qual o alvo primário da doença são os astrócitos e os distúrbios clínicos estão relacionados com a disfunção dos mesmos (Magistretti, 1999).

Trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstraram que o tratamento crônico com lítio induz um aumento na GFAP imunodetectável, bem como na astrogliose reativa, em hipocampo de ratos (Rocha & Rodnight, 1994; Rocha *et al.*, 1998). Os mecanismos para esta ação não são bem conhecidos, uma vez que o lítio atua de maneira complexa sobre os mecanismos de transdução de sinal, e é possível que mais de um esteja envolvido nesta reatividade astrogliar. Uma das hipóteses que tínhamos ao iniciar o trabalho era a de que o lítio poderia atuar induzindo uma gliose benéfica nos cérebros dos animais estressados, o que aumentaria a superfície de contato entre as células gliais e os neurônios, minimizando, assim, os postulados efeitos neurotóxicos do excesso de glutamato presente em situações de estresse.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram diferentes tendências a aumento na GFAP imunodetectável em três estruturas cerebrais: no córtex, este aumento foi induzido unicamente pelo tratamento com lítio. No giro denteado, por sua vez, houve uma tendência a aumento em função do estresse. Já na amígdala, tanto o estresse quanto o lítio influenciaram a expressão desta proteína.

Alguns trabalhos da literatura indicam um aumento na GFAP imunodetectável após situações de estresse. Lambert *et al.* (2000) demonstraram diferentes tipos de reatividade a diferentes modelos de estresse: enquanto os animais estressados por restrição de comida não apresentaram alterações nas células imunorreativas a GFAP, os estressados também por atividade física forçada (concomitantemente à restrição de comida) demonstraram um aumento de 30% destas células na região CA3 do hipocampo. Outros trabalhos demonstraram que os hormônios corticóides podem alterar positivamente a expressão desta proteína (De Nicola *et al.*, 1998), sugerindo que a reatividade glial frente a níveis alterados de glicocorticóides represente uma mecanismo de proteção do sistema nervoso.

Os resultados obtidos na tarefa do labirinto aquático demonstraram um prejuízo cognitivo dos animais cronicamente estressados, o qual foi revertido pelo tratamento com lítio, conforme já citado. Aparentemente, contudo, estes resultados não foram mediados pelos efeitos indutores de astrogliose do lítio, uma vez que as estruturas cerebrais classicamente envolvidas com o aprendizado (i.e., as regiões do hipocampo) não apresentaram diferenças no

imunoconteúdo de GFAP. Pode-se supor, com isto, que o efeito protetor do lítio se dê por outros mecanismos, como, por exemplo, ação sobre fatores neurotróficos, sistemas neurotransmissores e estímulo à neurogênese.

Cabe ainda salientar que todos os animais, inclusive os controles, foram submetidos a tarefas de aprendizado. Diversos estudos têm demonstrado que o aprendizado influencia a plasticidade neuronal, podendo inclusive estimular a neurogênese (Gould *et al.*, 1999, 2000). É possível que a ausência de diferenças mais expressivas no imunoconteúdo da GFAP se deva, portanto, a uma plasticidade neural desencadeada pelas tarefas de aprendizado, especialmente nas regiões do hipocampo (as mais diretamente envolvidas nos processos cognitivos) em todos os grupos testados.

CONCLUSÕES

1 – O tratamento crônico com lítio adicionado à ração foi eficiente para produzir nos animais níveis séricos dentro da faixa terapêutica utilizada em humanos.

2 – Os animais tratados com lítio apresentaram ganho de peso e consumo hídrico dentro do esperado, de acordo com trabalhos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo de tratamento.

3 – Na Medida da Latência para Retirada da Cauda, todos os grupos demonstraram-se responsivos à novidade, ou seja, apresentaram analgesia induzida por uma situação nova. Além disso, houve uma interação estresse-lítio, com os animais tratados cronicamente com lítio apresentando-se hiperalgésicos em relação aos demais.

4 – Na exposição ao Campo Aberto, ambos os tratamentos alteraram a latência para deixar o primeiro quadrante. Contudo, a atividade exploratória e locomotora, bem como o número de bolos fecais excretados, não foram alterados por nenhum dos tratamentos. Houve, outrossim, efeito da sessão, com todos os animais demonstrando habituação entre as sessões treino e teste.

5 – Na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado, houve um claro efeito ansiolítico do tratamento com lítio, o qual foi evidenciado pelo aumento no

tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos. Por sua vez, o estresse provocou um certo efeito ansiogênico, com diminuição no número de entradas nos braços abertos, sem, contudo, alterar o tempo de permanência nestes mesmos braços, o que pode ser um indicativo de “congelamento” do animal.

6 – Na tarefa da Esquiva Inibitória, não houve diferença significativa entre os grupos. Contudo, os animais tratados apenas com lítio mostraram uma diferença não significativa entre as latências das duas sessões, o que pode significar prejuízo cognitivo ou, também, diminuição do nível de ansiedade dos animais.

7 – Os resultados das medidas de memória espacial de referência, medidos no Labirinto Aquático de Morris, demonstraram um prejuízo provocado pelo estresse na sessão teste, o que foi evidenciado pelo aumento na latência para encontrar o local exato da plataforma, diminuição do número de cruzamentos e diminuição da razão “tempo no quadrante alvo/tempo no quadrante oposto”. O tratamento crônico com lítio foi eficiente na reversão de todos estes prejuízos, chegando a sozinho melhorar o desempenho dos animais em alguns parâmetros.

8 – Na memória de trabalho, medida também em um Labirinto Aquático, todos os animais apresentaram desempenho satisfatório, à exceção dos

animais estressados, que apresentaram aumento no tempo de latência no primeiro *trial* de cada sessão.

9 – Os níveis de beta-tubulina apresentaram-se inalterados na maioria das estruturas cerebrais analisadas, estando diferentes apenas no hemisfério direito do córtex cerebral. Isto indica que talvez esta medida não apresente sensibilidade suficiente para detectar em nível celular as alterações observadas no comportamento.

10 – Não houve diferença significativa nos níveis de GFAP imunodetectável em nenhuma das estruturas, apresentando-se uma tendência a aumento no imunoconteúdo desta proteína na amígdala de animais submetidos a ambos os tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, N.; NAMBA, C.; NAGARO, T.; ARAI, T. Dexamethasone reduces energy utilization in ischemic gerbil brain. **European Journal of Pharmacology**, 427: 119-123, 2001.
- AKIL, H. A. & MORANO, M.I.. Stress. IN: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (eds) **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**, pp. 773-785, 1995
- ALLEVA, E.; ALOE, L.; BIGI, S. An update role for nerve growth factor in neurobehavioral regulation of adult vertebrates. **Review in Neuroscience**, 4(1): 41-62, 1993.
- ALTAR, C.A. Neurotrophins and depression. **Trends in Pharmacological Science** 20: 59-61, 1999.
- AMBROGINI, P.; CUPPINI, R.; CUPPINI, C.; CIARONI, C.; CECCHINI, T.; FERRI, P.; SARTINI, S.; DEL GRANDE, P. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. **Neuroscience Letters**, 286: 21-24, 2000.
- ANDERSON, C.M.; SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, 32(1): 1-14, 2000.
- ARMANINI, M.P.; HUTCHINS, C.; STEIN, B.A.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. **Brain Research**, 532: 7-12, 1990.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neuroscience – exploring the brain**. Cap. 12 e 16, Williams & Wilkins (eds), 1996.
- BERGGREN, U. The effect of chronic lithium administration and withdrawal on locomotor activity and apomorphine-induced locomotor stimulation in rats. **Journal of Neural Transmission**, 71: 65-72, 1988.
- BERRIDGE, M.J.; DOWNES C.P.; HANLEY, M.R. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. **Cell**, 59: 411-419, 1989.
- BERT, A.; FINK, H.; SOHR, R.; REX, A. Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 70: 411-420, 2001.
- BHATNAGAR, M.; CINTRA, A.; CHADI, G.; LINDBERG, J.; OITZL, M.; DE KLOET, E.R.; MÖLLER, A.; AGNATI, L.F.; FUXE, K. Neurochemical changes in the hippocampus of the brown norway rat during aging. **Neurobiology of Aging**, 18: 319-327, 1997.

- BIEBL, M.; COOPER, C.M.; WINKLER, J.; KUHN, H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self renewing capacity in the adult rat brain. **Neuroscience Letters**, 291: 17-20, 2000.
- BODNOFF, S.R.; HUMPHREYS, A.G.; LEHMAN, J.C.; DIAMOND, D.M.; ROSE, G.M.; MEANEY, M.J. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. **The Journal of Neuroscience**, 15 :61-69, 1995.
- BOWDEN, C.L. Efficacy of lithium in mania and maintenance therapy of bipolar disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, 61: 35-40, 2000.
- CABIB, S.; CASTELLANO, C. Impairments produced by amphetamine and stress on memory storage are reduced following a chronic stressful experience. **Psychopharmacology**, 129: 161-167, 1997.
- CALVO, J.L.; CARBONELL, A.L.; BOYA, J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. **Brain Research**, 566: 333-336, 1991.
- CALVO-TORRENT, A.; BRAIN, P.F.; MARTINEZ, M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. **Physiology & Behavior**, 67: 189-196, 1999.
- CAMPEAU, S.; DAY, H.E.W.; HELMREICH, D.L.; KOLLACK-WALKER, S.; WATSON, S.J. Principles of Psychoneuroendocrinology. **Psychoneuroendocrinology**, 21: 259-276, 1998.
- CAPPELIEZ, P. Comparing oral lithium carbonate and intraperitoneal lithium chloride chronic administrations on rats' activity levels. **Neuropsychopharmacology**, 16: 103-108, 1986.
- CHEN, B.; DOWLATSHAHI, D.; MacQUEEN, G.M.; WANG, J-F, YOUNG, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biological Psychiatry**, 50: 260-265, 2001.
- CHEN, G.; RAJKOWSKA, G.; DU, F.; SERAJI-BOZORGZAD, N.; MANJI, H.K. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *Journal of Neurochemistry*, 75: 1729-1734, 2000.
- CHEN, G.; ZENG, W.Z.; YUAN, P.X.; HUANG, L.D.; JIANG, Y.M.; ZHAO, Z.H.; MANJI, H.K. The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. **The Journal of Neurochemistry**, 72: 879-882, 1999.

- CHEN, R.W.; CHUANG, D.M. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression – A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 6039-6042, 1999.
- CHIPKIN, S.R.; VAN BUEREN, A.; BERCEL, E.; GARRISON, C.R.; McCALL, A.L. Effects of dexamethasone in vivo and in vitro on hexose transport in brain microvasculature. **Neurochemical Research**, 23: 645-652, 1998.
- CHRISTENSEN, S.; KUSANO, E.; YUSIFI, A.N.K.; MURAYAMA, N.; DOUSA, T.P. Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus due to chronic administration of lithium in rats. **Journal of Clinical Investigation**, 75: 1869-1879, 1985.
- CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. Stress: basic mechanisms and clinical implications - Introduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 771: xv-xviii, 1995.
- CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO, C. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, 315: 33-36, 2001.
- CONRAD, C.D.; GALEA, L.A.; KURODA, Y.; McEWEN, B.S. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. **Behavioral Neuroscience**, 110: 1321-1334, 1996.
- COTTER, D.R.; PARIANTE, C.M.; EVERALL, I.P. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. **Brain Research Bulletin**, 55: 585-595, 2001.
- D'AQUILA, P.S.; PEANA, A.T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Exploratory behavior and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. **European Journal of Pharmacology**, 399: 43-47, 2000.
- DE NICOLA, A.F.; FERRINI, M.; GONZALEZ, S.L.; DENISELLE, M.C.; GRILLO, C.A.; PIROLI, G.; SARAIVA, F.; KLOET, E.R. Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal cord. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 65: 253-272, 1998.

- DE VRIES, A.C.; JOH, H.D.; BERNARD, O.; HATTORI, K.; HURN, P.D.; TRAYSTMAN, R.J.; ALKAYED, N.J. Social stress exacerbates stroke outcome by suppressing *Bcl-2* expression. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 98: 11824-11828, 2001.
- DELBENDE, C.; DELAURE, H.; LEFEBVRE, D.; BUNEL, D.T.; SZAFARCZYK, A.; MOCÄER, E.; KAMOUN, A.; JEGOU, S.; VAUDRY, H. Glucocorticoids, transmitters and stress. **British Journal of Psychiatry**, 160: 24-34, 1992.
- DIXON, J.F.; HOKIN, L.E. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. **Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.**, 95: 8363-8368, 1998.
- DIAMOND, M.C. Hormonal effects on the development of cerebral lateralization. **Psychoneuroendocrinology**, 16: 121-129, 1991.
- DUMAN, R.S.; HENINGER, G.R.; NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives in General Psychiatry**, 54: 597-606, 1997.
- DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; D'SA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biological Psychiatry**, 48: 732-739, 2000.
- DUMAN, R.S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biological Psychiatry**, 46: 1181-1191, 1999.
- ECHANDIA, E.L.R.; GONZALVES, A.S.; CABRERA, R.; FRACCHIA, L.N. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. **Physiology & Behavior**, 43: 789-795, 1988.
- EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, 54: 15-36, 1993.
- EINAT, H.; BELMAKER, R.H. The effects of inositol treatment in animal models of psychiatric disorders. **Journal of Affective Disorders**, 62: 113-121, 2001.
- ELLIOTT, E.; SAPOLSKY, R. Corticosterone impairs hippocampal neuronal calcium regulation: Possible mediating mechanisms. **Brain Research**, 602: 84-90, 1993.

- FERRETTI, C.; BLENGIO, M.; GAMALERO, S.R.; 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**, 280: 19-26, 1995.
- FILE, S. Recent developments in anxiety, stress and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54: 3-12, 1996.
- FIN, C.; SCHMITZ, P.K.; DA SILVA, R.C.; BERNABEU, R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Intrahippocampal, but not intra-amygdala, infusion of an inhibitor of heme oxygenase causes retrograde amnesia in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 271: 227-229, 1994.
- FLÜGGE, G. Dynamics of central 5HT_{1A}-receptor under psychosocial stress. **Journal of Neuroscience**, 15: 7132-7140, 1995.
- FOREMAN, P.J.; TAGLIALATELA, G.; ANGELUCCI, L.; TURNER, C.P.; PEREZ-POLO, J.R. Nerve growth factor and p75^NGF^R factor receptor mRNA change in rodent CNS following stress activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Journal of Neuroscience Research**, 36: 10-18, 1993.
- FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 295-300, 1998.
- FUCHS, E.; FLUGGE, G.; OHL, F.; LUCASSEN, P.; VOLLMANN-HONSDORF, G.K.; MICHAELIS, T. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. **Physiology and Behavior**, 73: 285-291, 2001.
- FUKUMOTO, T.; MORINOBU, S.; OKAMOTO, Y.; KAGAYA, A.; YAMAWAKI, S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. **Psychopharmacology**, 158: 100-106, 2001.
- GAMARO, G.D. Estresse crônico variável: estudo de parâmetros bioquímicos e comportamentais. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, 1998.
- GAMARO, G.D.; MICHALOWSKY, M.B.; CATELLI, D.H.; XAVIER, M.H.; DALMAZ, C. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32: 341-347, 1999.

- GAMARO, G.D.; XAVIER, M.H.; DENARDIN, J.D.; PILGER, J.A.; ELY, D.R.; FERREIRA, M.B.; DALMAZ, C. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. **Physiology & Behavior**, 63z: 693-697, 1998b.
- GARCIA, R. Stress, hippocampal plasticity, and spatial learning. **Synapse**, 40: 180-183, 2001.
- GARCIA-MARQUEZ, C.; ARMARIO, A. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. **Physiology & Behavior**, 40:33-38, 1987.
- GEHLEN, G. Efeitos do lítio sobre a gliose reativa induzida por isquemia global transitória no hipocampo de ratos adultos. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, 2002.
- GIAUME, M.; GRANGE, E.; BAUBET, V.; GAY, N.; SERMET, E.; SARDA, N.; BOBILLIER, P. Cerebral protein synthesis alterations in response to acute and chronic immobilization stress in the rat. **Brain Research**, 675: 121-126, 1995.
- GOLDBERG, J.L.; BARRES, B.A. The relationship between neuronal survival and regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, 23: 579-612, 2000.
- GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. International Edition, 1996.
- GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry** 46: 1472-1479, 1999.
- GOULD, E.; TANAPAT, P.; HASTINGS, N.; SHORS, T.J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends in Cognitive Sciences**, 3: 186-192, 1999.
- GOULD, E.; TANAPAT, P.; RYDEL, T.; HASTINGS, N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. **Biological Psychiatry** 48: 715-720, 2000.
- HALBE, H.W.; CELESTINO, C.A.; HALBE, A.F.P.; BAGNOLI, V.R. Esteróides sexuais, estresse e hipocampo. **Sinopse de Ginecologia e Obstetrícia**, 4: 98-100, 1996.

- HASTINGS, N.; GOULD, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. **Journal of Comparative Neurology**, 433: 146-154, 1999.
- HASTINGS, N.B.; TANAPAT, P.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult mammalian brain. **Clinical Neuroscience Research**, 1: 175-182, 2001.
- 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**, 85: 189-196, 2001.
- HAYDEN-HIXON, D.M.; NEMEROFF, C.B. Role(s) of neuropeptides in responding and adaptation to stress: a focus on corticotrofin-releasing factor and opioid peptides. *IN*: Stanford, S.C.; Salmon, P. (ed.). **Stress: From synapse to syndrome**. London: Academic Press. p. 356-391, 1993.
- HERBERT, J. Neurosteroids, brain damage, and mental illness. **Experimental Gerontology**, 33: 713,727, 1998.
- HERMAN, J.P.; PREWITT, C.M.F.; CULLINAN W.E. Neuronal circuit regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress axis. **Critical Review in Neurobiology**, 10: 371-394, 1996.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54: 21-30, 1996.
- HORNER, H.C.; PACKAN, D.R.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. **Neuroendocrinology**, 52: 57-64, 1990.
- IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology**, 51: 171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I. The neurobiology of memory consolidation. **Neuroscience**, 18: 1-11, 1992.
- IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB Journal**, 8: 1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.; CARRASCO, M.A.; VOLKMER, N.; NETTO, C.A. 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**, 9: 381-389, 1984.
- IZQUIERDO, I.; NETTO, C.A. The role of β -endorphin on memory regulation. **Annals of New York Academy of Science**, 444: 162-167, 1985.
- JAHKEL, M.; OEHLER, J.; SCHUMACHER, H.E. Influence of nootropic and antidepressive drugs on open field and running wheel behavior in spontaneously high and low active mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49: 263-269, 1994.
- JARRARD, L.E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behavioral and Neural Biology** 60: 9-26, 1993.
- JERUSALINSKY, D.; FIN, C.; QUILLFELDT, J.A.; FERREIRA, M.B.C.; SCHMITZ, P.K.; DA SILVA, R.C.; WALZ, R.; BAZAN, N.G.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Effect of antagonists of platelet-activating factor receptors on memory of inhibitory avoidance in rats. **Behavioral and Neural Biology**, 62: 1-3, 1994.
- JESSOP, D.S. Stimulatory and inhibitory regulators of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology and Metabolism**, 13: 491-501, 1999.
- JOELS, M.; DE KLOET, E.R. Effect of corticosteroid hormones on electrical activity in rat hippocampus. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 40: 83-86, 1991.
- JOPE, R.S. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. **Molecular Psychiatry**, 4: 117-128, 1999.
- JORDAN, S.; KRAMER, G.L.; ZUCAS, P.E.; PETTY, F. Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swim stress. **Neurochemical Research**, 19: 1521-1525, 1994.
- KALIN, N.H.; TAKAHASHI, L.K.; CHEN, F.L. Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. **Brain Research**, 656: 182-186, 1994.
- KANDEL, E.R. Disorders of mood: depression, mania, and anxiety disorders. IN: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (eds): **Principles of Neural Science**, pp. 869-886, 1991.

- KIMONIDES, V.G.; SPILLANTINI, M.G.; SOFRNIEW, M.V.; FAWCETT, J.W.; HERBERT, J. Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. **Neuroscience**, 89: 429-436, 1999.
- KOFMAN, O.; BELMAKER, R.H.; GRISARU, N.; ALPERT, C.; FUCHS, I.; KATZ, V.; RIGLER, O. Myo-inositol attenuates two specific behavioral effects of acute lithium in rats. **Psychopharmacology Bulletin**, 27: 185-190, 1991.
- KOFMAN, O.; EINAT, H.; COHEN, H.; TENNE, H.; SHOSHANA, C. The anxiolytic effect of chronic inositol depends on the baseline level of anxiety. **Journal of Neural Transmission**, 107: 241-253, 2000.
- KONARSKA, M.; STEWART, R.E.; McCARTY, R. Predictable of chronic intermittent stress: effects on sympathetic adrenal medullary responses of laboratory rats. **Behavioral and Neural Biology**, 53: 231-243, 1990.
- KOPIN, I.J. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. **Annals of New York Academy of Sciences**, 771: 19-30, 1995.
- KORTE, S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 25: 117-142, 2001.
- LAKSHMANAN, J. Nerve growth factor levels in mouse serum: variations due to stress. **Neurochemical Research**, 12: 393-397, 1987.
- LAMBERT, K.G.; GERECKE, K.M.; QUADROS, P.S.; DOUDERA, E.; JASNOW, A.M.; KINSLEY, C.H. Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. **Stress**, 3: 275-284, 2000.
- LENOX, R.H.; McNAMARA, R.K.; PAPKE, R.L.; MANJI, H.K. Neurobiology of lithium: an update. **Journal of Clinical Psychiatry**, 59: 37-47, 1998.
- LEONARD, B.E.; SONG, C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. **Pharmacology, Biochemical and Behavior**, 54: 299-303, 1996.
- LÓPEZ, J.F.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Neural circuits mediating stress. **Biological Psychiatry**, 46: 1461-1471, 1999.
- LOUW, D.F.; MASADA, T.; SUTHERLAND, G.R. Ischemic neuronal injury is ameliorated by astrocyte activation. **Canadian Journal of Neurological Science**, 25:102-107, 1998.

- LOVESTONE, S.; DAVIS, D.R.; WEBSTER, M.T.; KAECH, S.; BRION, J.P.; MATUS, A.; ANDERTON, B.H. Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. **Biological Psychiatry**, 45: 995-1003, 1999.
- LU, R.; SONG, L.; JOPE, R.S. Lithium attenuates p53 levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroreport**, 10: 1123-1125, 1999.
- LUINE, V.N.; SPENCER, R.L.; MCEWEN, B.S. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. **Brain Research**, 616: 65-70, 1993.
- LUPIEN, S.J. & MEANEY, M.J. Stress, glucocorticoids, and hippocampal aging in rat and human. IN: WANG, E. & SNYDER, D.S. (eds). **Handbook of the Aging Brain**. Academic Press Ltd., 1998. Chap. 1, pp. 1-19.
- MADSEN, T.M.; TRESCHOW, A.; BENGZON, J.; BOLWIG, T.G.; LINDVALL, O.; TINGSTRÖM, A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. **Biological Psychiatry**, 47: 1043-1049, 2000.
- MAGARIÑOS, A.M.; FERRINI, M.; DE NICOLA, A. Corticosteroid receptors and glucocorticoid content in microdissected brain regions: correlative aspects. **Neuroendocrinology**, 50: 673-678, 1989.
- MAGARIÑOS, A. M.; VERDUGO J.M.G.; McEWEN B.S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proceedings of the National Academic of Sciences, USA**, 94: 14002-14008, 1997.
- MAGARIÑOS, A.M.; DESLANDES, A.; McEWEN, B.S. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. **European Journal of Pharmacology**, 371: 113-122, 1999.
- MAGARIÑOS, A.M.; McEWEN, B.S. Stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, 69: 83-88, 1995.
- MAGISTRETTI, P. J. Brain Energy Metabolism. *In*: ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L. R. (eds.) **Fundamental Neuroscience**. San Diego: Academic Press, pp. 389-409, 1999.

- MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, 20: 9104-9110, 2000.
- MANEV, H.; UZ, T.; SMALHEISER, N.R.; MANEV, R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **European Journal of Pharmacology**, 411: 67-70, 2001.
- MANJI, H.K.; POTTER, W.Z.; LENOX, R.H. Signal transduction pathways: molecular targets for lithium's actions. **Archives in General Psychiatry**, 52: 531-543, 1995.
- MANJI, H.K.; MOORE, G.J.; CHEN, G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? **Biological Psychiatry**, 46: 929-940, 1999.
- MANJI, H.K.; LENOX, R.H. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. **Biological Psychiatry**, 48: 518-530, 2000.
- MANJI, H.K.; MOORE, G.J.; CHEN, G. Clinical and preclinical evidence for the neurotrophic effects of mood stabilizers: implications for the pathophysiology and treatment of manic-depressive illness. **Biological Psychiatry**, 48: 740-754, 2000a.
- MANJI, H.K.; MOORE, G.J.; CHEN, G. Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo: a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness. **Journal of Clinical Psychiatry**, 61: 82-96, 2000b.
- MANOLI, L.P.; GAMARO, G.D.; SILVEIRA, P.P.; DALMAZ, C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. **Neurochemical Research**, 25: 915-921, 2000.
- MARTÍ, O.; HARBUZ, M.S.; ANDRÉS, R.; LIGHTMAN, S.L.; ARMARIO, A. Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. **Brain Research**, 821: 1-7, 1999.
- MATHEWS, A. Why worry? The cognitive function os anxiety. **Behavior Research and Therapy**, 28: 455-468, 1990.
- McALLISTER, A.K.; KATZ, L.C.; LO, D.C. Neurotrophin and synaptic plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, 22: 295-318, 1999.
- McEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, 22: 105-122, 1999.

- McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, 886: 172-189, 2000a.
- McEWEN, B.S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, 48: 721-731, 2000b.
- McEWEN, B.S.; SAPOLSKY, R.M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, 5: 205-16, 1995.
- McEWEN, B.S.; CONRAD, C.D.; KURODA, Y.; FRANKFURT, M.; MAGARINOS, A.M.; McKITTRICK, C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. **European Neuropsychopharmacology**, 7: S323-S328, 1997.
- McEWEN, B.S.; MAGARINOS, A.M. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. **Annals of New York Academy of Sciences**, 821: 271-284, 1997.
- McEWEN, B.S.; DE LEON, M.J.; LUPIEN, S.J.; MEANEY, M.J. Corticosteroids, the aging brain and cognition. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 10: 92-96, 1999.
- McGAUGH, J.L.; INTROINI-COLLISON, I.B.; CAHILL, L.F.; CASTELLANO, C.; DALMAZ, C.; PARENT, M.B.; WILLIAMS, C.L. Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala. **Behavioral Brain Research**, 58: 81-90, 1993.
- McINTOSH, L. & SAPOLSKY, R. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental Neurology**, 141: 201-206, 1996
- McINTOSH, L.J.; HONG, K.E.; SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. **Brain Research**, 791: 215-222, 1998.
- McKITTRICK, C.R.; MAGARIÑOS, A.M.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; McEWEN, B.S.; SAKAI, R.R. Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. **Synapse**, 36: 85-94, 2000.
- McLAY, R.N.; FREEMAN, S.M.; ZADINA, J.E. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes Maze. **Physiology & Behavior**, 63: 933-937, 1997.

- McNALLY, G.P.; WESTBROOK, R.F. Test type influences the expression of lithium chloride-induced hyperalgesia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 61: 385-394, 1998.
- MEIJER, O.C.; VAN OOSTEN, R.V.; DE KLOET, E.R. Elevated basal trough levels of corticosterone suppress hippocampal 5-hydroxytryptamine(1A) receptor expression in adrenalectomized rats: implication for the pathogenesis of depression. **Neuroscience**, 80: 419-426, 1997.
- MOORE, G.J.; BEBCHUK, J.M.; HASANAT, K.; CHEN, G.; SERAJI-BOZORGZAD, N.; WILDS, I.B.; FAULK, M.W.; KOCH, S.; GLITZ, D.A.; JOLKOVSKY, L.; MANJI, H. Lithium increases N-acetyl-aspartate in the human brain: in vivo evidence in support of bcl-2's neurotrophic effects? **Biological Psychiatry**, 48: 1-8, 2000a.
- MOORE, G.J.; BEBCHUK, J.M.; WILDS, I.B.; CHEN, G.; MANJI, H.K. Lithium-induced increase in human brain grey matter. **Lancet**, 356(9237): 1241-1242, 2000b.
- MORA, A.; SABIO, G.; GONZÁLEZ-POLO, R.A.; CUENDA, A.; ALESSI, D.R.; ALONSO, J.C.; FUENTES, J.M.; SOLER, G.; CENTENO, F. Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. **Journal of Neurochemistry**, 78: 199-206, 2001.
- MORGAN, M.A.; PFAFF, D.W. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. **Hormonal Behavior**, 40: 472-482, 2001.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, 11: 47-60, 1984.
- MÜLLER, H.W.; JUNGHANS, U.; KAPPLER, J. Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. **Pharmacological Therapy**, 65: 1-18, 1995.
- MUÑOZ-MONTAÑO, J.R.; MORENO, F.J.; AVILA, J.; DÍAZ-NIDO, J. Downregulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) protein expression during neuroblastoma IMR-32 cell differentiation. **Journal of Neuroscience Research**, 55: 278-285, 1999.
- MURAKI, I.; INOUE, T.; HASHIMOTO, S.; IZUMI, T.; ITO, K.; OHMORI, T.; KOYAMA, T. Effect of subchronic lithium carbonate treatment on anxiolytic-like effect of citalopram and MKC-242 in conditioned fear stress in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 383: 223-229, 1999.

- MURUA, V.S.; MOLINA, V.A. Effects of chronic variable stress and antidepressant drugs on behavioral inactivity during an uncontrollable stress: interaction between both treatments. **Behavioral and Neural Biology**, 57: 87-89, 1992.
- NISHI, M.; AZMITIA, E.C. 5HT1A receptor expression is modulated by corticosteroid receptor agonists in primary rat hippocampal culture. **Brain Research**, 722: 190-194, 1996.
- NISHIMURA, J.I.; ENDO, Y.; KIMURA, F. A long term stress exposure impairs maze learning performance in rats. **Neuroscience Letters**, 273: 125-128, 1999.
- NIXDORF-BERGWEILER, B.E.; ALBRECHT, D.; HEINEMENN, U. Developmental changes in the number, size, and orientation of GFAP-positive cells in the CA1 region of rat hippocampus. **Glia**, 12: 180-195, 1994.
- NONAKA, S.; CHUANG, D-M. Neuroprotective effects of chronic lithium on focal ischemia in rats. **Neuro Report**, 9: 2081-2084, 1998.
- NORENBERG, M.D. Astrocyte responses to CNS injury. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 53: 213-220, 1994.
- OHL, F.; FUCHS, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. **Cognitive Brain Research** 7: 379-387, 1999.
- OITZL, M.S.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E.R. Acute blockade of hippocampal glucocorticoid receptors facilitates spatial learning in rats. **Brain Research**, 797: 159-162, 1998.
- ORCHINIK, M.; CARROLL, S.S.; LI, Y.H.; McEWEN, B.S.; WEILAND, N.G. Heterogeneity of Hippocampal GABA-A receptors: regulation by corticosterone. **The Journal of Neuroscience**, 21: 330-339, 2001.
- ORCHINIK, M.; WEILAND, N.G.; McEWEN, B.S. Chronic exposure to stress levels of corticosterone alters GABA-A receptor subunit mRNA levels in rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, 34: 29-37, 1995.
- PADOVAN, C.M.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 67: 325-330, 2000.

- PAPP, M.; WILLNER, P.; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology**, 104: 255-259, 1991.
- PARK, C.R.; CAMPBELL, A.M.; DIAMOND, D.M. Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. **Biological Psychiatry**, 50: 994-1004, 2001.
- PAVLIDES, C.; OGAWA, S.; KIMURA, A.; McEWEN, B.S. Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices. **Brain Research**, 738: 229-235, 1996.
- RAJKOWSKA, G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. **Biological Psychiatry**, 48: 766-777, 2000.
- REAGAN, L.P.; McEWEN, B.S. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 13: 149-167, 1997.
- REDROBE, J.P.; BOURIN, M. The effect of lithium administration in animal models of depression: a short review. **Fundamental Clinical Pharmacology**, 13: 293-299, 1999.
- RIDET, J.L.; MALHOTRA, S.K.; PRIVAT, A.; GAGE, F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **TRENDS in Neurological Science**, 20: 570-577, 1997.
- ROCHA, E.; ACHAVAL, M.; SANTOS, P.; RODNIGHT, R. Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. **Neuro Report**, 9: 3971-3974, 1998.
- ROCHA, E.; RODNIGHT, R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 63: 1582-1584, 1994.
- ROCHA, E.R. 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.

- ROSSI, D.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischemia is mainly by reversed uptake. **Nature**, 403: 316-321, 2000.
- RUTKA, J.T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P.B.; HUBBARD, S.L.; BECKER, L.E.; FUKUYAMA, S.J.; TSUGU, A.; MATSUZAWA, K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. **Journal of Neurosurgery**, 87: 420-430, 1997.
- SAPOLSKY, R.M. Deleterious and salutary effects of steroid hormones in the nervous system – possible mediating cellular mechanisms. IN: MATTSON, M.P.(ed) **Neuroprotective signal transduction**, Totowa, NJ, pp. 259-283, 1998.
- SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. **The Journal of Neuroscience**, 6: 2240-244, 1986.
- SAPOLSKY, R.M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biological Psychiatry**, 48: 755-765, 2000.
- SAPOLSKY, R.M. The stress-response and the emergence of stress-related disease IN: Bradford book (ed), **Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death**, London, pp. 3-9, 1992.
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; McEWEN, B.S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **The Journal of Neuroscience**, 5: 1222-1227, 1985.
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; McEWEN, B.S. The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. **Experimental Gerontology**, 18: 55-64, 1983.
- SAPOLSKY, R.M.; PACKAN, D.R.; VALE, W.W. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. **Brain Research**, 453: 367-371, 1988.
- SCHARFF, C. Chasing fate and function of new neurons in adult brains. **Current Opinion in Neurobiology**, 10: 774-783, 2000.
- SCHOU, M. **Lithium treatment of Manic-Depressive Illness: a practical guide**. Edited by S. Karger. Basel- München- Paris- London- New York- Sydney, 1980.

- SCHOU, M. The effect of prophylactic lithium treatment on mortality and suicidal behavior: a review for clinicians. **Journal of Affective Disorders**, 50: 253-259, 1998.
- SHALDUBINA, A.; AGAM, G.; BELMAKER, R.H. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry** 25: 855-866, 2001.
- SHIAH, I-S.; YATHAM, L.N. Gaba function in mood disorders: an update and critical review. **Life Sciences**, 63: 1289-1303, 1998.
- SHIMIZU, T.; SHIBATA, M.; WAKISAKA, S.; INOUE, T.; MASHIMO, T.; YOSHIYA, I. Intrathecal lithium reduces neuropathic pain responses in a rat model of neuropathy. **Pain**, 85: 59-64, 2000.
- SILVA, R.H.; 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**, 102: 117-125, 2000.
- SIUCIAK, J.A.; LEWIS, D.R.; WIEGAND, S.J.; LINDSAY, R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacology, Biochemical and Behavior**, 56: 131-137, 1997.
- SLANGEN, J.L.; EARLEY, B.; JAFFARD, R.; RICHELLE, M.; OLTON, D.S. Behavioral models of memory and amnesia. **Pharmacopsychiatry**, 2: 81-84, 1990.
- SMITH, M.A. Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role for neurotrophic factors. **Behavioral Brain Research**, 78: 25-36, 1996.
- SMITH, M.A.; MAKINO, S.; KVETNANSKY, R.; POST, R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, 15: 1768-1777, 1995.
- SMITH-SWINTOSKY, V.L.; PETTIGREW, L.C.; SAPOOLSKY, R.M.; PHARES, C.; CRADDOCK, S.D.; BROOKE, S.M.; MATTSON, M.P. Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 16: 585-598, 1996.

- SNYDER, J.S.; KEE, N.; WOJTOWICZ, J.M. Effect of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. **Journal of Neurophysiology**, 85: 2423-2431.
- SOUSA, N.; LUKOYANOV, N.V.; MADEIRA, M.D.; ALMEIDA, O.F.X.; PAULA-BARBOSA, M.M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience**, 97: 253-266, 2000.
- STAUNTON, D.A., DEYO, S.N.; SHOEMAKER, W.J.; ETTENBERG, A.; BLOOM, F.E. Effects of chronic lithium on enkephalin systems and pain responsiveness. **Life Sciences**, 31: 1837-1840, 1982.
- STEIN-BEHRENS, B.; ELLIOT, E.; MILLER, C.; SCHILLING, J., NEWCOMBE, R.; SAPOLSKY, R. Glucocorticoids exacerbate kainic acid-induced extracellular accumulation of excitatory aminoacids in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 58: 1730-1738, 1992.
- STEIN-BEHRENS, B.; LIN, W.; SAPOLSKY, R. Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, 63: 596-603, 1994a.
- STEIN-BEHRENS, B.; MATTSON, M.P.; CHANG, I.; YEH, M.; SAPOLSKY, R. Stress exacerbate neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, 14: 5373-5380, 1994b.
- STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Progress in Neurobiology**, 56: 149-171, 1998.
- STRACK, A.M.; SEBASTIAN, R.J.; SCHWARTZ, M.W.; DALLMAN, M.F. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. **American Journal of Physiology**, 268 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 37): R142-R149, 1995.
- STRATAKIS, C.A. & CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Annals of New York Academy of Sciences**, 771: 1-18, 1995.
- SULLIVAN, R.M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. **The Journal of Neuroscience**, 19: 2834-2840, 1999.
- SUTHERLAND, G.R.; BOSE, R.; LOUW, D.; PINSKY, C. Global elevation of brain superoxide dismutase activity following forebrain ischemia in rat. **Neuroscience Letters**, 128: 169-172, 1991.

- TANAPAT, P.; GALEA, L.A.; GOULD, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 16: 235-239, 1998.
- TEIXEIRA, N.A.; PEREIRA, D.G.; HERMINI, A.H. Lithium treatment prolongs shock-induced hypoalgesia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28: 791-799, 1995.
- THAU, K.; RAPPELSBERGER, P.; LOVREK, A.; PETSCHKE, H.; SIMHANDL, C.; TOPITZ, A. Effect of lithium on the EEG of healthy males and females. A probability mapping study. **Neuropsychobiology**, 20: 158-163, 1989.
- THOENEN, H. Neurotrophin and neuronal plasticity. **Science**, 270: 266-270, 1995.
- TORRES, I.L.; GAMARO, G.D.; SILVEIRA-CUCCO, S.N.; MICHALOWSKY, M.B.; CORREA, J.B.; PERRY, M.L.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 111-116, 2001a.
- TORRES, I.L.; VASCONCELLOS, A.P.; SILVEIRA-CUCCO, S.N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34: 241-244, 2001b.
- TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P.J. Metabolic coupling between glia and neurons. **The Journal of Neuroscience**, 16: 877-885, 1996.
- URSIN, H.; OLFF, M. The stress response IN: STANFORD, S.C.; SALMON, P. (eds). **Stress from synapses to syndrome**. London: Academic Press. pp. 3-22, 1993.
- VANDERKLISH, P.W.; BAHR, B.A. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. **International Journal of Pathology**, 81: 323-339, 2000.
- VERNADAKIS, A. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. **Progress in Neurobiology**, 49: 185-214, 1996.
- VOLONTE, C.; CIOTTI, M.T.; MERLO, D. LiCl promotes survival of GABAergic neurons from cerebellum and cerebral cortex: LiCl induces survival of GABAergic neurons. **Neuroscience Letters**, 172: 6-10, 1994.

- WANG, J.; AKIRAV, I.; RICHTER-LEVIN, G. Short-term behavioral and electrophysiological consequences of underwater trauma. **Physiology and Behavior**, 70: 327-332, 2000.
- WATANABE, Y.; GOULD, E.; McEWEN, B.S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, 588: 341-345, 1992.
- WENZEL, J.; LAMMERT, G.; MEYER, U.; KRUG, M. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. **Brain Reserach**, 560: 122-131, 1991.
- WILLNER, P.; MUSCAT, R. Animal models for investigating the symptoms of depression and the mechanisms of action of antidepressant drugs. In: OLIVIER, B.; MOS, J.; SLOUGEN, J.L. (eds). **Animal models in Psychopharmacology**. Boston, Birkhauser Verlag Basel, pp 183-197, 1991.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, 93: 358-364, 1987.
- XAVIER, M.H. Estresse crônico e sistema benzodiazepínico – estudo de parâmetros bioquímicos e comportamentais. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS, 1995.
- YUSIM, A.; AJILORE, O.; BLISS, T.; SAPOLSKY, R. Glucocorticoids exacerbate insult-induced declines in metabolism in selectively vulnerable hippocampal cell fields. **Brain Research**, 870: 109-117, 2000.
- ZIGMOND, J.M.; FINLAY, J.M.; SVED, A.F. Neurochemical studies of central noradrenergic responses to acute and chronic stress: implications for normal and abnormal behavior. *IN*: FRIEDMAN, M.J.; CHARNEY, D.S.; DEUTCH, A.Y. (eds) **Neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD**, Philadelphia, pp. 45-60, 1995.
- ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R.; CLOWER, R.P.; REMPEL, N.L. Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. **The Journal of Neuroscience**, 13: 251-265, 1993.

ZURITA, A.; MARTIJENA, I.; CUADRA, G.; BRANDÃO, M.L.; MOLINA, V. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behavioral Brain Research**, 117: 163-171, 2000.