



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

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM LÍCIO E METILFENIDATO SOBRE A  
ANSIEDADE E O COMPORTAMENTO ALIMENTAR**

**JOSÉ MENNA OLIVEIRA**

**Porto Alegre, novembro de 2010**

José Menna Oliveira

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM LÍTIO E METILFENIDATO SOBRE A  
ANSIEDADE E O COMPORTAMENTO ALIMENTAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabete Rocha da Rocha  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Dalmaz  
Co-Orientadora

Porto Alegre

2010

*Para Bete Rocha.*

## **AGRADECIMENTOS**

Acredito que elaborar este trabalho teve como resultado principal uma compreensão menos turva de que os esquemas cognitivos com que explicamos a nós mesmos o mecanismo de ação dos fármacos, e com o que justificamos prescrevê-los, são imperfeitos, muitas vezes beirando a ingenuidade. Por isso, e por tanto mais, agradeço aos professores, aos colegas e aos funcionários do PPG-Neurociências. Vocês me proporcionaram os encontros com que se dá o pensamento – e o espaço onde se constrói uma amizade: Bete, Carla, Jorge, Matilde, Elaine, CA, Tadeu, Gisele, Deusa, Guido, Ana, Léo, Fabi, Luísa, Simone, Lucas, Raquel, Cristie, Leti, Beta, Cris, Douglas, Andréa...

Agradeço aos meus pais pela sensibilidade, ao Pedro Magalhães pelo correio, ao Daison Dias pelos passeios, à Zana Rosa pelas mãos, ao Tato Ribeiro e à Bel pelo Dodoco que late, aos amigos Deco, Guto Pedrollo, Guto Estanislau e Alemão pelas pescarias, aos outros amigos Pedro Macedo, Adriano Zibetti e Robson Lopes pelos aniversários, ao meu irmão mais velho, Mário João, pelo aconselhamento espiritual, e ao Luciano Mello, meu irmão mais novo, pela cachorrinha Branca.

Permito-me desejar que um eventual leitor encontre neste material indícios da distância hoje existente entre os universos da ciência básica e da prática clínica, e sintá-se convidado a pensar esse estado de coisas.

*Quando eu visto um terno  
É que eu não me encontro mais*

Iassair, Tato Ribeiro

## RESUMO

Esta tese investiga os efeitos do tratamento com lítio e metilfenidato sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos, e possíveis mecanismos associados ao ganho de peso induzido pelo tratamento com lítio. Ratos Wistar foram alimentados com ração contendo lítio (um protocolo que leva a litemia entre 0,6 e 1,2mEq/L) e receberam administrações intraperitoneais de metilfenidato na dose de 5mg/Kg. Observou-se um efeito do metilfenidato aumentando a atividade locomotora e as reações de orientação na tarefa do campo aberto, e reduzindo o tempo de imobilidade na tarefa do nado forçado, o que não foi influenciado pelo tratamento com lítio. Quando as duas substâncias foram administradas concomitantemente, observou-se um aumento no tempo gasto na área central do campo aberto. Não houve efeito significativo sobre medidas de estresse oxidativo. Observou-se um efeito do lítio aumentando as expressões de prazer em resposta à estimulação gustativa com sabor doce, aumentando o consumo de alimento doce e de ração normal e reduzindo a massa de tecido adiposo marrom abdominal. O tratamento com metilfenidato reduziu o efeito do lítio sobre o tecido adiposo. Conclui-se que a hiperatividade induzida por metilfenidato não apresenta validade preditiva como modelo de mania, que a administração conjunta de lítio e metilfenidato pode ter efeito ansiolítico na clínica, que um efeito neurotóxico do metilfenidato e neuroprotetor do lítio não podem ser demonstrados com o protocolo utilizado. Além disso, uma maior sensibilidade a estímulos gustativos hedônicos, levando a maior ingestão alimentar de alimentos hipercalóricos pode estar envolvida no ganho de peso com tratamento com lítio.

## ABSTRACT

These studies were undertaken to investigate the effects of treatment with methylphenidate and lithium on behavioral and biochemical parameters, and possible mechanisms associated with lithium-induced weight gain. Male Wistar rats were fed with a lithium containing diet (a protocol that leads to serum levels between 0.6 and 1.2 mEq/L) and received intraperitoneal administration of methylphenidate at a dose of 5mg/kg. Methylphenidate treatment increased locomotor activity and rearings in the open field, and reduced the immobility time in the forced swimming task, without influence of lithium treatment. When the two substances were administered concomitantly, there was an increase in time spent in the central area of open field. There was no significant effect on measures of oxidative stress. We observed an effect of lithium increasing the expressions of pleasure in response to sweet taste, increasing the consumption of sweet food and normal food and reducing the abdominal brown adipose tissue. Methylphenidate treatment reduced the effect of lithium on adipose tissue. We conclude that hyperactivity induced by methylphenidate has no predictive validity as a model of mania, combined administration of lithium and methylphenidate may have anxiolytic effects, and neurotoxicity with methylphenidate and neuroprotection with lithium cannot be demonstrated with the protocol used. An increased sensitivity to gustatory hedonic stimuli, leading to increased food intake, may be involved in weight gain with lithium treatment.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

<b>Figura 1A:</b>	Comportamento no campo aberto – cruzamentos.	39
<b>Figura 1B:</b>	Comportamento no campo aberto – reações de orientação.	39
<b>Figura 1C:</b>	Comportamento no campo aberto – tempo na área central.	40
<b>Figura 2A:</b>	Comportamento no labirinto em cruz elevado – número total de entradas.	41
<b>Figura 2B:</b>	Comportamento no labirinto em cruz elevado – número de entradas no braço fechado.	41
<b>Figura 2C:</b>	Comportamento no labirinto em cruz elevado – número de entradas no braço aberto.	42
<b>Figura 3A:</b>	Comportamento no teste do nado forçado – latência para imobilidade na habituação.	43
<b>Figura 3B:</b>	Comportamento no teste do nado forçado – latência para imobilidade no teste.	43
<b>Figura 3C:</b>	Comportamento no teste do nado forçado – tempo de imobilidade no teste.	44
<b>Figura 4A:</b>	Parâmetros oxidativos no estriado – peroxidação lipídica.	45
<b>Figura 4B:</b>	Parâmetros oxidativos no estriado – potencial antioxidante radical total.	45
<b>Figura 4C:</b>	Parâmetros oxidativos no estriado – superóxido dismutase.	45
<b>Figura 4D:</b>	Parâmetros oxidativos no estriado – glutathiona peroxidase.	46

## ARTIGO 2

**Figura 1:** Efeito do lítio sobre tempo total de protrusões de língua. 54

## ARTIGO 3

**Figura 1A:** Efeito do tratamento com lítio sobre consumo de alimento doce. 62

**Figura 1B:** Efeito do tratamento com lítio sobre consumo de ração normal sem privação. 62

**Figura 1C:** Efeito do tratamento com lítio sobre consumo de ração normal após privação alimentar. 62

## ARTIGO 4

**Figura 1:** Efeitos do lítio e metilfenidato sobre a gordura abdominal. 70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPH	Anfetamina
AP-1	Proteína Ativadora 1
ATP	Adenosina Trifosfato
COX-2	Ciclooxigenase 2
cPLA2	Fosfolipase A <sub>2</sub> específica para o Ácido Araquidônico
CRE	Elemento Responsivo a AMP cíclico
DOPAC	Ácido Diidróxi-Fenilacético
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GPx	Glutathione Peroxidase
GSK-3 $\beta$	Glicogênio-Sintase-Cinase-3 $\beta$
HVA	Ácido Homovanílico
IP <sub>3</sub>	Inositol-Trifosfato
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAPs	Proteínas Associadas a Microtúbulos
MPTP	N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPH	Metilfenidato
NF-kB	NF-kappa-B
PKC	Proteína Cinase C
SOD	Superóxido Dismutase
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade
THB	Transtorno de Humor Bipolar
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1. LÍTIO .....	02
1.1.1. Histórico .....	02
1.1.2. Mecanismos de ação .....	03
1.1.3. Lítio e comportamento animal .....	05
1.1.4. Lítio e neuroproteção .....	08
1.1.5. Lítio e ganho de peso .....	09
1.2. ANFETAMINA E DERIVADOS ANFETAMÍNICOS .....	10
1.3. METILFENIDATO .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
2.1. GERAIS .....	14
2.2. ESPECÍFICOS .....	14
3. ARTIGOS .....	15
ARTIGO 1: “Coadministered lithium and methylphenidate present anxiolytic effects.” .....	17
ARTIGO 2: “Chronic lithium increases pleasurable affective reactions.” .....	47
ARTIGO 3: “O tratamento com lítio altera o consumo de alimento doce e ração normal de biotério.” .....	55
ARTIGO 4: “Lithium and methylphenidate have opposite effects on perirenal brown fat.” .....	63
4. DISCUSSÃO GERAL .....	71
5. CONCLUSÕES .....	85
6. REFERÊNCIAS .....	87

# **INTRODUÇÃO**

## 1.1. LÍTIO<sup>1</sup>

### 1.1.1. HISTÓRICO

O lítio é um elemento químico, o primeiro elemento sólido da tabela periódica, pertencente à família 1A, de número atômico 3, encontrado na natureza na forma de dois isótopos estáveis – <sup>6</sup>Li e <sup>7</sup>Li. Este último constitui aproximadamente 93% do lítio natural. Foi descoberto pelo químico sueco Johan August Arfwedson em 1817, a partir da análise do mineral petalita. O nome lítio deriva de “lithos”, palavra grega para “pedra”, e foi cunhado por Jons Jacob Berzelius, chefe do laboratório em que Arfwedson trabalhava. O cirurgião escocês Alexaner Ure introduziu os sais de lítio na prática médica, propondo seu uso no tratamento da litíase vesical. Na segunda metade do século XIX acreditava-se que a “diátese do ácido úrico” estaria envolvida em uma série de condições clínicas, incluindo mania e depressão – e acredita-se que o médico dinamarquês Carl Georg Lange tenha sido o primeiro profissional a usar sais de lítio no manejo de sintomas afetivos. No final do século XIX e início do século XX o lítio tornou-se bastante popular, sendo utilizado em uma série de remédios populares, e estando presente (em concentrações muito baixas) na composição de algumas águas minerais (Jeferson e Greist, 2005; Freeman et al., 2004; Marmol, 2008).

Em 1948 começou a ser comercializada nos Estados Unidos uma solução contendo cloreto de lítio a 25% como uma possível substituta do sal de cozinha em pacientes hipertensos. No ano seguinte relatos de grave intoxicação por lítio e morte levaram a sua retirada do mercado americano. Na mesma época o psiquiatra australiano John Frederick Joseph Cade pesquisava o uso de lítio no tratamento de estados afetivos patológicos – e em 1949 apresentava o resultado exitoso do tratamento com lítio de 10 pacientes maníacos hospitalizados (Cade, 1949). Nas décadas de 50 e posteriores Mogens Schou conduziu estudos mais extensos e criteriosos sobre os efeitos do tratamento com lítio (Shou et al., 1954; Baastrup e Schou, 1967; Shou et al., 1973), e desde então extensa bibliografia vem sendo produzida sobre o uso do lítio no manejo do transtorno de humor bipolar (THB).

---

<sup>1</sup> A introdução desta tese foi elaborada a partir de pesquisa no banco de dados PubMed, utilizando como palavras-chave os subtítulos de cada sessão entre outros termos, dando preferência a artigos de revisão e atenção especial a artigos históricos. Utilizaram-se também artigos e livros-texto recomendados pelas orientadora e co-orientadora deste trabalho.

Estudos duplo-cegos e randomizados têm confirmado a eficácia do lítio na mania aguda (Rosenbaum et al., 2005) e na profilaxia de sintomas maníacos, depressivos e ansiosos no transtorno bipolar (Davis et al., 1999; Geddes et al., 2004). Há forte evidência de que, entre todos estabilizadores do humor, o lítio seja a primeira escolha no tratamento de manutenção em pacientes bipolares (Coryell, 2009).

Além disso, o fato de o lítio ser um elemento encontrado na natureza – sobre o qual a indústria farmacêutica não pode, portanto, reclamar patente – faz com que seja um tratamento extremamente barato comparado a muitos dos fármacos disponíveis para o manejo dos transtornos neuropsiquiátricos. O carbonato de lítio faz parte da lista de medicamentos considerados essenciais pelo Ministério da Saúde (RENAME).

### **1.1.2. MECANISMOS DE AÇÃO**

Existem numerosos efeitos moleculares descritos para o lítio. Este elemento encontra-se em pequenas quantidades no organismo dos animais (nos humanos a quantidade normal de lítio no plasma oscila entre 0,1 e 0,2 mEq/L). Dotado de carga, possivelmente interfere fisiologicamente em fenômenos em membranas, cruciais nos processos de comunicação celular. Além disso, dado seu pequeno tamanho, transita facilmente através das células, podendo participar de processos citoplasmáticos, em especial os relacionados à transdução de sinais intracelulares.

Além das possíveis (e ainda não bem compreendidas) ações do lítio normalmente presente nos organismos, quando administrado via exógena, levando a níveis séricos superiores a 0,6mEq/L, este íon interfere com uma série de fenômenos bioquímicos. Diversas dessas ações têm sido propostas como possíveis explicações para seus efeitos estabilizadores do humor. Entre os alvos moleculares descritos encontram-se diversos sistemas de neurotransmissão, em vários níveis – fenômenos de membrana, concentração de substâncias na fenda sináptica, sistemas de segundos-mensageiros e expressão gênica. Numa visão panorâmica, sabe-se que o lítio:

- Transita para o interior da célula, tanto às custas de adenosita trifosfato (ATP), usando a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para isso, ou usando a energia da diferença de concentração, através do sistema de trocas  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ . Foi demonstrado também que o influxo pode se dar por canais de sódio voltagem-dependentes, quando no seu estado ativo, o que

leva a um maior influxo de íons lítio quando a célula está ativa (na mania, hipoteticamente) e um menor influxo na eutímia (talvez isso explique porque os níveis séricos de lítio sejam mais altos quando um paciente em litioterapia está eufímico, em comparação com os períodos sintomáticos da doença). Como consequência, o lítio interfere no transporte e no gradiente de íons transmembrana: o influxo de lítio parece contribuir para a depleção de  $\text{Na}^+$  intracelular em células eletricamente ativadas, numa proporção de 1 para 1, e para a normalização da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, que se encontra elevada em pacientes bipolares. Parece ainda exercer um efeito sobre a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , alguns estudos demonstrando um efeito inibitório, outros excitatório (Shaw, 1966; Dubovsky et al., 1992; Lenox e Manji, 1998; Marmol, 2008);

- Foi demonstrado uma influência do lítio sobre praticamente todos sistemas de neurotransmissão. Como a concentração de neurotransmissores e peptídeos na fenda sináptica é dependente dos processos de síntese, liberação, recaptção e degradação, e como vem sendo demonstrada uma ação direta do lítio sobre alguns desses processos, pode-se compreender eventuais modificações nas concentrações de espécies químicas na fenda como uma consequência de ações primárias em outros estágios do processo. Assim, em termos gerais, acredita-se que o lítio aumente a relação acetilcolina/dopamina, eleve a concentração de serotonina na fenda sináptica (aparentemente por inibição de auto-receptores somáticos  $5\text{HT}_{1A}$  e dendríticos  $5\text{HT}_{1B}$ ) e aumente a relação ácido gama aminobutírico (GABA)/glutamato (em termos mais específicos: agudamente iniba a recaptção de glutamato e cronicamente supra-regule essa recaptção) (Dunigan e Shamoo, 1995; Lenox e Manji, 1998; Jope, 1999; Shaldubina et al., 2001);

- Interfere no sistema do fosfoinositol, inibindo a ativação da proteína- $\text{G}_q$ , da proteína cinase C (PKC), inibindo a liberação de cálcio do retículo endoplasmático pelo inositol-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e inibindo a enzima inositol-monofosfatase (Jope, 1999; Marmol, 2008);

- Interfere no sistema do AMP cíclico, estimulando a conformação inativa (heterotrimérica) das proteínas  $\text{G}_i$  e  $\text{G}_s$ , o que resulta numa ação bimodal: inibição da

adenilatociclase em situações de estimulação excessiva e estimulação da mesma enzima em situações basais (Jope, 1999; Harwood e Agam, 2003);

- Interfere no sistema do ácido araquidônico, reduzindo em 80% o turnover desta molécula e reduzindo tanto a expressão gênica como a síntese protéica de uma fosfolipase A<sub>2</sub> específica para o ácido araquidônico (cPLA<sub>2</sub>) e da ciclooxigenase 2 (COX-2) (Chang et al., 1996; Bosetti et al., 2002; Rao e Rapoport, 2009);

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

- Possui ação inibitória sobre a proteína glicogênio-sintase-cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), envolvida na resposta celular à insulina e em uma série de processos relacionados ao crescimento e estrutura celulares, incluindo a fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos (MAPs), como tau e MAP-1B, da proteína  $\beta$ -catenina e de fatores de transcrição (Jope, 1999; Wada, 2009).

Em termos farmacocinéticos, o lítio talvez seja o fármaco psicoativo com o modelo menos complicado de distribuição e eliminação, pois não sofre transformação hepática, não se liga substancialmente a proteínas plasmáticas e não apresenta substancial excreção hepática (Swartz e Wilcox, 1984).

### **1.1.3. LÍLIO E COMPORTAMENTO ANIMAL**

Ao longo dos anos, diversas tarefas comportamentais têm sido utilizadas no estudo dos mecanismos terapêuticos do lítio. Uma revisão de O'Donnell e Gould (2007), aborda extensivamente os resultados obtidos com a administração de lítio a roedores em diversas tarefas comportamentais. Um dos modelos em que mais frequentemente as ações do lítio são estudadas requer a indução de hiperatividade por uma droga psicoestimulante, em especial anfetamina (AMPH). Nesse paradigma, é consistente a ação do lítio no sentido de atenuar a hiperatividade induzida por anfetamina, o que é

considerado um equivalente, em termos de comportamento animal, às suas propriedades anti-maniacas em humanos (Cox et al., 1971; Berggren et al., 1978).

Os estudos relacionados à atividade locomotora geralmente envolvem o paradigma do campo aberto, em que o animal é exposto a um ambiente novo e sua movimentação, tanto horizontal como vertical, é mensurada. Neste teste, geralmente se considera que a movimentação horizontal nos primeiros 10 a 30 minutos, assim como a movimentação vertical (*rearings*), são uma medida da atividade exploratória do animal. Quando expostos ao aparato por mais tempo, ou quando houve uma habituação prévia, tais medidas relacionam-se a atividade locomotora inespecífica (O'Donnell e Gould, 2007). A maioria dos estudos envolvendo lítio e a tarefa do campo aberto demonstra que a administração crônica de lítio não interfere na locomoção. Contudo, o comportamento exploratório, medido através dos *rearings*, ou da locomoção nos primeiros minutos após exposição ao novo ambiente, costuma ser reduzido pelo tratamento com lítio (Smith, 1975, Gray et al., 1976, Cappeliez, 1986, O'Donnell e Gould, 2007).

O teste do nado forçado foi introduzido pelo grupo de Porsolt na década de 70 (Porsolt et al., 1977) como um possível modelo animal de comportamento depressivo, e está entre os testes mais usados como preditores de efeitos antidepressivos de substâncias. Neste teste o animal (rato ou camundongo) é colocado em um cilindro com água. Nos primeiros instantes, o animal apresenta intensa atividade, mas logo após surgem períodos de imobilidade, nos quais se realizam apenas discretos movimentos para manter a cabeça fora da água. Vários medicamentos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste modelo. Estudos envolvendo lítio e a tarefa do nado forçado demonstram, de um modo geral, um efeito do lítio reduzindo o tempo de imobilidade, o que é coerente com o efeito antidepressivo encontrado em pacientes (Eroglu e Hizal, 1987; O'Brien et al., 2004; Shaldubina et al., 2006; Cryns et al., 2007).

Uma tarefa frequentemente utilizada para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade é a do labirinto em cruz elevado (LCE) (Pellow et al., 1985), em que duas plataformas ou braços, um fechado (com “paredes”) e outro aberto, se cruzam em um ângulo de 90° e ficam a uma altura de aproximadamente 1 metro do chão. O animal é colocado no ponto de cruzamento entre elas com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento é avaliado por um período de 5

minutos. Neste paradigma, o número total de entradas em cada braço pode ser compreendido como uma medida da atividade locomotora e exploratória e – o principal em relação ao LCE – postula-se que a preferência do animal pelo braço aberto (aferida tanto pelo número total de entradas neste, tempo transcorrido neste e proporção de tempo neste em relação ao braço fechado) relaciona-se inversamente à ansiedade do animal (Hogg, 1996). Até onde é de nosso conhecimento, comparativamente aos estudos de atividade locomotora e estudos envolvendo a tarefa de nado forçado, há menos estudos avaliando os efeitos do lítio sobre a ansiedade no LCE, e os resultados existentes são controversos. Há estudos demonstrando que o lítio isoladamente não interfere no desempenho do LCE (Wood et al., 2004), embora atenua a hiperatividade induzida por alguns tipos de lesão encefálica (Yan et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o lítio pode atenuar a hiperatividade e reduzir o tempo gasto nos braços abertos em animais manipulados geneticamente (Yuskaitis et al., 2010). Em estudos de nosso grupo o tratamento com lítio aumentou o tempo proporcional nos braços abertos e o número de entradas nos braços abertos em ratos machos (De Vasconcellos, 2005), e reduziu o número total de entradas em ambos braços em fêmeas (Oliveira, 2006). Por outro lado, foi descrito que a administração de lítio a ratos em desenvolvimento pode aumentar a expressão de ansiedade até seis semanas após a interrupção do tratamento (Youngs et al., 2006).

Em estudos *in vivo* um método frequente de administração de lítio é a via parenteral. Tal procedimento, embora seja relativamente simples, possui alguns inconvenientes como o estresse e a possível dor relacionados à manipulação dos animais, o risco de infecções, o custo dos materiais e características farmacocinéticas distintas da administração V.O. (Wood et al., 1986). Foi demonstrado que a administração intraperitoneal aguda leva a altos níveis séricos, que caem subsequentemente, e a níveis cerebrais baixos, que subsequentemente aumentam (O'Donnell e Gould, 2007).

Na década de 90 Rocha e Rodnight desenvolveram um método de administração de lítio na própria ração dos animais de laboratório. Tal método não possui os inconvenientes mencionados acima e leva a níveis séricos entre 0,6 e 1,2 mEq/L – a faixa considerada terapêutica em humanos. Utilizando este método foi demonstrado um efeito do lítio em aumentar marcadores imunológicos astrocitários (Rocha e Rodnight, 1994), modificar a morfologia glial em hipocampo de ratos (Rocha et al.,

1998), aumentar a atividade da via das ecto-nucleotidases em sinaptosomas hipocampais (Wilot et al., 2004) e proteger contra a morte celular induzida por ATP (Wilot et al., 2007). Este método também vem sendo utilizado na pesquisa da interação entre os efeitos do lítio e do estresse em animais. Nesse sentido, foi demonstrado um efeito protetor do lítio contra o estresse em uma tarefa de memória espacial (Vasconcellos et al., 2003; de Vasconcellos et al., 2005) e em medidas de atividade da Na/K-ATPase (de Vasconcellos et al., 2005).

#### **1.1.4. LÍTIO E NEUROPROTEÇÃO**

Um promissor campo de estudo que vem crescendo há mais de quinze anos diz respeito à utilidade do lítio como agente neuroprotetor. Isso foi demonstrado em estudos comportamentais (Pascual e Gonzales, 1995; Vasconcellos et al., 2003; Castro et al., 2009), morfológicos (Moore et al., 2000; Chen et al., 2000) e bioquímicos (Nonaka et al., 1998; Chen et al., 2003; Chen e Chuang, 1999; Wei et al., 2001; De Sarno et al., 2002; Zhou et al., 2005).

O primeiro estudo nesse sentido utilizou um modelo de lesão do sistema colinérgico através da administração intracerebral de ácido ibotênico, e demonstrou que a administração intraperitoneal de lítio por nove dias reduziu os déficits na deambulação, na tarefa de esquivar e na atividade da colina acetiltransferase observados com o modelo (Pascual e Gonzales, 1995). Posteriormente, demonstrou-se que a administração crônica de lítio atenua os déficits na memória de referência na tarefa do labirinto aquático de Morris, induzidos por um protocolo de estresse crônico variado (Vasconcellos et al., 2003).

Em cultura de neurônios cerebelares demonstrou-se que a apoptose induzida por glutamato é marcadamente reduzida com a exposição das células a uma concentração de lítio na faixa terapêutica por 6 a 7 dias. Tal efeito protetor parece relacionado a uma inibição das correntes de  $Ca^{++}$  mediadas por receptores NMDA (Nonaka et al., 1998). Em coerência com tais resultados, um estudo envolvendo cultura de células hipocampais observou que tanto lítio quanto ácido valpróico preveniam a morte celular induzida pela presença de ATP extracelular em concentrações citotóxicas (Wilot et al., 2007).

Diversos trabalhos evidenciam o efeito protetor do lítio contra determinados insultos, como por exemplo: isquemia (Cimarosti et al., 2001; Ren et al., 2003);

neurotoxicidade glutamatérgica (Nonaka et al., 1998); estresse oxidativo (Shao et al., 2005; De Vasconcellos et al., 2006); chumbo (Yang et al., 2004), beta-bulgarotoxina (Tseng e Lin-Shiau, 2002), ácido quinolínico (Wei et al., 2001), ácido ibotênico (Arendt et al., 1999),  $\beta$ -amilóide (Alvarez et al., 1999), N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Youdim e Arraf, 2004) entre outros, e propõe-se que diversos alvos bioquímicos do lítio estejam envolvidos, em maior ou menor grau, neste efeito (Manji et al., 1999).

Até o momento existem poucos estudos clínicos sobre o assunto, e alguns resultados fazem reforçar o interesse por este campo de pesquisa. Por exemplo, em um estudo com pacientes bipolares em episódio depressivo utilizando ressonância magnética de crânio foi encontrado um efeito do tratamento com lítio por 4 semanas de aumentar o volume total de substância cinzenta, o que foi relacionado a neuroproteção (Moore et al., 2000). Em um ensaio clínico recente com humanos portadores de esclerose lateral amiotrófica, pacientes recebendo lítio por 15 meses não exibiram deterioração clínica significativa, à diferença do grupo controle, em que a esperada progressão da patologia se fez presente (Fornai et al., 2008).

### **1.1.5. LÍTIO E GANHO DE PESO**

Embora ganho de peso seja um efeito bem conhecido e muitas vezes limitante do tratamento com lítio (Lenox e Manji, 1998; Garland et al., 1988), pouco se compreende sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos. Foi sugerido um efeito sobre o metabolismo dos carboidratos (Mellerup et al., 1983), sobre os ritmos circadianos (inversão do hábito alimentar do período escuro para claro em animais noturnos) (Reghunandan et al., 1989), além de um efeito sobre os níveis de leptina (Atmaca et al., 2002) e de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Himmerich et al., 2005) – contudo não existe consenso sobre como se dá o ganho de peso induzido pelo lítio (Lenox e Manji, 1998). Curiosamente, existe pouca informação na literatura a respeito da influência do tratamento com lítio sobre o consumo de alimentos – em especial de alimentos palatáveis ou ricos em calorias – possivelmente por dificuldades de mensurar de forma confiável a ingestão alimentar por longos períodos. Em um pequeno estudo envolvendo 5 voluntários em litioterapia com níveis séricos entre 0,5 e 0,8 mmol/L, foi demonstrado um discreto aumento no consumo em uma refeição específica, embora os indivíduos tratados não tenham experimentado aumento de peso

(Chen et al., 1992). Em nosso laboratório encontramos um efeito substancial do lítio de aumentar o consumo de alimentos doces em ratas submetidas a um modelo de estresse crônico variado, bem como de reduzir o período de latência para início de consumo deste alimento, sem aumentar o peso destes animais (Oliveira, 2006). Na perspectiva de que a ingestão de alimentos é um comportamento naturalmente reforçado (Berridge e Kringelbach, 2008), e de que alimentos possuem, portanto, propriedades hedônicas, é possível sugerir que uma eventual interferência sobre o sistema de recompensa, envolvido na reatividade afetiva a estímulos (Berridge e Robinson, 1998) contribuiria para o consumo aumentado, pelo menos de determinados tipos de alimentos. Uma tarefa comportamental que vem sendo utilizada para o estudo da reatividade afetiva em animais é a observação de expressões faciais após a administração intraoral de líquidos com sabores determinados (Grill e Norgren, 1978; Steiner et al., 2001; Jarret et al., 2005).

Outro possível mecanismo para o ganho de peso induzido por lítio, até onde é de nosso conhecimento ainda não estudado, relaciona-se a um efeito sobre os tecidos adiposos marrom e branco. Em mamíferos, tais tecidos estão localizados em diferentes regiões do corpo e possuem funções distintas e complementares: enquanto o tecido branco mobiliza reservas lipídicas em resposta a demandas metabólicas entre refeições, o tecido marrom libera a energia acumulada na forma de calor e há evidências de que o tecido branco esteja sob regulação do tecido marrom (Hansen e Kristiansen, 2006). Foi demonstrado em culturas celulares um efeito da administração de lítio na diferenciação de ambos os tipos de gordura (Aratani et al., 1987; Rodrigues de la Concepción et al., 2005).

## **1.2. ANFETAMINA E DERIVADOS ANFETAMÍNICOS**

Em 1937 foi publicado o primeiro relato dos efeitos benéficos de psicoestimulantes sobre crianças apresentando o que, posteriormente, veio a ser chamado Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) (Bradley, 1937). Atualmente, esta é uma entidade nosológica bem reconhecida, com alta prevalência (algumas estimativas chegam a 10% da população) (Michanie et al., 2007), cujo tratamento farmacológico consiste essencialmente de psicoestimulantes. Embora não sejam utilizadas no Brasil, AMPH e metanfetamina compõem o arsenal terapêutico do TDAH na Europa e nos EUA. Contudo, essas substâncias têm importante potencial de abuso e há uma série de

relatos sugerindo que possuam propriedades neurotóxicas. Por exemplo, a administração crônica de anfetamina leva a uma redução na quantidade de dopamina estriatal, bem como de seus metabólitos ácido diidróxi-fenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), o que se acompanha de alterações estruturais, incluindo degeneração axonal, em várias regiões corticais, incluindo o caudado e o córtex somatossensorial (Advokat, 2007). Entre os mecanismos moleculares propostos para justificar estes fenômenos encontram-se a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (Wan et al., 2000; D'Almeida et al., 1995).

Como citado anteriormente, a AMPH é bastante utilizada em pesquisa básica por seu potencial de induzir hiperatividade em animais, a qual é contrabalançada pela administração de estabilizadores do humor. Estudos envolvendo AMPH e estabilizadores do humor oferecem informações relevantes na compreensão da fisiopatologia do transtorno bipolar (entre outros) e permitem um percurso racional no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (O'Donnel & Gould, 2007).

### **1.3. METILFENIDATO**

Metilfenidato (MPH) é um psicoestimulante extensivamente usado no tratamento do TDAH. No Brasil é a droga de primeira escolha neste transtorno e a efetividade do tratamento com MPH chega a 70% de acordo com algumas estimativas. O mecanismo de ação do MPH assemelha-se, em alguns aspectos, ao das anfetaminas, uma vez que age nos transportadores citoplasmáticos de monoaminas, em especial dopamina e noradrenalina, aumentando a concentração destas na fenda sináptica, à semelhança das anfetaminas (Yu et al., 2000; Gerasimov et al., 2000; Easton et al., 2007). Além disso, quando administrado em concentrações superiores a 2,5mg/Kg a animais ele induz hiperatividade, possivelmente por ativação da via dopaminérgica nigroestriatal – portanto compartilhando algumas propriedades comportamentais com a anfetamina.

Contudo, apesar de seu difundido uso clínico, até onde é de nosso conhecimento, não existem estudos avaliando a segurança da administração de MPH a longo prazo. Assim como as anfetaminas, MPH pode ser utilizado como droga de abuso, em especial através das vias inalatória e endovenosa. Tendo em vista o mecanismo de ação semelhante às anfetaminas e a toxicidade descrita com aquelas drogas, é relevante discutir questões relacionadas à segurança do MPH. Estudos recentes, coerentemente com isso, mostram o potencial do MPH de induzir estresse oxidativo e

dano no DNA (Martins et al., 2006; Andreazza et al., 2007). Em estudos com ratos jovens, a administração de MPH foi capaz de modelar sintomas depressivos (Carlezon et al., 2003) e inibir a neurogênese hipocampal (Lagace et al., 2006) na vida adulta.

Por outro lado, visto que MPH induz hiperatividade em animais, e dada a dificuldade no Brasil de se obter anfetaminas via importação, justifica-se estudá-lo como um possível modelo de mania, à semelhança do que é bem descrito com as AMPH. Uma razão adicional para isso é o fato de que com a ampliação do conceito de Espectro Bipolar, e com o maior conhecimento epidemiológico e fenomenológico à respeito do TDAH, mais pessoas vêm sendo diagnosticadas e, inclusive, situações de comorbidade Transtorno Bipolar – TDAH vêm se tornando comuns na clínica. Consequentemente, é previsto que o uso em associação de estabilizadores de humor com MPH torne-se mais freqüente.

---

Em função do acima exposto, partindo da linha de pesquisa “lítio e neuroproteção”, este trabalho de doutorado ramifica-se em dois braços principais: um deles aborda aspectos comportamentais e bioquímicos da interação lítio x metilfenidato; o segundo estuda possíveis mecanismos que, indiretamente, possam contribuir para o ganho de peso induzido por lítio. Buscamos responder às seguintes perguntas:

- [1] hiperatividade induzida por MPH pode ser considerada um modelo de mania ?
- [2] existem interações significativas entre os efeitos do MPH e do lítio em tarefas comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão?
- [3] a administração de MPH é capaz de causar dano neural passível de prevenção com a administração de lítio?
- [4] a administração de lítio é capaz de influenciar a sensibilidade a estímulos hedônicos?
- [5] a administração de lítio é capaz de influenciar o consumo de alimento de um modo sustentado?
- [6] existe um efeito diferenciado do lítio sobre diferentes tecidos adiposos?

# **OBJETIVOS**

## **2.1. GERAIS**

Avaliar se o tratamento com lítio tem efeito protetor contra possíveis efeitos neurotóxicos do tratamento com metilfenidato. Identificar possíveis mecanismos para o ganho de peso induzido pelo tratamento com lítio.

## **2.2. ESPECÍFICOS**

### *COMPORTAMENTAIS*

[1] Estudar os efeitos do tratamento com lítio e metilfenidato na tarefa do campo aberto.

[2] Estudar os efeitos do tratamento com lítio e metilfenidato na tarefa do labirinto em cruz elevado.

[3] Estudar os efeitos do tratamento com lítio e metilfenidato na tarefa do nado forçado.

[4] Estudar os efeitos do tratamento com lítio sobre reações afetivas a um alimento palatável.

[5] Estudar os efeitos do tratamento com lítio sobre o consumo de alimento doce e ração normal de biotério.

### *MORFOLÓGICOS*

Estudar os efeitos do tratamento com lítio sobre a massa de tecido adiposo abdominal.

### *BIOQUÍMICOS*

Estudar os efeitos do tratamento com lítio e metilfenidato sobre a formação de espécies reativas de oxigênio.

# **ARTIGOS**

### **Artigo 1**

“Coadministered lithium and methylphenidate present anxiolytic effects.”

Submetido à revista *Pharmacology*.

### **Artigo 2**

“Chronic lithium increases pleasurable affective reactions.”

Submetido ao *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

### **Artigo 3**

“O tratamento com lítio altera o consumo de alimento doce e ração normal de biotério.”

Submetido à *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*.

### **Artigo 4**

“Lithium and methylphenidate have opposite effects on perirenal brown fat.”

Publicado na *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*.

*Rev Psiquiatr Rio Gd Sul. 2010;32(2):35-37.*

**Coadministered lithium and methylphenidate present anxiolytic effects**

José Menna Oliveira<sup>a\*</sup>; Leonardo Machado Crema<sup>a</sup>; Luísa Amália Diehl<sup>a</sup>; Letícia Ferreira Pettenuzzo<sup>a</sup>; Carla Dalmaz<sup>a,b</sup>; Elizabete Rocha da Rocha<sup>a,b</sup>.

a – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37. 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/FAX: 0055-51 33085562.

b – Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Running head:** Lithium and methylphenidate

\* To whom correspondence should be addressed.

Mailing address: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37. Postal code: 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/FAX: 0055-51 33165562.

e-mail: [josemennaoliveira@gmail.com.br](mailto:josemennaoliveira@gmail.com.br)

## ABSTRACT

**Introduction:** Administration of amphetamine-like compounds was associated to oxidative damage. **Objectives:** To evaluate the effects of methylphenidate (MPH) in behavioral tasks and in oxidative stress and the ability of lithium to influence these outcomes. **Methods:** Adult male Wistar rats received normal or lithium-containing chow for 30 days. From the 15th to the 30th day of treatment, animals also received MPH or saline I.P. daily. Open-field (OF), elevated plus maze and a forced swimming test (FST) were performed. Oxidative parameters were measured in striatum and hippocampus. **Results:** MPH increased crossings and rearings, and reduced immobility in the FST. Co-administration of both drugs increased the time spent in the central area of the OF. There were no differences in the oxidative measurements. **Conclusions:** The association of MPH and lithium may have anxiolytic properties; these results were not found correlated with any alteration in oxidative measurements.

**Key-words:** lithium; methylphenidate; behavior; anxiety; exploration; oxidative damage.

## 1. INTRODUCTION

Hyperactivity, induced by amphetamine (AMPH) and reversed by mood stabilizers, is an accepted model of mania [1, 2, 3]. Although AMPH reduces symptoms of attention-deficit with hyperactivity disorder (ADHD), there are concerns related to its security related, for example, to its potential to produce dependence [4]. Moreover, anxiety, depressive and psychotic symptoms are common in abusers and in patients who take this drug to achieve weight loss [5, 6]. In animal behavioral tasks, AMPH reduces the percentage of entries into, and time spent in, the open arms of the elevated plus maze (EPM) [7, 8, 9]. In the forced swimming test (FST), AMPH reduces immobility when administered in an acute or subchronic schedule [10, 11], but increases immobility upon withdrawal [12, 13]. These effects in EPM and FST are consistent, respectively, with the anxiety and depressive symptoms reported by AMPH users. Among other molecular phenomena, reactive oxygen species formation has been proven to underlie undesirable AMPH effects and toxicity [14, 15, 16].

Methylphenidate (MPH) is a psychostimulant that is extensively used for the treatment of attention-deficit with hyperactivity disorder (ADHD) and that shares some pharmacological properties with AMPH, such as improvement in central dopaminergic and noradrenergic activity [17, 18, 19]. Despite being a widely-prescribed drug, little is known about the long-term consequences of exposure to MPH, although it has been recently demonstrated that chronic MPH increases lipid peroxidation (a measurement of oxidative damage) in young rats [20].

Lithium is a strong mood stabilizer with antimanic and antidepressive properties [21, 22] and, during the last decade, interest has increased in the neuroprotective properties of lithium salts [23, 24, 25]. The nervous system is extremely sensitive to oxidative

damage [26]. Natural enzymatic antioxidant systems include superoxide dismutase (SOD), which converts superoxide radicals into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and glutathione peroxidase (GPx), which breaks down peroxides, notably those derived from the oxidation of membrane phospholipids [27].

In light of the extensive literature concerning AMPH long-term toxicity, a better knowledge about MPH safety is desirable. The aims of this work are, firstly, to evaluate whether lithium reverts MPH effects on locomotor activity; secondly, to observe whether MPH has AMPH-like effects in the plus-maze and forced swim test; and finally to determine if MPH induces oxidative damage that is reversible by lithium treatment. These data may offer insights into the mechanisms of these drugs and contribute to a better understanding of manic states and animal mania models.

## **2. METHODS**

### **2.1. Animals**

Thirty-eight adult male Wistar rats, 90-120-days old, were used. Animals were housed in groups of 3 to 5 rats in home cages made of Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and were maintained under a standard dark-light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.), with a room temperature of 22 ± 2 °C. Rats had free access to food and water, and animal treatments were in accordance with the institutional guidelines and followed the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS).

## **2.2. Experimental procedure**

Animals were divided into two groups that received, or not, a lithium-containing chow for 30 days. On the 15<sup>th</sup> day of treatment, animals were subdivided into another two groups: receiving an acute administration of MPH or receiving saline, and were exposed for 30 min to the open field apparatus. After the open field procedure, animals were habituated for 30 min to a room with red light illumination and then exposed to the elevated plus maze apparatus for 5 min. Between days 16 to 22 of treatment, in addition to lithium P.O. treatment, animals received daily injections of MPH or saline. On the 21<sup>th</sup> and 22<sup>th</sup> days, the forced swimming test was performed. On the 30<sup>th</sup> day, animals were sacrificed and the striatum and hippocampus dissected. These structures were chosen due to the enriched dopaminergic terminations in the striatum and the role of the hippocampus in behavior and depression. Moreover, previous studies have demonstrated oxidative damage in both [20].

## **2.3. Drug preparation**

Lithium chloride (2.5 mg LiCl /g of chow) and NaCl (17 mg/g) were added to the food, as previously described [25]. The administration of lithium in food has been used in previous studies and confers lithium levels in the therapeutic range [25, 28]. MPH (Ritalina®, Novartis, Brazil) 10mg tablets were diluted in saline in order to form a 5mg/ml solution that was filtered in paper and then administered IP in the dose of 5mg/Kg (1ml/Kg). Saline was also administered in a volume of 1ml/Kg.

#### **2.4. Open-field (OF)**

A circular OF apparatus was used; the apparatus possessed a diameter of 79 cm, a floor that was divided into rows and a central area with a diameter of 50 cm. Animals received an injection of MPH or saline (see below) and were then immediately placed in the central area and observed for 30 min. The number of crossings, rearings and time spent in the central area were registered in each of the 5 min-intervals.

#### **2.4. Elevated plus maze (EPM)**

The elevated plus maze apparatus was made of wood and consisted of two opposed open arms (50 cm × 10 cm), two opposed enclosed arms with no roof (50 cm × 10 cm × 24 cm), and an open square (10 cm × 10 cm) in the center. The maze was elevated to 88 cm above the floor. The behavioral test was conducted in the observational room using red light illumination. The animal was placed in the center of the plus maze, facing one of the open arms, and remained in the apparatus for 5 min. The number of entries and the time spent in the open or enclosed arms were analyzed.

#### **2.5. Forced-swimming test (FST)**

The classic forced-swimming protocol [29] was employed with a few modifications [30]: briefly, on the 21<sup>st</sup> day (habituation) of treatment, animals were placed for 15 min in plastic cylinders (20 x 56 cm) filled with water to a depth of 35 cm, and heated until 22-25°C. The latency to assume the immobile behavior for 2 consecutive seconds was measured. Animals were then gently dried, placed in their

home cage and warmed with an external source. Thirty min later, animals were injected with their daily schedule of MPH or saline. Twenty-four hours later, animals were again placed on the swim apparatus for 5 min, and the latency until becoming immobile and the total time of immobility were measured. Animals were considered immobile after 2 seconds without moving. Water was cleaned after each rat was removed.

## **2.6. Oxidative Stress**

### **Chemicals**

Thiobarbituric acid (TBA) and Trolox were obtained from Merck and 2,2 $\phi$ -azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) was obtained from Wako Chemicals USA, Inc. Other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co.

### **Tissue preparation**

Rats were killed by decapitation, and the striatum and hippocampus dissected out and frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until biochemical measurements. For assays, tissues were homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing 140 mM KCl and 1 mM EDTA. For the TBA analysis, buffer without EDTA was utilized. The homogenate was centrifuged at 960g for 10 min and the supernatant was used.

### **Assay of lipid peroxidation (TBA-RS)**

TBA-RS was determined according to the method of Esterbauer and Cheeseman [31]. Briefly, 300  $\mu\text{L}$  of cold 10% trichloroacetic acid was added to 150  $\mu\text{L}$  of homogenate and centrifuged at 300 g for 10 min. Three hundred  $\mu\text{L}$  of the supernatants were transferred to a pyrex tube and incubated with 300  $\mu\text{L}$  of 0.67% TBA in a boiling water bath for 25 min. The tubes containing the mixture were allowed to cool under running tap water for 5 min. The resulting pink-stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane, and each curve point was subjected to the same treatment as the supernatants.

### **Total radical antioxidante potencial (TRAP)**

TRAP, representing the total non-enzymatic antioxidant capacity of the tissue, was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by 2,2'-azo-bis-(2- amidinopropane) (ABAP), according to the method of Lissi et al. [32]. The chemiluminescence generated by the mixture of 4 mL 10 mM ABAP dissolved in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6 and 10  $\mu\text{L}$  of luminol (4 mM) was measured in a Wallac 1409 liquid scintillation counter. This chemiluminescence was considered to represent the initial value. The addition of 10  $\mu\text{L}$  of 100  $\mu\text{M}$  trolox (soluble  $\alpha$ -tocopherol analogue) or 10  $\mu\text{L}$  of cerebral homogenate supernatant provokes a marked reduction in the light intensity, which is maintained for a certain period after which light intensity rapidly increases. This period corresponds to induction time (IT) and

represents the TRAP measurement. IT is directly proportional to the antioxidant capacity of the tissue. The IT of each sample is calculated and compared with the IT of Trolox and the value of the TRAP sample is expressed as nmol trolox/mg of protein.

### **Superoxide dismutase activity**

Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD kit (Randox Laboratories Ltd., UK) based on a procedure previously described by Delmas-Beauvieux et al. [33]. This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a red formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 505 nm, 37°C. One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of formazan dye formation by 50%, results are expressed as units/lg of protein.

### **GPx activity**

Glutathione peroxidase activity was determined according to Wendel [34]. The reaction was carried out at 25°C in 600ml of solution containing 100 mM pH 7.7 potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, 0.4 mM sodium azide, 2 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.62 U of GSH reductase. The activity of selenium-dependent GPx was measured by using tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the

overall reaction rate. GPx activity was expressed as units (nmol NADPH oxidized/min)/mg protein.

## **2.7. Statistical analysis**

Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) and repeated measures ANOVA, when indicated. Difference was considered significant when  $p < 0.05$ . Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical software SPSS v. 8.0 were used.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Open-field**

Administration of MPH increased crossings in the open field in all intervals analyzed (two-way ANOVA,  $n=10-12$  per group,  $F(1,41)=56.178$ ,  $p<0.001$ ), with no effect of lithium and no interaction between lithium and MPH. The peak of crossings in the MPH groups was between 10 and 15 minutes. Crossings reduced with time in the groups without MPH, but not in the groups that received MPH (there was an interaction between MPH administration and time, repeated-measures ANOVA,  $F(1,41)=12.734$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 1A).

Animals receiving MPH exhibited significantly more rearings in all intervals (two-way ANOVA,  $F(1,41)=28.816$ ,  $p<0.001$ ), with an interaction between MPH and lithium in the first 5 minutes (two-way ANOVA,  $F(1,41)=5.412$ ,  $p=0.03$ ). Rearings

reduced with time in animals without MPH but not those animals treated with MPH (interaction between MPH administration and time, repeated-measures ANOVA,  $F(1,41)=4.581, p=0.001$ ) (Fig 1B).

Co-administration of MPH and lithium increased total time spent in the central area (TCA) of the open field (two-way ANOVA,  $F(1,41)=6.228, p=0.017$ ) and TCA at each 5-min, after the 10-15 interval. During the first 5 min, lithium increased TCA (two-way ANOVA,  $F(1,41)=6.539, p=0.015$ ); between 5 and 10 min, MPH increased TCA (two-way ANOVA,  $F(1,41)=10.942, p=0.002$ ); finally, between 10 and 15 min, MPH and lithium increased TCA and there was a tendency towards an interaction between these two treatments (two way ANOVA:  $F(1,41)=12.803, p=0.001$ ;  $F=4.759, p=0.036$ ;  $F=3.787, p=0.06$  to MPH, lithium and interaction respectively) (Fig. 1C).

### **3.2. Elevated plus-maze**

MPH increased total number of entries (two-way ANOVA,  $n=7-10$  per group,  $F(1,34)=4.693, p=0.04$ ) and entries specifically in the closed arm (two-way ANOVA,  $F(1,34)=4.495, p=0.04$ ) (Fig.2A-B). In relation to the open arm entries, an interaction was observed between MPH and lithium effects. When administered alone, both drugs decreased entries into the open arm, but when the two were administered concomitantly, the behavior of the animals was similar to that of the controls (two-way ANOVA,  $F(1,34)=4.336, p=0.05$ ) (Fig.2C). There were no significant differences in relation to the ratios of time spent in the open arm/total time and entries in the open arm/total of entries, nor were differences found in the time spent in the open arm (data not shown).

### **3.3. Forced-swimming test**

MPH reduced immobility time in the test (two-way ANOVA,  $n=9-13$  per group,  $F(1,38)=4.234$ ,  $p=0.05$ ). There were no differences between groups in relation to latency to become immobile while in habituation and in the test (Fig.3A-C).

### **3.4. Oxidative parameters**

Fig. 4(A-D) shows the results of the evaluation of oxidative parameters in the striatum. There were no significant differences between the groups for TBARS, TRAP, SOD and GPx (two-way ANOVA,  $n=5$  per group,  $p>0.05$  to all measurements). In addition, there were no significant differences in any of these biochemical parameters in the hippocampus (data not shown).

## **4. DISCUSSION**

In this study, MPH induced increased locomotor activity in the OF and EPM, a finding that is in accordance with those of the literature [18, 35, 36]. Unexpectedly, this effect was not prevented by lithium. Our results differ to those of Yang's group, who demonstrated that lithium treatment transiently attenuates the locomotor response to MPH [37]. However, smaller doses of MPH were used (2.5 mg/Kg) in Yang's study and lithium was administered I.P., possibly contributing to the differences in relation to our work.

Our results demonstrate that MPH-induced hyperactivity seems to have no predictive validity for a model of mania, but may have a face validity [38]. An accepted strategy, today, is to deconstruct complex diseases in specific aspects of behavior [39, 40]; since hyperactivity is a symptom of mania and switches to mania have been demonstrated in patients treated with MPH [41], our findings may suggest that MPH-induced hyperactivity might be more useful for studying some of the aspects of the physiopathology of mania, and less useful for studying the mechanisms of action of mood stabilizers.

In our study, lithium and MPH alone decreased entries into the open arm of EPM, however, the association of lithium and MPH counteracted this effect. In addition, lithium plus MPH markedly increased the time spent in the central area of the open field. It is accepted that the more the animal explores the central area of the open field, the less it avoids the open arms of EPM (and less anxiety is experienced by the animal) [42, 43]. Lithium has been used in association with MPH in situations in which affective symptoms are concurrent with ADHD symptoms and also in the treatment of bipolar patients [44]. Carlson and colleagues reported a “synergistic rather than an antagonistic effect” of lithium and MPH in seven hospitalized children with bipolar disorder and disruptive behavior disorders [45]. Our results may suggest that using both drugs to treat anxiety in some clinical conditions deserves further study.

During the first 5 minutes of OF exposure, lithium together with MPH increased rearings, a behavior related to exploratory activity. It may be speculated that when both drugs are administered concomitantly, an improvement in exploratory behavior may occur and habituation may be responsible for the loss of this effect. Nonetheless, since a number of conditions such as schizophrenia, depression and dementia, and

treatments that include antipsychotics and even lithium, may decrease initiative and arousal, future studies to evaluate the utility of the association of MPH and lithium in these situations will be of value. Currently, MPH is sometimes used to minimize apathy and other negative symptoms, which are sometimes drug-induced, in non-ADHD-patients [46, 47].

MPH administration reduced immobility time in the FST. The ability of a drug to reduce immobility in FST is predictive of the antidepressive effect in humans [48]. While MPH increases locomotion in OF and EPM, it is unlikely that these findings in FST are due to non-specific increase in motility, since doses smaller than 40mg/kg of MPH after 24 hours do not modify motor parameters in the FST [35]. MPH improves depressive symptoms of children with ADHD [49] and some case reports suggest that MPH may augment antidepressive therapy in non-ADHD patients. However, recent well-delineated studies did not show promising results when studying MPH as an antidepressive augmentation strategy [50, 51]. These negative studies, however, used extended-release formulations. In our experiments, we used I.P. administrations, which are pharmacokinetically closer to the immediate-release formulation. These findings may suggest more studies with the immediate-release formulation of MPH in depression. MPH, administered during the early days of development, induces depressive behavior in adulthood [30], suggesting age-dependent effects, since the converse was observed during administration in adulthood.

We did not find any differences between the groups in relation to oxidative damage. In contrast, Martins and cols. [20] demonstrated that chronic exposure of young rats (postnatal day 25 to 28) increased lipid peroxidation and protein carbonyl formation in specific brain regions, including striatum. When MPH was administered chronically to adult rats they demonstrated a significant decrease in lipid peroxidation

in the cerebellum and hippocampus [20]. Treatment with MPH was recently reported to increase DNA damage in young and adult rats, and this damage was more pronounced with chronic treatment [52]. With regard to lithium salts, Vasconcellos and cols. demonstrated an effect of lithium on antioxidant enzymes [53]. Oxidative status regulation is a very dynamic process, and it is possible that some differences in the protocol utilized explain our negative results. Generally, the absence of increased immobility in FST, together with negative results in antioxidant enzymes argues in favor of the security of MPH, but controversy regarding this matter exists and more studies are needed.

## **5. CONCLUSIONS**

Hyperactivity induced by acute methylphenidate demonstrated face validity, but no predictive validity as a model of mania. The association of MPH and lithium may have anxiolytic properties and may increase exploratory activity in a novel environment. A sub-chronic MPH treatment induced antidepressive behavior, as measured 24h after the last administration. These results were not correlated with any alteration in antioxidant measurements.

We declare that the experiments comply with the current laws of the Brazil for scientific research.

## **6. REFERENCES**

[1] Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC: Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:209–224.

[2] Gould TD, O'Donnell KC, Picchini AM, Manji HK: Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:1321-1333.

[3] Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ et al.: Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 2006;79:281-286.

[4] Winslow BT, Voorhees KI, Pehl KA: Methamphetamine abuse. *Am Fam Physician* 2007;76:1169-1174.

[5] London ED, Simon SL, Berman SM, Mandelkern MA, Lichtman AM, Bramen J. et al.: Mood disturbances and regional cerebral metabolic abnormalities in recently abstinent methamphetamine abusers. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:73-84.

[6] Silverstone T: Appetite suppressants. A review. *Drugs* 1992;43:820-836.

[7] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M: Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-167.

[8] Lapin IP: Anxiogenic effect of phenylethylamine and amphetamine in the elevated plus-maze in mice and its attenuation by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:241-243.

[9] Cancela LM, Basso AM, Martijena ID, Capriles NR, Molina VA: A dopaminergic mechanism is involved in the 'anxiogenic-like' response induced by

chronic amphetamine treatment: a behavioral and neurochemical study. *Brain Res* 2001;909:179-186.

[10] Duncan GE, Paul IA, Harden TK, Mueller RA, Stumpf WE, Breese GR: Rapid down regulation of beta adrenergic receptors by combining antidepressant drugs with forced swim: a model of antidepressant-induced neural adaptation. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234:402-408.

[11] Wieland S, Lucki I: Antidepressant-like activity of 5-HT<sub>1A</sub> agonists measured with the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;101:497-504.

[12] Kokkinidis L, Zacharko RM, Anisman H: Amphetamine withdrawal: a behavioral evaluation. *Life Sci* 1986;38:1617-1623.

[13] Cryan JF, Hoyer D, Markou A: Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biol Psychiatry* 2003;54:49-58.

[14] Wan FJ, Lin HC, Huang KL, Tseng CJ, Wong CS: Systemic administration of d-amphetamine induces long-lasting oxidative stress in the rat striatum. *Life Sci* 2000;66:205-212.

[15] Lotharius J, O'Malley KL: Role of mitochondrial dysfunction and dopamine-dependent oxidative stress in amphetamine-induced toxicity. *Ann Neurol* 2001;49:79-89.

[16] D'Almeida V, Camarini R, Azzalis LA, Mattei R, Junqueira VB, Carlini EA: Antioxidant defense in rat brain after chronic treatment with anorectic drugs. *Toxicol Lett* 1995;81:101-105.

[17] Yu H, Rothman RB, Dersch CM, Partilla JS, Rice KC: Uptake and release effects of diethylpropion and its metabolites with biogenic amine transporters. *Bioorg Med Chem* 2000;8:2689-2692.

[18] Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D. et al.: Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:51-57.

[19] Easton N, Steward C, Marshall F, Fone K, Marsden C: Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. *Neuropharmacology* 2007;52:405-414.

[20] Martins MR, Reinke A, Petronilho FC, Gomes KM, Dal-Pizzol F, Quevedo J: Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. *Brain Res* 2006;1078:189-197.

[21] Cade JFJ: Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 1949;2:349-352.

[22] Yatham LN, Kennedy SH, O'Donovan C, Parikh S, MacQueen G, McIntyre R. et al.: Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies. *Bipolar Disord* 2005;7 Suppl 3:5-69.

[23] Pascual T, Gonzales JL: A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Research* 1995;695:289-292.

[24] Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate CA Jr, Manji HK: Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology* 2010;62:50-60.

- [25] Vasconcellos AP, Tabajara AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaz C: Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav* 2003;79:143-149.
- [26] Weil ZM, Norman GJ, Devries AC, Nelson RJ: The injured nervous system: A Darwinian perspective. *Prog Neurobiol* 2008;86:48-59.
- [27] Kehrer JP: Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 2000;62:235-236.
- [28] Rocha E, Rodnight R: Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. *J Neurochem* 1994; 63:1582-1584.
- [29] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M: Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730-732.
- [30] Carlezon WA Jr, Mague SD, Andersen SL: Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 2003;54:1330-1337.
- [31] Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.
- [32] Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD: Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 1992;17:299-311.
- [33] Delmas-Beauvieux MC, Combe C, Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, de Précigout V et al.: Evaluation of red blood cell lipoperoxidation in hemodialysed patients during erythropoietin therapy supplemented or not with iron. *Nephron* 1995;69:404-410.
- [34] Wendel A: Hepatic lipid peroxidation: caused by acute drug intoxication, prevented by liposomal glutathione. *Int J Clin Pharmacol Res* 1983;3:443-447.

[35] Gaytan O, Ghelani D, Martin S, Swann A, Dafny N: Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of dark cycle. *Brain Research* 1996;727:13-21.

[36] Aoyama T, Yamamoto K, Kotaki H, Sawada Y, Iga T: Pharmacodynamic modeling for change of locomotor activity by methylphenidate in rats. *Pharmaceutical Research* 1997;14:1601-1606.

[37] Yang P, Singhal N, Modi G, Swann A, Dafny N: Effects of lithium chloride on induction and expression of methylphenidate sensitization. *Eur J Pharmacol* 2001; 426:65-72.

[38] Willner P: Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:131-136.

[39] Gottesman II, Gould TD: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 2003;160:636-645.

[40] O'donnell KC, Gould TD: The behavioral actions of lithium in rodent models: Leads to develop novel therapeutics. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:932-962.

[41] Koehler-Troy C, Strober M, Malenbaum R: Methylphenidate-induced mania in a prepubertal child. *J Clin Psychiatry* 1986;47:566-567.

[42] Prut L, Belzung C: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3-33.

[43] Carobrez AP, Bertoglio LJ: Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:1193-1205.

[44] Kowatch RA, Sethuraman G, Hume JH, Kromelis M, Weinberg WA: Combination pharmacotherapy in children and adolescents with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2003;53:978-984.

[45] Carlson GA, Rapport MD, Kelly KL, Pataki CS: The effects of methylphenidate and lithium on attention and activity level. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1992;31:262–270.

[46] Galynker I, Ieronimo C, Miner C, Rosenblum J, Vilkas N, Rosenthal R: Methylphenidate treatment of negative symptoms in patients with dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1997;9:231-239.

[47] Teixeira AL Jr, Caramelli P: Apathy in Alzheimer's disease. *Rev Bras Psiquiatr* 2006;28:238-241.

[48] Lucki I: The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523-532.

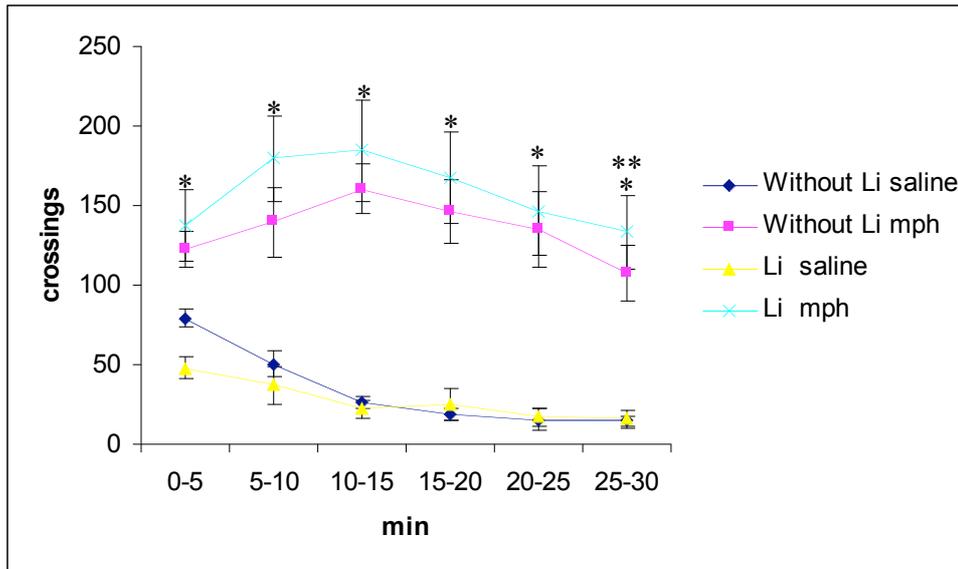
[49] Gadow KD, Nolan EE, Sverd J, Sprafkin J, Schwartz J: Anxiety and depression symptoms and response to methylphenidate in children with attention-deficit hyperactivity disorder and tic disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22:267-274.

[50] Ravindran AV, Kennedy SH, O'Donovan MC, Fallu A, Camacho F, Binder CE: Osmotic-release oral system methylphenidate augmentation of antidepressant monotherapy in major depressive disorder: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* 2008;69:87-94.

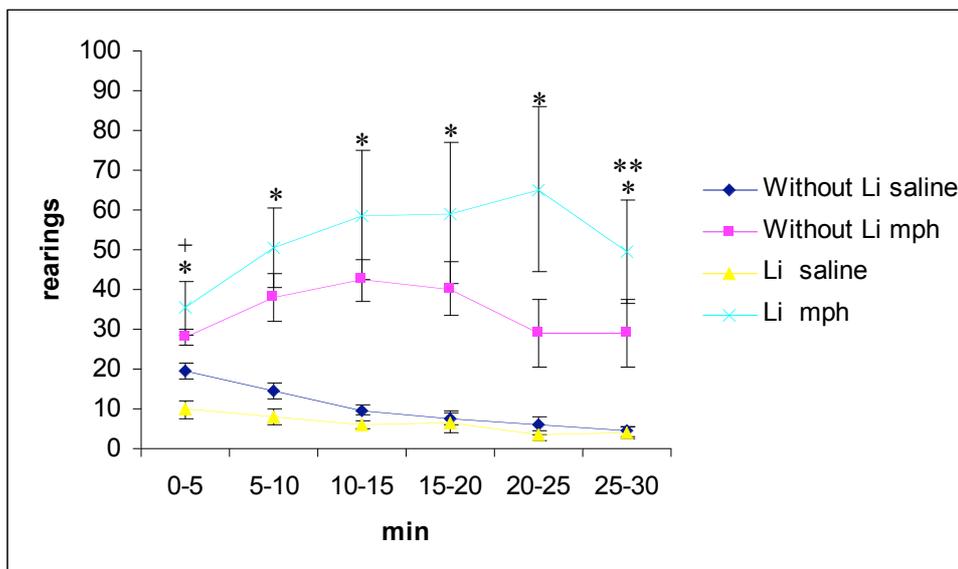
[51] Patkar AA, Masand PS, Pae CU, Peindl K, Hooper-Wood C, Mannelli P et al.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of augmentation with an extended release formulation of methylphenidate in outpatients with treatment-resistant depression. *J Clin Psychopharmacol* 2006;26:653-656.

[52] Andreazza AC, Frey BN, Valvassori SS, Zanotto C, Gomes KM, Comim CM et al.: DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1282-1288.

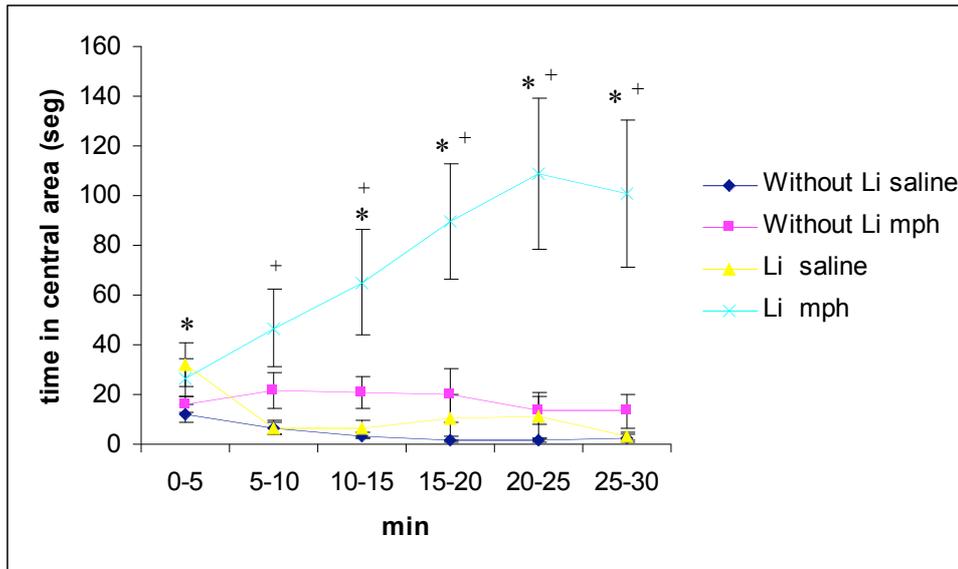
[53] de Vasconcellos AP, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, de Almeida LM, Prediger ME, et al.: Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem Res* 2006;31:1141-1151.



1A

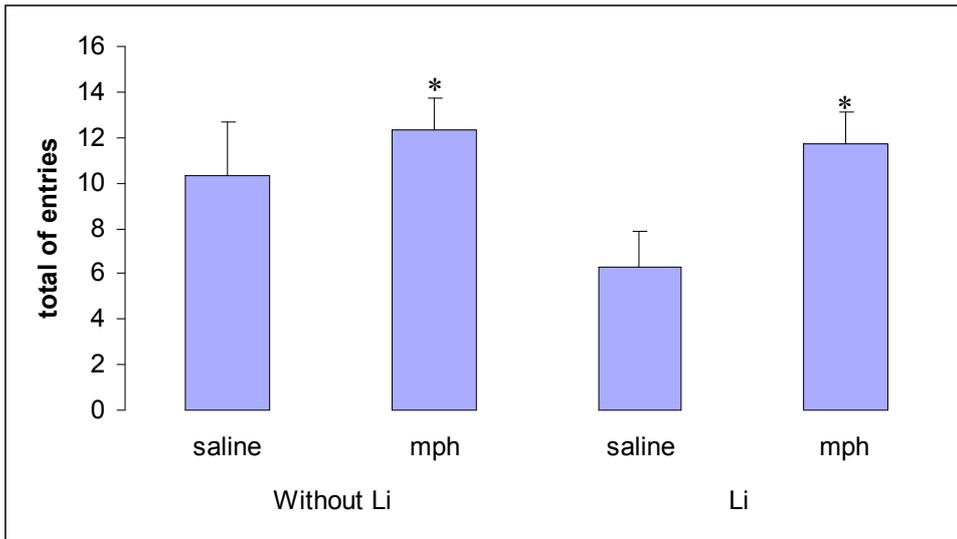


1B

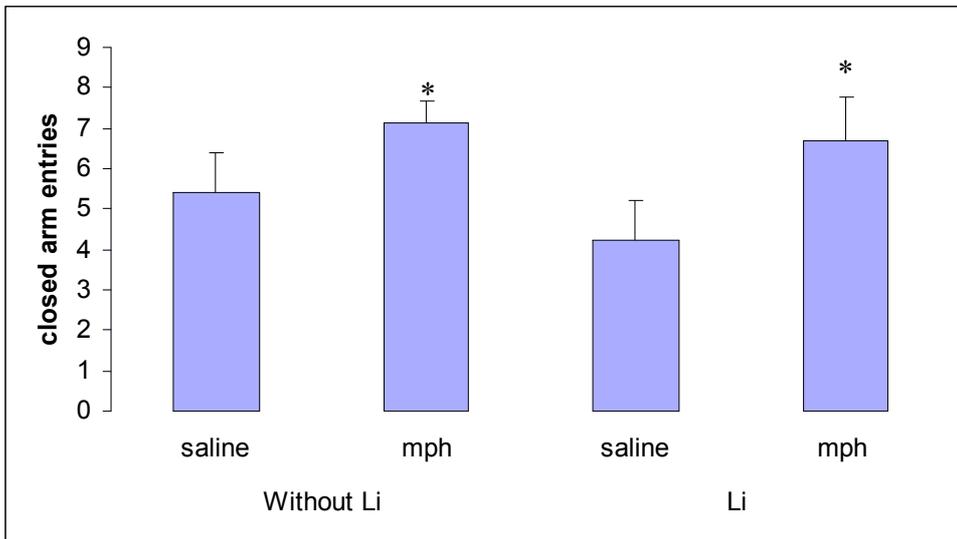


1C

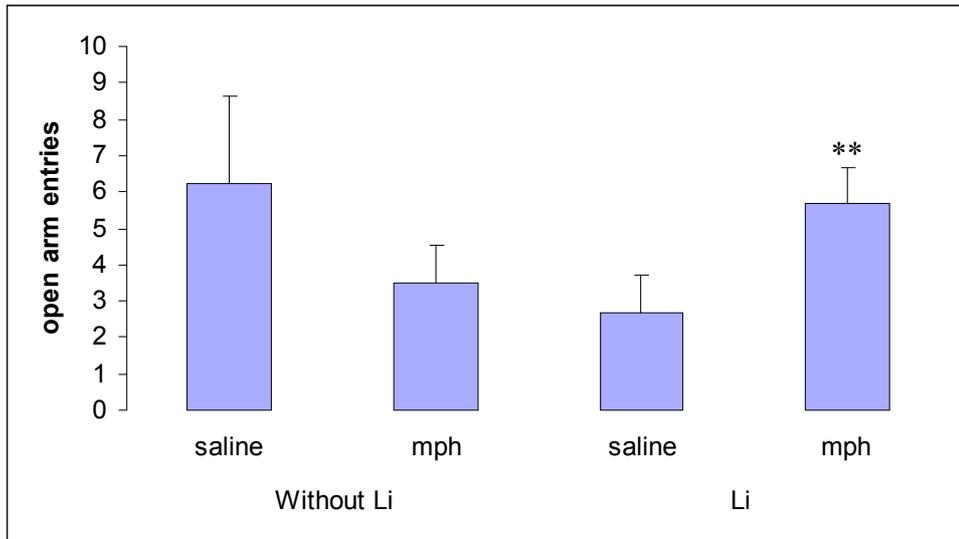
**Fig. 1(A-C):** Behavior in the open-field. **A:** Crossings. \*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA in comparison with absence of MPH; \*\*  $p < 0.001$ , repeated-measures ANOVA, interaction between MPH and time. **B:** Rearings. \*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA in comparison with absence of MPH; \*\*  $p < 0.001$ , repeated-measures ANOVA, interaction between MPH and time;  $^+ p = 0.03$ , two-way ANOVA, interaction between MPH and Li. **C:** Time spent in the central area of open field. \*  $^+ p < 0.05$ , two-way ANOVA, interaction among lithium and MPH; \*  $p < 0.05$ , two-way ANOVA, in comparison with absence of lithium;  $^+ p < 0.05$ , two-way ANOVA, in comparison with saline.



2A

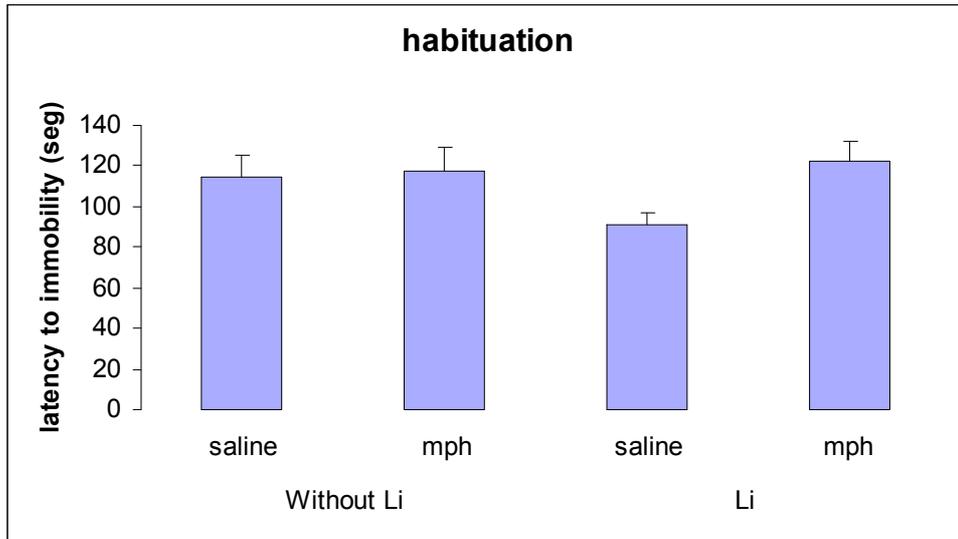


2B

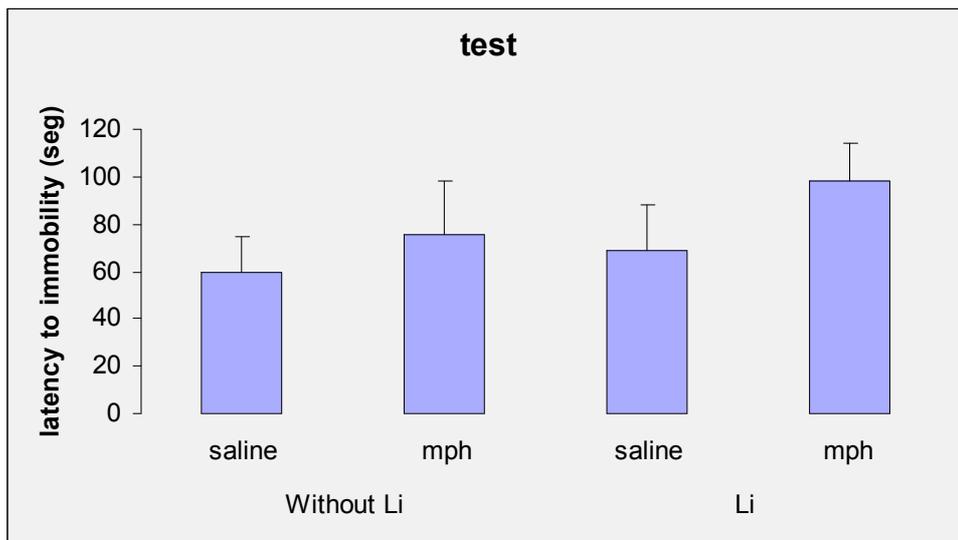


2C

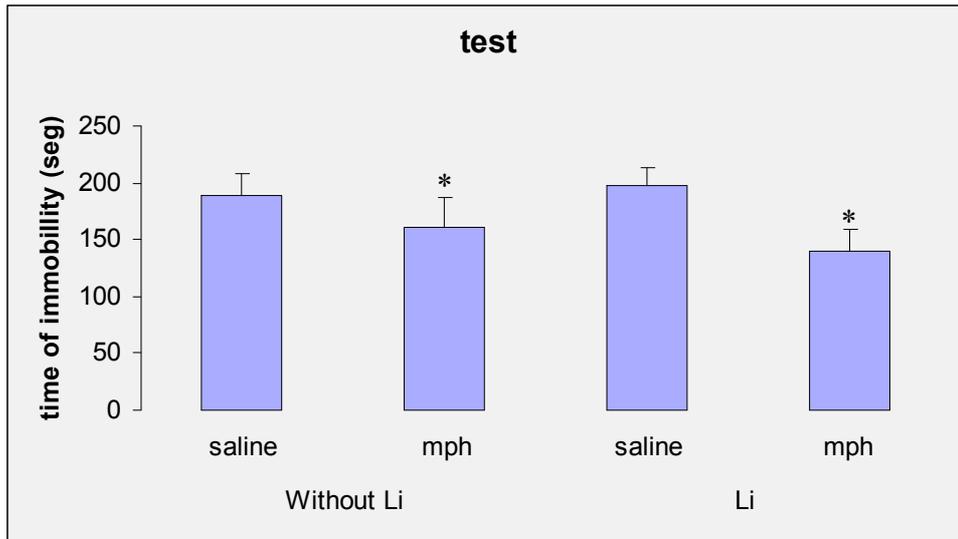
**Fig 2 (A-C):** Behavior in the elevated-plus maze. **A:** total number of entries. **B:** entries in the closed arm. **C:** entries into the open arm. \*  $p=0.04$  in comparison with absence of MPH; \*\*  $p=0.05$ , interaction between lithium and MPH effects.



3A

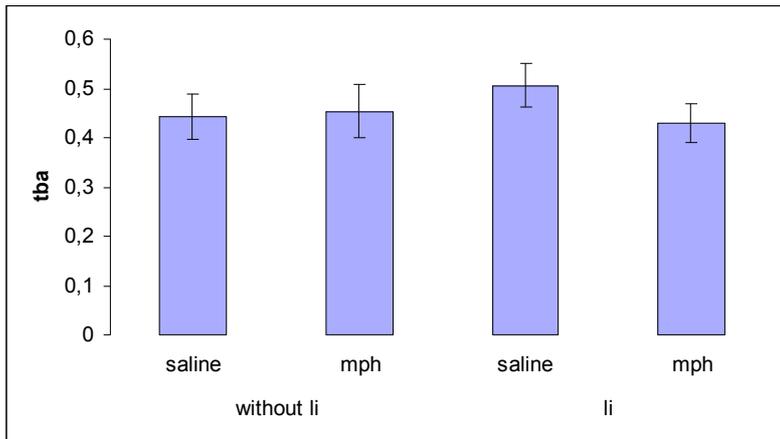


3B

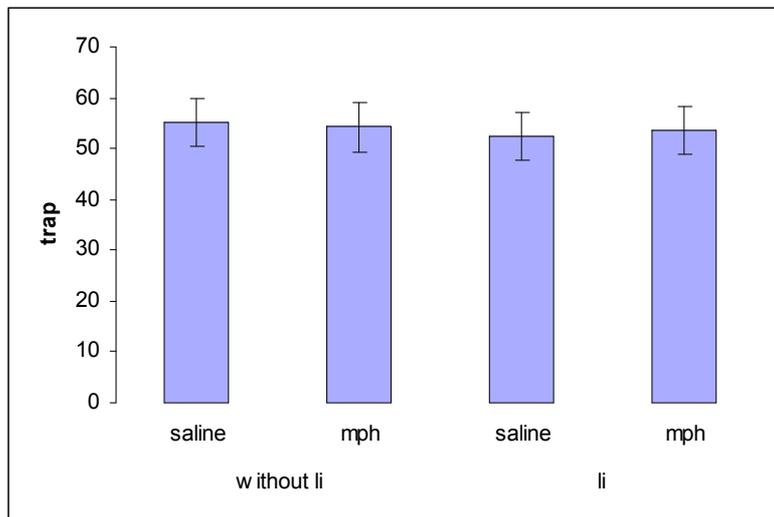


### 3C

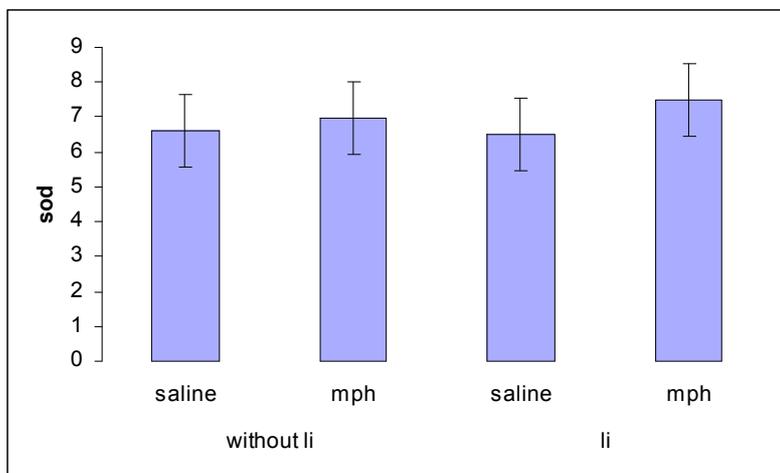
**Fig. 3(A-C):** Behavior in the forced-swimming test. **A:** habituation, latency to immobility. **B:** test, latency to immobility. **C:** test, total time of immobility. \* $p=0.05$ , two-way ANOVA, in comparison with animals without MPH.



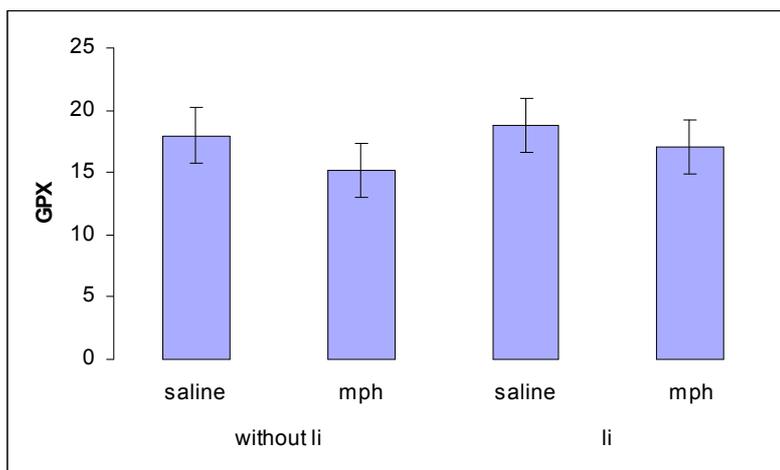
4A



4B



4C



#### 4D

**Fig. 4(A-D):** Oxidative parameters in the striatum. **A:** TBA-RS. **B:** TRAP (nmol trolox/mg of protein). **C:** SOD (units/mg). **D:** GPX (nmol NADPH oxidized/min)/mg of protein. No significant differences were found.

**CHRONIC LITHIUM INCREASES PLEASURABLE AFFECTIVE REACTIONS**

José Menna Oliveira<sup>a</sup>; Leonardo Machado Crema<sup>a</sup>; Luísa Amália Diehl<sup>a</sup> Simone Aparecida Celina das Neves Assis<sup>a</sup>; Carla Dalmaz<sup>a,b</sup>; Elizabete Rocha da Rocha<sup>a,b</sup>.

Mailing address: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37. 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/FAX: 0055-51 33085562.

a – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

b – Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: [josemennaoliveira@gmail.com](mailto:josemennaoliveira@gmail.com) (José Menna Oliveira)

Phone: 0055-51 33321987

## **ABSTRACT**

Weight gain is a common side effect of lithium treatment, and its mechanisms are poorly understood. It is possible that this treatment modifies the hedonic impact of palatable food, such as sweet food. The objective of this study was to evaluate whether lithium treatment is able to increase the hedonic sensitivity to a sweet solution. Male Wistar rats were fed for 40 days with standard or lithium-containing chow. After habituation to the procedures for the test, animals received intraoral infusions (200  $\mu$ l) of water and a 0.1M saccharose solution on two consecutive days, and tongue protrusions were registered on video for 1 min. Lithium-treated animals demonstrated an increased duration of tongue protrusions. We conclude that chronic lithium administration in chow increases positive hedonic expressions in rats. Weight gain in patients on lithium therapy may be, at least in part, mediated by an increased sensitivity to the hedonic impact of sweet food.

## **INTRODUCTION**

Lithium salts are extensively used in the treatment of affective disorders (1). Weight gain is a common side effect of lithium treatment and often responsible for poor adherence to treatment (2, 3, 4). There is no consensus about mechanisms involved in lithium-induced weight gain. Previous studies from our laboratory have demonstrated that chronic lithium administration increases consumption of sweet food (Vasconcellos AP et al., unpublished results). One hypothesis derived from these results is that lithium increases the sensitivity to hedonic stimuli or the affective value of some kinds of food.

An accepted evaluation of hedonic states that may be used in experimental animals is the taste reactivity (TR) test (5, 6, 7), in which a flavoured solution is infused directly into the intraoral cavity. Palatable solutions, such as sucrose, elicit ingestive TR behaviours such as tongue protrusions, suggesting that a stimulus is perceived as hedonic.

Lithium salts have been used in conditioned taste avoidance paradigms: IP lithium administration, paired with flavors otherwise associated with taste preference, results in negative physiological sensations and conditioned taste avoidance (8, 9, 10). These aversive properties are not observed with oral administration. Therefore, our aim was

to investigate whether lithium administered P.O. is able to influence tongue protrusions in response to a palatable flavor. In the present study, we used chronic lithium administration, since differences in weight gain in patients taking lithium are statistically significant only after chronic treatment, indicating that weight gain is a relatively late-developing correlate of lithium therapy (11).

## **METHODS**

Eighteen experimentally-naive adult male Wistar rats were housed in groups of 4 or 5 in home-cages made of Plexiglas material (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust. Animals were maintained under a standard dark-light cycle (lights on between 7:00 and 19:00 h) at a room temperature of  $22 \pm 2$  °C. The rats had free access to food (see below) and water. All animal treatments were in accordance with the institutional guidelines and according to the recommendations of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), and all efforts were made to reduce the number of animals.

Lithium was administered via chow. Lithium chloride (LiCl—2.5 mg/g of chow) and sodium chloride (NaCl—17 mg/g) were added to the food, as described by Rocha and Rodnight (12). This procedure confers lithium levels in the therapeutic range (12, 13). At the end of 40 days of treatment, the animals were subjected to the taste reactivity test. On the first day of testing, rats were placed in a transparent test chamber and gently held by a researcher for 1 min. A 58 cm × 42 cm mirror, positioned on the floor of the chamber, reflected a view of the rat's face and mouth into the close-up lens of a video camera to permit videotaping of affective facial reactions. This procedure was repeated daily for six days, in order to habituate the animal. From the 2nd to the 6th days, a 0.20 ml volume of water was delivered into the animal's mouth through an automatic dispenser (a pipette with a plastic tip that was gently introduced into the rat's mouth and delivered the solution). On the following day (test), a solution of 0.1 M saccharose was offered. Affective reactions, elicited by the taste solution, were videotaped for subsequent analysis. Duration and frequency of protrusions were scored in 1 min-video analyses (frame-by-frame, 1 frame = 1/22 s) by a person blinded to the treatment. Duration was expressed as a percentage of total frames. A positive hedonic "liking" total was compiled by adding

scores for rhythmic tongue protrusions and lateral tongue protrusions (14). Statistical analyses were performed using the *t* test. A difference was considered significant when  $p < 0.05$ . Results were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## RESULTS

When compared to controls, lithium-treated animals demonstrated an increased duration of tongue protrusions in response to both water ( $t_{1,9}=-2.092$ ,  $p=0.05$ ) and saccharose ( $t_{1,8}=-3.037$ ,  $p=0.008$ ). Lithium-treated animals also presented an increased frequency of protrusions with water ( $t_{1,8}=-2.808$ ,  $p=0.013$ ) and saccharose ( $t_{1,8}=-2.468$ ,  $p=0.025$ ). When the difference between saccharose and water scores was analyzed, lithium-treated animals presented an increased duration of protrusions (Fig. 1), but no significant alteration in relation to frequency.

## DISCUSSION

Stimuli that induce hedonic responses may work as reinforcers, eliciting or improving seeking behaviour. Sweet taste is a positive reinforcer that is sometimes used in conditioned paradigms (15, 16). Our results suggest that lithium administration increases the hedonic value of sweet food (incentive aspects of feeding behavior) and we propose that this effect may underlie the weight gain that occurs with lithium treatment, probably mediating an increase in palatable food intake.

Lithium administration has been demonstrated to attenuate self-stimulation (17), decrease voluntary consumption of alcohol (18) and reduce morphine ingestion in addicted rats (19), results that challenge our hypothesis. However, all these studies used I.P. lithium administration and, probably, the alternative effects observed are due to the irritation caused by lithium injection (9). On the other hand, rats treated with lithium show increased appetitive responses to vanilla sugar and increased dopaminergic responses in the nucleus accumbens shell, a system known to be involved in the acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats (20), and our results are in agreement with this last study.

Different neurotransmitter systems, including GABA (21), opioid (22) and cannabinoid systems (23), have been described as relevant for the neurochemical control of hedonic expressions, and several structures have been implicated in this mechanism, such as the nucleus accumbens shell, the ventral pallidum and the brainstem (14). There are reports of the action of lithium in all these systems and structures, but our experiment does not test mechanisms underlying the effects of lithium on taste reactivity.

In our study, lithium improved the hedonic impact of sweet food and also of water. The effect on water ingestion may be a consequence of the addition of Na<sup>+</sup> to chow, a procedure necessary for lithium to achieve therapeutic serum levels (12). However, when the difference between saccharose and water was considered, lithium showed a significant effect on the total time of protrusions, a result that confirms our initial hypothesis.

Weight gain, while taking lithium, has been suggested to be limited to a group of patients who are susceptible to obesity, in general, and who would therefore also be susceptible to lithium-induced weight gain (11). These patients may be more susceptible to the hedonic impact of palatable food and, therefore, to an increased appetite for this type of food. Better comprehension of this mechanism might allow the use of lithium treatment with the appropriate approach with regard to the concomitant diet.

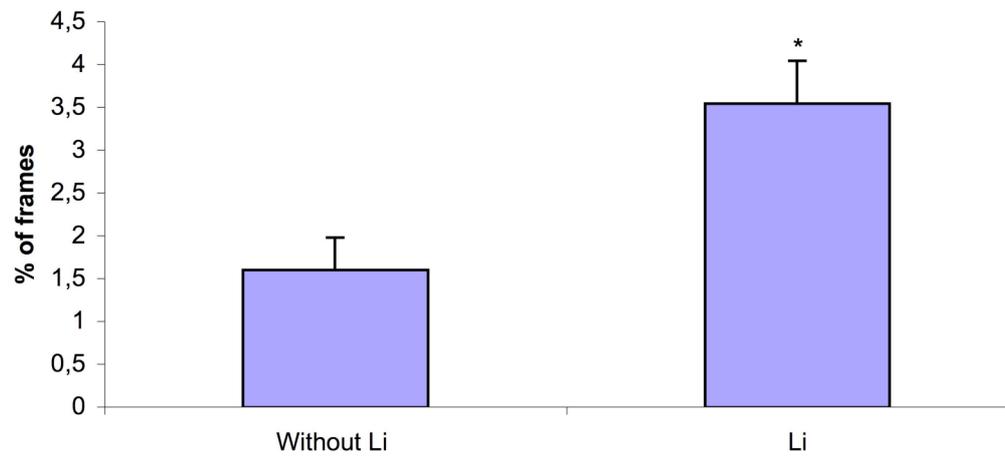
In conclusion, chronic lithium administration in chow increases positive hedonic expressions in rats. Weight gain in patients on lithium therapy may be, at least in part, mediated by an increased sensitivity to the hedonic impact of palatable food.

## REFERENCES

- (1) Nivoli AM et al. Lithium: still a cornerstone in the long-term treatment in bipolar disorder? *Neuropsychobiology* 2010; 7; 62: 27-35.
- (2) Bhuvanewar CG et al. Adverse endocrine and metabolic effects of psychotropic drugs: selective clinical review. *CNS Drugs* 2009; 23: 1003-1021.
- (3) Lenox RH, Manji HK. Lithium. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, eds. *Textbook of Psychopharmacology*. 2th ed. Washington: The American Psychiatric Press, 1998: 379-429.

- (4) Gitlin MJ et al. Maintenance lithium treatment: side effects and compliance. *J Clin Psychiatry* 1990; 51: 126–127.
- (5) Wilmouth CE, Spear LP. Hedonic sensitivity in adolescent and adult rats: taste reactivity and voluntary sucrose consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 92: 566-573.
- (6) Steiner JE et al. Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 53-74.
- (7) Grill HJ, Norgren R. The taste reactivity test: I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 1978; 143: 263-279.
- (8) Harkness JH et al. Abstinence-dependent transfer of lithium chloride-induced sucrose aversion to a sucrose-paired cue in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 208: 521-530.
- (9) O'Donnell KC, Gould TD. The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31: 932-962.
- (10) Cantora R et al. Extinction of a saccharin-lithium association: assessment by consumption and taste reactivity. *Learn Behav* 2006; 34: 37-43.
- (11) Bowden CL et al. Impact of lamotrigine and lithium on weight in obese and nonobese patients with bipolar I disorder. *Am J Psychiatry* 2006; 163: 1199-1201.
- (12) Rocha E, Rodnight R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. *J Neurochem* 1994; 63: 1582-1584.
- (13) Vasconcellos AP et al. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav* 2003; 79: 143-149.
- (14) Berridge KC. Pleasures of the brain. *Brain and Cognition* 2003; 52: 106-128.
- (15) Dwyer DM et al. A learned flavor preference persists despite the extinction of conditioned hedonic reactions to the cue flavors. *Learn Behav* 2009; 37: 305-310.
- (16) Jarosz PA et al. Effect of opioid antagonism on conditioned place preferences to snack foods. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 83: 257-264.
- (17) Edelson A et al. Effect of lithium and other alkali metals on brain chemistry and behavior. II. Intracranial self-stimulation behavior. *Psychopharmacologia* 1976; 45: 233-237.
- (18) Ho AK, Tsai CS. Effects of lithium on alcohol preference and withdrawal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1976; 273: 371-377.

- (19) Tomkiewicz M, Steinberg H. Lithium treatment reduces morphine self-administration in addict rats. *Nature* 1974; 252: 227-229.
- (20) Gambarana C et al. Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neuroscience* 2003; 121: 179-187.
- (21) Reynolds SM, Berridge KC. Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste “liking”/”disliking” reactions, place preference/avoidance, and fear. *The Journal of Neuroscience* 2002; 22: 7308-7320.
- (22) Peciña S, Berridge KC. Opioid eating site in accumbens shell mediates food intake and hedonic ‘liking’: Map based on microinjection Fos plumes. *Brain Research* 2000; 863: 71-86.
- (23) Jarret MM et al. Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on sucrose palatability as measured by the taste reactivity test. *Physiology & Behavior* 2005; 86: 475-479.



**Fig. 1:** Lithium effect on total time of tongue protrusions, expressed as a percentage of video frames. \*  $t_{1,8}=-3.074$ ,  $p=0.007$ .

**O TRATAMENTO COM LÍLIO ALTERA O CONSUMO DE ALIMENTO  
DOCE E RAÇÃO NORMAL DE BIOTÉRIO**

O tratamento com lítio altera o consumo de alimento

**LITHIUM TREATMENT ALTERS SWEET FOOD AND NORMAL CHOW  
INTAKE**

Lithium treatment alters food intake

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37. 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil.  
Phone/FAX: 0055-51 33085562.

José Menna Oliveira<sup>a</sup>; Luísa Amália Diehl<sup>a</sup>; Leticia Ferreira Pettenuzzo<sup>a</sup>; Carla  
Dalmaz<sup>a,b</sup>; Elizabete Rocha da Rocha<sup>a,b</sup>.

a – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas  
da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

b – Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS,  
Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondência: José Menna Oliveira. E-mail: josemennaoliveira@gmail.com

Telefones: (51) 9322 4836 e (51) 3332 1987

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul. Todos os direitos autorais são cedidos à Revista de Psiquiatria do Rio  
Grande do Sul.

Comunicação breve. Número de palavras: 1887

Última revisão bibliográfica sobre o assunto: 2010

Fomento: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Ganho de peso é um efeito indesejável do tratamento com lítio, cujos mecanismos podem estar associados a um aumento no apetite. Nossos objetivos são avaliar se a administração de lítio é capaz de induzir um consumo aumentado de alimento doce e de ração normal. **MÉTODO:** Ratos machos Wistar foram alimentados com ração normal ou ração contendo lítio por 14 dias. Após habituação, os animais foram testados em diferentes dias quanto a consumo de alimento doce, ração normal, e ração normal após 24 horas de privação alimentar. **RESULTADOS:** Os animais tratados com lítio apresentaram consumo elevado de alimento doce e ração normal. Após privação alimentar, o consumo de ração não diferiu entre os grupos. As latências para início do consumo foram reduzidas nos animais tratados com lítio. **CONCLUSÃO:** O consumo alimentar aumentado pode estar envolvido no ganho de peso induzido por lítio.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Weight gain is an undesirable effect of lithium treatment. It is possible that increased appetite contributes to this effect. Our aims are to evaluate if lithium treatment is able to induce increased consumption of sweet food and normal chow. **METHOD:** Male Wistar rats were fed with normal or lithium containing chow for 14 days. After habituation they were tested in different days to consumption of sweet food, normal chow and normal chow after 24h-food deprivation. **RESULTS:** In all measures lithium treated animals had an elevated intake of sweet food and normal chow except after deprivation, when there was not differences between groups. Latencies to begin to eat were reduced in lithium treated animals. **CONCLUSION:** Increased food intake may be involved in lithium induced weight gain.

## Keywords:

lítio, obesidade, apetite, ganho de peso  
lithium, obesity, appetite, weight gain

## INTRODUÇÃO

Ganho de peso é um efeito indesejável do tratamento a longo prazo com lítio, e um dos motivos de má adesão ao tratamento<sup>1,2</sup>. O mecanismo deste efeito não é conhecido, embora sugira-se que interferências no metabolismo e no sistema de trocas renais estejam envolvidas<sup>3</sup>. É também possível que, ao menos em parte, o ganho de peso com lítio esteja associado a modificações no apetite e nos hábitos alimentares dos pacientes. Nesse sentido, um estudo prévio de nosso grupo demonstrou que a administração de lítio por 4 semanas na ração de fêmeas Wistar aumentou o consumo de alimento doce (pellets do cereal Froot-Loops® – Kellog's) durante 3 minutos de exposição a este alimento<sup>4</sup>.

Tendo em vista que: (1) muitos seres humanos são expostos a grande oferta de alimentos calóricos; e (2) a hipótese de alterações no comportamento alimentar como causa do ganho de peso implicaria na manutenção de um consumo alterado – nossos objetivos no presente trabalho são avaliar os efeitos do tratamento com lítio sobre o consumo de alimento doce e ração normal, durante um período mais longo – 40 minutos (min) – de exposição ao alimento.

## MÉTODOS

Ratos machos Wistar (n=18, 90-120 dias, 293-347g) receberam ração normal ou preparada com lítio como descrito previamente<sup>5</sup> (2,5 mg LiCl + 17 mg NaCl por grama de ração) durante 35 dias, exceto no intervalo de 24 horas de privação alimentar (vide abaixo). Após 14 dias de tratamento, os animais foram habituados em caixas individuais contendo alimento doce (10 pellets do cereal Froot-Loops® - Kellog's) e testados quanto a consumo de alimento doce, ração normal e ração normal após 24 horas de privação alimentar. Os testes consistiam na exposição ao alimento durante 40 min: no caso de alimento doce, 8 sessões de 3 min nas caixas individuais contendo o alimento, intercaladas por 2 min nas caixas-moradia; no caso da ração normal, 4 sessões de 5 min nas caixas individuais intercaladas por 5 min nas caixas-moradia. Mensuravam-se em cada sessão as latências para início de consumo e a quantidade de alimento ingerida. A análise estatística foi realizada através do teste *t* para amostras independentes ou da ANOVA de medidas repetidas quando indicado, e

os valores expressos como media  $\pm$  erro padrão. Uma diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Os animais foram tratados de acordo com os princípios de ética em pesquisa institucionais.

## RESULTADOS

Os animais tratados com lítio exibiram em todas as medidas aumento no consumo de alimento doce e de ração normal, ingerindo no total  $29,4 \pm 4,7$  pellets doces em comparação com  $9,9 \pm 2$  nos animais controle ( $t_{1,8} = -3,851$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 1A) e  $5086 \pm 877$  mg de ração normal em comparação com  $168 \pm 152$  nos controles ( $t_{1,6} = -5,522$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 1B). Após privação de alimento ambos os grupos exibiam aumento no consumo, sem diferença entre si (Fig. 1C).

Os animais tratados com lítio exibiam menor latência que os controles para iniciar o consumo tanto de alimento doce ( $211,2 \pm 140,6$  segundos para os tratados com lítio e  $801 \pm 89,6$  segundos para os controles,  $t_{1,8} = 3,536$ ,  $p = 0,003$ ), como de ração normal ( $217 \pm 164$  segundos para os tratados com lítio e  $971 \pm 130$  segundos para os controles,  $t_{1,6} = 3,608$ ,  $p < 0,005$ ). Após privação alimentar não houve diferenças entre os grupos quanto às latências. A latência para consumo de doce (mas não de ração normal) inicialmente diminuía e em seguida aumentava nos animais controle, enquanto se mantinha reduzida ao longo do tempo nos animais tratados com lítio (ANOVA de medidas repetidas,  $p = 0,03$ ).

## DISCUSSÃO

Neste experimento a administração do lítio levou a maior consumo tanto de alimento doce como de ração normal, e a menor latência para início de consumo. Em animais de laboratório, a taxa de ingestão normal diminui discretamente durante uma refeição, e em sessões repetidas de observação as latências para começar uma refeição diminuem e em seguida aumentam<sup>6</sup>. Nos animais tratados com lítio, as latências se mantinham reduzidas. Tais resultados falam a favor de uma interferência do tratamento com lítio sobre os sistemas reguladores do apetite e saciedade, e sugerem que uma ingestão aumentada de alimentos pode contribuir para o ganho de peso

observado em alguns pacientes em uso de lítio. Após a privação alimentar, ambos grupos apresentaram consumo elevado, sem diferenças entre si. Interpretamos que, independentemente da privação, os animais tratados com lítio comem tão rápido quanto podem e, mesmo quando dispõem de alimento nas caixas-moradia, comportam-se como os animais em privação alimentar.

O consumo de alimento é regulado por um sistema complexo envolvendo componentes periféricos e eferências prosencefálicas que convergem em regiões caudais do tronco cerebral<sup>7</sup>. Em diversos componentes dessa circuitaria observam-se alvos moleculares do lítio, como os sistemas de transdução de sinal  $IP_3$ -DAG<sup>8</sup>, AMPc<sup>9</sup> e Ácido araquidônico<sup>10</sup>, sugerindo possíveis explicações farmacodinâmicas para a influência do lítio sobre o comportamento alimentar e constituindo possíveis objetos de estudos futuros.

Embora se tenha observado aumento no consumo alimentar, a técnica experimental utilizada não modela ganho de peso: em trabalhos anteriores demonstrou-se um retardo no ganho de peso normal em animais tratados com lítio nas primeiras duas semanas de tratamento, e uma tendência para redução de peso em comparação com os controles em determinados pontos específicos do experimento<sup>11,4</sup>. Uma possível explicação para isso é o fato de que nesses experimentos alimentos de alto valor calórico foram disponibilizados apenas durante os testes e procedimentos de habituação, enquanto humanos em tratamento com lítio têm acesso irrestrito a esse tipo de alimento.

Até onde é de nosso conhecimento a literatura sobre a influência do tratamento com lítio no consumo alimentar de humanos é escassa, possivelmente por dificuldades de mensurar de forma confiável a ingestão alimentar por longos períodos. Em um pequeno estudo envolvendo 5 voluntários em litioterapia com níveis séricos entre 0,5 e 0,8 mmol/L, foi demonstrado um discreto aumento no consumo em uma refeição específica, embora os indivíduos tratados não tenham experimentado aumento de peso<sup>12</sup>.

Com mais de meio século de uso, o lítio ainda é peça fundamental no tratamento do transtorno bipolar<sup>13</sup>. Embora dados recentes apontem para um menor ganho de peso na manutenção do tratamento com lítio em comparação com outros estabilizadores do humor<sup>14</sup>, este ainda é um parefeito relevante. Nossos resultados somam-se aos esforços no sentido de compreender mecanismos de efeitos adversos deste fármaco e desenvolver estratégias que melhorem a adesão ao tratamento.

## CONCLUSÃO

Em animais de laboratório o tratamento com lítio aumentou o consumo de alimento doce e de ração normal. Consumo alimentar aumentado pode estar envolvido no ganho de peso induzido pelo tratamento com lítio.

## REFERÊNCIAS

- (1) Garland EJ, Remick RA, Zis AP. Weight gain with antidepressants and lithium. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1988;8:323-30.
- (2) Baptista T, Teneud L, Contreras Q, Alastre T, Burguera JL, de Burguera M, de Baptista E, Weiss S, Hernández L. Lithium and body weight gain. *Pharmacopsychiatry*. 1995;28:35-44.
- (3) Grünfeld JP, Rossier BC. Lithium nephrotoxicity revisited. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5:270-6.
- (4) Oliveira JM. Efeitos do tratamento com lítio e/ou estradiol sobre um modelo de estresse crônico variado [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
- (5) Rocha E, Rodnight R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. *J Neurochem* 1994;63:1582-4.
- (6) Clifton PG. Eating. In: Whishaw IQ, Kolb B, ed. *The Behavior of the Laboratory Rat*. New York: Oxford University Press; 2005. p. 197-206.
- (7) Schwartz GJ. Brainstem integrative function in the central nervous system control of food intake. *Forum Nutr*. 2010;63:141-51.
- (8) Serretti A, Drago A, De Ronchi D. Lithium pharmacodynamics and pharmacogenetics: focus on inositol mono phosphatase (IMPase), inositol poliphosphatase (IPPase) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 beta). *Curr Med Chem*. 2009;16:1917-48.

(9) Wiborg O, Krüger T, Jakobsen SN. Region-selective effects of long-term lithium and carbamazepine administration on cyclic AMP levels in rat brain. *Pharmacol Toxicol.* 1999;84:88-93.

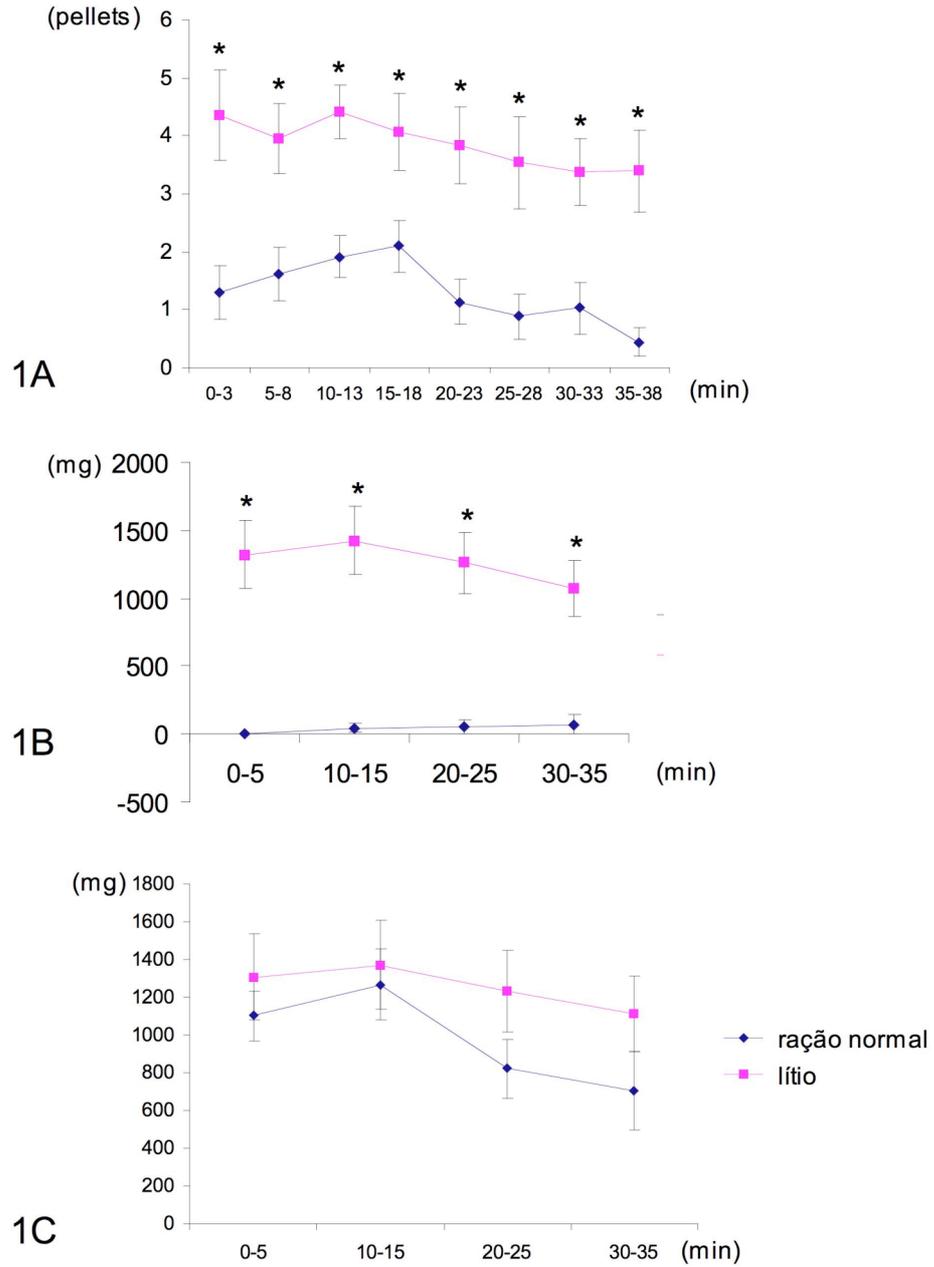
(10) Basselin M, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Chronic lithium chloride administration to unanesthetized rats attenuates brain dopamine D2-like receptor-initiated signaling via arachidonic acid. *Pharmacopsychiatry.* 1995;28:35-44.

(11) Vasconcellos APS. Avaliação da atividade neuroprotetora e antidepressiva do tratamento com lítio em um modelo de estresse crônico variado [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

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

(13) Nivoli AM, Murru A, Vieta E. Lithium: still a cornerstone in the long-term treatment in bipolar disorder? *Neuropsychobiology.* 2010;62:27-35.

(14) Coryell W. Maintenance treatment in bipolar disorder: a reassessment of lithium as the first choice. *Bipolar Disord.* 2009;11:77-83.



**Fig. 1:** consumo de alimento. **1A:** consumo de alimento doce,  $*p < 0,001$ ; **1B:** consumo de ração normal sem privação,  $*p < 0,001$ ; **1C:** consumo de ração normal após privação alimentar.

**LITHIUM AND METHYLPHENIDATE: OPPOSITE EFFECTS ON PERIRENAL BROWN FAT**

**Lithium and methylphenidate: opposite effects**

**LÍTIO E METILFENIDATO: EFEITOS OPOSTOS SOBRE A GORDURA PERIRENAL**

**Lítio e metilfenidato: efeitos opostos**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37. 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil. Phone/FAX: 0055-51 33085562.

José Menna Oliveira<sup>a</sup>; Leonardo Machado Crema<sup>a</sup>; Luísa Amália Diehl<sup>a</sup>; Letícia Ferreira Pettenuzzo<sup>a</sup>; Liane Tavares Bertinette<sup>a</sup>; Carla Dalmaz<sup>a,b</sup>; Elizabete Rocha da Rocha<sup>a,b</sup>.

a – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

b – Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondência: José Menna Oliveira. E-mail: josemennaoliveira@gmail.com

Telefones: (51) 9322 4836 e (51) 3332 1987

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os direitos autorais são cedidos à Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul.

Comunicação breve. Número de palavras: 1610

Última revisão bibliográfica sobre o assunto: outubro de 2009

Fomento: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00.

## **ABSTRACT**

To evaluate how lithium administration to adult rats affects brown (perirenal) and white (inguinal) adipose tissues and if methylphenidate modulates lithium effects, adult male Wistar rats were fed with a regular or a lithium containing chow for 30 days. Between days 15 to 30 of treatment, animals received daily I.P. administrations of either methylphenidate or saline. Lithium significantly reduced perirenal fat and this effect was minimized by methylphenidate administration. There was no significant between-group effect regarding inguinal fat. These findings suggest that a differential effect on white and brown tissue distribution may be involved in lithium-induced weight gain.

## **RESUMO**

Para avaliar como a administração de lítio a ratos adultos afeta o tecido adiposo marrom (perirenal) e branco (inguinal), ratos Wistar adultos foram alimentados com ração normal ou contendo lítio por 30 dias. Entre os dias 15 e 30 de tratamento os animais receberam doses I.P. diárias de metilfenidato ou salina. A administração de lítio reduziu significativamente a gordura perirenal. Esse efeito foi reduzido com a administração de metilfenidato. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação à gordura inguinal. Tais achados sugerem que um efeito diferenciado sobre os tecidos adiposos marrom e branco pode estar envolvido no ganho de peso induzido pelo tratamento com lítio.

### **Keywords:**

lithium, methylphenidate, obesity, weight gain

lítio, metilfenidato, obesidade, ganho de peso

## INTRODUCTION

In mammal's abdomen, brown and white adipose tissues (BAT and WAT, respectively) are distinctly localized and have different, complementary functions: BAT is predominantly found in perirenal tissue and mobilizes its accumulated energy as heat in response to noradrenergic stimulation, while WAT occupies inguinal tissue and mobilizes its lipid reservoirs in response to metabolic needs between meals<sup>1, 2</sup>. There is good evidence of a regulatory role of BAT on WAT, as demonstrated by genetic studies in which impaired BAT activity has been associated with obesity, hyperlipidemia and insulin resistance<sup>3</sup>.

Weight gain is a common side effect of lithium therapy in humans<sup>4</sup>, but the mechanisms of this effect is not well established<sup>5</sup>. Cell-culture studies with adipocyte precursors demonstrate an inhibitory effect of lithium on differentiation of white<sup>6</sup> and brown<sup>7</sup> adipocytes.

Our aims are to evaluate if lithium administration to adult rats is able to independently modify perirenal (BAT) and inguinal (WAT) tissues and, since BAT is under noradrenergic control<sup>8</sup>, if methylphenidate (MPH), a dopaminergic and noradrenergic drug, is able to modulate lithium effects. MPH was chosen because attention-deficit with hyperactivity have been recently recognized a common comorbidity in bipolar patients<sup>9</sup>, and the co-prescription of both drugs (lithium and MPH) is becoming frequent in clinical practice.

## METHODS

Twenty-five adult male Wistar rats, 90-120-days old, 160-220 g of weight, were used. Animals were fed with regular or a lithium containing chow (2.5 mg LiCl + 17 mg NaCl /g of chow) as described<sup>10</sup> for 30 days. This lithium treatment leads to serum levels between 0.4 and 1.2 mEq/l<sup>11</sup>. Between days 15 to 30 of treatment, animals in each group received daily I.P. administrations of a solution containing MPH (5 mg/Kg) or saline. This is frequently employed in experiments using rats<sup>12, 13</sup>. In the 30th day of treatment animals were decapitated and perirenal and inguinal

fat stores dissected and weighted, using a scale with 0.0001 g precision. All animal treatments were in accordance with the institutional guidelines and followed the principles of laboratory animal care recommendations. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) and results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## RESULTS

Lithium administration decreased animal weight,  $h^2=0.49$ , and MPH counterbalanced this effect,  $F(1,25)=6.94$ ,  $p=0.01$ ,  $h^2=0.11$  for the interaction between lithium and MPH. Figure 1 shows the effect of lithium and methylphenidate on abdominal fat. Lithium significantly reduced total abdominal fat,  $F(1,25)=7.19$ ,  $p=0.01$ ,  $h^2=0.26$  and MPH administration counteracted this effect: a significant interaction lithium x MPH was observed,  $F(1,25)=5.24$ ,  $p=0.03$ ,  $h^2=0.20$ . Perirenal fat was reduced by chronic lithium administration,  $F(1,25)=5.90$ ,  $p=0.02$ ,  $h^2=0.22$ , and this effect was minimized by MPH administration: significant interaction lithium x MPH,  $F(1,25)=6.15$ ,  $p=0.02$ ,  $h^2=0.23$ . In regard to inguinal fat, there was no significant differences between groups, although a non-significant reduction in the lithium-treated animals was observed,  $p=0.07$ ,  $h^2=0.06$  (Fig. 1).

## DISCUSSION

We found that 30 days of lithium treatment reduced total and perirenal fat and this effect was counterbalanced by MPH administration. To our knowledge, there are no other studies that evaluate lithium effects on perirenal and inguinal fat in vivo.

Previous studies with cell cultures have shown that lithium inhibits adipocyte differentiation: inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells, mouse preadipocyte models, is inhibited by lithium<sup>6</sup>, and also expression of mRNAs for UCP-1, PG-1alpha and PPAR-alpha, specific genes of brown differentiated tissue<sup>7</sup>. This seems to occur via inhibition of GSK-3B and hence, indirectly, enhancement of transmission via Wnt signaling pathway<sup>14, 15</sup>.

A reduction in BAT may be explained by decreased synthesis or increased degradation of triacylglycerol depots. Stimulation of BAT occurs mainly via beta-adrenergic receptors and the cAMP signal transduction pathway and there are well documented effects of lithium interfering with noradrenaline poll, expression of adrenoreceptors, Gs and Gi-proteins and adenilcyclase function<sup>5,16</sup>. This may, at least in part, explain our results. Also, inhibition of GSK-B by lithium and consequently enhancement of Wnt signaling may underlie the herein observed effects on fat stores.

The counterbalance of lithium effect by MPH is in accordance with the known noradrenergic stimulation of BAT. MPH inhibits noradrenaline and dopamine transporters with a  $K_i$  of  $0.17 \pm 0.03$  and  $0.26 \pm 0.03$   $\mu$ M, respectively<sup>17</sup>. In this way, administration of noradrenaline to cells with differentiation inhibited by 5 mM of lithium from the 4th day of culture leads to UCP-1 mRNA expression, a characteristic of brown activated tissue<sup>7</sup>.

However, despite our results are in coherence with the reported literature, there are some relevant observations. First, treatment's effect sizes in this study are small and data may be considered in this perspective. Second, effects on cellular differentiation on cell cultures are not the same as in adult tissues. Actually, it was described that in the seventh day of culture, when cells are already differentiated, lithium treatment does not modify cells<sup>7</sup>.

Lithium inhibitory effect on differentiation and, according our results, on fat mass (BAT, in particular) seems a paradox in light of the known weight gain with lithium treatment in humans. There are some possible explanations to that. First, in great mammals, like humans, BAT decreases importantly after birth, but in rodents BAT persists all lifelong<sup>1</sup>. This may contribute to inter-species differences in regulation BAT/WAT and to inter-species differences in effects of lithium treatment. Second, it is possible that alterations in the texture or palatability of the chow have modified consumption, although an experiment using normal chow prepared with NaCl in the same concentrations used in the present study did not alter consumption of animals, and in another experiment animals receiving the same lithium containing chow eat more normal chow and high-caloric food that controls<sup>18, 19</sup>. Also, once genetic manipulations in witch BAT features are underexpressed causes obesity and insuline

resistance<sup>20</sup>, and since obesity does not develop suddenly, it is possible that differences in inguinal fat were observed if animals were observed in a longer period. This may be a matter for future studies.

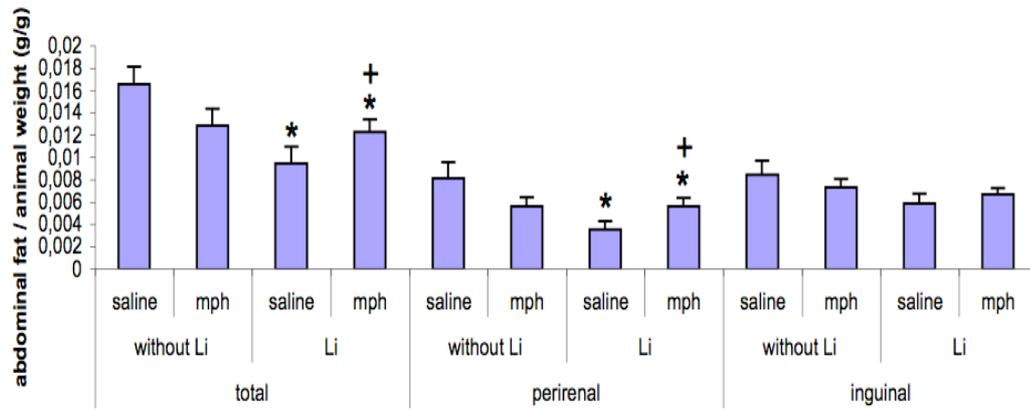
## REFERENCES

1. Hansen JB, Kristiansen K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochemical Journal*. 2006;398:153-68.
2. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*. 2004;84:277-359.
3. Lowell BB, Susulic VS, Harmann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*. 1993;366:740-2.
4. Garland EJ, Remick RA, Zis AP. Weight gain with antidepressants and lithium. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 1988;8:323-30.
5. Lenox RH, Manji HK. Lithium. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB, ed. *Textbook of Psychopharmacology*. 2nd ed. Washington: The American Psychiatric Press; 1998. p. 379-429.
6. Aratani Y, Sugimoto E, Kitagawa Y. Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS Letters*. 1987;218: 47-51.
7. Rodríguez de la Concepción ML, Yubero P, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Lithium inhibits brown adipocyte differentiation. *FEBS Letters*. 2005;579:1670-4.
8. Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005;53:671-83.
9. Tamam L, Karakus G, Ozpoyraz N. Comorbidity of adult attention-deficit hyperactivity disorder and bipolar disorder: prevalence and clinical correlates. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2008; 258:385-93.
10. Vasconcellos AP, Tabajara AS, Ferrari C, Rocha E, Dalmaz C. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiology & Behavior*. 2003;79:143-9.

11. Rocha E, Rodnighi R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 1994;63:1582-4.
12. Cassaday HJ, Finger BC, Horsley RR. Methylphenidate and nicotine focus responding to an informative discrete CS over successive sessions of appetitive conditioning. *Journal of Psychopharmacology*. 2008;8:849-59.
13. Duchin D, Taukulis HK. Chronic oral methylphenidate administration to periadolescent rats yields prolonged impairment of memory for objects. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2007;88:312-20.
14. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000;289:950-3.
15. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C. Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. *BMC Cell Biology*. 2008;9:11.
16. Jope RS. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Molecular Psychiatry*. 1999;4:117-28.
17. Han DD, Gu HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacology*. 2006;6:6.
18. Vasconcellos APS. Personal communication. [anavasco21@hotmail.com](mailto:anavasco21@hotmail.com)
19. Oliveira J, Crema LM, Diehl LA, Pettenuzzo LF, Dalmaz C, Rocha ER. Chronic lithium increases food intake and pleasurable affective reactions. Manuscript in preparation. [josemennaoliveira@gmail.com](mailto:josemennaoliveira@gmail.com)
20. Yang X, Enerback S, Smith U. Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obesity Research*. 2003;11:1182-91.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Financial Support: CNPq, Capes and FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00.



**Figure 1:** Lithium and methylphenidate effects on abdominal fat. Total abdominal fat in relation to animal weight: \*  $p=0.01$  to lithium effect, +  $p=0.03$  to interaction among lithium and MPH. Perirenal fat in relation to animal weight: \*  $p=0.02$  to lithium effect, +  $p=0.02$  to interaction among lithium and MPH. Inguinal fat in relation to animal weight: no significant differences were found.

# **DISCUSSÃO GERAL**

Os principais resultados deste trabalho podem ser sumarizados como segue:

#### **Aspectos comportamentais e bioquímicos da interação lítio x MPH:**

- MPH induziu hiperatividade mas esta não foi influenciada pelo tratamento com lítio.
- A associação de MPH e lítio aumentou o tempo na área central do campo aberto e o número de reações de orientação nos primeiros 5 minutos desta tarefa.
- MPH reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.
- Tanto MPH como lítio não demonstraram efeitos sobre as medidas de estresse oxidativo.

#### **Possíveis mecanismos para o ganho de peso associado ao tratamento com lítio:**

O tratamento com lítio aumentou o caráter hedônico de uma solução doce, aumentou o consumo de alimento doce e ração normal, e influenciou seletivamente o tecido adiposo perirrenal.



Sais de lítio vêm sendo utilizados em medicina há mais de um século e meio, e há pelo menos seis décadas tal prática se apóia em investigações científicas cuja metodologia se considera aceitável atualmente. Um tratamento com doses de 1.200mg/dia tem preço máximo ao consumidor brasileiro inferior a R\$ 35,00 em farmácias comuns, e pode ser obtido gratuitamente na rede pública. O contraste com o custo de outros medicamentos eficazes no manejo do transtorno bipolar é significativo – por exemplo, o tratamento com 15mg/dia do antipsicótico atípico olanzapina pode ter um custo mensal superior a R\$ 900,00. Além de sua utilidade clínica no manejo do THB, o lítio pode ser útil, em psiquiatria, no tratamento da depressão (como potencializador de fármacos antidepressivos) (Heit e Nemeroff, 1998), da agressividade (do Prado-Lima et al., 2001), e de alguns sintomas em transtornos de personalidade (Bellino et al., 2008). Condições não psiquiátricas em que o tratamento com lítio pode ser útil incluem a neutropenia (Focosi et al., 2008) e o hipertireoidismo (Lazarus, 2009). Na década de 90 foi publicado o primeiro trabalho sugerindo

propriedades neuroprotetoras deste íon (Pascual e Gonzales, 1995), e desde então o campo de pesquisa lítio e neuroproteção vem crescendo. Nos últimos anos, vêm sendo publicados estudos clínicos sugerindo um efeito benéfico do lítio em transtornos neurodegenerativos como demências (Kessing et al., 2010), esclerose lateral amiotrófica (Fornai et al., 2008), e discinesia tardia induzida por antipsicóticos (van Harten et al., 2007). Nesse panorama, investigações em pesquisa básica envolvendo sais de lítio são válidas e podem lançar luz sobre novos possíveis campos de investigação e novas possíveis aplicabilidades clínicas deste fármaco.

Estimativas conservadoras da prevalência do THB giram em torno de 1% da população (Sadock e Sadock, 2007). A popularização do conceito de espectro bipolar (Akiskal, 1996), mais abrangente, e o desenvolvimento de novas medicações, vêm contribuindo para que mais pessoas sejam diagnosticadas como portadoras de alguma forma de THB e recebam tratamento (Danner et al., 2009).

Por outro lado, a prevalência de TDAH varia muito entre os diversos estudos que investigam o tema, provavelmente por questões metodológicas. Acredita-se que as melhores estimativas oscilam em torno de 5,29% entre crianças e adolescentes e 4,4% entre adultos (Polanczyk e Rohde, 2007). Desde os primeiros relatos de uso de estimulantes em crianças com alteração do comportamento (Bradley, 1937) a prescrição de tais fármacos em pacientes com problemas de atenção ou hiperatividade vem se tornando cada vez mais comum. Em especial nos últimos 20 anos vem se demonstrando uma crescente prescrição de anfetaminas e MPH em vários países, em alguns locais chegando a quintuplicar em cinco anos a taxa de habitantes em uso de psicoestimulantes (Donker et al., 2005; Miller et al., 2001).

Muitos sintomas centrais para o diagnóstico de TDAH também pertencem à esfera sintomatológica do THB, como desatenção, impulsividade, irritabilidade e oscilações do humor. Sintomas de desatenção e impulsividade que permitam o diagnóstico de TDAH ocorrem em mais de 60, 80 e 90% de amostras de crianças bipolares, conforme o estudo (Carlson e Kelly, 1998; Tillman et al., 2003; Faraone et al., 1997). Em uma população em que a prevalência de possível TDAH era de 4,4%, dentre estes indivíduos, 86% também poderiam ser diagnosticados como portadores de transtornos de humor ou de ansiedade (Kessler et al., 2006). Recentemente, em crianças com diagnóstico de TDAH demonstrou-se uma prevalência de THB quinze vezes maior que numa amostra da população infantil controle (Donfrancesco et al., 2010).

Tais dados podem ser compreendidos simplesmente como comorbidade, o que poderia sugerir, no manejo de tais pacientes, o uso concomitante de fármacos indicados para manejo de TDAH e THB (por exemplo, a associação de estabilizadores do humor com psicoestimulantes ou bupopriona). Por outro lado, dentro do conceito de hierarquia de diagnósticos, muitos sintomas cognitivos como desatenção podem ser compreendidos como consequências de um transtorno de humor de base, e pode-se sugerir que o tratamento deste transtorno de base levaria ao alívio da desatenção (Goodwin e Jamison, 2007), minimizando os riscos inerentes à politerapia.

De qualquer forma, o aumento no diagnóstico de ambas morbidades faz relevante o estudo da associação de fármacos usados no tratamento de uma e outra e, até onde é de nosso conhecimento, há pouca informação nesse sentido. Em um pequeno estudo controlado, com *crossover*, de sete pacientes internados com sintomas maníacos mistos, a combinação de lítio com MPH foi superior à monoterapia com MPH em reduzir medidas de desatenção e hiperatividade (Carlson et al., 1992). Em outro estudo, 40 crianças e adolescentes com THB foram tratados de modo aberto com ácido valpróico e então randomizados para receber a adição de placebo ou o psicoestimulante dextroanfetamina. O grupo que recebeu dextroanfetamina obteve melhora na escala YMRS e nos sintomas de TDAH de modo superior ao grupo placebo, sem piora dos sintomas maníacos e sem outros efeitos colaterais (Scheffer et al., 2005). Até onde é de nosso conhecimento, um único estudo investigou o uso a longo termo de MPH em pacientes bipolares: uma revisão de prontuários em que 16 pacientes utilizaram MPH como medicação adjunta aos estabilizadores de humor durante 14 meses. Os autores encontraram melhora na concentração e no humor depressivo, sendo os efeitos colaterais mais comuns discreta irritabilidade e agitação, sem viradas maníacas ou uso abusivo do estimulante ou de outras substâncias (Lydon e El-Mallakh, 2006).

O primeiro trabalho desta tese estuda a associação lítio e MPH, e foi desenhado com os objetivos de validar a hiperatividade induzida por MPH como um modelo de mania, estudar os efeitos protetores do lítio sobre uma possível lesão induzida pelo MPH e, por fim, observar eventuais interações de ambos fármacos em tarefas comportamentais. Os resultados positivos que encontramos dizem respeito a este último ponto. Na tarefa do campo aberto, observamos que a administração

concomitante de lítio e MPH levou a um aumento no tempo gasto na área central do aparato. A associação de ambas drogas levou também a um aumento do número de reações verticais de exploração nos primeiros cinco minutos da tarefa. Além disso, os animais que não receberam MPH reduziam o número de cruzamentos com o tempo, enquanto aqueles sob efeito de MPH mantinham-se acelerados durante toda a tarefa.

Quando a tarefa do campo aberto é realizada sem habituação prévia, acredita-se que a locomoção nos primeiros minutos esteja relacionada a atividade exploratória (Prut, 2003). Além disso, o tempo gasto na área central geralmente é utilizado como uma medida de ansiedade (este tempo sendo inversamente proporcional à ansiedade experimentada pelo animal) (Morgan e Pfaff, 2001). Considerando-se que a ansiedade pode reduzir a atividade exploratória (Prut, 2003), propomos que a associação lítio e MPH, na tarefa em questão, parece gerar um efeito ansiolítico e desinibitório. Isso é coerente com o achado de que a associação de ambas drogas reverteu a redução no número de entradas no braço aberto do LCE, induzido por cada uma das substâncias isoladamente. Em conjunto, tais resultados podem sugerir o estudo da associação de ambas substâncias em situações clínicas em que ansiedade e inibição psicomotora sejam sintomas proeminentes, como algumas formas de sintomas negativos na esquizofrenia e determinadas fases do transtorno bipolar.

A capacidade de uma droga reduzir o tempo de imobilidade na tarefa do nado forçado está associada a propriedades antidepressivas na clínica (Lucki, 1997). Em nossos resultados, os animais que utilizaram MPH apresentaram reduzida imobilidade nesta tarefa. Como os animais foram submetidos ao teste 24 horas após a última administração de MPH e, de acordo com a literatura, doses até oito vezes superiores às aquelas utilizadas em nosso experimento não afetaram a atividade locomotora do animal 24h após sua administração I.P. (Gaytan et al., 1996), compreendemos que o efeito do MPH encontrado em nosso trabalho não se deve a um aumento inespecífico da atividade motora.

De qualquer forma, embora MPH melhore sintomas depressivos em crianças com ADHD (Gadow, 2002), tal fármaco não é utilizado como antidepressivo. Uma questão que permanece controversa é seu uso na clínica como estratégia de potencialização de fármacos antidepressivos. Apesar de alguns relatos sugerindo seu uso com essa finalidade (Stoll et al., 1996), estudos recentes, de melhor qualidade, não apresentam resultados promissores (Ravindran, 2008; Patkar, 2006). Contudo, tais estudos com resultados negativos utilizaram apresentações de MPH de liberação

lenta. Como nossos resultados, com animais, derivam de MPH administrado I.P., e como essa forma de administração leva a um pico e declive nas concentrações séricas mais acentuado (o que é mais próximo da cinética do MPH de liberação imediata), podemos sugerir que mais estudos avaliando o potencial antidepressivo de MPH sejam realizados, utilizando preferentemente as formulações de liberação imediata.

Como mencionado anteriormente, um dos objetivos do primeiro trabalho foi o de validar a hiperatividade induzida por MPH com um modelo de mania. Nesse sentido, três conceitos relevantes em ciência básica envolvendo comportamento animal são os de *validade aparente* (ou *de face*), *validade preditiva* e *validade de constructo* (Willner, 1991). Por *validade aparente* compreende-se que um modelo animal de um transtorno psiquiátrico deve provocar no animal um comportamento que mimetize algum aspecto do transtorno em si (por exemplo, hiperatividade na modelagem de mania). Por *validade preditiva* compreende-se que intervenções úteis no tratamento clínico de determinado sintoma, também “tratem” o comportamento animal (por exemplo, estabilizadores do humor, eficazes no tratamento da mania, revertendo a hiperatividade induzida em animais). Por fim, *validade de constructo* diz respeito à racionalidade subjacente ao modelo. De acordo com estes conceitos, em nosso trabalho a hiperatividade induzida por metilfenidato apresentou validades aparente e de constructo como um modelo de mania, mas não validade preditiva. Segundo O’Donnell e Gould (2007), devido às limitações inerentes a todos modelos animais (é improvável que um modelo reflita a etiologia, a patofisiologia, os sintomas e o tratamento de um determinado transtorno), o tripé das “três validades” deve ser considerado com flexibilidade. Pensando um modelo animal como um constructo que permita estudar algum aspecto da doença, propomos que a hiperatividade induzida por MPH pode contribuir para o estudo dos processos neurofisiológicos subjacentes aos quadros maníacos – mas não para o estudo do efeito do lítio sobre estes.

Sugerimos também que o efeito de outros estabilizadores de humor sobre a hiperatividade induzida por MPH seja estudado. Isso pode ser particularmente útil em ciência básica realizada em nosso país, visto que a anfetamina, droga amplamente usada como modelo de mania, não é comercializada no Brasil e há dificuldades substanciais relacionadas à sua importação. Nesse sentido, MPH vem se mostrando como uma alternativa a anfetamina em outros ramos de pesquisa, como por exemplo na pesquisa básica relacionada à doença de Parkinson (Silvestrin et al., 2009).

Ainda em relação ao primeiro trabalho, não encontramos resultados positivos em relação às medidas de estresse oxidativo. Existem na literatura várias fontes fundamentando um potencial efeito neurotóxico de drogas que elevem a concentração sináptica de dopamina. Sabe-se que a dopamina pode sofrer auto-oxidação na presença de  $Fe^{+2}$ , gerando semiquinonas, altamente neurodegenerativas, e pode também ser metabolizada pela MAO produzindo radicais hidroxila altamente reativos (Obata, 2002). Em humanos com histórico de abuso de estimulantes foi demonstrada uma diminuição nos transportadores de dopamina semelhante àquela observada em portadores da Doença de Parkinson, e, embora tais pacientes não apresentassem sinais clínicos de Parkinsonismo no estudo em questão, os autores questionam se, com a idade, tais pacientes não serão um grupo mais vulnerável para síndromes comportamentais relacionadas ao comprometimento dopaminérgico (McCann et al., 1998). Embora controverso, um estudo demonstrou genotoxicidade com o uso a longo prazo de MPH (El-Zein et al., 2005). Andreazza e colegas, através do teste do cometa, demonstraram lesão transitória de DNA com a administração de MPH a ratos, jovens e adultos, sendo maior a lesão com a administração crônica (Andreazza et al., 2007).

Nossos resultados, em que não houve indução de estresse oxidativo com a administração de MPH, concordam em parte com o trabalho de Martins e colaboradores (2006). Tais autores identificaram lesão oxidativa com administração de MPH apenas quando este era administrado (aguda ou cronicamente) a ratos jovens (até o 60º dia pós-natal), e não quando era administrado a ratos adultos, como os que usamos em nosso experimento.

Acredita-se que o sistema dopaminérgico mesolímbico e mesocortical, onde o metilfenidato e outros psicoestimulantes exercem parte de sua ação, está envolvido em processos intimamente relacionados, como cognição e regulação do humor, atribuição de saliência a estímulos externos e aquisição e execução de comportamentos naturalmente reforçados (Berridge e Robinson, 1998). Fenômenos fisiológicos (como atenção e humor adaptados a um contexto e busca por reforços naturais como novidade, alimento e sexo) e patológicos (como psicoses, obsessões e compulsões, dependência a substâncias, impulsividade e outros prejuízos na tomada de decisões, assim como as várias formas de parkinsonismo) parecem depender em grande parte da função dopaminérgica. O modo como alterações nesse sistema podem contribuir para um ou outro desses processos, ainda é grosseiramente compreendido. Um aspecto que parece especialmente relevante, é o farmacocinético: manipulações

que levem a um aumento agudo seguido de declive nas concentrações sinápticas de dopamina, parecem mais propensas a induzir propriedades de reforço e lesão celular (Gerasimov et al., 2000). Tendo em vista que a lesão no sistema dopaminérgico é mais facilmente identificada (ao menos em suas manifestações motoras) após uma perda neuronal superior a 80% (Marek e Jennings, 2009) acreditamos ser necessária mais pesquisa envolvendo a segurança de fármacos psicoestimulantes como MPH e uma postura mais conservadora em relação à prescrição de tais medicações. Nesse contexto, lembramos a inexistência, até onde é de nosso conhecimento, de estudos a longo prazo (tempo superior a 10-20 anos de uso) que demonstrem ausência de efeitos danosos em humanos do uso de psicoestimulantes no TDAH.

Também arriscamo-nos a sugerir que o desenvolvimento de formulações de metilfenidato de liberação prolongada, amplamente propagandeadas nos últimos anos, pode ser compreendido como uma estratégia que, além de promover o conforto do paciente a curto prazo (solidamente demonstrado em estudos), vise minimizar um possível efeito deletério das medicações de curta ação, que ainda não tenha sido possível demonstrar em estudos sistematizados.

Finalmente, nossos resultados negativos envolvendo estresse oxidativo e lítio divergem de parte da literatura, que vem demonstrando propriedades antioxidativas deste sal. Por exemplo, em culturas celulares de tecido cortical demonstrou-se que o tratamento com lítio ou valproato preveniu a peroxidação lipídica, a oxidação protéica e o aumento do cálcio livre intracelular, induzidos por glutamato (Shao et al., 2005), assim como a ativação da via das caspases 2 e 3, pelo inibidor mitocondrial rotenona (King e Jope, 2005). Talvez o trabalho relacionando lítio e dano oxidativo cuja metodologia mais se aproxime da utilizada em nosso experimento é o de De Vasconcellos et al. (2006) que, utilizando o mesmo procedimento de administração de lítio na ração dos animais, demonstrou um efeito do lítio em induzir aumento nas enzimas Glutathione Peroxidase (GPx) no hipocampo e Superóxido Dismutase (SOD) no hipotálamo. No trabalho de Vasconcellos o tempo de tratamento foi ligeiramente superior (40 dias, em comparação com os 30 dias utilizados em nosso experimento). Tendo em vista a complexidade e a dinâmica dos fenômenos oxidativos, sugerimos que mais estudos nesse campo envolvendo lítio são necessários, para uma melhor compreensão de suas eventuais propriedades.



A má adesão ao tratamento é uma dificuldade frequente no manejo de doenças crônicas. Nos países em desenvolvimento, metade dos pacientes crônicos não segue adequadamente as recomendações médicas (Young et al., 1999; Goodwin e Jamison, 2007), e isso pode ter profundas consequências no caso de portadores de THB. Nestes pacientes, a precipitação de episódios afetivos pode gerar desde angústia pessoal até comportamentos extremos como o suicídio. No THB, a não aderência é quase certamente a principal causa de resposta pobre ao tratamento (Goodwin e Jamison, 2007) e está descrito que os clínicos são, de um modo geral, pouco competentes na avaliação da aderência – muitas vezes imaginando que o paciente está usando a medicação, quando na verdade não está (Osterberg e Blaschke, 2005).

De acordo com uma revisão de estudos conduzidos entre 1976 e 2003, em média 42% dos pacientes bipolares não aderem ao tratamento (Perlick et al., 2004). Em relação especificamente ao tratamento com lítio, a média de não adesão varia entre 14 e 79%, conforme o estudo, sendo próxima a 50% na maioria dos trabalhos (Goodwin e Jamison, 2007). Efeitos colaterais da medicação, uma eficácia menor que a esperada (ou maior, a ponto de evitar completamente as recorrências e o paciente acreditar que pode interromper a medicação), pressões externas contra o tratamento farmacológico, perda da sensação de vitalidade e energia a que o paciente estava acostumado nas hipomanias – vêm sendo descritos como fatores associados à má adesão (Schou, 1997).

Menos de 20% dos pacientes em litioterapia não apresentará nenhum efeito colateral (embora poucos pacientes experienciem parefeitos graves) (Goodwin e Jamison, 2007). A relevância dos efeitos colaterais pode variar de paciente para paciente. Gitlin e colaboradores, por exemplo, encontraram que sede e poliúria (os efeitos colaterais mais comuns do tratamento com lítio) foram muito menos importantes para os pacientes que o ganho de peso ou os efeitos cognitivos, e dentre os possíveis efeitos colaterais, aquele que seria mais capaz de motivar a interrupção do tratamento seria o ganho de peso (Gitlin et al., 1989). Outros autores têm descrito o ganho de peso como importante causa de má adesão ao tratamento com lítio (Schou et al., 1970; Baptista et al., 1995).

Os mecanismos do ganho de peso induzido por lítio não são conhecidos. Há sugestões de que uma interferência no metabolismo dos carboidratos (Mellerup et al., 1983; Srivastava et al., 1983), nos níveis de leptina (Atmaca et al., 2002), retenção

hídrica (Garland et al., 1988) e ações sobre o TNF- $\alpha$  (Himmerich et al., 2005) estejam envolvidos.

Expressões faciais em resposta a estimulação gustativa com alimento doce são consideradas um protótipo de reações afetivas positivas, ou seja, a expressão comportamental de uma experiência prazerosa (Berridge, 2003). Diversas espécies, de humanos a roedores, exibem um padrão bem definido de reações faciais a estímulos doces, e a mensuração de tais reações vem sendo utilizada em pesquisa comportamental relacionada às emoções e ao sistema de recompensa (Steiner et al., 2001).

O artigo 2 desta tese demonstra um efeito do lítio sobre a expressão de reações afetivas em resposta a um sabor doce. O aumento no tempo de protrusões de língua induzido pelo tratamento com lítio sugere que o valor hedônico da solução de sacarose esteja aumentado nos animais tratados, o que poderia favorecer a procura e o consumo de alimentos doces, caso estes sejam livremente disponibilizados. Esta seria a situação de pacientes em tratamento, que têm, de um modo geral, livre acesso a vários tipos de alimento ao longo do dia. No artigo 3 demonstramos que o consumo dos cereais *Froot-Loops*, de sabor doce e alto valor calórico, assim como de ração normal, encontra-se aumentado nos animais tratados com lítio, de um modo sustentado – ou seja, durante 40 minutos de observação. Estes resultados ampliam o que se demonstrou em dissertação de mestrado concluída em 2006 (Oliveira, 2006). Ali demonstramos que a administração de lítio a ratas Wistar levava a aumento do consumo de alimento doce, em um período de 3 minutos de observação, e a uma redução na latência para início de consumo em comparação com os controles. Tais efeitos se observavam tanto no dia do teste (sexto dia do experimento) como nos cinco dias de habituação precedentes. Nesta tese demonstramos um efeito semelhante em ratos machos, utilizando um tempo de observação maior.

Ratos de laboratório, assim como outros mamíferos, tendem a organizar sua alimentação em períodos relativamente curtos de intensa ingestão, mesmo quando há alimento disponível constantemente. Tais períodos chamam-se “refeições” (“meals”), e um tempo de observação de 30 minutos usualmente abarca duas ou mais refeições (Clifton, 2005). Ao longo de uma mesma refeição a taxa de consumo alimentar decai levemente (em especial em refeições doces ou no animal em privação alimentar) (Clifton, 2000). Em nossos resultados os animais tratados com lítio não apresentavam

decréscimo significativo na quantidade de alimento ingerida ao longo do tempo de observação.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o consumo aumentado de alimentos, em especial de alimentos doces, pode ser considerado um possível mecanismo a contribuir para o ganho de peso lítio-induzido. Um aumento na palatabilidade desses alimentos induzido por lítio pode explicar, ao menos em parte, o consumo aumentado.

Diversas técnicas psicoterápicas vêm sendo propostas como métodos de aumentar a adesão ao tratamento, e intervenções voltadas para o esclarecimento, prevenção e minimização de parefeitos relacionados ao peso podem ser úteis. Uma possível aplicação clínica de nossos resultados seria, por exemplo, a recomendação de monitorização cuidadosa dos hábitos alimentares dos pacientes em litioterapia antes e depois do início do tratamento (com o uso, por exemplo, de tarefas comportamentais como diários alimentares) e a prática de psicoeducação com ênfase neste possível efeito colateral.

A maioria dos trabalhos envolvendo lítio e consumo de alimento consiste em tarefas de condicionamento aversivo (O'Donnell e Gould, 2007). Por exemplo, lítio é capaz de induzir aversão à sacarina (que normalmente causa preferência nos animais) (Berg e Baenninger, 1974) e de reduzir as propriedades de reforço da sacarose na tarefa de preferência condicionada ao lugar (Perks e Clifton, 1997). Também foi demonstrado que o lítio pode atenuar a auto-estimulação em animais (Edelson, 1976), e diminuir o consumo de álcool (Ho e Tsai, 1976) e morfina (Tomkiewicz e Steinberg, 1974). Tais efeitos aversivos parecem dever-se à associação do estímulo (um sabor, um lugar) a um desconforto fisiológico abdominal causado pela administração do lítio (geralmente por via intraperitoneal) seguida da ingestão de alimentos (O'Donnell e Gould, 2007). Isso é ilustrado pelo fato de que o pré-tratamento com antieméticos, ou lesões na area postrema, bloqueiam o desenvolvimento da aversão (Frisch et al., 1995; Ritter et al., 1980). Em nosso experimento, utilizamos a administração via oral do lítio, através da ração disponibilizada nas caixas-moradia. Acreditamos que, uma vez sendo evitado o desconforto fisiológico associado às injeções I.P., nossos resultados comportamentais falam a favor de um efeito direto do tratamento com lítio sobre estruturas e sistemas envolvidos na regulação do comportamento alimentar.

O tecido adiposo marrom é uma das estruturas envolvidas no controle do peso corporal de mamíferos, e vem recebendo considerável atenção recentemente. Embora tenha sido considerado não existente ou não fisiológico em humanos adultos – seria observado apenas em situações de exposição a frio ou estimulação adrenérgica excessiva, como em feocromocitomas (Cannon e Nedergaard, 2004; English et al., 1973) – trabalhos recentes têm descrito sua presença fisiológica em seres humanos adultos, em quantidade inversamente proporcional ao índice de massa corporal dos indivíduos (Cypess et al., 2009; Van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen, 2009). Em estudos animais o crescimento ou a ativação do tecido adiposo marrom contrabalança o ganho de peso induzido pela dieta e transtornos relacionados como diabetes mellitus tipo 2 (Lidell e Enerbäck, 2010), e pode influenciar o consumo de alimentos (Himms-Hagen, 1995). À dessemelhança do tecido adiposo branco, o tecido marrom não parece ter distribuição corporal distinta entre homens e mulheres (Cypess et al., 2009).

No quarto artigo desta tese demonstramos que o tratamento com lítio reduziu seletivamente o tecido adiposo marrom abdominal dos animais. É possível que tal efeito esteja relacionado aos resultados observados nas tarefas comportamentais relacionadas à alimentação e reações afetivas. Como o efeito do lítio foi prevenido pela administração de metilfenidato, e tendo em vista a regulação noradrenérgica do tecido marrom, propomos que o efeito do MPH pode estar relacionado à transmissão noradrenérgica. A redução de massa de gordura marrom foi associada ao ganho de peso induzido por uso a longo prazo de beta-bloqueadores (Sharma et al., 2001). Na clínica, beta-bloqueadores como propranolol são frequentemente usados em associação com lítio para minimizar os tremores induzidos por este. Sugerimos que o estudo de possíveis efeitos sobre o peso da associação lítio e betabloqueadores poderiam contribuir para sustentar ou refutar um efeito destes medicamentos sobre o tecido adiposo marrom.

Outro possível mecanismo associado aos resultados comportamentais observados diz respeito à interação do lítio com o sistema dopaminérgico. Foi demonstrado que a administração de lítio por três semanas leva a uma redução nos níveis basais de dopamina no núcleo accumbens, semelhante àquela observada após exposição ao estresse (Gambarana et al., 1999). Contudo essa redução na dopamina tônica se acompanha de um aumento na reatividade do sistema dopaminérgico frente a novidades com propriedades de reforço, como a exposição a açúcar de baunilha

(Gambarana et al., 2003). Ratos tratados com lítio apresentam picos dopaminérgicos mais rapidamente que controles, atingindo no cortex pré-frontal medial concentrações mais altas que os controles. Além disso, animais tratados com lítio não apresentam habituação do sistema dopaminérgico, em comparação com controles (Gambarana et al., 2003). Contudo, estudos envolvendo lítio e o sistema dopaminérgico têm resultados distintos, provavelmente devido à complexidade própria desse sistema e à influência do lítio em vários pontos do mesmo.

Uma limitação de nosso trabalho é que o tratamento utilizado não modela ganho de peso nos animais. Os animais submetidos ao nosso protocolo de tratamento apresentam um retardo no ganho ponderal nas primeiras duas semanas de tratamento, e uma tendência para redução de peso em determinados pontos do tratamento em comparação com os controles (Oliveira, 2006). Acreditamos que isso se deva ao fato de que em nossos experimentos alimentos com alto valor calórico não sejam disponibilizados *ad libitum* – e sim nos momentos dos testes. Isso se fazia necessário para evitar um consumo preferencial de outros alimentos, em detrimento da ração contendo lítio. Humanos em tratamento com lítio, por sua vez, como já foi mencionado, podem ter livre acesso a todos os tipos de alimentos.



Em resumo, retomando as perguntas de que partimos, os resultados obtidos permitem respondê-las da seguinte forma.

[1] Hiperatividade induzida por MPH pode ser considerada um modelo de mania ?

Não, mas possui validade aparente e de constructo como tal.

[2] Existem interações significativas entre os efeitos do MPH e do lítio em tarefas comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão?

Sim, em tarefas relacionadas à ansiedade e atividade exploratória. Sobre o comportamento depressivo apenas MPH demonstrou efeito.

[3] A administração de MPH é capaz de causar dano neural passível de prevenção com a administração de lítio?

Não.

[4] A administração de lítio é capaz de influenciar a sensibilidade a estímulos hedônicos?

Sim, de modo a aumentá-la.

[5] A administração de lítio é capaz de influenciar o consumo de alimento de um modo sustentado?

Sim, aumentando o consumo.

[6] Existe um efeito diferenciado do lítio sobre diferentes tecidos adiposos?

Sim, um efeito em reduzir a massa de tecido adiposo marrom.

# **CONCLUSÕES**

A administração de MPH induz aumento na locomoção e nas reações verticais de orientação na tarefa do campo aberto, e induz aumento no número de entradas na tarefa do labirinto em cruz elevado. O tratamento por 30 dias com lítio não previne o efeito sobre a locomoção induzido pelo MPH, de modo que hiperatividade induzida por esta substância não apresenta validade preditiva como modelo de mania.

Os animais tratados com lítio e MPH permanecem mais tempo na área central do campo aberto, realizam mais reações de orientação verticais nos primeiros cinco minutos desta tarefa e não apresentam o decréscimo no número de entradas nos braços abertos exibido pelos animais tratados com cada droga isoladamente. Em conjunto tais observações sugerem um efeito ansiolítico da administração conjunta de ambas substâncias, a ser confirmado por outros estudos.

A administração de MPH reduz a imobilidade na tarefa do nado forçado, o que sugere eventuais propriedades antidepressivas das formulações de liberação imediata dessa substância, a serem confirmadas por outros estudos.

A administração de MPH por 15 dias, na dose de 5mg/Kg I.P., e o tratamento com lítio por 30 dias não induzem alterações nos níveis de espécies reativas ao TBA, no TRAP, e nas atividades da SOD e da GPx. Contudo, a indução de estresse oxidativo com a administração a longo prazo de MPH não pode ser excluída.

O tratamento com lítio aumenta o consumo de alimento doce e de ração normal, aumenta a reatividade afetiva ao sabor doce e reduz a quantidade de tecido adiposo marrom abdominal. Tais efeitos podem contribuir para o ganho de peso induzido pelo tratamento com lítio. A administração de MPH reduz o efeito do lítio sobre a gordura marrom abdominal, sugerindo que o efeito do lítio se dê através da via de transmissão noradrenérgica.

## **REFERÊNCIAS**

ADVOKAT, C. Update on amphetamine neurotoxicity and its relevance to the treatment of ADHD. **Journal of Attention Disorders**, v. 11, p. 8-16, 2007.

AKISKAL, H. S. The prevalent clinical spectrum of bipolar disorders: beyond DSM-IV. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 16, p. 4S-14S, 1996.

ALVAREZ, G. *et al.* Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. **FEBS Letters**, v. 453, p. 260-4, 1999.

ANDREAZZA, A. C. DNA damage in rats after treatment with methylphenidate. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 31, p. 1282-8, 2007.

ARATANI, Y.; SUGIMOTO, E.; KITAGAWA, Y. Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. **FEBS Letters**, v. 218, p. 47-51, 1987.

ARENDRT, T. *et al.* Synergistic effects of tetrahydroaminoacridine and lithium on cholinergic function after excitotoxic basal forebrain lesions in rat. **Pharmacopsychiatry**, v. 32, p. 242-7, 1999.

ATMACA, M. *et al.* Weight gain and serum leptin levels in patients on lithium treatment. **Neuropsychobiology**, v. 46, p. 67-9, 2002.

BAASTRUP, P. C.; SCHOU, M. Lithium as a prophylactic agents. Its effect against recurrent depressions and manic-depressive psychosis. **Archives of General Psychiatry**, v. 16, p. 162-72, 1967.

BAPTISTA, T. *et al.* Lithium and body weight gain. **Pharmacopsychiatry**, v. 28, p. 35-44, 1995.

BELLINO, S.; PARADISO, E.; BOGETTO, F. Efficacy and tolerability of pharmacotherapies for borderline personality disorder. **CNS Drugs**, v. 22, p. 671-92, 2008.

BERG, D.; BAENNINGER, R. Predation: separation of aggressive and hunger motivation by conditioned aversion. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, v. 86, p. 601-6, 1974.

BERGGREN, U. *et al.* The effect of lithium on amphetamine-induced locomotor stimulation. **Psychopharmacology**, v. 59, p. 41-5, 1978.

BERRIDGE, K.C.; KRINGELBACH, M.L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 457-80, 2008.

BERRIDGE, K. C. Pleasures of the brain. **Brain and Cognition**, v. 52, p. 106-128, 2003.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Research Reviews**, v. 28, p. 309-69, 1998.

BOSETTI, F. *et al.* Chronic lithium downregulates cyclooxygenase-2 activity and prostaglandin E(2) concentration in rat brain. **Molecular Psychiatry**, v. 7, p. 845-50, 2002.

BRADLEY, C. The behavior of children receiving Benzedrine. **American Journal of Psychiatry**, v. 94, p. 577-585, 1937.

CADE, J. F. J. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. **The Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 349-52, 1949.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 277-359, 2004.

CAPPELIEZ, P. Comparing oral lithium carbonate and intraperitoneal lithium chloride chronic administrations on rats' activity levels. **Neuropsychobiology**, v. 16, p. 103-8, 1986.

CARLEZON, W. A. JR.; MAGUE, S. D.; ANDERSEN, S. L. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 1330-7, 2003.

CARLSON, G. A. *et al.* Lithium in hospitalized children at 4 and 8 weeks: mood, behavior and cognitive effects. **The Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 33, p. 411-25, 1992.

CARLSON, G. A.; KELLY, K. L. Manic symptoms in psychiatrically hospitalized children--what do they mean? **Journal of Affective Disorders**, v. 51, p. 123-35, 1998.

CASTRO, A. A. *et al.* Lithium attenuates behavioral and biochemical effects of neuropeptide S in mice. **Peptides**, v. 30, p. 1914-20, 2009.

CHANG, M. C. *et al.* Lithium decreases turnover of arachidonate in several brain phospholipids. **Neuroscience Letters**, v. 220, p. 171-4, 1997.

CHEN, G. *et al.* Enhancement of hippocampal neurogenesis by Lithium. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 1729-34, 2000.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, 1999.

CHEN, R. W. *et al.* Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, p. 566-75, 2003.

CHEN, Y.; GOODALL, E.; SILVERSTONE, T. The effects of lithium on body weight and food intake in normal subjects – a pilot study. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 7, p. 51-4, 1992.

CIMAROSTI, H. *et al.* An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 315, p. 33-6, 2001.

CLIFTON, P. G. Eating. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. (ed.) **The Behavior of the Laboratory Rat**. New York: Oxford University Press, 2005. P. 197-206.

CLIFTON, P. G. Meal patterning in rodents: psychopharmacological and neuroanatomical studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, p. 213-22, 2000.

CORYELL W. Maintenance treatment in bipolar disorder: a reassessment of lithium as the first choice. **Bipolar Disorders**, v. 2, p. 77-83, 2009.

COX, C. *et al.* Lithium attenuates drug-induced hyperactivity in rats. **Nature**, v. 232, p. 336-8, 1971.

CRYNS, K. *et al.* Lack of lithium-like behavioral and molecular effects in IMPA2 knockout mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 881-91, 2007.

CYPESS, A. M. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1509-17, 2009.

D'ALMEIDA, V. *et al.* Antioxidant defense in rat brain after chronic treatment with anorectic drugs. **Toxicol Lett.**, v. 81, p. 101-5, 1995.

DANNER, S. *et al.* Early-onset bipolar spectrum disorders: diagnostic issue. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 12, p. 271-93, 2009.

DAVIS, J. M.; JANICAK, P. G.; HOGAN, D. M. Mood stabilizers in the prevention of recurrent affective disorders: a meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 100, p. 406-17, 1999.

DE SARNO, P.; LI, X.; JOPE, R. S. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 1158-64, 2002.

DE VASCONCELLOS, A. P. *et al.* Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. **Neurochemical Research**, v. 31, p. 1141-51, 2006.

DE VASCONCELLOS, A. P. *et al.* Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, p. 102-10, 2005.

DONFRANCESCO, R. *et al.* Bipolar disorder co-morbidity in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Psychiatry Research**, 2010. *In press*.

DONKER, G.A.; GROENHOF, F.; VAN DER VEEN, W.J. Increasing trend in prescription of methylphenidate in general practices in the north-east of The Netherlands, 1998-2003. **Ned Tijdschr Geneeskd**, v. 149, p. 1742-7, 2005.

DO PRADO-LIMA, P. *et al.* Lithium reduces maternal child abuse behaviour: a preliminary report. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, p. 279-82, 2001.

DUBOVSKY, S. L. *et al.* Abnormal intracellular calcium ion concentration in platelets and lymphocytes of bipolar patients. **American Journal of Psychiatry**, v. 149, p. 118-20, 1992.

DUNIGAN, C. D.; SHAMOO, A. E. Li<sup>+</sup> stimulates ATP-regulated dopamine uptake in PC12 cells. **Neuroscience**, v. 65, p. 1-4, 1995.

EASTON, N. Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 405-14, 2007.

EDELSON, A. *et al.* Effect of lithium and other alkali metals on brain chemistry and behavior. II. Intracranial self-stimulation behavior. **Psychopharmacologia**, v. 45, p. 233-237, 1976.

EL-ZEIN, R. A. *et al.* Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. **Cancer Letters**, v. 230, p. 284-91, 2005.

ENGLISH, J. T.; PATEL, S. K.; FLANAGAN, M. J. Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. **Radiology**, v. 107, p. 279-81, 1973.

EROĞLU, L.; HIZAL, A. Antidepressant action of lithium in behavioral despair test. **Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy**, v. 39, p. 667-73, 1987.

FARAONE, S. V. *et al.* Is comorbidity with ADHD a marker for juvenile-onset mania? **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 36, p. 1046-55, 1997.

FOCOSI, D. *et al.* Lithium and hematology: established and proposed uses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 20-8, 2009.

FORNAI, F. *et al.* Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, p. 2052-7, 2008.

FREEMAN, M. P.; WIEGAND, C.; GELENBERG, A. J. Lithium. In: SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. **Textbook of Psychopharmacology**. 3<sup>rd</sup> ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2004. P. 547-565.

FRISCH, C. *et al.* Blockade of lithium chloride-induced conditioned place aversion as a test for antiemetic agents: comparison of metoclopramide with combined extracts of *Zingiber officinale* and *Ginkgo biloba*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p.321-327, 1995.

GADOW, K. D. *et al.* Anxiety and depression symptoms and response to methylphenidate in children with attention-deficit hyperactivity disorder and tic disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 22, p. 267-274, 2002.

GAMBARANA, C. *et al.* Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. **Neuroscience**, v. 121, p. 179-87, 2003.

GAMBARANA, C. *et al.* The effects of long-term administration of rubidium or lithium on reactivity to stress and on dopamine output in the nucleus accumbens in rats. **Brain Research**, v. 826, p. 200-9, 1999.

GARLAND, E. J.; REMICK, R. A.; ZIS, A. P. Weight gain with antidepressants and lithium. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 8, p. 323-30, 1988.

GAYTAN, O. *et al.* Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of dark cycle. **Brain Research**, v. 727, p.13-21, 1996.

GEDDES, J. R. *et al.* Long-term lithium therapy for bipolar disorder: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 217-22, 2004.

GERASIMOV, M. R. *et al.* Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 51-7, 2000.

GITLIN, M.J.; COCHRAN, S. D.; JAMISON, K. R. Maintenance lithium treatment: side effects and compliance. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 50, p. 127-31, 1989.

GOODWIN, F. K.; JAMISON, K. R. **Manic-Depressive Illness. Bipolar Disorders and Recurrent Depression**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Oxford University Press, 2007.

GRAY, P. *et al.* Effects of lithium on open field behavior in “stressed” and “unstressed” rats. **Psychopharmacology**, v. 48, p. 277-81, 1976.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test: I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Research**, v. 143, p. 263-79, 1978.

HANSEN, J. B.; KRISTIENSEN, K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. **Biochemical Journal**, v. 398, p. 153-168, 2006.

HARWOOD, A. J; AGAM, G. Search for a common mechanism of mood stabilizers. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 179-89, 2003.

HEIT, S.; NEMEROFF, C. B. Lithium augmentation of antidepressants in treatment-refractory depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59 (Suppl 6), p. 28-33, 1998.

HIMMERICH, H *et al.* Plasma levels of leptin and endogenous immune modulators during treatment with carbamazepine or lithium. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 447-51, 2005.

HIMMS-HAGEN, J. Does thermoregulatory feeding occur in newborn infants? A novel view of the role of brown adipose tissue thermogenesis in control of food intake. **Obesity Research**, v. 3, p. 361-9, 1995.

HO, A. K.; TSAI, C. S. Effects of lithium on alcohol preference and withdrawal. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 273, p 371-377, 1976.

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

JARRETT, M. M.; LIMEBEER, C. L; PARKER, L. A. Effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on sucrose palatability as measured by the taste reactivity test. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 475-9, 2005.

JEFERSON, J. W; GREIST, J. H. Lithium. In: SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A; RUIZ, P. **Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. P. 2839-51.

JOPE, R. S. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. **Molecular Psychiatry**, v. 4, p. 117-28, 1999.

KESSING, L. V.; FORMAN, J. L.; ANDERSEN, P. K. Does lithium protect against dementia? **Bipolar Disorders**, v. 12, p. 87-94, 2010.

KESSLER, R. C. *et al.* The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, p. 716-23, 2006.

LAGACE, D. C. *et al.* Juvenile administration of methylphenidate attenuates adult hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 60, p. 1121-30, 2006.

LAZARUS, J. H. Lithium and thyroid. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, p. 723-33, 2009.

LENOX, R. H.; MANJI, H. K. Lithium. In.: SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. **Textbook of Psychopharmacology**. 2<sup>nd</sup> ed. Washington: The American Psychiatric Press, 1998. P. 379-429.

LIDELL, M. E.; ENERBÄCK, S. Brown adipose tissue – a new role in humans? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 6, p. 319-25, 2010.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 523-32, 1997.

LYDON, E.; EL-MALLAKH, R.S. Naturalistic long-term use of methylphenidate in bipolar disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 26, p. 516-8, 2006.

KING, T. D.; JOPE, R. S. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. **Neuroreport**, v. 16, p. 597-601, 2005.

MANJI, H. K.; MOORE, G. J.; CHEN, C. Lithium at 50: have de neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 929-40, 1999.

MAREK, K.; JENNINGS, D. Can we image premotor Parkinson disease? **Neurology**, v. 72, p. S21-6, 2009.

MARMOL, F. Lithium: Bipolar disorder and neurodegenerative diseases. Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1761-71, 2008.

MARTINS MR, *et al.* Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. **Brain Research**, v. 1078, p.189-97, 2006.

MCCANN, U. D. *et al.* Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [<sup>11</sup>C]WIN-35,428. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 8417-22, 1998.

MELLERUP, E. T. *et al.* Diurnal variation of blood glucose during lithium treatment. **Journal of Affective Disorders**, v. 5, p. 341-7, 1983.

MICHANIE, C. *et al.* Symptom prevalence of ADHD and ODD in a pediatric population in Argentina. **Journal of Attention Disorders**, v. 11, p. 363-7, 2007.

MILLER, A. R. *et al.* Prescription of methylphenidate to children and youth, 1990-1996. **Canadian Medical Association Journal**, v. 165, p. 1489-94, 2001.

MOORE, G. J. *et al.* Lithium-induced increase in human brain grey matter. **Lancet**, v. 356, p. 1241-2, 2000.

MORGAN, M. A.; PFAFF, D.W. Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. **Hormones and Behavior**, v. 40, p. 472-82, 2001.

NONAKA, S.; HOUGH, C. J.; CHUANG, D. M. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 95, p. 2642-7, 1998.

OBATA, T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. **Journal of Neural Transmission**, v. 109, p. 1159-80, 2002.

O'BRIEN, W. T. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 6791-8, 2004.

O'DONNELL, K. C.; GOULD, T. D. The behavioral actions of lithium in rodent models: Leads to develop novel therapeutics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2007.

OLIVEIRA, J. M. Efeitos do tratamento com lítio e/ou estradiol sobre um modelo de estresse crônico variado. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

OSTERBERG, L., BLASCHKE, T. Adherence to medication. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 487-97, 2005.

PASCUAL, T., GONZALES, J. L. A protective effect of lithium on rat behaviour altered by ibotenic acid lesions of the basal forebrain cholinergic system. **Brain Research**, v. 695, p. 289-92, 1995.

PATKAR, A. A. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of augmentation with an extended release formulation of methylphenidate in outpatients with treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 26, p. 653-656, 2006.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-67, 1985.

PERKS, S. M; CLIFTON, P. G. Reinforcer revaluation and conditioned place preference. **Physiology & Behavior**, v. 61, p. 1-5, 1997

PERLICK, D. A. *et al.* Medication non-adherence in bipolar disorder: A patient-centered review of research findings. **Clinical Approaches in Bipolar Disorders**, v. 3, p. 56-64, 2004.

POLANCZYK, G.; ROHDE, L. A. Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 20, p. 386-92, 2007.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-2, 1977.

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

RAO, J. S.; RAPOPORT, S. I. Mood-stabilizers target the brain arachidonic acid cascade. **Current Molecular Pharmacology**, v. 2, p. 207-14, 2009.

RAVINDRAN, A. V. *et al.* Osmotic-release oral system methylphenidate augmentation of antidepressant monotherapy in major depressive disorder: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, p. 87-94, 2008.

REGHUNANDANAN, V. *et al.* Lithium chloride SCN injection alters the circadian rhythm of food intake. **Chronobiology International**, v. 6, p. 123-9, 1989.

REN, M. *et al.* Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia / reperfusion model. **Neuroscience**, v. 100, p. 6210-5, 2003.

RITTER, S.; MCGLONE, J. J. ; KELLEY, K. W. Absence of lithium-induced taste aversion after area postrema lesion. **Brain Research**, v. 201, p. 501-6, 1980.

ROCHA, E. *et al.* Lithium treatment causes gliosis and modifies the morphology of hippocampal astrocytes in rats. **Neuroreport**, v. 9, p. 3971-4, 1998.

ROCHA, E.; RODNIGHT, R. Chronic administration of lithium chloride increases immunodetectable glial fibrillary acidic protein in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, p. 1582-4, 1994.

RODRÍGUEZ DE LA CONCEPCIÓN, M. L. *et al.* Lithium inhibits brown adipocyte differentiation. **FEBS Letters**, v. 579, p. 1670-4, 2005.

ROSENBAUM, J. F. *et al.* **Handbook of Psychiatric Drug Therapy**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SADOCK, B. J.; SADOCK, V. A. **Kaplan & Sadock – Compêndio de Psiquiatria. Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. 9<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Armed, 2007.

SCHEFFER, R. E. *et al.* Randomized, placebo-controlled trial of mixed amphetamine salts for symptoms of comorbid ADHD in pediatric bipolar disorder after mood stabilization with divalproex sodium. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, p. 58-64, 2005.

SCHOU, M. *et al.* Lithium and pregnancy. I. Report from the Register of Lithium Babies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 135-6, 1973.

SCHOU, M. *et al.* Pharmacological and clinical problems of lithium prophylaxis. **British Journal of Psychiatry**, v. 116, p. 615-9, 1970.

SCHOU M. The combat of non-adherence during prophylactic lithium treatment. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 95, p. 361-3, 1997.

SCHOU M., *et al.* The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 17, p. 250-60, 1954.

SHALDUBINA, A.; AGAM, G.; BELMAKER, R. H. The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, p. 855-66, 2001.

SHALDUBINA, A. *et al.* SMIT1 haploinsufficiency causes brain inositol deficiency without affecting lithium-sensitive behavior. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 88, p. 384-8, 2006.

SHAO, L.; YOUNG, L. T.; WANG, J. F. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. **Biological Psychiatry**, v. 58, p. 879-84, 2005.

SHARMA, A. M. *et al.* Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis. **Hypertension**, v. 37, p. 250-4, 2001.

SHAW, D. M. Mineral metabolism, mania, and melancholia. **British Medical Journal**, v. 2, p. 262-7, 1966.

SILVESTREIN, R. B. *et al.* The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 177, p. 317-21, 2009.

SMITH, D. F. Biogenic amines and the effect of short term lithium administration on open field activity in rats. **Psychopharmacologia**, v. 41, p. 295-300, 1975.

SRIVASTAVA, P. *et al.* Insulin like effects of lithium and vanadate on the altered antioxidant status of diabetic rats. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 80, p. 283-93, 1993.

STEINER, J. E. *et al.* Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 53-74, 2001.

STOLL, A. L. *et al.* Methylphenidate augmentation of serotonin selective reuptake inhibitors: a case series. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 57, p. 72-6, 1996.

SWARTZ, C. M.; WILCOX, J. Characterization and prediction of lithium blood levels and clearances. **Archives of General Psychiatry**, v. 41, p. 1154-8, 1984.

TILLMAN, R. *et al.* Ages of onset and rates of syndromal and subsyndromal comorbid DSM-IV diagnoses in a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 42, p.1486-93, 2003.

TOMKIEWICZ, M.; STEINBERG, H. Lithium treatment reduces morphine self-administration in addict rats. **Nature**, v. 252, p. 227-9, 1974.

TSENG, W. P.; LIN-SHIAU, S. Y. Long-term lithium treatment prevents neurotoxic effects of beta-bungarotoxin in primary cultured neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, p. 633-41, 2002.

VAN HARTEN, P. N., *et al.* Evidence that lithium protects against tardive dyskinesia: the Curaçao Extrapyramidal syndromes study VI. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, p.152-5, 2008.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1500-8, 2009.

VASCONCELLOS, A. P., *et al.* Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. **Physiology & Behavior**, v. 79, p. 143-9, 2003.

VIRTANEN, K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p.1518-25, 2009.

WADA, A. Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 110, p. 14-28, 2009.

WAN, F. J. *et al.* Systemic administration of d-amphetamine induces long-lasting oxidative stress in the rat striatum. **Life Sciences**, v. 66, p. PL205-12, 2000.

WEI, H. *et al.* Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. **Neuroscience**, v. 106, p. 603-12, 2001.

WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 131-6, 1991.

WILOT, L. C. *et al.* Chronic treatment with lithium increases the ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience Letters**, v. 368, p.167-70, 2004.

WILOT, L. C. *et al.* Lithium and valproate protect hippocampal slices against ATP-induced cell death. **Neurochemical Research**, v. 32, p.1539-46, 2007.

WOOD, A. J. *et al.* The pharmacokinetic profile of lithium in rat and mouse; an important factor in psychopharmacological investigation of the drug. **Neuropharmacology**, v. 25, p.1285-8, 1986.

WOOD, G. E. *et al.* Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, p. 3973-8, 2004.

YANG, F.; LI, J.; YANG, F. Neuroprotection of lithium and the antagonism of lithium to toxic effects of lead on primary culturing cerebrocortical neurons in vitro. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 33, p. 671-4, 2004.

YAN, X. B. *et al.* Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 282-9, 2007.

YOUDIM, M. B. H.; ARRAF, Z. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 1130-40, 2004.

YOUNG, J. L. *et al.* Medication adherence failure in schizophrenia: a forensic review of rates, reasons, treatments, and prospects. **Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law**, v. 27, p. 426-44, 1999.

YOUNGS, R.M. *et al.* Lithium administration to preadolescent rats causes long-lasting increases in anxiety-like behavior and has molecular consequences. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 6031-9, 2006.

YU, H. *et al.* Uptake and release effects of diethylpropion and its metabolites with biogenic amine transporters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 2689-92, 2000.

YUSKAITIS, C. J. *et al.* Lithium ameliorates altered glycogen synthase kinase-3 and behavior in a mouse model of fragile X syndrome. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 632-46, 2010.

ZHOU, R. *et al.* The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 4493-502, 2005.