

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA
PELO LÍTIO**

ANA JULIA PENTEADO

CASCAVEL - PARANÁ
2017

ANA JULIA PENTEADO

**ESTUDO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA
PELO LÍTIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Área de concentração Fármacos e Medicamentos, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Itinose

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek

CASCADEL – PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P47e

Penteado, Ana Julia

Estudo do efeito da N-Acetilcisteína sobre a toxicidade induzida pelo lítio
./ Ana Julia Penteado. — Cascavel, 2017.
132 p.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Itinose

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de
Cascavel, 2017

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

1. Antioxidante. 2. Efeitos tóxicos. 3. Espectrometria de absorção atômica
de chama. 4. Estabilizadores de humor. 5. Transtorno bipolar. I. Itinose, Ana Maria. II.
Marek, Carla Brugin. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 615

CIP – NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

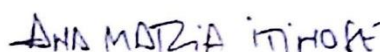
ANA JULIA PENTEADO

ESTUDO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A TOXICIDADE
INDUZIDA PELO LÍTIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Itinose

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Ana Maria Itinose
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE



Prof^a/Dr^a. Silmara Baroni
15^a Regional de Saúde

Cascavel - PR
2017

BIOGRAFIA

Ana Julia Penteado, nascida no ano de 1992, na cidade de Laranjeiras do Sul. Graduada em Farmácia no ano de 2014, pela Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná – UNICENTRO. Atualmente, é mestranda no curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, na linha de pesquisa de Fármacos e Medicamentos, atuando como membro do grupo de pesquisa Toxicologia Celular.

“Donde no puedas amar, no te demores.”

(Frida Kahlo)

AGRADECIMENTOS

Acredito que o mais importante ao final dessa jornada seja agradecer. Agradecer pessoas extraordinárias que não apenas me ajudaram, mas que possibilitaram que esse trabalho fosse concluído; eu não teria conseguido sem vocês. Começo agradecendo aos meus pais, que me aguentam há mais tempo (hahaha), por todo apoio e incentivo que me dão, incondicionalmente. Ir para casa em alguns finais de semana foi um alívio em meio ao caos. Para minha sorte, vocês me deram duas irmãs, Denize e Fernanda, e posso dizer que são dois laços de amor, confusão (né, Fer hahaha) e afinidade, minha vida é mais gostosa com vocês. Como amor nunca é demais, a Luiza e a Carol vieram para alegrar meus dias, e me mostrar que a vida pode ser mais leve e divertida, Lu, você salvou muitos dias meus, “minha super heroína”. Família também é feita de agregados, e eu tive sorte nisso, obrigada Ivan, por fazer parte da minha vida. Minha família é sensacional, amo vocês.

Agradeço também às minhas amigas de longa data, Larissa, Vanessa, Rafaella, Andreia, Marciele e Luana, vocês são muito especiais e levo todas com carinho no meu coração. Sendo a amizade uma das coisas mais importantes, agradeço também a vocês, Ana Clara, Kaílla e Thiele, a Farmácia foi muito generosa comigo, quando me apresentou a vocês, tê-las em infinitos áudios e encontros no Skype é algo que não sei expressar o quão importante foi e é para mim! Vocês sempre se fizeram presentes no meu dia-a-dia, mesmo na distância física, mostrando-me que amizade não é estar, é ser presente.

Como a vida tem me mostrado que amizade nunca é demais, eu gostaria de mostrar minha gratidão aos amigos que fiz na Toxicologia, Fabiana, Isabella, Fernanda, Denise, Julio, Elouisa e Marina. Vocês me ajudaram tanto que a gratidão parece não ser suficiente. Vocês me ajudaram de tantas formas, foram dúvidas com o Office (Fabiíííí, me ajuda com essa tabela?), com programas de estatística, sobre metodologias, sobre experimentos, e de tantas outras coisas. E não me ajudaram apenas com a teoria, me ajudaram, e MUITO, na prática. Vocês não tiveram preguiça de me ajudar quando eu precisei. Com vocês, eu entendi o que é trabalhar em grupo e como isso é importante. Além de toda a ajuda no meu trabalho, vocês ainda me ouviram e tiveram paciência comigo em momentos que eu estava desanimada e perdida...eu nem sei como agradecer por isso. Como o laboratório de Toxicologia é uma família grande, agradeço também a Suélyn, Priscila e Angélica, pela convivência,

mesmo que pouco, foi muito bom conhecer pessoas como vocês. Minha gratidão aos estagiários, que tanto me ajudaram, Luiz Guilherme, Victor e Ana Paula. Vocês foram minha mão direita na correria do dia-a-dia. Foi muito mais divertido e agradável passar por essa fase com todos vocês da família Toxicologia. Agradeço também ao Remote Engineer da empresa Agilent, Felipe Chagas, você teve a paciência e a competência de me guiar por telefone para que eu fosse capaz de operar com sucesso o espectrômetro de absorção atômica com chama. Sem a sua ajuda, eu ainda estaria lá tentando.

Gostaria de agradecer também à prof. Dra. Sueli Pércio Quináia e à prof. Silmara Baroni, por terem se disponibilizado a participarem das bancas de qualificação e defesa, a contribuição de vocês, certamente tornará o meu trabalho melhor. Agradeço à minha orientadora, prof. Dra. Ana Maria Itinose, e à minha coorientadora, prof. Dra. Carla Brugin Marek, por terem me aceitado no laboratório de Toxicologia mesmo sem me conhecer, obrigada pela confiança em mim e no meu trabalho, nestes dois anos, vocês me ensinaram que eu posso ir além do que imagino, e essa aprendizagem vou levar para a vida.

Por último, mas não menos importante, agradeço, com todo o meu amor, ao meu noivo Leko. Você foi tudo e mais um pouco nesses dois anos, mesmo à distância, sempre soube que poderia ligar para você quando eu precisasse e que você me ajudaria como pudesse. Você me ajudou lendo e opinando sobre os meus textos, me escutando falar dos experimentos (mesmo você não gostando de ouvir sobre os ratos hahaha), me aconselhando, me confortando em dias difíceis e me fazendo rir. Muito obrigada pela compreensão e paciência, e também pela dedicação em me fazer feliz.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada de acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e será apresentada em formato misto, sendo composta por revisão bibliográfica breve do assunto e dois artigos científicos para publicação. O primeiro artigo, intitulado “Validação da quantificação de lítio no espectrômetro de absorção atômica – modo emissão”, será submetido à revista *Química Nova*, e o segundo artigo, intitulado “Análise do perfil de toxicidade do lítio e investigação de efeitos protetores da N-acetilcisteína”, será submetido à revista *Archives of Toxicology*. Ambos foram formatados conforme as normas das revistas científicas escolhidas. O projeto teve todos os experimentos realizados no Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

ESTUDO DO EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA PELO LÍTIO

RESUMO

O carbonato de lítio é o principal medicamento utilizado no tratamento do transtorno bipolar. Este medicamento possui estreita faixa terapêutica e geralmente é utilizado de forma crônica pelos pacientes, gerando a necessidade da monitorização terapêutica por meio da quantificação plasmática de lítio. Além disso, os registros de efeitos tóxicos decorrentes do uso medicinal crônico remetem a necessidade de uma ferramenta que auxilie no tratamento. Desta forma, uma metodologia confiável para a quantificação de lítio e um adjuvante terapêutico surgem como meios de melhorar a qualidade de vida do paciente. Em nosso trabalho, utilizamos o espectrômetro de absorção atômica de chama para validar um método para quantificação de lítio e os resultados foram satisfatórios, pois cumpriram os critérios exigidos, assegurando a confiabilidade do método. Com foco em buscar um adjuvante terapêutico, a N-acetilcisteína (NAC) foi estudada por apresentar características importantes contra os efeitos tóxicos causados pelo lítio. Em nossos resultados o lítio apresentou efeitos tóxicos principalmente induzindo o estresse oxidativo, enquanto que a coadministração de NAC reverteu esse efeito nos órgãos fígado, rim e cérebro. O uso da NAC como adjuvante terapêutico mostrou ser promissor, porém, mais estudos precisam ser realizados para entender melhor essa relação.

Palavras-chave: Antioxidante, Efeitos tóxicos, Espectrometria de absorção atômica de chama, Estabilizadores de humor, Transtorno bipolar.

STUDY OF THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTINE ON TOXICITY INDUCED BY LITHIUM

ABSTRACT

Lithium carbonate is the main drug used to treat bipolar disorder. This medicine has a narrow therapeutic range and is usually used in a chronic way by the patients, generating the need for therapeutic monitoring by means of plasma lithium quantification. In addition, records of toxic effects from chronic medical use reinforce the need for a tool that assists in the treatment. Thus, a reliable methodology for the quantification of lithium and a therapeutic adjuvant emerge as a means to improve the quality of life of the patient. In our work, we used the flame atomic absorption spectrometer to validate the method for quantification of lithium and the results were satisfactory, because they complied with the required criteria, assuring the reliability of the method. In order to find a therapeutic adjuvant, N-acetylcysteine (NAC) was studied for presenting important characteristics against the toxic effects caused by lithium. In our results lithium presented toxic effects mainly inducing oxidative stress, while the coadministration of NAC reversed this effect in the liver, kidney and brain organs. The use of NAC as a therapeutic adjuvant has been shown to be promising, however, further studies need to be performed to better understand this relationship.

Keywords: Antioxidant, Toxic effects, Flame atomic emission spectrometry, Mood stabilizers, Bipolar disorder.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	32
4.1. ARTIGO 1.....	32
4.2. ARTIGO 2.....	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
7. ANEXOS.....	101

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1. Determinação da precisão e exatidão intracorrída e intercorrída com água ultrapura	47
Tabela 2. Determinação da precisão e exatidão intracorrída e intercorrída em plasma	48
Tabela 3. Determinação do efeito matriz.....	50

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1. Avaliação da linearidade utilizando a técnica FAAS. (A) e (B) Concentrações de lítio analisadas: 0,006, 0,014, 0,03, 0,05 e 0,1 mEq/L em curvas de adição de padrão sobre água ultrapura e matriz plasma, respectivamente. (C) e (D) Concentrações de lítio analisadas: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mEq/L em curvas de adição de padrão sobre água ultrapura e matriz plasma, respectivamente	45
Figura 2. Curvas de adição de padrão utilizando a técnica FAAS e análise da variação das três curvas de adição de padrão sobre (A) água ultrapura e (B) matriz plasma normal, em relação ao valor nominal do padrão	46
Figura 3. Efeito residual. Análise de efeito residual utilizando o branco e o LSQ.....	49

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Fig. 1 Alteração no peso dos animais. (A) A figura representa a variação do peso dos animais entre o primeiro dia de tratamento e o último dia de tratamento. (B) Acompanhamento da ingestão de ração e de (C) água dos animais no decorrer do tratamento. Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM	79
Fig. 2 Efeito do tratamento sobre o índice do peso dos órgãos. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li.....	80
Fig. 3 Análise do efeito da coadministração de NAC sobre a quantificação do lítio. Não houve alterações significativas entre os grupos. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM	81
Fig. 4 Análise dos parâmetros hematológicos, e seus perfis na administração de Li, NAC e na coadministração de NAC + Li. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li	82
Fig. 5 Contagem e diferencial de leucócitos, e o efeito da administração de NAC, Li e NAC + Li sobre eles. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li	83
Fig. 6 Dosagens bioquímicas realizadas no plasma de ratos machos conforme o tratamento exposto no gráfico. Foram realizados a dosagem de (A) glicose, de indicadores de distúrbios hepáticos, como a FA (B), AST (C) e ALT (D), e parâmetros da função renal, como a creatinina (E) e uréia (F). Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li	84
Fig. 7 Efeito da administração de NAC, e Li e da codministração de ambos na atividade da butirilcolinesterase presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li	85
Fig. 8 Efeito da administração de NAC, e Li e da codministração de ambos na peroxidação lipídica (LPO) em homogenatos de fígado (A), de rim (B) e de cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li.....	86
Fig. 9 Efeito da administração de NAC, e Li e da codministração de ambos na quantidade de tióis em homogenatos de fígado (A), de rim (B) e de cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li	87

Fig. 10 Efeito da administração de NAC, e Li e da codministração de ambos na atividade da superóxido dismutase (SOD) presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li88

Fig. 11 Efeito da administração de NAC, e Li e da codministração de ambos na atividade da butirilcolinesterase presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li.....89

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADH	Hormônio antidiurético
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BDRS	Escala de depressão bipolar
BuChE	Butirilcolinesterase
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Catalase
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENaC	Canal de sódio epitelial
EPR	Erro padrão relativo
FA	Fosfatase alcalina
FAAS	Espectrômetro de absorção atômica de chama
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Fator de matriz normalizado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH-Px	Glutathiona-peroxidase
GSK-3	Glicogênio-sintase-quinase-3
HUOP	Hospital Universitário do Oeste do Paraná
IRM	Imagens de ressonância magnética
LACEPE	Laboratório de análises clínicas ensino e pesquisa
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MADRS	Escala de depressão de Montgomery & Åsberg

NAC	N-acetilcisteína
NHE3	Isoforma 3 do trocador sódio-hidrogênio
PTCh	Propioniltiocolina
PTH	Hormônio da paratireoide
SEM	Erro padrão médio
SOD	Superóxido-dismutase
TB	Transtorno bipolar
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
YMRS	Escala de avaliação de mania de Young

1. INTRODUÇÃO

O transtorno bipolar (TB) é uma doença crônica, caracterizada pela alternância de episódios de depressão e de mania, que necessita de um tratamento adequado, reduzindo, assim, os sintomas e a frequência destes episódios de alternância de humor, a incapacitação e as consequências psicossociais.

A medicação mais indicada para o tratamento do TB é o carbonato de lítio, sendo que seu efeito terapêutico está diretamente relacionado com a sua concentração plasmática, com níveis terapêuticos entre 0,6 e 1,2 mEq/L. Portanto, níveis abaixo de 0,6 mEq/L não exercem efeito terapêutico e níveis acima de 1,5 mEq/L são considerados tóxicos. Devido à estreita faixa terapêutica, e por ser usado em tratamentos crônicos, o medicamento pode acumular-se gradualmente em tecidos como o cérebro, podendo causar toxicidade crônica.

Devido a estas características, tem sido relatado respostas tóxicas ao lítio, como, alterações neuromusculares, distúrbios cardiovasculares, sintomas gastrintestinais, lesões hepáticas, incluindo alterações histológicas, enzimáticas e no metabolismo de carboidratos. No rim, ocorrem também alterações histológicas, além de insuficiência renal crônica com perda progressiva da função renal. Com relação ao cérebro, os resultados são controversos, algumas pesquisas indicam que o uso crônico de lítio previne mudanças estruturais e tem efeitos neuroprotetores, e outras, relatam os prejuízos no que diz respeito à cognição, aprendizagem, vigilância, alerta e em memória de curto prazo. Outro efeito marcante do lítio é a alteração nos níveis das enzimas antioxidantes, níveis de óxido nítrico e da peroxidação lipídica.

Para evitar os efeitos tóxicos causados pelo uso medicinal do lítio, e também para possibilitar a correlação entre dose e efeitos tóxicos, é essencial a quantificação do lítio em amostras biológicas. Com essa finalidade, a técnica que emprega o espectrômetro de absorção atômica de chama (FAAS) no modo emissão é uma das mais utilizadas, sendo necessária a validação da metodologia analítica para assegurar a confiabilidade do método e dos resultados.

Desta forma, a relação entre a concentração plasmática do lítio e seus efeitos tóxicos se mostra extremamente importante, para que haja uma melhor compreensão e possível redução destes efeitos tóxicos, otimizando, portanto, a farmacoterapia. Além disso, é necessário a busca de tratamentos mais eficazes para intoxicações causadas pelo lítio, uma vez que, atualmente, não existe um antídoto específico.

Com este enfoque, o uso da N-acetilcisteína (NAC) tem apresentado efeitos promissores devido às suas propriedades antioxidantes e redução de efeitos tóxicos. Testes com animais mostraram que o seu uso evitou o dano renal induzido por lítio. Estudos comprovaram que a associação de N-acetilcisteína na farmacoterapia, promoveu melhoras em escalas de avaliação do distúrbio bipolar. Em vista disso, torna-se importante um estudo para melhor entendimento de uma possível ação da NAC sobre o lítio.

2. OBJETIVOS

Objetivo central:

Investigar uma possível ação protetora da N-acetilcisteína sobre os efeitos tóxicos do lítio em modelo animal.

Objetivos específicos:

Desenvolver um método analítico adequado para a quantificação plasmática do lítio, utilizando espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS) no modo emissão.

Verificar os efeitos tóxicos renais e hepáticos causados pelo lítio, em modelo animal.

Verificar os efeitos do lítio sobre o estresse oxidativo, em modelo animal.

Verificar os efeitos da N-acetilcisteína sobre as alterações hepáticas e renais causadas pelo lítio, em modelo animal.

Verificar os efeitos da N-acetilcisteína sobre as alterações no estresse oxidativo causadas pelo lítio, em modelo animal.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Perfil de toxicidade do lítio no transtorno bipolar

O transtorno bipolar (TB) é uma doença crônica, caracterizada pela alternância entre períodos de depressão e períodos de mania. O TB possui, clinicamente, uma infinidade de perfis com sintomas diferentes, e estes perfis variam consideravelmente de um indivíduo para o outro (ALDA *et al.*, 2009; MALHI *et al.*, 2009). Para acompanhar as manifestações clínicas do TB, são usadas escalas de avaliação que servem para medir e caracterizar o fenômeno, isto é, traduzem o fenômeno clínico em informações objetivas e quantitativas, sendo úteis no diagnóstico e avaliação do tratamento. Existem várias escalas de avaliação do TB, a Escala de depressão bipolar (BDRS) foi o primeiro instrumento criado para detectar e mensurar os perfis específicos de TB, incluindo itens para avaliar a gravidade dos sintomas depressivos e maníacos. Para avaliar fases específicas do TB, há a escala para avaliar a depressão de Montgomery & Åsberg (MADRS), e a escala de avaliação de mania de Young (YMRS), que é mais utilizada em estudos clínicos com pacientes maníacos (BERK *et al.*, 2007).

Considerando que o TB é uma doença crônica, os principais objetivos do tratamento são: a diminuição dos sintomas maníacos e depressivos, a diminuição da frequência com que o humor se altera e a severidade das alterações comportamentais, conferindo maior estabilidade no humor e proporcionando uma profilaxia eficaz (MALHI *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2006; SPROULE, 2002). O principal medicamento utilizado no tratamento do TB é o lítio. Este foi descoberto em 1817, sendo um dos elementos metálicos mais leves, (KSZOS & STEWART, 2003) integrando o grupo dos metais alcalinos com o sódio e o potássio (CASARETT & KLAASSEN, 2008). Seu uso na prática clínica, ocorreu apenas em 1949 quando John Cade empregou o lítio no tratamento de pacientes psiquiátricos. Esta indicação de uso terapêutico foi, então, avaliada por outros pesquisadores, como SCHOU *et al.* (1954), que, alguns anos depois, comprovaram a sua eficácia para o tratamento de pacientes maníacos e para a profilaxia do TB (ZUNG, MICHELON & CORDEIRO, 2010).

Como resultado destas evidências, o lítio foi o primeiro fármaco aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o TB, sendo, desde então, utilizado para o

tratamento das fases agudas e de manutenção do TB. Além disso, o lítio é o único medicamento com propriedades estabilizadoras do humor comprovadas (ROSA *et al.*, 2006; BAUER & MITCHNER, 2004; SPROULE, 2002). Seu uso, por mais de meio século na clínica médica, tem gerado uma riqueza de evidências empíricas, mostrando um perfil terapêutico único que inclui, por exemplo, características adicionais, como o seu efeito neuroprotetor e anti-suicida (LEWITZKA *et al.*, 2015; VAN ERP *et al.*, 2012).

Apesar de ser tão indicado e eficaz, o seu uso demanda atenção e cuidados específicos, por apresentar características como: estreita faixa terapêutica, lento início de ação, variação na relação dose-nível plasmático, devido a interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas, sendo que estes fatores aumentam o risco de intoxicação. Desta forma, preconiza-se a monitorização dos efeitos tóxicos do lítio, para garantir a eficácia do tratamento e a segurança do paciente (DE SOUZA *et al.*, 2013; BUSBY & SAJATOVIC 2010; SEVERUS *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2007).

Propriedades farmacológicas

O lítio está disponível como carbonato de lítio em cápsulas, comprimidos e comprimidos de liberação lenta, sendo facilmente, e quase completamente, absorvido no trato gastrointestinal (ROSA *et al.*, 2006; VISMARI *et al.*, 2002). As concentrações séricas máximas ocorrem entre 30 minutos e 3 horas após a ingestão de comprimidos e cápsulas convencionais (MALHI *et al.*, 2012; KECK & MCELROY, 2002).

Inicialmente, o fármaco é distribuído no fluído extracelular e, gradualmente, levando entre 6 e 10 horas, atinge os compartimentos intracelulares (LARODIE *et al.*, 1999). Sua distribuição é desigual, o que pode ser justificado pelo fato de não se ligar às proteínas séricas, atravessar livremente a placenta e cruzar lentamente a barreira hematoencefálica (FYRO, PETTERSSON & SEDVALL, 1970). Devido a isso, os picos no cérebro ocorrem cerca de 24 horas após a ingestão (MALHI *et al.*, 2012; CHEN, SHEN & LU, 2004). O lítio não sofre metabolização e 95% da sua excreção é renal (MALHI *et al.*, 2012; SPROULE, HARDY & SHULMAN, 2000), sendo o restante excretado pelo suor e pelas fezes, com meia-vida de eliminação de aproximadamente 24 horas (ROSA *et al.*, 2006; KECK & MCELROY, 2002).

O mecanismo exato pelo qual o lítio age ainda não é totalmente compreendido. No entanto, evidências indicam que o lítio tem ação em uma série de neurotransmissores (MALHI *et al.*, 2012; KECK & MCELROY, 2002), como a

serotonina, dopamina, noradrenalina, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e acetilcolina (BRUNELLO & TASCEDDA, 2003; LAROUDIE *et al.*, 1999; DIXON & HOKIN, 1998; DIXON & HOKIN, 1997; RISBY *et al.*, 1991; BALDESSARINI & VOGT, 1988). O lítio também é ativo, possivelmente por meio dos seus efeitos na transdução de sinal, tais como a hidrólise do fosfoinosítídeo, glicogênio-sintase-quinase-3 (GSK-3), e fatores neurotróficos (BEAULIEU & CARON, 2008; QUIROZ, GOULD & MANJI, 2004; KECK & MCELROY, 2002; LENOX & HAHN, 2000). Uma das hipóteses mais aceitas para o modo de ação do lítio é a "hipótese de depleção do inositol". Supõe-se que o lítio age em regiões do cérebro onde inositol está em excesso, e são encontrados níveis elevados de inositol em episódios de mania e depressão, mas níveis inalterados em pacientes eutímicos (MALHI *et al.*, 2012; IKONOMOV & MANJI, 1999).

Propriedades toxicológicas

Como os sais de lítio partilham algumas características com os de sódio e potássio, são capazes de substituir estes íons em vários locais no organismo (LAROUDIE *et al.*, 1999). Devido a esta característica, o lítio tem entrada livre em células renais, mas o transporte para fora das células é mais limitado e, gradualmente, isso resulta em acumulação intracelular (TIMMER & SANDS, 1999). Mais especificamente, o lítio é filtrado completamente nos glomérulos, e cerca de 80% é reabsorvido nos túbulos proximais (MALHI *et al.*, 2012).

O lítio não está ligado às proteínas plasmáticas, mas está associado às células vermelhas do sangue. Sua distribuição ocorre de maneira desigual com níveis mais elevados no rim, tireoide, e ossos, em comparação a outros tecidos (CASARETT & KLAASSEN, 2008). Se a função renal estiver comprometida, a meia-vida de eliminação pode aumentar em até 60 horas (CASARETT & KLAASSEN, 2008; TIMMER & SANDS, 1999). Sendo assim, fatores como hiponatremia, depleção do volume de fluido, e a associação com diuréticos ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) podem reduzir a depuração renal de lítio e levar à toxicidade (EVANS, SCHENTAG & JUSKO 1992).

Outro fator que contribui para o aumento de toxicidade do lítio é o seu estreito índice terapêutico, sendo que há proporcionalidade entre a toxicidade e concentrações plasmáticas acima das consideradas terapêuticas, embora alguns

pacientes possam apresentar sinais de toxicidade na extremidade superior do intervalo terapêutico (CASARETT & KLAASSEN, 2008, KECK & MCELROY, 2002).

Intoxicação

Intoxicações relacionadas com a exposição de lítio são, principalmente, decorrentes de seu uso medicinal (TIMMER & SANDS, 1999). Considerando o índice terapêutico relativamente estreito do lítio, é importante manter seus níveis dentro de uma faixa específica para cada paciente e isso exige um equilíbrio entre eficácia e efeitos adversos. Visando diminuir os efeitos tóxicos, há orientações que sugerem que, no início da terapia, o lítio deve ser administrado em pequenas doses divididas, para minimizar os efeitos secundários, e em seguida, titulado gradualmente para atingir níveis plasmáticos terapêuticos, enquanto se monitoriza a tolerabilidade (MALHI *et al.*, 2012; ESTADOS UNIDOS, 2010).

As concentrações plasmáticas terapêuticas-alvo recomendadas para o estado agudo maníaco-depressivo variam entre 0,8 e 1,5 mEq/L, e de 0,6 até 1,2 mEq/L para a terapêutica de manutenção (MALHI *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2006; SPROULE, 2002).

Durante uma intoxicação aguda, os níveis plasmáticos de lítio podem atingir níveis potencialmente letais ($> 2,0$ mEq/L) (GRANDJEAN & AUBRY, 2009a). Porém, idosos podem apresentar respostas tóxicas ao lítio mesmo em níveis terapêuticos (SHULMAN, 2010).

As respostas tóxicas nas intoxicações agudas incluem alterações neuromusculares (tremor, hiperirritabilidade muscular e ataxia), distúrbios cardiovasculares (arritmia cardíaca, hipertensão e colapso circulatório), sintomas gastrintestinais (anorexia, náuseas, diarreia e vômitos) e distúrbios do sistema nervoso central (períodos de apagão, crises epiléticas, fala arrastada, coma, perdas cognitivas, retardo psicossomático, e aumento da sede) (CASARETT & KLAASSEN, 2008; HARDMAN, GILMAN & LIMBIRD, 1995). Tais efeitos são, geralmente, transitórios (LYDIARD & GELENBERG, 1982; FYRO, PETTERSSON & SEDVALL, 1970) e, comumente, não duram mais do que um ou dois dias, porém, há casos em que os efeitos colaterais podem persistir por dias ou semanas (MALHI *et al.*, 2012; GRANDJEAN & AUBRY, 2009a).

Na intoxicação crônica, que é a mais frequente, os efeitos colaterais podem surgir após anos e décadas de tratamento, devido ao fato de que o lítio é normalmente,

receitado por longo prazo (MALHI *et al.*, 2012), e geralmente, está associado a outros fatores, como tolerância individual e comprometimento da função renal (MALHI *et al.*, 2012; GRANDJEAN & AUBRY, 2009a; CHEN, SHEN & LU, 2004). O tratamento longo pode levar a um acúmulo gradual de lítio no cérebro e isso ocorre, apesar das concentrações plasmáticas estarem dentro da faixa terapêutica, uma vez que o lítio tem uma meia-vida mais longa no cérebro do que no plasma (PLENGE *et al.*, 1994). Outro efeito decorrente do uso crônico de lítio, é o ganho de peso, e adicionalmente, o TB predispõe à obesidade devido a hipersonia, hiperfagia e diminuição da atividade física, principalmente quando os pacientes estão deprimidos (MALHI *et al.*, 2012).

Pacientes com TB têm taxas mais elevadas de anomalias primárias de tireoide do que a população em geral (BAUER *et al.*, 2008), e o uso do lítio tem provocado um efeito inibidor marcante sobre a liberação do hormônio da tireoide (CASARETT & KLAASSEN, 2008). Na glândula tireoide, o acúmulo de lítio altera a estimulação da tireoglobulina e inibe a absorção de iodo, o acoplamento iodotirosina e a secreção de tiroxina. A redução deste leva a um aumento no hormônio estimulante da tireoide (TSH) e o quadro clínico típico de hipotireoidismo emerge (MALHI *et al.*, 2012; JOHNSTON & EAGLES, 1999; LAZARUS, 1998; LOMBARDI *et al.*, 1993). Pacientes em tratamento com lítio são propensos a desenvolver hipercalcemia secundária a níveis elevados de hormônio da paratireoide (PTH) (KUSALIC & ENGELSMANN, 1999). Isto ocorre porque o lítio interfere na ligação de calcitonina e PTH, o que resulta em uma diminuição compensatória na excreção urinária de cálcio e está associada com uma diminuição da reabsorção óssea (MALHI *et al.*, 2012).

Alterações hepáticas induzidas pelo lítio

O uso de lítio, mesmo dentro do intervalo terapêutico, provoca impacto negativo, causando desordens hepáticas (APRAHAMIAN *et al.*, 2014; CHADHA, BHALLA & DHAWAN, 2008). Há vários estudos que relatam efeitos tóxicos do lítio sobre a função hepática, provocando alterações enzimáticas (SHARMA & IQBAL, 2005) e no metabolismo hepático de carboidratos (ALTAN *et al.*, 1993).

Aumento significativo das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e da atividade de fosfatase alcalina (FA) foram observados após tratamento com lítio (CHADHA, BHALLA & DHAWAN, 2010). A FA é o protótipo de enzimas que refletem as reduções patológicas no fluxo da bile; portanto, é possível que o aumento da atividade da fosfatase alcalina no fígado possa

ser devido à contribuição de células fagocíticas e à diminuição da secreção biliar em lesão hepática induzida por lítio (CHADHA, BHALLA & DHAWAN, 2010; HATOFF & HARDISON, 1981).

Estudos *in vivo* indicam que os sais de lítio exercem efeitos sobre o metabolismo da glicose do fígado (RODRIGUEZ-GIL *et al.*, 2000). Existem evidências de que o lítio possui alguns efeitos semelhantes aos da insulina em hepatócitos de rato, tais como a estimulação da síntese de glicogênio a partir de glicose. Este efeito pode estar relacionado com a ativação do glicogênio sintase, tanto na presença (NYFELER, FASEL & WALTER, 1981), quanto na ausência (BOSCH *et al.*, 1986) de glicose, por um mecanismo que provavelmente envolve uma diminuição concomitante na atividade da glicogênio-fosforilase (RODRIGUEZ-GIL *et al.*, 2000, BOSCH *et al.*, 1986).

De acordo com pesquisas, o tratamento com lítio causa alterações no estresse oxidativo e nas defesas antioxidantes, uma vez que seu uso induz a peroxidação lipídica, com aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além de influenciar na atividade da catalase (CAT), da superóxido-dismutase (SOD) e da glutatona-peroxidase (GSH-Px), (ESKANDARI *et al.*, 2012; NCIRI *et al.*, 2010; VIJAIMOHAN, MALLIKA & SHYAMALA, 2010; CHADHA, BHALLA & DHAWAN, 2008).

Alterações renais provocadas pelo lítio

A nefrotoxicidade induzida pelo lítio é uma complicação conhecida desde o advento de sua utilização no tratamento dos transtornos de humor e pode ocorrer com a exposição a longo prazo, mesmo quando os níveis de lítio permanecem dentro do intervalo terapêutico (GRUNFELD & ROSSIER, 2009; ALEXSANDER *et al.*, 2008; GITLIN, 1999). O tratamento a longo prazo com lítio pode prejudicar a capacidade de concentração renal e causar sintomas como poliúria e sede secundária (MALHI *et al.*, 2012; GRANDJEAN & AUBRY, 2009a; GITLIN, 1999). Além disso, acredita-se que as lesões renais ocorram devido a nefropatia hipocalêmica. A nefrotoxicidade causada por lítio tem como alvo principal os túbulos distais e coletores, com uma maior incidência de proteinúria e patologia glomerular associada (CASARETT & KLAASSEN, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2000).

Farmacologicamente, o lítio diminui a resposta do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) ao hormônio antidiurético (ADH), que por sua vez, limita a

capacidade do rim para armazenar a água livre. Em conjunto com o acúmulo de lítio nos túbulos coletores, o efeito de lítio sobre o ADH diminui a capacidade dos rins de concentrar a urina (GITLIN, 1999). As complicações renais em função tubular incluem o desenvolvimento de diabetes insípido nefrogênico e acidose tubular renal. (OLIVEIRA *et al.*, 2010; GRUNFELD & ROSSIER, 2009).

Devido as semelhanças entre o lítio, o sódio e o potássio, várias proteínas transportadoras de sódio no néfron também podem carrear o lítio, como a isoforma 3 do trocador sódio-hidrogênio (NHE3), o co-transportador de Na-K-2Cl, do ramo ascendente espesso da alça de Henle e o canal de sódio epitelial (ENaC), do túbulo coletor cortical. O ENaC tem uma permeabilidade 1,5 a 2 vezes maior ao lítio do que ao sódio. No entanto, ao contrário do sódio, o lítio não é exportado para fora da célula pela Na/K-ATPase, o que leva ao seu acúmulo intracelularmente (OLIVEIRA *et al.*, 2010; GRUNFELD & ROSSIER, 2009).

As alterações histológicas renais consistem, principalmente, na distrofia tubular e uma ligeira hipertrofia glomerular, a qual evolui para distrofia tubular mais pronunciada ao nível proximal. As alterações progridem com o tempo, tanto em nível glomerular quanto tubular (LOGHIN *et al.*, 1999). Além disso, podem ser encontrados níveis elevados de creatinina e ureia (KALANTARI *et al.*, 2015), de TBARS e alterações na atividade da CAT e SOD no rim, indicando aumento do estresse oxidativo provocado pelo lítio (NCIRI *et al.*, 2012; NCIRI *et al.*, 2010).

Consequências do transtorno bipolar no cérebro

Indivíduos com TB apresentam alterações como declínio cognitivo e funcional, além destas alterações, ocorrem também mudanças estruturais cerebrais progressivas, normalmente, com atrofia neuronal e redução da densidade celular, havendo uma redução da matéria cinzenta na região límbica anterior (BORA *et al.*, 2010). Mecanismos que podem conduzir essas mudanças incluem ativação de vias imunológicas e inflamatórias, disfunção nas vias mitocondriais, fatores apoptóticos e neurotróficos (DODD *et al.*, 2013; BERK *et al.*, 2011b).

Evidências indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia de várias desordens neuropsiquiátricas, incluindo o TB (PANDYA, HOWELL & PILLAI, 2013), com alterações significativas nas enzimas antioxidantes CAT e SOD, e nos níveis de óxido nítrico (ANDREAZZA *et al.*, 2008), sendo também relatado uma redução das defesas de glutathione (GAWRYLUK *et al.*, 2011).

Ações do lítio no cérebro

A ação neuroprotetora do lítio vem sendo investigada e imagens de ressonância magnética (IRM) confirmam a prevenção de mudanças no tamanho do cérebro. Pesquisas indicam que o uso crônico de lítio previne a redução de volume no córtex cingulado e do volume total da matéria cinzenta, além de ter efeitos potencialmente neuroprotetores no hipocampo (BERGER *et al.*, 2012; SASSI *et al.*, 2004; SASSI *et al.*, 2002). Estudos observaram que os efeitos neuroprotetores e neurotróficos do lítio ocorrem através de vários mecanismos de ação, agindo como inibidor do GSK-3 e indutor do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (CHUANG, WANG & CHIU, 2011; CHALECKA-FRANASZEK & CHUANG, 1999), além disso, o lítio também inibe o dano oxidativo e aumenta o conteúdo de glutatona em cultura de córtex de rato (CUI *et al.*, 2007).

Devido ao fato do lítio se distribuir amplamente no sistema nervoso central, ele age sobre alguns neurotransmissores, diminuindo a liberação de noradrenalina e aumentando a síntese da serotonina (SHAH *et al.*, 2015), os níveis de GABA e receptores GABA-B (BRUNELLO & TASCEDDA 2003), e também aumentando as concentrações de glutamato. Isto pode resultar na redução da neurotransmissão excitatória presente nos pacientes com TB (JOPE, 1999). Outro efeito do uso crônico de lítio é o aumento da produção de receptores muscarínicos M3 em células de grânulos em cultura de cerebelo de rato (GAO, FUKAMAUCHI & CHUANG, 1993).

Por outro lado, há pesquisas que relatam os prejuízos causados pelo uso prolongado de lítio, no que diz respeito à cognição, podendo ocorrer efeitos negativos discretos na aprendizagem, vigilância, alerta e em memória de curto prazo (STIP *et al.*, 2000; HONIG *et al.*, 1999). Alguns pacientes também relatam lentidão mental e psicomotora após a sua utilização (PACHET & WISNIEWSKI, 2003) e isso pode ser explicado com base no fato do lítio ter uma meia-vida mais longa em tecidos neurais, podendo causar neurotoxicidade (PLENGE *et al.*, 1994).

Tratamento

Estudos analisando pacientes com intoxicação crônica e aguda mostraram que a hemodiálise foi o método mais eficaz para a redução de lítio no sangue, ao passo que os diuréticos se mostraram parcialmente eficazes. Portanto, a hemodiálise pode ser utilizada para tratar a toxicidade de lítio e, em adição, os diuréticos de tiazida e

inibidores da ECA. Medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais também podem conferir benefícios profiláticos, e talvez impedir ou limitar o risco de disfunção renal, ou episódios de intoxicação (MALHI & TANIOUS, 2011; GITLIN, 1999; FINLEY, WARNER & PEABODY, 1995).

Em pacientes que fazem o uso de lítio, o tratamento com diuréticos deve ser acompanhado de reposição de água e eletrólitos (CASARETT & KLAASSEN, 2008; TIMMER & SANDS, 1999). A administração de potássio (20-50mmol/dia) pode ser útil na redução dos efeitos da toxicidade do lítio no rim (GITLIN, 1999). Em intoxicações agudas, a lavagem gástrica diminui a absorção do lítio, e a administração de ureia, manitol e aminofilina produzem aumentos na excreção de lítio (GRANDJEAN & AUBRY, 2009b; KECK & MCELROY, 2002).

Portanto, há ferramentas que são utilizadas no tratamento de intoxicações causadas pelo lítio, mas atualmente, não existe um antídoto específico disponível para estas intoxicações e nem uma opção terapêutica para diminuir os efeitos tóxicos do lítio. Neste contexto, estudos têm indicado que parâmetros de estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica e radicais livres, desempenham um papel importante na fisiopatologia de desordens neuropsiquiátricas como o TB (ANDREAZZA *et al.*, 2008). Foram encontrados também em pacientes com TB, níveis séricos de TBARS mais elevados, independentemente da fase psiquiátrica da doença: eufímicos, deprimido ou maníaco (ANDREAZZA *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, outro grupo também descobriu um aumento dos parâmetros de estresse oxidativo e ativação de defesas antioxidantes em episódios maníacos iniciais (PANDYA, HOWELL & PILLAI, 2013; MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2007).

O uso da N-acetilcisteína (NAC)

Tem sido discutido que compostos com propriedades antioxidantes podem melhorar os sintomas de algumas doenças como o TB, e devem ser explorados como possível terapia adjuvante. Com base nisso, a NAC tem sido indicada como farmacoterapia adjuvante para TB, devido às suas propriedades antioxidantes. Uma recente revisão sistemática de ensaios clínicos indicou que o uso de NAC como tratamento adjuvante mostrou resultados positivos (PANDYA, HOWELL & PILLAI, 2013; SARRIS, MISCHOULON & SCHWEITZER, 2011). Sendo um medicamento bem tolerado pelos pacientes e de uso seguro (AYORECH *et al.*, 2015).

A NAC é um derivado de cisteína e, como a maioria dos tióis (RSH), pode ser oxidado por uma grande variedade de radicais e, por ser um precursor direto da síntese de glutathione, reabastece os níveis intracelulares de glutathione reduzida. Adicionalmente, a N-acetilcisteína é um antioxidante direto, pois neutraliza os radicais livres antes que eles possam prejudicar as células (DHOUIB *et al.*, 2016). Seu alvo são uma série de vias moleculares incluindo neurotrofinas, transmissão glutaminérgica, glutathione, apoptose, função mitocondrial e vias inflamatórias. Estas vias são pertinentes a uma série de distúrbios neuropsiquiátricos (DODD *et al.*, 2013; BAKER *et al.*, 2002).

Estudos sobre o efeito de NAC avaliaram sua administração como terapia adjuvante em indivíduos com TB, e indicaram que o tratamento com NAC provoca uma melhora significativa em escalas utilizadas para avaliar o TB. Na escala de MADRS, houve uma redução de 50% em pontuações do MADRS de pacientes tratados com NAC (AYORECH *et al.*, 2015). BERK *et al.* (2011a) realizaram um estudo em que os participantes receberam NAC por um período de dois meses, e após esse período, foram designados aleatoriamente ao tratamento com NAC ou placebo, de uma forma duplamente cega por mais seis meses, em indivíduos com transtorno bipolar na fase de manutenção, tratados com NAC (1 g uma vez ao dia), foi descoberto que o tratamento NAC causou uma diminuição robusta em pontuações da Escala de Depressão Bipolar (BDRS) com tratamento utilizando NAC durante 2 meses em indivíduos com depressão moderada. Enquanto que, em outro estudo envolvendo pacientes com episódios de mania, ocorreu uma melhora na pontuação da escala YMRS, a qual os pacientes foram submetidos após o tratamento (MAGALHÃES *et al.*, 2013). Desta forma, as evidências indicam que a NAC tem efeitos positivos em sintomas de depressão e de mania (AYORECH *et al.*, 2015).

Além do mais, há evidências pré-clínicas que a NAC pode impedir o dano renal induzido por lítio (MALHI *et al.*, 2012; EFRATI *et al.*, 2005). Neste contexto, a NAC surge como uma opção em potencial.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1. ARTIGO 1

VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE LÍTIO NO ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA – MODO EMISSÃO

Ana Julia Penteado^a, Fernanda C. Silva^a, Carla B. Marek^a e Ana Maria Itinose^{a,*}

^aCentro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85.814-110 Cascavel – PR, Brasil.

*e-mail: itinoseanamaria@uol.com.br

VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE LÍTIO NO ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA – MODO EMISSÃO

RESUMO

O carbonato de lítio medicamento usado no tratamento do transtorno bipolar tem uma estreita faixa terapêutica e devido a esta característica, apresentam respostas tóxicas. Devido a isso, a quantificação do lítio em amostras biológicas é essencial para entender a relação entre concentração plasmática e efeitos tóxicos. Assim, o objetivo deste estudo é desenvolver um método analítico para quantificação plasmática de lítio, usando o espectrômetro de absorção atômica de chama (FAAS) no modo emissão. A validação do método analítico foi realizada com base nos parâmetros estabelecidos nas Resolução 27, de 17 de maio de 2012 e Resolução 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA. Os resultados da validação mostraram que o método usando o FAAS no modo emissão foi satisfatório para quantificação de lítio na água e no plasma e portanto, o método utilizado é: linear, com desvio do valor nominal dos padrões utilizado nas curvas de adição de padrão sobre a matriz dentro dos limites estabelecidos, com grau de dispersão dos resultados respeitando o limite determinado para os ensaios de precisão intracorrida e intercorrida, com valores de erro padrão relativo indicando a exatidão do método, com limites de detecção e de quantificação considerados adequados. Além disso, o método avaliado é seletivo para o lítio, não apresenta interferentes da matriz e não tem efeito residual.

Palavras-chaves: Espectrômetro de absorção atômica de chama, Validação, Estabilizadores de humor

VALIDATION OF LITHIUM QUANTIFICATION IN THE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETER - EMISSION MODE

ABSTRACT

Lithium carbonate used to treat bipolar disorder has a narrow therapeutic range and because of this feature, occur toxic responses. Because of this, the quantification of lithium in biological sample it is essential to understand the relationship between plasma concentration and toxic effects. Thus, the objective of this study is to develop an adequate analytical method for plasma quantification of lithium, using the flame atomic absorption spectrometer in emission mode (FAES). The validation of the analytical method was performed based on the parameters established in Resolution 27, of May 17, 2012 and Resolution 899, of May 29, 2003 of ANVISA. Partial results of analytical validation shown that the method using the FAAS mode emission was satisfactory for quantitation of lithium in water and plasma, since the test results the required conditions and therefore the method used is: linear, with deviation from the nominal value of the calibration curves within the established limits, with degree of dispersion of results respecting the limit to the intra-run and inter-run precision essays, with standard error values relative indicating the accuracy of the method, with limits of detection and quantification considered suitable. Furthermore, the method is selective for lithium, shows no interfering matrix and has no residual effect.

Keywords: Flame atomic emission spectrometry, Validation, Mood stabilizers.

INTRODUÇÃO

A alternância de episódios de depressão e de mania caracteriza a doença crônica conhecida como transtorno bipolar (TB).¹ A medicação mais indicada para o tratamento do TB é o carbonato de lítio, sendo que o seu efeito terapêutico está diretamente relacionado com a sua concentração plasmática, com níveis terapêuticos entre 0,6 e 1,2 mEq/L. Portanto, níveis abaixo de 0,6 mEq/L não exercem efeito terapêutico e níveis acima de 1,5 mEq/L são considerados tóxicos.^{2,3}

Para evitar os efeitos tóxicos causados pelo uso medicinal do lítio, e também para possibilitar a correlação entre dose e efeitos tóxicos, é essencial a quantificação do lítio em amostras biológicas. Desta forma, a relação entre a concentração plasmática do lítio e seus efeitos tóxicos se mostra extremamente útil, para que haja uma melhor compreensão e possível redução destes efeitos tóxicos, otimizando, portanto, a farmacoterapia.⁴

A monitoração do lítio é imprescindível para garantir a eficácia do tratamento e a segurança do paciente, proporcionando o ajuste individual da dose, favorecendo a adesão do paciente ao tratamento e prevenindo a ocorrência de intoxicações, evitando ou detectando precocemente a ocorrência de níveis subterapêuticos ou tóxicos.^{5,6}

Com finalidade de realizar a monitoração, a técnica que emprega o espectrômetro de absorção atômica de chama (FAAS) no modo emissão, para quantificar o lítio, é uma das mais utilizadas.⁷ E desde que, os resultados obtidos servem para tomada de decisões sobre a terapêutica do paciente, a validação de metodologias é importante para garantir que a técnica que será empregada atenda aos objetivos requeridos, fornecendo resultados confiáveis.⁸

Uma metodologia sem validação não é capaz de fornecer dados confiáveis, o que pode acarretar no excesso ou subestimação de efeitos e interpretações falsas de achados toxicológicos, bem como na avaliação de estudos científicos. Se tais erros não forem óbvios, podem permanecer despercebidos durante um estudo científico ou uma investigação de caso. Sendo assim, a validação se torna fundamental.⁹⁻¹¹

A validação deve ser planejada antes de sua execução, sendo necessário realizar um desenho experimental, levando em consideração o propósito da metodologia, para garantir a obtenção de resultados precisos e exatos.⁹ Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico adequado para a quantificação

plasmática de lítio utilizando espectrômetria de absorção atômica de chama (FAAS) no modo emissão.

PARTE EXPERIMENTAL

A validação foi realizada segundo parâmetros fixados na Resolução 27, de 17 de maio de 2012 e Resolução 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), utilizando adição de padrão em água ultrapura e em plasma, e abrangendo os seguintes ensaios: linearidade, curva de adição de padrão sobre a matriz, precisão intracorrida e intercorrida, exatidão intracorrida e intercorrida, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, efeito residual e efeito matriz.¹³⁻¹⁴

Instrumental

Para a validação da metodologia, foram utilizados reagentes de grau analítico. Foi utilizado padrão de lítio de 1000 mg/L (Hexis, SP, BR). Em todos os procedimentos que exigiram o uso de água, foi utilizada água ultrapura obtida por sistema de purificação Gehaka: Master system P&D, com valores de condutividade e resistividade de 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 18,18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, respectivamente. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições da solução estoque em água ultrapura. As vidrarias utilizadas foram previamente descontaminadas em solução de HNO_3 10% (v/v) e, em seguida, foram enxaguadas com água ultrapura.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro de absorção atômica da marca Varian, modelo SPECTRAA 55-B. Considerando a fácil ionização sofrida por este elemento e, de não haver necessidade do uso de lâmpada de cátodo oco de lítio, o equipamento foi operado no modo emissão. Os parâmetros utilizados foram: chama composta por fluxo de ar 3,5 L/min e de acetileno de 1,5 L/min, a estequiometria da chama foi oxidante, para o monocromador, foi utilizada uma largura da fenda de 0,2 nm e comprimento de onda de 670,8 nm. O *software* utilizado na leitura das amostras foi o SpectrAA 55, AA 240Z, Version 5.1 PRO.

Preparo de amostras

Para o preparo das amostras, foi utilizado solução analítica padrão de lítio na concentração de 1000 mg/L. No processo da validação, foram utilizados dois tipos de

amostras, a água ultrapura e o plasma fornecido por laboratórios colaboradores. Os padrões aquosos foram preparados utilizando água ultrapura e o plasma foi diluído com solução de KCl 0,2% na razão de 1:25 nos plasmas normal e lipêmico, e na razão 1:62,5 para plasma hemolisado, sendo que a razão de diluição para cada plasma foi definida após serem realizados testes com diferentes diluições para a redução do efeito matriz. O plasma hemolisado teve sua hemoglobina dosada utilizando equipamento automatizado hematológico Coulter LH 750 Analyzer Beckman Coulter, e o plasma lipêmico teve as dosagens de triglicerídeo e colesterol realizadas no equipamento automatizado bioquímica Au 680 Beckman Coulter, com kits comerciais da Beckman Coulter. Os padrões foram preparados em balão volumétrico e homogeneizados em agitador vórtex por 1 minuto.^{8,12}

Linearidade

Com a finalidade de avaliar a capacidade da metodologia analítica de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, o teste de linearidade foi utilizado. Para tal, foram realizadas curvas de adição de padrão sobre a água ultrapura e matriz plasma, empregando intervalos diferentes das concentrações de lítio. Sendo assim, a primeira curva abrangeu as seguintes concentrações 0,006, 0,014, 0,03, 0,05 e 0,1 mEq/L. Para avaliar o limite de concentração de lítio que a relação permanece linear, foram analisadas concentrações mais elevadas de lítio, tais como, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mEq/L. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R^2) foi de $R \geq 0.99$.

Curva de adição de padrão

Para a realização das curvas de calibração, foram utilizadas curvas de adição de padrão sobre a água ultrapura e matriz plasma normal, contendo lítio nas concentrações 0,00, 0,006, 0,009, 0,014, 0,02, 0,03, 0,05, 0,07 e 0,1 mEq/L. Foram realizadas três curvas de adição de padrão, sendo considerados aprovados os padrões que tiverem desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal dos padrões utilizados, com exceção do LIQ, que é permitido desvio menor ou igual a 20%.¹³ No final deste processo, estabeleceu-se a relação entre as concentrações e suas emissões foram plotadas e analisadas por um modelo matemático linear, utilizando o R^2 , com critério de aceitação $R \geq 0.99$.

Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas em uma mesma corrida analítica (precisão intracorrída) e em, no mínimo, 3 (três) corridas diferentes (precisão intercorridas). Foram utilizados dois tipos de amostras, a água ultrapura e o plasma e em cada corrida foram realizadas 5 (cinco) replicatas em 5 (cinco) concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ) de 0,006 mEq/L, controle de qualidade de baixa concentração (CQB) de 0,014 mEq/L, controle de qualidade de média concentração (CQM) de 0,03 mEq/L, controle de qualidade de alta concentração (CQA) de 0,08 mEq/L e controle de qualidade de diluição (CQD) de 0,16 mEq/L que foi diluído na razão 1:2 com água ultrapura. Na validação realizada com padrão em água ultrapura, a precisão e a exatidão intercorridas foram realizadas em 2 (duas) corridas diferentes, e para todos os testes, cada padrão foi realizado em triplicata, além de ter sido excluído o CQD das análises. Como critério de aceitação, foram aceitos para os testes de precisão valores de coeficiente de variação (CV) menores ou iguais a 15%, e para o LIQ, menores ou iguais a 20%. Para o teste de exatidão, o critério de aceitação exige que os valores para o erro padrão relativo (EPR) devem estar contidos na faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual os valores devem estar contidos na faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.¹³

Limite de detecção e Limite de quantificação

A estimativa do limite de detecção e de quantificação foram realizadas com base na relação de 3 e 10 vezes o ruído da linha de base, respectivamente. O limite de detecção e de quantificação foram determinados pelas equações 1 e 2 respectivamente,

$$LD = \frac{3DPa}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10DPa}{IC} \quad (2)$$

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de adição de padrão sobre a água ultrapura e matriz plasma normal, construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação; IC é a inclinação da curva de adição de padrão sobre a água ultrapura e matriz plasma normal.

Seletividade

Para avaliar a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra, foram utilizadas quatro amostras de plasmas normais, um lipêmico e um hemolisado. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ, sendo que as respostas de leituras de emissão de amostras próximo ao padrão adicionado devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do padrão adicionado.

Efeito residual

Para estimar se há o aparecimento ou aumento do sinal do analito e, se este foi causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente, foram aspiradas a amostra branco (plasma sem adição de padrão) e o limite superior de quantificação (LSQ) de 0,1 mEq/L, na seguinte sequência (1) amostra branco, (2) LSQ, (3) amostra branco e (4) amostra branco. O resultado foi comparado com os valores processados de LIQ, e foram considerados aprovados quando os valores foram inferiores a 20% do valor de LIQ.

Efeito matriz

Para determinar se há efeito na resposta do analito causado por componentes da matriz biológica, foram analisadas as seguintes amostras de plasma, sendo quatro normais, um lipêmico e um hemolisado, em duas concentrações a CQB de 0,014 mEq/L e CQA de 0,08 mEq/L. Os resultados foram comparados com leituras de CQB de 0,014 mEq/L e CQA de 0,08 mEq/L em solução aquosa, sendo que para cada amostra, foi realizado o fator de matriz normalizado (FMN), conforme a equação 3,

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução}} \quad (3)$$

O resultado é considerado aprovado se o coeficiente de variação dos FMNs relativos a todas as amostras for inferior a 15%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a linearidade do método foi avaliada considerando concentrações que, inicialmente, foram de 0,006 a 0,1 mEq/L e posteriormente, concentrações de 0,1 a 0,5 mEq/L. Os gráficos A e B, da Figura 1, ilustram o primeiro momento contendo as menores concentrações, e o resultado das curvas de adição de padrão sobre a água ultrapura e matriz plasma foi uma relação linear entre a concentração do analito e a resposta do equipamento. Contudo, no segundo momento, onde foram analisadas as concentrações maiores (Figura 1C e 1D), o que se observa é uma relação quadrática entre a concentração do analito e a resposta do equipamento. Portanto, nota-se que a partir da concentração 0,1 mEq/L, o método avaliado perde a sua linearidade e, desta forma, apesar das duas curvas apresentarem um $R^2 \geq 0.99$, optou-se por empregar o intervalo linear do método que abrange as concentrações de 0,006 até 0,1 mEq/L de lítio. Outro estudo⁷ utilizando o espectrômetro de absorção atômica, encontrou uma faixa linear que vai de 0,01 até 1 mEq/L, enquanto que em outra pesquisa¹⁵, utilizando a técnica de espectroscopia de emissão atômica, encontraram que em concentrações de 0,04 até 1,5 mEq/L, a linearidade do método foi mantida. Esses dados reforçam a necessidade da validação de métodos, pois mesmo utilizando métodos semelhantes, os resultados diferem entre si.

As curvas de calibrações de adição de padrão em matriz plasma e água ultrapura foram construídas utilizando as concentrações compreendidas entre 0,006 e 0,1 mEq/L. Os resultados obtidos por meio da análise linear dos dados e do coeficiente de correlação (R^2) mostram que o método escolhido é adequado, revelando uma relação linear entre sinal do aparelho e concentrações das amostras analisadas. O R^2 e as equações obtidas com as curvas de adição de padrão sobre a matriz plasma e em água ultrapura estão representadas na Figura 2A e 2B, respectivamente.

Nas Figuras 2A e 2B também constam, respectivamente, as três curvas de adição de padrão sobre a matriz plasma e em água ultrapura, bem como o desvio padrão de cada valor, sendo considerado aprovado os padrões com desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal. Sendo assim, todos os padrões de todas as curvas foram considerados aprovados, pois respeitam o desvio do valor nominal estabelecido.

Os resultados dos testes de precisão e exatidão intracorrida e intercorrida realizados com água ultrapura estão descritos nas Tabelas 1. Os dados foram avaliados

calculando o CV da triplicata de cada padrão. O maior CV encontrado na precisão intracorrída foi de 5,44%, correspondendo a análise do CQB, diferente do que foi encontrado na precisão intercorrída, cujo maior valor de CV analisado foi o do LIQ de 7,88%. Ainda assim, todas as amostras foram julgadas como aprovadas, por apresentarem valores de CV inferiores aos limites máximos estabelecidos, o que implica que os padrões testados apresentam baixo grau de dispersão em seus resultados, sendo considerados apropriados para a metodologia proposta.

Os testes de exatidão foram analisados por meio do cálculo do EPR. O maior EPR encontrado no ensaio de exatidão intracorrída foi de 11,67%, e no ensaio de exatidão intercorrída foi de 8,61%. Esse teste avalia o quão próximo estão os valores encontrados com os valores previamente estabelecidos, e deve ser estabelecido abrangendo a faixa de concentração de interesse.⁹ Desta forma, todos foram considerados aprovados, por apresentarem o EPR dentro dos limites estabelecidos, e pode-se afirmar que os valores avaliados possuem boa concordância entre os valores estabelecidos.

Os resultados dos ensaios de precisão intracorrída e intercorrída realizados em matriz plasma estão detalhados na Tabelas 2. Os dados foram analisados pelo cálculo do CV da quintuplicata de cada padrão, de acordo os limites estabelecidos. O maior valor de CV encontrado na análise dos padrões no ensaio intracorrída foi de 7,42%, valor este abaixo do limite máximo permitido, e o maior valor de CV encontrado no ensaio intercorrída foi de 6,66%, estando também abaixo do limite máximo permitido. Portanto, todos os valores foram considerados aprovados.

Os testes de exatidão foram analisados utilizando o valor do EPR. O maior EPR encontrado no ensaio de exatidão intracorrída foi de 10% e no ensaio de exatidão intercorrída foi de 6,92%. Sendo assim, todos os valores foram considerados aprovados, por apresentarem o EPR dentro dos limites estabelecidos, e pode-se afirmar que os valores avaliados possuem boa concordância entre os valores estabelecidos.

O limite de detecção do método empregado foi de $4,4 \times 10^{-4}$ mEq/L, quando analisadas as curvas de calibração de adição de padrão em água ultrapura e de $5,5 \times 10^{-4}$ mEq/L, nas curvas de adição de padrão em plasma. Estes resultados mostram que mesmo o menor valor da curva de adição de padrão sobre a matriz está dentro do limite de detecção do método.

Com relação ao limite de quantificação, os resultados encontrados utilizando as curvas de calibração em água ultrapura e em plasma, são de $1,46 \times 10^{-3}$ mEq/L e

$1,84 \times 10^{-3}$ mEq/L, respectivamente. Em estudo⁸, utilizando espectroscopia atômica de absorção em chama no modo emissão, o valor de quantificação encontrado foi 0,01 mEq/L, portanto, um limite de quantificação menor quando comparado aos encontrados neste trabalho. Estes resultados confirmam que mesmo o menor valor das curvas de adição de padrão está dentro do limite de quantificação do método, demonstrando que este método pode ser utilizado, garantindo a quantificação das concentrações necessárias.

Para o teste de seletividade foi realizada a leitura do branco (amostras de plasma) sem adição de padrão de quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, e os resultados mostraram que a resposta da leitura de emissão de todas as amostras de plasma foram de 0,00. Valor este bem abaixo do permitido, que é leitura de emissão dos plasmas inferior a 5% da resposta do LIQ. Este resultado demonstra que o método é altamente capaz de diferenciar e quantificar o lítio na presença de outros componentes da matriz da amostra.

O teste de efeito residual foi realizado utilizando o branco e o LSQ, e os resultados mostraram que mesmo após a leitura do LSQ, não ocorre efeito residual no método utilizado, como pode ser visto na Figura 3. O fato de não haver efeito residual é uma vantagem, pois assim não há interferência na concentração entre duas leituras consecutivas de amostras com concentrações diferentes, podendo-se garantir, portanto, que a concentração mensurada é de fato da amostra em análise.

No teste de efeito matriz foi realizada a leitura do padrão de qualidade de baixa concentração e padrão de qualidade de alta concentração, preparados em soluções aquosas. O valor de hemoglobina do plasma hemolisado foi de 0,3 g/dL, e os valores de triglicérideo e colesterol do plasma lipêmico foram de 12.000 mg/dL e 2.500 mg/dL, respectivamente. Para cada amostra realizou-se o FMN e o CV obtido dos FMNs foi de 1,85% valor dentro do máximo permitido que é 15%, como pode ser visto na Tabela 3. Estes resultados indicam que não há interferência na quantificação de lítio no plasma mesmo quando o plasma estiver lipêmico ou hemolisado.

Métodos sobre a quantificação do lítio são encontrados em outras pesquisas, onde foram relatadas diferenças nos métodos avaliados; alguns autores empregaram desproteinizantes, como o ácido tricloroacético (TCA)^{4,16}, em várias concentrações nos plasmas analisados, enquanto que em outros estudos, o plasma apenas foi diluído em água ultrapura.^{8,17} Em outro estudo¹², a adição da solução de KCl nas amostras foi evidenciado, com o intuito de suprimir possíveis interferentes.

Foram realizados testes iniciais utilizando apenas plasma diluído em água ultrapura (razão de 1:20), foi testada a influência do vórtex nas leituras, a adição de TCA 3% (proporção de 1:6), e diluições utilizando KCl 0,2% na razão de 1:20 e 1:25 (dados não apresentados), e, dentre estes testes realizados no laboratório, o método que utiliza KCl 0,2% para diluição do plasma na razão 1:25 e utiliza o vórtex, foi o que apresentou melhores resultados, sendo, portanto, o método escolhido.

Neste contexto, somente a validação de métodos pode garantir que um método analítico cumpre os critérios mínimos exigidos e assim assegurar sua aplicabilidade para o objetivo requerido, gerando dados de confiança. E é por isso que a validação se torna uma prática imprescindível em métodos analíticos.¹¹

CONCLUSÃO

Os testes preconizados pelas RDC 27/2012 e RDC 899/2003 foram realizados e os resultados obtidos foram considerados aprovados após análise e, portanto, o método avaliado é linear, preciso, exato, seletivo para o lítio, com limites de detecção e de quantificação considerados adequados, e não apresenta interferentes da matriz e efeito residual. Portanto, o método utilizando o FAAS no modo emissão foi considerado satisfatório para a quantificação de lítio em padrões aquosos e matrizes plasmáticas.

REFERÊNCIAS

1. Alda, M.; Hajek, T.; Calkin, C.; O'Donovan, C.; *Ann. Med.* **2009**, *41*, 186.
2. Casaret, L.J.; Klaassen, C.D. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 7th ed., McGraw-Hill Medical: New York, 2008.
3. Malhi, G.S.; Tanious, M.; Das, P.; Berk, M.; *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry.* **2012**, *46*, 192.
4. Camus, M.; Henneré, G.; Baron, G.; Peytavin, G.; Massias, L.; Mentré, F.; Farinotti, R. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *59*, 583.
5. Livingstone, C.; Rampes, H.; *J. Psychopharmacol.* **2006**, *20*, 347.

6. McKnight, R.F.; Adida, M.; Budge, K.; Stockton, S.; Goodwin, G.M.; Geddes, J.R.; *Lancet*, **2012**, 379, 721.
7. Guilherme, M. C. G.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
8. Santo, C.E.E.; Carvalho, T.M.J.P.; *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2014**, 50, 12.
9. Bridwell, H.; Dhingra, V.; Peckman, D.; Roark, J.; Lehman, T.; *Quality Assurance Journal*. **2010**, 13, 72.
10. Peters, F.T.; Maurer, H.H.; *Accredit. Qual. Assur.* **2002**, 7, 441.
11. Peters, F.T.; Drummer, O.H.; Musshoff, F. *Forensic Sci. Int.* **2007**, 165, 216.
12. Aliasgharpour, M.; Hagani, H.; *North American Journal of Medical Sciences*, **2009**, 1, 244.
13. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA) BRASIL. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Diário Oficial da União, 22 de maio de 2012.
14. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA) BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003.
15. Türck, D.; Heinzl, G.; Luik, G.; *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, 50, 197.
16. Arancibia, A.; Paulos, C.; Chávez, J.; Ritschel, W.A. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 41, 200.
17. Gai, M.N.; Thielemann, A.M.; Arancibia, A. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **2000**, 38, 320.

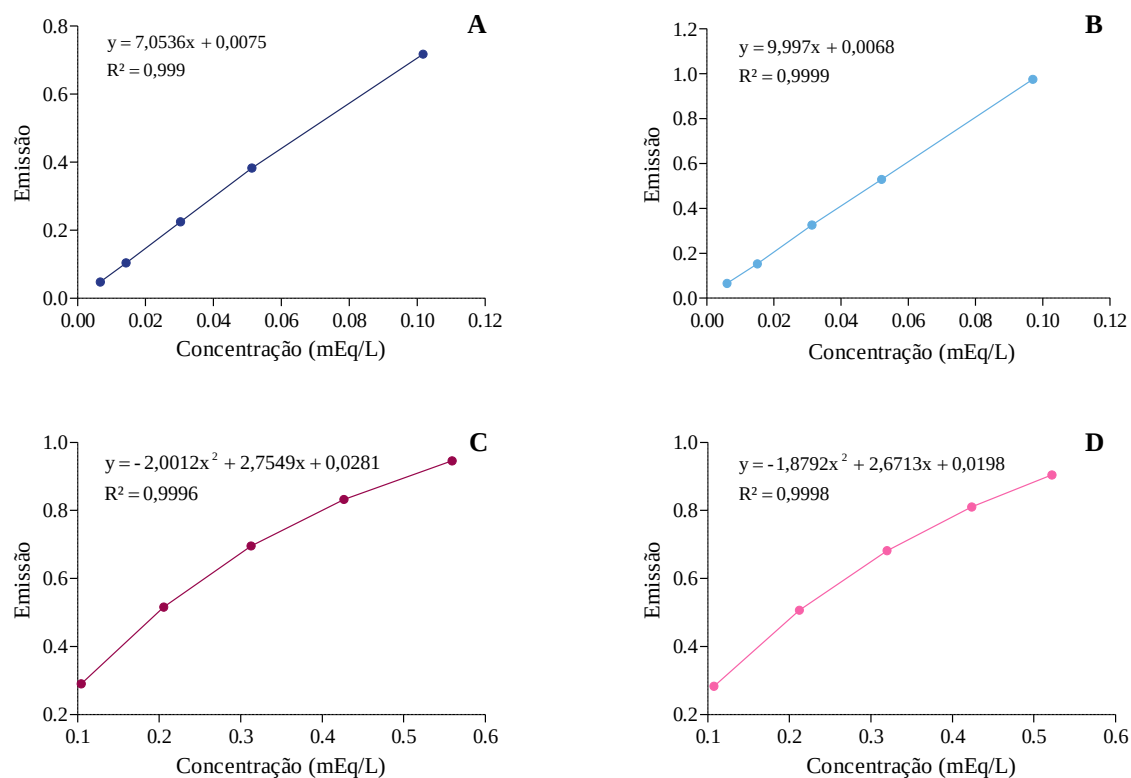


Figura 1. Avaliação da linearidade utilizando a técnica FAAS. (A) e (B) Concentrações de lítio analisadas: 0,006, 0,014, 0,03, 0,05 e 0,1 mEq/L em curvas de adição de padrão sobre água ultrapura e matriz plasma, respectivamente. (C) e (D) Concentrações de lítio analisadas: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mEq/L em curvas de adição de padrão sobre água ultrapura e matriz plasma, respectivamente

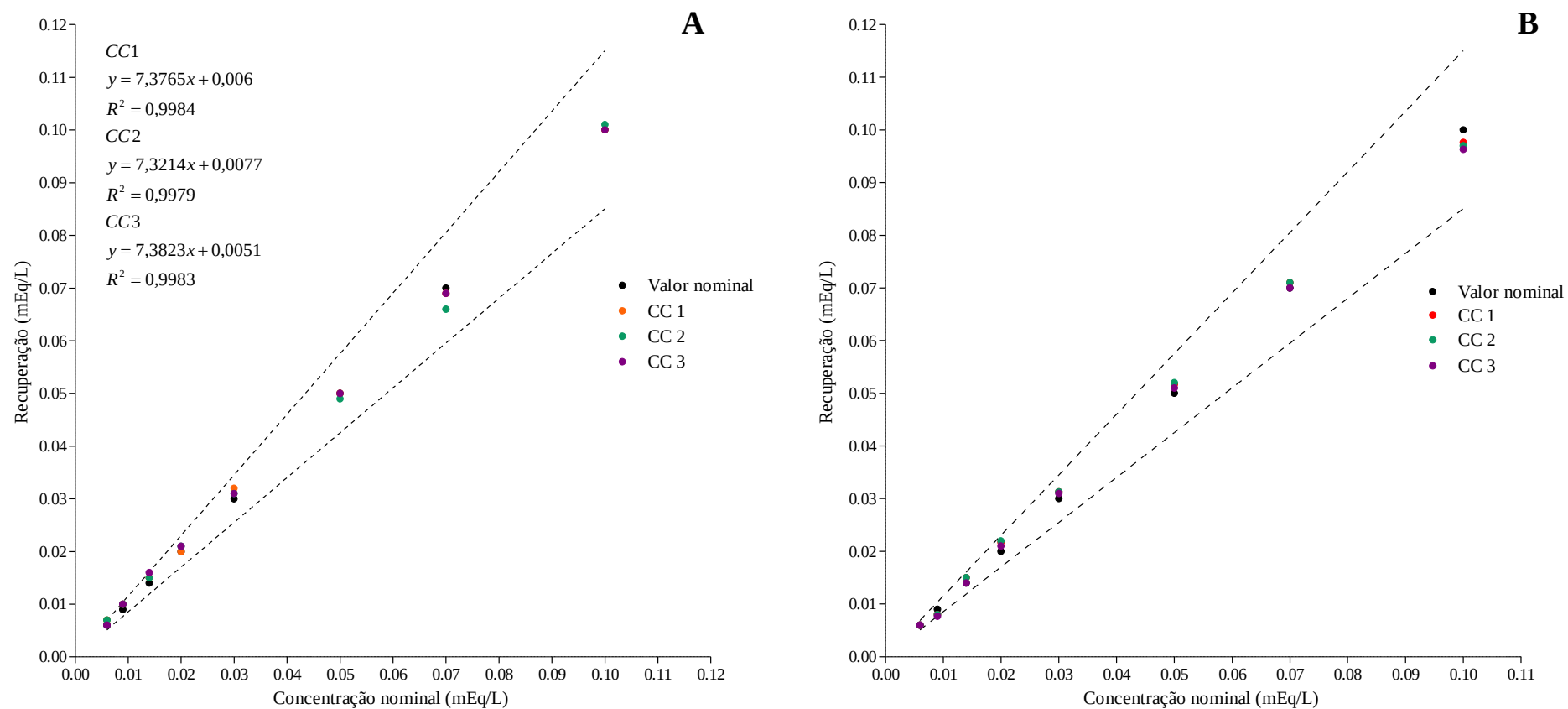


Figura 2. Curvas de adição de padrão utilizando a técnica FAAS e análise da variação das três curvas de adição de padrão sobre (A) água ultrapura e (B) matriz plasma normal, em relação ao valor nominal do padrão

Tabela 1. Determinação da precisão e exatidão intracorrida e intercorrida com água ultrapura

Concentração (mEq/L)	LIQ (0,006)	CQB (0,014)	CQM (0,03)	CQA (0,08)
Precisão intracorrida (CV %)	0,00	5,44	0,00	0,59
Precisão intercorrida (CV %)	7,88	7,09	2,44	0,85
Exatidão intracorrida (EPR %)	11,67	9,29	4,33	0,38
Exatidão intercorrida (EPR %)	8,61	4,76	2,72	4,78

CV (%): coeficiente de variação = desvio padrão/média*100; EPR (%): erro padrão relativo = (concentração média experimental – valor nominal)/valor nominal*100.

Tabela 2. Determinação da precisão e exatidão intracorrida e intercorrida em plasma

Concentração (mEq/L)	LIQ (0,006)	CQB (0,014)	CQM (0,03)	CQA (0,08)	CQD (0,08)
Precisão intracorrida (CV %)	7,42	2,70	1,98	2,46	1,88
Precisão intercorrida (CV %)	6,66	3,93	0,93	1,02	1,35
Exatidão intracorrida (EPR %)	10,00	7,14	6,67	9,00	7,75
Exatidão intercorrida (EPR %)	5,56	5,72	5,11	6,92	5,92

CV (%): coeficiente de variação = desvio padrão/média*100; EPR (%): erro padrão relativo = (concentração média experimental – valor nominal)/valor nominal*100.

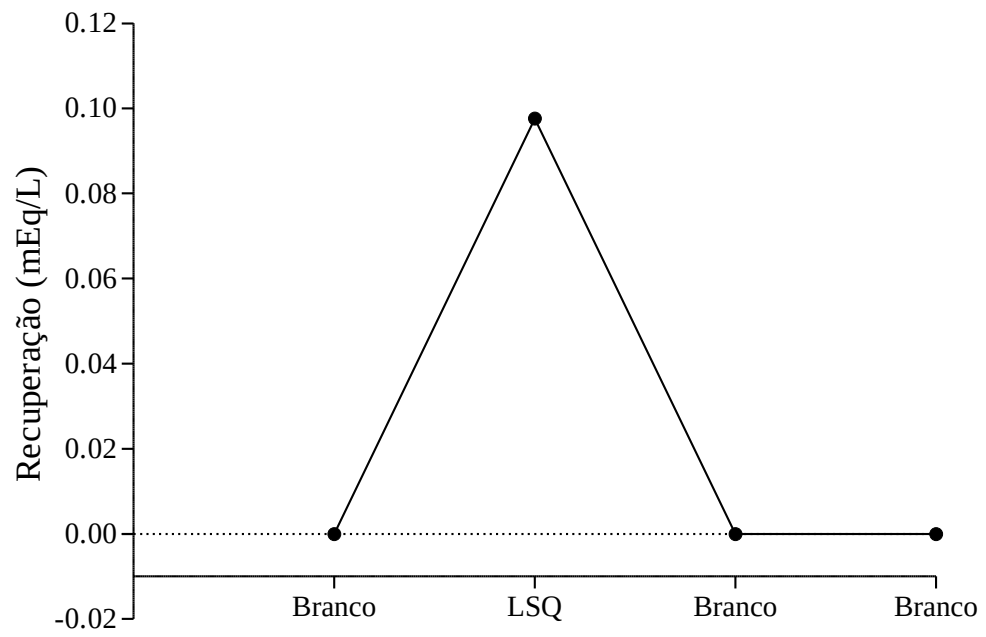


Figura 3. Efeito residual. Análise de efeito residual utilizando o branco e o LSQ

Tabela 3. Determinação do efeito matriz

Concentração (mEq/L)				
Solução	0,0144	0,0789	FMN ¹	FMN ²
Plasma normal	0,0145	0,0811	1,0070	1,0278
Plasma lipêmico	0,0140	0,0799	0,9722	1,0130
Plasma hemolisado	0,0148	0,0801	1,0277	1,0152
			CV = 1,85%	

FMN: fator de matriz normalizado = resposta do analito em matriz/ resposta do analito em solução; FMN¹: da concentração de 0,014 mEq/L; FMN²: da concentração de 0,08 mEq/L; CV (%): coeficiente de variação = desvio padrão/média*100

4.2. ARTIGO 2

ANÁLISE DO PERFIL DE TOXICIDADE DO LÍTIO E INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS PROTETORES DA N-ACETILCISTEÍNA

Ana Julia Penteado¹, Fernanda C. Silva¹, Carla B. Marek¹, Ana Maria Itinose^{2*}

¹Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil

²Centro de Assistência em Toxicologia (CEATOX), Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves 3224, 85806470, Cascavel, Brasil

*Correspondência ao autor:

Telefone: +55(45) 3321 5429

Email: itinoseanamaria@uol.com.br

Cascavel, Paraná, Brasil

ANÁLISE DO PERFIL DE TOXICIDADE DO LÍTIO E INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS PROTETORES DA N-ACETILCISTEÍNA

RESUMO

O transtorno bipolar é uma doença caracterizada pela alternância do humor e o principal tratamento é o carbonato de lítio. Este medicamento apresenta estreita faixa terapêutica e, conseqüentemente, muitos efeitos tóxicos, sendo, os mais pronunciados, no rim, no fígado e no cérebro. Além disso, o transtorno bipolar e o uso do lítio têm sido relacionados ao estresse oxidativo e, sendo a N-acetilcisteína (NAC) um antioxidante, e ter demonstrado efeitos positivos sobre a toxicidade do lítio, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da coadministração de lítio e NAC. Para este estudo, foram utilizados ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos: controle, NAC, lítio e a coadministração de NAC e lítio. Nos resultados deste trabalho, o lítio causou efeitos tóxicos no peso dos animais, alterou parâmetros hematológicos e causou linfopenia e neutropenia, e a coadministração não demonstrou ter efeito sobre essas alterações. No entanto, o lítio não mostrou afetar a função renal, e os resultados indicam que ele causa uma melhora na função hepática, pela diminuição nos níveis de fosfatase alcalina, e também um efeito semelhante a insulina por diminuir a glicose sanguínea. O lítio ainda causou alterações na atividade da BuChE, e peroxidação lipídica no fígado e no rim, além de provocar depleção das enzimas antioxidantes, enquanto que o uso da NAC, reverteu esses efeitos tóxicos do lítio sobre o estresse oxidativo, demonstrando que o seu uso é promissor.

Palavras-chaves: antioxidante, estabilizadores de humor, estresse oxidativo, NAC, transtorno bipolar.

ANALYSIS OF LITHIUM TOXICITY PROFILE AND INVESTIGATION OF PROTECTORS EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE

ABSTRACT

Bipolar disorder is a disease characterized by the alternation of mood and the main treatment is lithium carbonate. This drug has a narrow therapeutic range and consequently many toxic effects, being most pronounced in the kidney, liver and brain. In addition, bipolar disorder and lithium use have been associated to oxidative stress and considering that N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant and has demonstrated positive effects on lithium toxicity, the objective of this work was to evaluate the effect of coadministration of lithium and NAC. For this study were used male Wistar rats, divided into four groups: control, NAC, lithium and coadministration of NAC and lithium. In the results of this study, lithium caused toxic effects on animal weight, altered hematological parameters and caused lymphopenia and neutropenia, and coadministration was not shown to have an effect on these changes. However, lithium has not been shown to affect renal function, and the results indicate that it causes an improvement in liver function, by the decrease in alkaline phosphatase levels, and also an insulin-like effect by lowering blood glucose. Lithium also caused changes in BuChE activity, and lipid peroxidation in the liver and kidney, besides causing depletion of antioxidant enzymes, while the use of NAC reversed these toxic effects of lithium on oxidative stress, demonstrating that its use is promising.

Keywords: antioxidant, mood stabilizers, oxidative stress, NAC, bipolar disorder.

INTRODUÇÃO

Caracterizada pela desregulação periódica do humor com períodos de mania ou hipomania e de depressão, o transtorno bipolar (TB) é uma doença psiquiátrica com uma prevalência estimada de cerca de 1-3% da população mundial com o diagnóstico baseado em sinais e sintomas clínicos e histórico do paciente (Andreazza et al. 2008; Busby e Sajatovic 2010; Oruch et al. 2014).

O tratamento do TB inclui o uso de agentes estabilizadores do humor, que devem apresentar eficácia tanto nos episódios de mania, como de depressão, além de possuírem propriedades profiláticas e de estabilização da doença. Considerado como medicamento padrão-ouro, o carbonato de lítio além de apresentar as características necessárias, ainda possui um perfil terapêutico único por reduzir o risco de suicídio, e por isso é a escolha de primeira linha no tratamento e manutenção da doença (Gershon et al. 2009; Lewitzka et al. 2015).

A estreita faixa terapêutica do fármaco e as variações farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre os pacientes podem causar diferentes efeitos tóxicos nos pacientes (Grandjean e Aubry 2009a; Souza et al. 2013). Determinar a dose adequada do medicamento com base nas concentrações plasmáticas, é uma forma de individualizar a farmacoterapia, pois considera as variações farmacocinéticas de cada paciente e, portanto, permite que seja atingido no tratamento um máximo de eficácia com um mínimo de efeitos adversos.

A litioterapia deve ser bem controlada e individualizada, uma vez que evidências sugerem a relação entre concentração plasmática do lítio e seus efeitos, que podem ser terapêuticos ou tóxicos (Moreau e de Siqueira 2008). Existem dois tipos de toxicidade provocadas pelo lítio, a intoxicação aguda que é caracterizada por concentrações plasmáticas elevadas de lítio, mas sintomas relativamente ligeiros; e a intoxicação crônica, caracterizada por sintomas clínicos graves, apesar das concentrações terapêuticas de lítio no plasma (Malhi e Tanious 2011).

Um efeito comum e bem reconhecido da terapia com lítio é a redução da capacidade de concentração urinária. Clinicamente, isto manifesta-se como poliúria obrigatória, com sede secundária (Grandjean e Aubry 2009a), causando complicações que incluem diabetes insípido nefrogênico, acidose metabólica, nefropatia crônica e hipercalcemia (Grandjean e Aubry 2009b). Além do mais, existem vários relatos sobre os efeitos tóxicos do lítio sobre a função hepática, com estudos mostrando alterações

histopatológicas e nos níveis sanguíneos dos marcadores da função hepática, como a fosfatase alcalina e as transaminases (Chadha et al. 2008; Ahmad et al. 2011; Aprahamian et al. 2014). A butirilcolinesterase (BuChE) diminui em disfunções hepáticas como consequência da síntese reduzida, podendo ser usada como um marcador mais específico de lesão hepática (Santarpia et al. 2013).

Manifestações neurológicas também afetam os pacientes com transtorno bipolar e os distúrbios cognitivos são frequentemente relatados, ocorrendo prejuízo na memória, vigilância e tempo de reação (Grandjean e Aubry 2009a). Os produtos do estresse oxidativo têm sido apontados como agravantes, com estudos apontando que em pacientes com transtorno bipolar ocorre uma redução na glutathione cerebral e nos níveis das enzimas antioxidantes, como a SOD e CAT (Gawryluk et al. 2011; Khairova et al. 2012), e um aumento da peroxidação lipídica, causando alterações na fluidez e agregação de proteínas da membrana, comprometendo a integridade neuronal, acarretando em morte celular por apoptose (Berk et al. 2010).

A influência do lítio sobre o estresse oxidativo ainda gera controvérsias, alguns estudos relatam que o lítio causa um aumento nas defesas antioxidantes, enquanto outros mostram uma tendência pró-oxidante. Ratos tratados com lítio mostraram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica e superóxido dismutase, e uma diminuição nos níveis de glutathione e catalase (Chadha et al. 2008; Ahmad et al. 2011). Por outro lado, existem estudos em que o lítio mostrou prevenir e/ou reverter danos ao DNA, formação de radicais livres e peroxidação lipídica demonstrando um papel neurotrófico e neuroprotetor (Machado-Vieira et al. 2007; Khairova et al. 2012).

O desequilíbrio oxidativo encontrado no transtorno bipolar, somado com os efeitos causados pelo lítio, podem causar prejuízos ao paciente. Neste cenário, a NAC, sendo um precursor da glutathione, que é um dos principais sequestradores de radicais livres, vem mostrando seu valor terapêutico quando aliado à terapia do TB. Além de apresentar efeitos antioxidantes, estudos sobre a NAC revelam suas propriedades anti-inflamatórias, seus efeitos antidepressivos e eficácia na prevenção da nefrotoxicidade e insuficiência renal (Efrati et al. 2005; Malhi et al. 2009; Berk et al. 2011; Magalhães et al. 2013). Há evidências que apontam que a NAC também apresenta efeitos quelantes sobre alguns metais como o mercúrio (Kelly 1998; Blanus et al. 2005), diminuindo os níveis de metais no organismo e, por consequência, o efeito tóxico. Com este enfoque, o propósito deste trabalho foi avaliar o efeito da coadministração do lítio e da NAC sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e em parâmetros do estresse oxidativo, além de investigar o possível

efeito quelante da NAC sobre o lítio, com o intuito de melhorar a farmacoterapia dos pacientes que utilizam o lítio.

METODOLOGIAS

Animais

Foram utilizados ratos adultos machos, albinos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 g. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Toxicologia Celular, bloco LACEPE/HUOP, em caixas de polipropileno, ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e sistema de exaustão constante. Os ratos receberam água e foram alimentados com dieta para roedores Bio-Tec® (BioBase Ltda, SC, BR), *ad libitum*. Os procedimentos experimentais seguiram protocolo autorizado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE).

Administração do lítio e da N-acetilcisteína

O carbonato de lítio (Laboratório Eurofarma, SP, BR) e a N-acetilcisteína (Farmácia Chamomilla Cascavel, PR, BR) foram administrados por via oral, diluído na água de beber na dose de 0,2%, e por via intraperitoneal 10 mg.Kg⁻¹, respectivamente.

Tratamentos

Após o período de 1 semana para a adaptação dos animais, estes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 5 animais em cada grupo. Para o modelo experimental, foram utilizados ratos saudáveis, que receberam tratamento diário durante 15 dias da seguinte forma:

Grupo controle (Cont) – ração e água;

Grupo Lítio (Li) – 0,2% de carbonato de lítio, diariamente, diluído na água de beber;

Grupo NAC + Lítio (NAC + Li) – 0,2% de carbonato de lítio, diariamente, diluído na água de beber e N-acetilcisteína 10 mg.Kg⁻¹ uma vez ao dia por via intraperitoneal;

Grupo NAC (NAC) – N-acetilcisteína 10 mg.Kg⁻¹ uma vez ao dia por via intraperitoneal.

A dose para o carbonato de lítio está de acordo com Toplan et al. (Toplan et al. 2013) e da NAC conforme Efrati et al. (Efrati et al. 2005).

Acompanhamento dos animais

Os animais tiveram seu comportamento e os seus sinais e/ou sintomas observados no decorrer do tratamento. O peso corpóreo foi avaliado por meio da pesagem diária dos animais e a média diária do consumo de ração e de água também foram determinados diariamente, na avaliação do efeito do lítio sobre o desenvolvimento dos animais.

Coleta de sangue e retirada de órgãos

Ao término de 15 dias de tratamento, os animais ficaram em jejum *overnight* e, após, foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de quetamina (100 mg.Kg⁻¹) e cloridrato de xilazina (15 mg.Kg⁻¹). A coleta de sangue foi via intracardíaca, utilizando heparina sódica para a análise do teor de lítio plasmático, perfil hematológico e bioquímico. Após a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados por overdose de cloridrato de quetamina (300 mg.Kg⁻¹) e cloridrato de xilazina (45 mg.Kg⁻¹), e após foi realizada a retirada do fígado, rins, cérebro e da tíbia.

Índice do peso dos órgãos

Após a retirada dos órgãos, o fígado, o rim e o cérebro foram observados macroscopicamente e pesados. O índice do peso dos órgãos foi realizado para avaliar alterações no tamanho dos órgãos e é calculado de acordo com a equação 1,

$$I = \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do rato}} \times 100 \quad (1)$$

Os resultados foram expressos em (%).

Digestão de amostras biológicas

A digestão de amostras biológicas foi realizada através de adaptações da metodologia descrita por Gonzalez et al. (Gonzalez et al. 2009), utilizando o método de radiação micro-ondas, em sistema fechado, no digestor modelo ETHOS D. Para o teste, foram utilizadas amostras de fígado, rim, cérebro e tíbia, sendo o ácido nítrico 65% (p.a.) o solvente empregado para a digestão. Foi utilizado a quantidade de 100 mg de todas as amostras e quantidades de 2 mL de ácido nítrico para fígado, rim e cérebro, e 2,5 mL para a digestão da tíbia. O programa escolhido foi o mesmo para todas as amostras e consta das seguintes etapas: (1) 5 min em temperatura entre 40-80°C, potência de 300 W e pressão de 20 bar; (2) 5 min em temperatura entre 80-100°C, potência de 300 W e pressão de 30 bar; (3) 15 min em temperatura de 100°C, potência de 400 W e pressão de 40 bar; e (4) 20 min em resfriamento.

Dosagem de lítio

O teor de lítio foi determinado no plasma, fígado, rim, cérebro e tíbia. Para a dosagem no plasma, o mesmo foi submetido a uma diluição com solução de KCl 0,2% (preparado com água ultrapura) na razão de 1:25 em balão volumétrico e homogeneizado em agitador vórtex por 1 minuto. As amostras que foram digeridas tiveram seus frascos de digestão abertos e o conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 5 mL, sendo o volume completado com água ultrapura. A determinação de lítio em todas as amostras foi realizada no espectrômetro de absorção atômica da Varian, modelo SPECTRAA 55-B (Aliasgharpour e Hagani 2009; Santo e Carvalho 2014). Os resultados foram expressos em miliequivalente por litro.

Determinações hematológicas

A contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas e a determinação da hemoglobina foram feitas utilizando o equipamento automatizado hematológico Coulter LH 750 Analyzer Beckman Coulter. O diferencial de leucócitos foi realizado manualmente por contagem celular em lâmina/microscopia, usando coloração de May Grünwald Giemsa, e o hematócrito foi realizado pelo método do tubo capilar.

Dosagens bioquímicas

Para as dosagens bioquímicas, o sangue foi centrifugado a 3.700 g, e o plasma heparinizado foi separado para as dosagens de glicose, AST, ALT, FA, creatinina e ureia. O método utilizado em todas as dosagens foi o método enzimático, exceto na dosagem de creatinina, que foi utilizado o método cinético. Todas as análises foram realizadas no equipamento automatizado bioquímica Au 680 Beckman Coulter, com kits comerciais da Beckman Coulter®.

Preparo dos homogenatos

Foram preparados homogenatos de fígado, rim e cérebro para medir os marcadores de estresse oxidativo e sistema antioxidante de acordo com Schinella et al. (Schinella et al. 2002). Os tecidos foram picotados até restarem pedaços pequenos e esses foram transferidos para o homogeneizador de Dounce com diferentes soluções tampões, na proporção 1:6 (g/v). Após a homogeneização, os restos celulares foram separados por filtração em gaze. Para a análise de cada marcador, foi utilizado uma solução tampão e uma centrifugação específica, para a SOD, foi utilizado sacarose 0,25 M com triton X-100 0,5% (pH 8,5) e centrifugação de 2.377g por 10 minutos, para a CAT, foi utilizado tampão fosfato 100 mM com KCl 1,15% (pH 7,4) e centrifugação de 2.377g por 10 minutos, para BuChE e tióis, foi utilizado tampão ringer-fosfato 100 mM (pH 7,4) e centrifugação diferencial a 1.085g por 10 minutos, seguidos de centrifugação em 2.778g durante 10 minutos, exceto em homogenatos de cérebro que foi utilizado uma centrifugação diferencial a 1.085 g por 10 minutos, seguidos de centrifugação em 2.377g durante 15 minutos. As frações sobrenadantes de cada amostra foram separadas para as análises posteriores.

Foi realizada a determinação da quantidade presente de proteína em todos os homogenatos, de acordo com metodologia descrita por Lowry et al. (Lowry et al. 1951), utilizando albumina bovina como padrão, utilizando o espectrofotômetro FEMTO 6005 no comprimento de onda de 700 nm. Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por mililitro de homogenato.

Butirilcolinesterase e tióis

A dosagem de tióis e a atividade da butirilcolinesterase foram realizadas com base na metodologia descrita por Ellman et al. (Ellman et al. 1961). Para estas dosagens, foram utilizados tampão fosfato 114 mM (pH 7,4) e 0,5 mM de ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). Para a dosagem da BuChE, foi adicionado também propioniltiocolina (PTCh) 10 mM (DiaSys, Holzheim, BY, DE). A quantidade de proteína utilizada foi de aproximadamente 0,25 mg dos homogenatos de fígado, rim e cérebro. As amostras foram mantidas em banho maria a 37°C por 2 minutos e 30 segundos e a reação foi lida em 405 nm, no espectrofotômetro FEMTO 800 XI. Os tióis são lidos imediatamente, e a leitura da atividade da BuChE após a adição de PTCh a cada 20 segundos por 2 minutos. Os resultados de tióis são expressos em nanomol por miligrama de proteína, e os da BuChE em μ Kat por litro (μ Kat/L), onde 1 μ Kat corresponde a 60 vezes 1 unidade de atividade enzimática (U) necessária para converter 1 milimol de substrato hidrolisado por minuto.

Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada de acordo com a técnica descrita por Ohkawa et al. (1979). A lipoperoxidação foi medida utilizando ácido tio barbitúrico (TBA, Merck -Darmstadt, Alemanha), que mede a quantidade de malondialdeído bis que se complexa ao TBA. Para a análise, o homogenato foi diluído em água destilada (1:4) e desproteinizado com 8,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma-Aldrich Co.- St. Louis, MO, EUA). Adicionou-se TBA 0,67% e a reação foi incubada durante 60 minutos a 96°C. Após o resfriamento, foi adicionado n-butanol:piridina (15:1) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2377 g. A fase orgânica foi extraída e lida em 535 nm, utilizando o espectrofotômetro FEMTO 6005. O malondialdeído MDA 200 μ M foi utilizado como padrão e o resultado foi expresso em nanomol por miligrama de proteína.

Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o procedimento estabelecido por Nandi e Chatterjee (Nandi e Chatterjee 1988). Foi

utilizado tampão tris-HCl 50 mM com EDTA 1 mM, aproximadamente 0,4 mg de proteína dos homogenatos de fígado, rim e cérebro e pirogalol 2,6 mM em HCL 10 mM. A atividade SOD foi determinada pela inibição da autooxidação do pirogalol em meio básico e, portanto, a autooxidação foi lida em 420 nm no espectrofotômetro FEMTO 800 XI por 2 minutos com *delay time* de 1 minuto e 30 segundos. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína, onde 1 unidade equivale a inibição de 50% da autooxidação do pirogalol.

Catalase

A determinação da atividade da catalase foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Aebi (Aebi 1984). Foi utilizado tampão fosfato 50 mM com triton X-100 0,02% (pH 7,0) como meio de reação, e quantidade correspondente a 0,3 mg de proteína dos homogenatos de fígado, rim e cérebro. Após, foi adicionado H₂O₂ 20 mM, e imediatamente as leituras começaram e foram feitas a cada 5 segundos durante 30 segundos, em 240 nm no espectrofotômetro FEMTO 800 XI com temperatura controlada de 25°C. Os resultados foram expressos em micromol por minuto por miligrama de proteína.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica7[®]. Os resultados obtidos com os diferentes grupos de tratamento foram classificados em paramétricos e não paramétricos e os testes utilizados foram One-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Fisher e o teste de Kruskal-Wallis, respectivamente. Foi aceito como estatisticamente significativo $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (SEM).

RESULTADOS

Peso dos animais

Os animais foram acompanhados e pesados diariamente durante o tratamento (15 dias), sendo realizada a diferença do peso corporal do início até o final do tratamento. A quantidade ingerida de ração e de água também foram monitoradas. Estes acompanhamentos foram realizados com o intuito de analisar a influência do carbonato de lítio e da NAC no peso corporal dos animais. Como mostra a Fig. 1, os grupos que foram tratados com NAC e o controle tiveram ganho com relação ao peso inicial e os grupos que receberam lítio e NAC + Li, apresentaram perda de peso no decorrer do tratamento. Porém, não houve diferença significativa entre os grupos analisados, indicando que a NAC não teve efeito de reversão da perda de peso induzida pelo lítio. Ainda, quando analisados o perfil de alimentação e de ingestão de água, nota-se que os grupos controle e NAC mantiveram o padrão de alimentação e ingestão de água, enquanto os animais tratados com lítio e NAC + Li apresentaram queda no padrão de consumo tanto de ração quanto no de água.

Alterações no tamanho de órgãos

Ao final do tratamento, o fígado, os rins e o cérebro dos ratos foram isolados e pesados. Foi calculado o índice do peso dos órgãos em relação do peso do animal. Este dado foi utilizado para mensurar se o tratamento causou alterações no tamanho dos órgãos de interesse. Na Fig. 2 estão os índices do fígado, rim e cérebro de acordo com os grupos de tratamento. O grupo que recebeu NAC, teve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tamanho do rim, quando comparado com o controle. O grupo tratado com lítio apresentou uma diminuição significativa do fígado com relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Com relação ao grupo NAC, foi constatado um aumento ($p < 0,05$) no tamanho do fígado quando comparado ao grupo NAC + Li, e uma diminuição ($p < 0,05$) no tamanho do rim quanto comparado aos grupos controle e NAC + Li. Com relação ao grupo NAC + Li, o fígado teve seu tamanho significativamente ($p < 0,05$) diminuído quando comparado com o grupo controle. Estes resultados indicam que o tratamento com NAC causou uma diminuição do rim, o tratamento com lítio e NAC + Li gerou uma diminuição do fígado, e que a

coadministração da NAC não gerou nenhum efeito significativo no tamanho dos órgãos analisados.

Concentração de lítio

A concentração de lítio foi dosada no fígado, cérebro, rim, osso e plasma (Fig. 3). Essas dosagens foram realizadas para correlacionar o efeito da coadministração da NAC sobre as concentrações de lítio. Foram analisados os órgãos mais afetados pelo lítio (fígado, rim e cérebro), local de acúmulo dos metais (osso) e o plasma. Este teste também foi realizado nos grupos que não receberam lítio, o grupo controle e grupo NAC, por precaução devido a possíveis contaminações ambientais. No entanto, não foi detectado o lítio nesses grupos. Apesar da coadministração de NAC causar uma diminuição da concentração de lítio em todas as amostras analisadas, não foi estatisticamente significativo.

Parâmetros hematológicos

Foi analisado também, o perfil hematológico (Fig. 4) por meio das determinações de hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, a contagem e o diferencial de leucócitos (Fig. 5). Foi visto que a administração da NAC causou uma diminuição significativa das plaquetas ($p < 0,05$), enquanto que a administração de lítio e NAC + Li causaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da hemoglobina e do hematócrito comparando com o grupo controle. O grupo que recebeu lítio teve também, um valor de hematócrito significativamente ($p < 0,05$) menor que o grupo NAC + Li.

No diferencial de leucócitos (Fig. 5), constatou-se que a administração da NAC gera uma diminuição de neutrófilos ($p < 0,05$) e um aumento de linfócitos ($p < 0,05$) comparando com os grupos controle e NAC + Li. Analisando o efeito da administração de lítio em neutrófilos e linfócitos, nota-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de neutrófilos e uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de linfócitos. No grupo que foi administrado NAC + Li houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de leucócitos e neutrófilos comparando com o grupo controle, ao contrário do observado com os linfócitos onde ocorreu uma diminuição ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo

controle. Nota-se, portanto, que a coadministração de NAC manteve resultados semelhantes com os obtidos com a administração apenas do lítio.

Parâmetros bioquímicos

No plasma, foram realizadas as dosagens bioquímicas de glicose, fosfatase alcalina, AST, ALT, creatinina e ureia, para avaliar se a administração de lítio causa alguma alteração nestes parâmetros e os resultados da coadministração de NAC sobre os efeitos causados pelo lítio. Na avaliação da glicose (Fig. 6A) houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos grupos lítio e NAC + Li em comparação aos grupos controle, e um aumento ($p < 0,05$) da glicose no grupo NAC comparando com o grupo NAC + Li. Na análise da fosfatase alcalina (Fig. 6B), no grupo NAC, foi encontrado uma diminuição ($p < 0,05$) com relação ao controle e um aumento ($p < 0,05$) com relação ao grupo NAC + Li. Enquanto que nos grupos lítio e NAC + Li, houveram diminuições significativas ($p < 0,05$) quando comparadas com o grupo controle. Nas enzimas AST e ALT (Fig. 6C e 6D), não foram encontradas diferenças significativas em nenhum grupo, embora tenha-se observado padrões semelhantes entre os grupos controle e NAC, um aumento dessas enzimas no grupo lítio, e uma leve diminuição no grupo NAC + Li, quando comparado ao grupo lítio. Na dosagem da creatinina (Fig. 6E) e na dosagem da ureia (Fig. 6F), não foram encontrados dados significativos. A coadministração de NAC não produziu nenhuma alteração nos efeitos causados pelo lítio.

Atividade da butirilcolinesterase

A dosagem da atividade enzimática BuChE foi realizada no fígado, rim e cérebro, como mostra a Fig. 7. Não ocorreram diferenças significativas na atividade enzimática da BuChE no fígado (Fig. 7A) e no cérebro (Fig. 7C). No entanto, foi encontrado que nos grupos tratados com NAC e Li houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da enzima no rim (Fig. 7B), comparando com os grupos controle e NAC + Li. Desta forma, a coadministração de NAC + Li fez com que não houvesse diferença significativa da atividade da BuChE com o controle, ou seja, enquanto que analisados lítio e NAC individualmente ocorreu uma elevação da atividade da BuChE, na coadministração, a BuChE teve sua atividade normalizada.

Parâmetros do estresse oxidativo

Com a finalidade de avaliar o possível dano oxidativo causado pelo lítio e os efeitos antioxidantes da NAC, e o resultado da coadministração de lítio e NAC sobre o estresse oxidativo, alguns parâmetros foram avaliados. Considerando isso, foram dosados a peroxidação lipídica (Fig. 8), tióis (Fig. 9), SOD (Fig. 10) e a CAT (Fig. 11) em homogenatos preparados com fígado, rim e cérebro. Em homogenatos de fígado foi observado que o tratamento com lítio causou danos na membrana lipídica, devido ao aumento da lipoperoxidação ($p < 0,05$) (Fig. 8A), efeito revertido pela coadministração de NAC ($p < 0,05$), acompanhando essa tendência, houve um aumento não significativo de tióis no grupo tratado pelo lítio (Fig. 9A). A SOD não teve alteração significativa, porém, apresenta um padrão de diminuição no tratamento com lítio e na coadministração com NAC (Fig. 10A), enquanto que a CAT teve diminuição ($p < 0,05$) da sua atividade com o tratamento de lítio e um reestabelecimento da sua atividade quando NAC foi coadministrado (Fig. 11A).

Na avaliação dos homogenatos de rim, os ratos que foram submetidos ao tratamento com lítio apresentaram aumento ($p < 0,05$) da peroxidação lipídica, enquanto que a coadministração com NAC reverteu esses efeitos, apresentando resultado inferior aos do grupo controle (Fig. 8B). Com relação aos níveis dos grupos tióis, houve um aumento ($p < 0,05$) no grupo tratado com NAC e no grupo tratado com Li (Fig. 9B). Na avaliação das enzimas antioxidantes, foi encontrado que o tratamento com NAC, lítio e a coadministração de ambos causou uma diminuição ($p < 0,05$) da atividade da SOD (Fig. 10B), ao passo que o tratamento com NAC causou um ($p < 0,05$) aumento da atividade da CAT quando comparado ao grupo que recebeu lítio e NAC, apesar da coadministração de lítio e NAC ter diminuído a atividade da CAT (Fig. 11B).

Nas dosagens realizadas no cérebro, não houveram alterações significativas na peroxidação lipídica, no entanto, observou-se um aumento decorrente do tratamento com lítio e uma diminuição na coadministração de lítio e NAC (Fig. 8C), além de também ter causado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de tióis (Fig. 9C). Analisando o perfil da atividade da SOD, nota-se um comportamento linear e crescente na sua atividade, com o aumento ($p < 0,05$) causado pelo tratamento com NAC, com lítio e na coadministração de ambos (Fig. 10C). Enquanto que na investigação da CAT, apenas o tratamento com lítio causou sua diminuição ($p < 0,05$) (Fig. 11C).

DISCUSSÃO

Analisando o perfil do peso corporal dos animais tratados, nota-se dois comportamentos distintos, os ratos que não foram tratados com lítio ganharam peso no decorrer do experimento, enquanto que os tratados com lítio perderam peso. No entanto, o uso do lítio geralmente está associado ao ganho de peso dos pacientes (Curran e Ravindran 2014), porém, em pesquisas com animais, os resultados são ainda incertos, com relatos de perda de peso de ratos machos (Ahmad et al. 2011), e resultados como os de Levine e Saltzman (Levine e Saltzman 2008), que observaram um aumento de peso apenas em ratas fêmeas, enquanto os ratos machos mantiveram seu peso.

A perda de peso em ratos tratados com Li pode ter ocorrido devido a oferta deste metal na água, o que confere à água um sabor metálico desagradável, diminuindo consequente a ingestão de água, e o sabor residual do metal no sistema digestivo também diminuiu o consumo de ração pelos animais tratados com Li. Devido a esses fatores, a isso as preparações de lítio, as vias de administração e a oferta de macronutrientes devem ser consideradas a fim de minimizar este efeito tóxico (Baptista et al. 1995). A coadministração de NAC não reverteu os efeitos tóxicos do lítio sobre a ingestão de comida e de água e, consequentemente, não apresentou efeitos sobre a perda de peso corpóreo induzida pelo lítio.

Alterações no peso dos órgãos também foram analisadas, no fígado, ocorreu uma diminuição nos ratos tratados com lítio, o mesmo resultado foi encontrado por Bhat et al. (Bhat et al. 2014), onde houve uma relação inversa entre concentração de lítio e tamanho do fígado. Os resultados sobre o tamanho do rim indicam que o tratamento com lítio e mesmo a coadministração com NAC geraram um aumento no tamanho do rim quando comparados ao grupo NAC, que ao ser administrado sozinho causou efeito contrário. Porém, não houveram diferenças significativas quando os grupos foram comparados com o controle, o mesmo resultado foi encontrado por Xie et al. e Levine e Saltzman (Levine e Saltzman 2006; Xie et al. 2014), que não encontraram diferenças significativas quando o tratamento do lítio foi comparado ao controle. Sobre a variação no tamanho do cérebro, também não houveram alterações significativas entre os grupos, resultado contrário aos achados de Young (Young 2009), onde o tratamento com lítio fez com que houvesse uma diminuição no tamanho do cérebro.

Mesmo acompanhando os níveis sanguíneos de lítio para avaliar os efeitos tóxicos, essa prática não reflete os níveis de lítio nos tecidos (Lima et al. 2008). Para constatar a distribuição do lítio e se a NAC teria de fato um efeito quelante, foram feitas dosagens nos órgãos de interesse, e em nossos resultados foram encontradas concentrações progressivas de lítio seguindo a ordem de: fígado, cérebro, rim, tíbia e plasma.

Uma característica dos metais, é o acúmulo nos ossos, a maioria são acumulados e fixados no esqueleto, limitando assim sua biodisponibilidade e, portanto, protegendo o corpo de seus efeitos (Vidaud et al. 2012). Vários estudos foram realizados com o intuito de avaliar o efeito do lítio na saúde óssea, e os resultados são conflitantes entre si; alguns estudos sugerem que o lítio provoca perda óssea que pode predispor ou agravar a osteoporose, enquanto outros estudos não encontraram efeitos significativos. Em contraste, vários estudos destacaram os efeitos benéficos do lítio sobre o metabolismo ósseo, incluindo a inibição da reabsorção óssea e a formação de osteoclastos. Desta forma, não há um consenso sobre o efeito ósseo do lítio, apesar de ser notável o seu acúmulo nos ossos (Dermience et al. 2015).

O fato do rim e do cérebro, apresentarem concentrações maiores de lítio que o fígado, é explicado pela farmacocinética deste metal (Silva 2010), que não sofre metabolismo hepático e é excretado de forma inalterada pelos rins, e está de acordo com os efeitos tóxicos mais comuns do lítio.

A NAC foi administrada para verificar se apresentaria um efeito quelante sobre o lítio, diminuindo assim sua concentração plasmática e, conseqüentemente, sua toxicidade. Nos resultados obtidos, nos órgãos e no plasma, NAC diminuiu as concentrações de lítio, no entanto essas mudanças não foram significativas. Esse perfil encontrado sobre o efeito de NAC nas concentrações de lítio, sugere que possivelmente doses maiores de NAC produziriam diminuição significativa.

Estudos indicam que o tratamento com lítio também tem influência sobre as células sanguíneas, pois afeta a dinâmica da membrana dos glóbulos vermelhos, bem como, causa aumento na contagem total de leucócitos. Alguns dos mecanismos responsáveis pela leucocitose, são que o lítio favorece a granulopoiese na medula óssea, estimulando a proliferação de células-tronco pluripotentes e de fatores de crescimento. Outro efeito do lítio sobre os glóbulos brancos foi a ocorrência de linfopenia (Pettegrew et al. 1987; Young 2009; Ferensztajn-Rochowiak and Rybakowski 2016).

Em nossos achados, houve um aumento dos níveis de hemoglobina e do hematócrito, decorrentes do tratamento com lítio, resultados diferentes dos encontrados por Malhotra e Dhawan (Malhotra e Dhawan 2008), onde não foi relatada nenhuma alteração significativa. Com relação aos glóbulos brancos, apenas o grupo NAC + Li apresentou leucocitose, sendo que, o grupo que recebeu apenas Li, manteve os níveis normais. O grupo tratado com lítio também apresentou aumento na contagem de neutrófilos, e sozinho, ou coadministrado com NAC, causaram linfopenia, pois, de acordo com o exposto por Young (Young 2009), o tratamento com Li inibiu a produção de células T, mas, em compensação, potencializou a atividade dos linfócitos. A contagem de hemácias, plaquetas, leucócitos, bastões e monócitos não apresentou nenhuma alteração significativa.

Parâmetros bioquímicos também apontaram que o tratamento crônico com lítio causou muitos efeitos tóxicos em vários órgãos, incluindo o fígado e o rim, provocando alterações estruturais e em funções hepáticas e renais (Chadha et al. 2008; Grandjean e Aubry 2009a).

Uma complicação bem conhecida é a nefrotoxicidade decorrente do uso de lítio no tratamento dos transtornos de humor (Grünfeld e Rossier 2009). Para avaliar a taxa de filtração glomerular, os níveis de creatinina foram dosados e para avaliar o dano renal, realizou-se também a dosagem de ureia no plasma dos animais. Os resultados obtidos não demonstraram nenhuma alteração significativa, o mesmo resultado foi encontrado por Nciri et al. (Nciri et al. 2010). Segundo estudos (Gitlin 1999), o tratamento com lítio geralmente não é associado com uma diminuição expressiva na taxa de filtração glomerular, no entanto, foi observado uma tendência de aumento (não significativo) no valores de creatinina e ureia nos grupos que receberam lítio.

As dosagens de enzimas hepáticas foram realizadas por acusarem a presença de disfunção hepática, havendo vários trabalhos refletindo que o lítio provocou mudanças nos níveis das enzimas hepáticas (Chadha et al. 2010) e no metabolismo de carboidratos hepáticos (Rodriguez-Gil et al. 2000).

Em hepatócitos de ratos, lítio tem efeitos que se assemelham aos da insulina, tais como estimulação da síntese de glicogênio a partir da glicose, acarretando em diminuição dos níveis de sanguíneos de glicemia (Nyfeler et al. 1981), esse efeito pode ser alcançado pela ativação do glicogênio sintase com a concomitante inativação do glicogênio fosforilase (Rodriguez-Gil et al. 2000). Este resultado hipoglicemiante do lítio pode ser observado em nosso trabalho, onde os níveis de glicemia diminuiram

significativamente quando comparados ao controle. O mesmo efeito foi encontrado no grupo que recebeu NAC + Li, indicando que a NAC não interferiu neste efeito do lítio.

As transaminases são reconhecidas como marcadores enzimáticos do fígado, as quais são ativas nas trocas reversíveis de grupos amino entre aminoácidos e estão na junção entre o metabolismo das proteínas e carboidratos. Enquanto que as fosfatases, incluindo a FA, são enzimas importantes por serem responsáveis pela detoxificação, metabolismo e biossíntese de macromoléculas para diferentes funções essenciais. Interferências nessas enzimas levam a prejuízos bioquímicos e lesões em tecidos e função celular (Woreta e Alqahtani 2014).

Sugere-se que mudanças na atividade destas enzimas são devido a alterações na permeabilidade da membrana plasmática e necrose celular. Geralmente, seguindo a lógica, quando há danos nos tecidos, as enzimas são liberadas dos tecidos para o plasma, e sua dosagem detecta níveis plasmáticos elevados (Ahmad et al. 2011). No entanto, não foram encontradas alterações significativas de ALT e AST entre os grupos estudados, resultados semelhantes a Ahmad et al. (Ahmad et al. 2011) e diferente dos resultados encontrados por Chadha et al. (Chadha et al. 2008), no qual o tratamento com o lítio gerou um aumento plasmático das transaminases. Com relação aos níveis plasmáticos da fosfatase alcalina, sob as condições experimentais empregadas em nosso estudo não foi encontrado um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina, como foi encontrado por Chadha et al. (Chadha et al. 2010), pelo contrário, ocorreu um decréscimo da atividade com o uso do lítio, mesmo resultado encontrado por Ahmad et al. (Ahmad et al. 2011), sugerindo que o lítio causou uma melhora hepática.

Como a BuChE é sintetizada no fígado, um comprometimento hepatocelular irá refletir uma diminuição da atividade enzimática, como de fato, são encontrados níveis plasmáticos baixos em lesões hepáticas, com níveis reestabelecidos quando há recuperação das lesões no hepatócito, sugerindo a BuChE como um marcador bioquímico de dano hepático (Santarpia et al. 2013). Em estudo conduzido por Ezzaher et al. (Ezzaher et al. 2012), os valores médios da atividade da butirilcolinesterase foi maior nos pacientes bipolares do tipo 1. Em nossos resultados, não foram observadas alterações significativas da atividade da BuChE nos homogenatos de fígado e cérebro. Enquanto que nos homogenatos de rim, o tratamento com Li e NAC, acarretou em um aumento da atividade da BuChE.

Uma hipótese que pode explicar o aumento das colinesterases, é uma falha na estrutura lipídica das membranas neuronais, uma vez que a diminuição no nível de

ácido graxo nestas membranas diminui a sensibilidade e especificidade dos receptores muscarínicos, acarretando no aumento da acetilcolina (Dilsaver 1986; Ezzaher et al. 2012), sendo que, de forma análoga, se isso ocorrer em outros locais, pode haver um aumento da BuChE.

A farmacocinética do lítio complementa a hipótese que essa falha na estrutura lipídica pode ocorrer em outros lugares, onde o lítio apresenta um perfil tóxico maior, uma vez que o lítio apresenta passagem lenta pela barreira hematoencefálica (Silva 2010) e não sofre biotransformação no fígado, ou seja, sendo excretado quase que exclusivamente pelo rim (Goldfrank et al. 1996), tornando-o o órgão mais prejudicado.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos normais do metabolismo celular, contudo, a geração em excesso de ERO leva a danos em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que prejudicam as funções celulares, acarretando em doenças (Oga et al. 2014), sendo que a fisiopatologia do transtorno bipolar e o emprego do lítio no tratamento da doença, têm sido associados a alterações em parâmetros de estresse oxidativo (Machado-Vieira et al. 2007). Uma substância antioxidante é definida como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Consequentemente, são os antioxidantes que defendem o organismo do dano das ERO em excesso (Eskandari et al. 2012), e são várias as moléculas presentes nos sistemas biológicos que atuam nesse sistema de proteção, que incluem os grupos tióis, a SOD e a CAT (Oga et al. 2014).

A hepatotoxicidade induzida pelo lítio pode ser causada por indução do estresse oxidativo. Neste estudo, o tratamento com lítio causou aumento da peroxidação lipídica hepática, o mesmo encontrado por Toplan et al. e Ben Saad et al. (Toplan et al. 2015; Ben Saad et al. 2016), apontando para peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, deixando os tecidos mais susceptíveis ao dano oxidativo, pois compromete a integridade estrutural, diminui a fluidez da membrana e inativa enzimas e receptores da membrana (Chadha et al. 2008). O aumento da peroxidação lipídica foi acompanhado pelo aumento (não significativo) de tióis. Os tióis mitocondriais são centrais para a defesa antioxidante, pois sequestram os produtos reativos da degradação lipídica, retardando a propagação da peroxidação lipídica e reparam proteínas oxidadas (Murphy 2012; Comini 2016), indicando um aumento da defesa contra o dano lipídico causado pelo lítio. A coadministração com NAC, reestabeleceu os níveis da peroxidação lipídica e os níveis de tióis, demonstrando o alto poder antioxidante da NAC. Nos grupos que receberam

a NAC, esse aumento é consistente com o fato de existirem na estrutura química da NAC grupamentos tióis (Oga et al. 2014).

A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, e a reação gera peróxido de hidrogênio; a catalase, por sua vez, elimina o peróxido de hidrogênio derivado da SOD. Em nossos resultados, os níveis da SOD diminuíram, apesar de não estatisticamente significativo, enquanto que os níveis da CAT diminuíram significativamente, resultados semelhantes encontrados por Nciri et al. (Nciri et al. 2009). Isso pode ser explicado devido ao seu uso para converter o peróxido de hidrogênio, e considerando que quando há baixos níveis de peróxido de hidrogênio, quem preferencialmente o metaboliza é a glutathione peroxidase e isso, portanto, indica um intenso estresse oxidativo com altas taxas de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (Chadha et al. 2008). No grupo onde a NAC foi coadministrada houve uma diminuição nos níveis de catalase, devido ao fato da NAC possuir cisteína em sua estrutura, sua administração aumenta os níveis de cisteína, que é o passo limitante para a produção de glutathione, a NAC aumenta a glutathione disponível para defesas redox (Dean et al. 2011; Dodd et al. 2013).

No rim, com a administração de lítio, houve um aumento acentuado da peroxidação lipídica, bem como, também foi encontrado um aumento nos níveis de tióis na tentativa de amenizar a propagação do estresse oxidativo e do dano às membranas lipídicas. Nciri et al. (Nciri et al. 2012) também encontrou danos oxidativos, com aumento da peroxidação lipídica, decorrentes do tratamento com lítio. Além disso, as enzimas responsáveis pela defesa antioxidante tiveram seus níveis diminuídos pelo lítio, indicando que houve um esgotamento delas frente ao alto nível de substâncias reativas de oxigênio e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (Ben Saad et al. 2016). A coadministração de NAC mostrou uma diminuição nos níveis de peroxidação lipídica e reestabeleceu os níveis de tióis e da SOD. O fato de Efrati et al. (Efrati et al. 2005) ter encontrado que o tratamento com NAC tem um efeito protetor renal contra a insuficiência renal induzida em ratos, somando com os resultados promissores da NAC contra o estresse oxidativo neste trabalho, presumem que o estresse oxidativo pode ser um importante mecanismo dos efeitos tóxicos do lítio.

O cérebro é, particularmente vulnerável aos danos oxidativos, uma vez que contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e possui baixa capacidade de defesa antioxidante (Chen et al. 2012), tornando-o mais vulnerável à peroxidação lipídica, provocando uma desordem na transdução de sinal, plasticidade estrutural e, principalmente, induzindo alterações bioquímicas adversas em proteínas

e genes (Mahadik et al. 2001; Banerjee et al. 2012). Em nossos resultados, foi encontrado um aumento, porém não significativo, da peroxidação lipídica, acompanhado também do aumento dos níveis de tióis, como resposta aos danos lipídicos. Além disso, houve um aumento da enzima SOD, concomitante a diminuição da CAT. Estes achados podem significar que o estresse oxidativo está no começo, ainda não causando danos tão significativos, e que o organismo na tentativa de reverter o quadro, aumentou os níveis da SOD para catalisar a transformação dos radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio, e possivelmente por haver pequenas concentrações de peróxidos de hidrogênio, este está sendo convertido em água e oxigênio pela glutathione, os níveis da CAT foram diminuídos.

Analizando os parâmetros em conjunto, nota-se que há um efeito mais moderado causado pelo estresse oxidativo. Este efeito mais ameno encontrado no cérebro, quando comparado ao fígado e rim, podem ser explicados pela farmacocinética do lítio, pois, o lítio atravessa a membrana hematoencefálica numa taxa mais lenta que outros cátions, levando até 6 a 10 dias para causar algum efeito nos pacientes (Goldfrank et al. 1996), e como o nosso tratamento durou 14 dias, provavelmente não foi tempo suficiente para causar danos mais acentuados no cérebro. No entanto, a coadministração de NAC mostrou ser promissora, pois impediu o aumento da peroxidação lipídica, quando comparado aos ratos tratados apenas com lítio.

Nossos resultados confirmam que o tratamento subcrônico com lítio envolve vários efeitos adversos como, perda de peso nos animais e redução do tamanho do fígado e a coadministração de NAC não reverteu esses efeitos tóxicos. O uso de NAC, com foco no seu efeito quelante, é promissor, portanto, estudos empregando doses maiores de NAC devem ser realizados. Em parâmetros hematológicos, o uso de lítio mesmo quando coadministrado com NAC, causou linfopenia e neutropenia, diminuindo, portanto, as células de defesa e só quando a NAC foi coadministrada houve leucocitose. Na avaliação dos indicadores renais, foi encontrado que o lítio não causa efeitos tóxicos, e na avaliação dos indicadores da função hepática, o lítio mostrou melhorar as condições hepáticas por diminuir os níveis da fosfatase alcalina. O lítio também apresentou diminuição na concentração da glicose, efeito semelhante ao da insulina. Na análise da atividade da butirilcolinesterase, foi registrado um aumento causado pelo lítio no rim, enquanto que a coadministração de NAC reestabeleceu aos níveis normais. No entanto quando os parâmetros de estresse oxidativo foram medidos, o lítio demonstrou um perfil potencializador do estresse

oxidativo no fígado, rim e cérebro, enquanto que a NAC demonstrou um perfil antioxidante revertendo e amenizando efeitos tóxicos do lítio nesses órgãos. Além disso, a avaliação da glutathione peroxidase precisa ser incluída neste trabalho, por fazer parte do sistema de defesa antioxidante responsável pela eliminação das espécies reativas formadas e ter uma parte importante na transformação do peróxido de hidrogênio. Considerando que o lítio é usado em tratamentos crônicos, substâncias que minimizem os efeitos tóxicos do lítio, como a NAC, se apresentam como ferramentas promissoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Ahmad M, Elnakady Y, Farooq M, Wadaan M (2011) Lithium induced toxicity in rats: blood serum chemistry, antioxidative enzymes in red blood cells and histopathological studies. *Biol Pharm Bull* 34:272–277. doi: 10.1248/bpb.34.272
- Aliasgharpour M, Hagani H (2009) Evaluation of lithium determination in three analyzers: flame emission, flame atomic absorption spectroscopy and ion selective electrode. *N Am J Med Sci* 1:244–246. doi: 10.4297/najms.2009.5244
- Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, et al (2008) Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord* 111:135–144. doi: 10.1016/j.jad.2008.04.013
- Aprahamian I, De Sousa RT, Valiengo LCL, et al (2014) Lithium safety and tolerability in mood disorders: A critical review. *Rev Psiquiatr Clin* 41:9–14.
- Banerjee U, Dasgupta A, Rout JK, Singh OP (2012) Effects of lithium therapy on Na⁺-K⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 37:56–61. doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.12.006
- Baptista T, Teneud L, Contreras Q, et al (1995) Lithium and body weight gain. *Pharmacopsychiatry* 28:35–44. doi: 10.1055/s-2007-979586
- Ben Saad A, Dalel B, Rjeibi I, et al (2016) Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats. *Pharm Biol* 55:516–525. doi: 10.1080/13880209.2016.1255976
- Berk M, Conus P, Kapczinski F, et al (2010) From neuroprogression to neuroprotection: Implications for clinical care. *Med J Aust* 193:S36–S40. doi: ber10227_fm [pii]
- Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, et al (2011) Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev* 35:804–817. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.001
- Bhat GM, Shah NA, Shah BA, et al (2014) Lithium carbonate induced histological changes in the liver of albino rats. *IOSR J Pharm Biol Sci* 9:45–48.
- Blanusa M, Varnai VM, Piasek M, Kostial K (2005) Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr Med Chem* 12:2771–94. doi: 10.2174/092986705774462987
- Busby KK, Sajatovic M (2010) Patient, treatment, and systems-level factors in bipolar disorder nonadherence: A summary of the literature. *CNS Neurosci Ther* 16:308–315. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00191.x
- Chadha VD, Bhalla P, Dhawan D (2010) Uptake and retention of ⁶⁵Zn in lithium-treated rat liver: role of zinc. *Dig Liver Dis* 42:446–450. doi: 10.1016/j.dld.2009.07.021

- Chadha VD, Bhalla P, Dhawan DK (2008) Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. *Liver Int* 28:558–565. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01674.x
- Chen X, Guo C, Kong J (2012) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 7:376–385.
- Comini M (2016) Measurement and meaning of cellular thiol: disulphide redox status. *Free Radic Res* 50:246–271. doi: 10.3109/10715762.2015.1110241
- Curran G, Ravindran A (2014) Lithium for bipolar disorder: a review of the recent literature. *Expert Rev Neurother* 14:1079–1098. doi: 10.1586/14737175.2014.947965
- Dean OM, Van Den Buuse M, Berk M, et al (2011) N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one and d-amphetamine-treated rats: Relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett* 499:149–153. doi: 10.1016/j.neulet.2011.05.027
- Dermience M, Lognay G, Mathieu F, Goyens P (2015) Effects of thirty elements on bone metabolism. *J Trace Elem Med Biol* 32:86–106. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.06.005
- Dilsaver SC (1986) Pathophysiology of “cholinoceptor supersensitivity” in affective disorders. *Biol Psychiatry* 21:813–829. doi: 10.1016/0006-3223(86)90246-5
- Dodd S, Maes M, Anderson G, et al (2013) Putative neuroprotective agents in neuropsychiatric disorders. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 42:135–145. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.11.007
- Efrati S, Averbukh M, Berman S, et al (2005) N-Acetylcysteine ameliorates lithium-induced renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 20:65–70. doi: 10.1093/ndt/gfh573
- Ellman GL, Courtney KD, Valentino Andres J, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95.
- Eskandari MR, Fard JK, Hosseini MJ, Pourahmad J (2012) Glutathione mediated reductive activation and mitochondrial dysfunction play key roles in lithium induced oxidative stress and cytotoxicity in liver. *BioMetals* 25:863–873. doi: 10.1007/s10534-012-9552-8
- Ezzaher A, Mouhamed DH, Mechri A, et al (2012) Pseudocholinesterase activity in type 1 bipolar patients. *Ann Biol Clin (Paris)* 70:25–31. doi: 10.1684/abc.2011.0652
- Ferensztajn-Rochowiak E, Rybakowski JK (2016) The effect of lithium on hematopoietic, mesenchymal and neural stem cells. *Pharmacol Reports* 68:224–230. doi: 10.1016/j.pharep.2015.09.005
- Gawryluk JW, Wang J-F, Andreazza AC, et al (2011) Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:123–130. doi: 10.1017/S1461145710000805
- Gershon S, Chengappa KNR, Malhi GS (2009) Lithium specificity in bipolar illness: A classic agent for the classic disorder. *Bipolar Disord* 11:34–44. doi:

10.1111/j.1399-5618.2009.00709.x

- Gitlin M (1999) Lithium and the kidney An updated review. *Drug Saf* 20:231–243.
- Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al (1996) Goldfrank's toxicologic emergencies, 5th edn. Prentice Hall, United States
- Gonzalez MH, Souza GB, Oliveira R V., et al (2009) Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta* 79:396–401. doi: 10.1016/j.talanta.2009.04.001
- Grandjean EM, Aubry DJ-M (2009a) Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: part III: clinical safety. *CNS Drugs* 23:397–418. doi: 10.2165/00023210-200923050-00004
- Grandjean EM, Aubry J-M (2009b) Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach. Part II: clinical pharmacology and therapeutic monitoring. *CNS Drugs* 23:331–349. doi: 10.2165/00023210-200923040-00005
- Grünfeld J-P, Rossier BC (2009) Lithium nephrotoxicity revisited. *Nat Rev Nephrol* 5:270–276. doi: 10.1038/nrneph.2009.43
- Kelly GS (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 3:114–127.
- Khairova R, Pawar R, Salvatore G, et al (2012) Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol Med* 5:680–682. doi: 10.3892/mmr.2011.732.Effects
- Levine S, Saltzman A (2008) Lithium increases gastrointestinal tract weight of male or female rats but it increases body weight only in females. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 32:29–33. doi: 10.1016/j.pnpbp.2007.06.018
- Levine S, Saltzman A (2006) Lithium increases body weight of rats: relation to thymolysis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 30:155–158. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.08.023
- Lewitzka U, Severus E, Bauer R, et al (2015) The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence—a narrative review. *Int J Bipolar Disord* 3:15. doi: 10.1186/s40345-015-0032-2
- Lima TZ, Blanco MM, Dos Santos JG, et al (2008) Staying at the crossroads: Assessment of the potential of serum lithium monitoring in predicting an ideal lithium dose. *Rev Bras Psiquiatr* 30:215–221. doi: 10.1590/S1516-44462008000300007
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J biol Chem* 193:265–275.
- Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, et al (2007) Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: A possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 421:33–36. doi: 10.1016/j.neulet.2007.05.016
- Magalhães PV da S, Dean OM, Bush AI, et al (2013) A preliminary investigation on the efficacy of N-acetyl cysteine for mania or hypomania. *Aust N Z J Psychiatry* 47:564–8. doi: 10.1177/0004867413481631
- Mahadik SP, Evans D, Lal H (2001) Oxidative stress and role of antioxidant and

- omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:463–93. doi: 10.1016/S0278-5846(00)00181-0
- Malhi GS, Adams D, Berk M (2009) Medicating mood with maintenance in mind: Bipolar depression pharmacotherapy. *Bipolar Disord* 11:55–76. doi: 10.1111/j.1399-5618.2009.00711.x
- Malhi GS, Tanious M (2011) Optimal frequency of lithium administration in the treatment of bipolar disorder: Clinical and dosing considerations. *CNS Drugs* 25:289–298. doi: 10.2165/11586970-000000000-00000
- Malhotra A, Dhawan DK (2008) Zinc improves antioxidative enzymes in red blood cells and hematology in lithium-treated rats. *Nutr Res* 28:43–50. doi: 10.1016/j.nutres.2007.11.002
- Moreau RL de M, de Siqueira MEPB (2008) *Toxicologia Analítica - Ciências Farmacêuticas*, 1st edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Murphy MP (2012) Mitochondrial Thiols in Antioxidant Protection and Redox Signaling: Distinct Roles for Glutathionylation and Other Thiol Modifications. *Antioxid Redox Signal* 16:476–495. doi: 10.1089/ars.2011.4289
- Nandi A, Chatterjee IB (1988) Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *J Biosci* 13:305–315. doi: 10.1007/BF02712155
- Nciri R, Allagui M, Vincent C, et al (2009) The effects of subchronic lithium administration in male Wistar mice on some biochemical parameters. *Hum Exp Toxicol* 28:641–646. doi: 10.1556/ABiol.60.2009.3.4
- Nciri R, Allagui MS, Bourogaa E, et al (2012) Lipid peroxidation, antioxidant activities and stress protein (HSP72/73, GRP94) expression in kidney and liver of rats under lithium treatment. *J Physiol Biochem* 68:11–18. doi: 10.1007/s13105-011-0113-3
- Nciri R, Allagui MS, Vincent C, et al (2010) Chronic lithium administration triggers an over-expression of GRP94 stress protein isoforms in mouse liver. *Food Chem Toxicol* 48:1638–1643. doi: 10.1016/j.fct.2010.03.038
- Nyfeler F, Fasel P, Walter P (1981) Short-term stimulation of net glycogen production by insulin in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 675:17–23. doi: 10.1016/0304-4165(81)90064-7
- Oga S, Camargo MM, Batistuzzo JA (2014) *Fundamentos de Toxicologia*, 4th edn. Atheneu Sp, São Paulo
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3
- Oruch R, Elderbi MA, Khattab HA, et al (2014) Lithium: A review of pharmacology, clinical uses, and toxicity. *Eur J Pharmacol* 740:464–473. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.06.042
- Pettegrew JW, Short JW, Woessner RD, et al (1987) The effect of lithium on the membrane molecular dynamics of normal human erythrocytes. *Biol Psych* 22:857–871. doi: 10.1016/0006-3223(87)90084-9
- Rodriguez-Gil JE, Fernández-Novell JM, Barberá A, Guinovart JJ (2000) Lithium's

- effects on rat liver glucose metabolism in vivo. *Arch Biochem Biophys* 375:377–384. doi: 10.1006/abbi.1999.1679
- Santarpia L, Grandone I, Contaldo F, Pasanisi F (2013) Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 4:31–39. doi: 10.1007/s13539-012-0083-5
- Santo CE do E, Carvalho TM de JP (2014) Determination of serum lithium: comparison between atomic emission and absorption spectrometry methods. *J Bras Patol e Med Lab* 50:12–19. doi: 10.1590/S1676-24442014000100002
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, et al (2002) Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci* 70:1023–1033. doi: 10.1016/S0024-3205(01)01482-5
- Silva P (2010) *Farmacologia*, 8th edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Souza C de, Vedana KGG, Mercedes BP do C, Miaso AI (2013) Bipolar disorder and medication: adherence, patients' knowledge and serum monitoring of lithium carbonate. *Rev Lat Am Enfermagem* 21:624–631. doi: 10.1590/S0104-11692013000200021
- Toplan S, Dariyerli N, Ozdemir S, et al (2013) Lithium-induced hypothyroidism: oxidative stress and osmotic fragility status in rats. *Biol Trace Elem Res* 152:373–378. doi: 10.1007/s12011-013-9629-4
- Toplan S, Ozdemir S, Tanriverdi G, et al (2015) The effects of lithium administration on oxidant/antioxidant status in rats: Biochemical and histomorphological evaluations. *Biol Trace Elem Res* 169:279–284. doi: 10.1007/s12011-015-0425-1
- Vidaud C, Bourgeois D, Meyer D (2012) Bone as target organ for metals: the case of f-elements. *Chem Res Toxicol* 25:1161–1175. doi: 10.1021/tx300064m
- Woreta TA, Alqahtani SA (2014) Evaluation of abnormal liver tests. *Med Clin North Am* 98:1–16. doi: 10.1016/j.mcna.2013.09.005
- Xie C, Zhou K, Wang X, et al (2014) Therapeutic benefits of delayed lithium administration in the neonatal rat after cerebral hypoxia-ischemia. *PLoS One* 9:e107192. doi: 10.1371/journal.pone.0107192
- Young W (2009) Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplant* 18:951–975. doi: 10.3727/096368909X471251

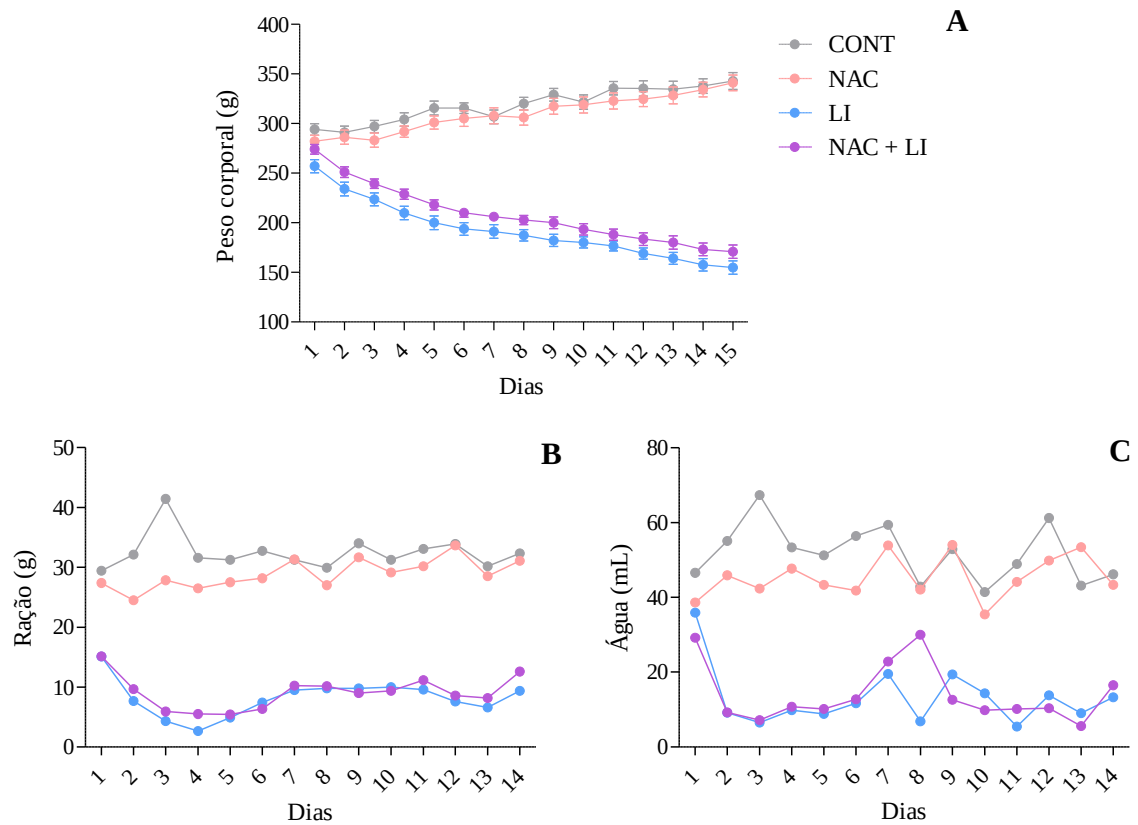


Fig. 1 Alteração no peso dos animais. (A) A figura representa a variação do peso dos animais entre o primeiro dia de tratamento e o último dia de tratamento. (B) Acompanhamento da ingestão de ração e de (C) água dos animais no decorrer do tratamento. Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM

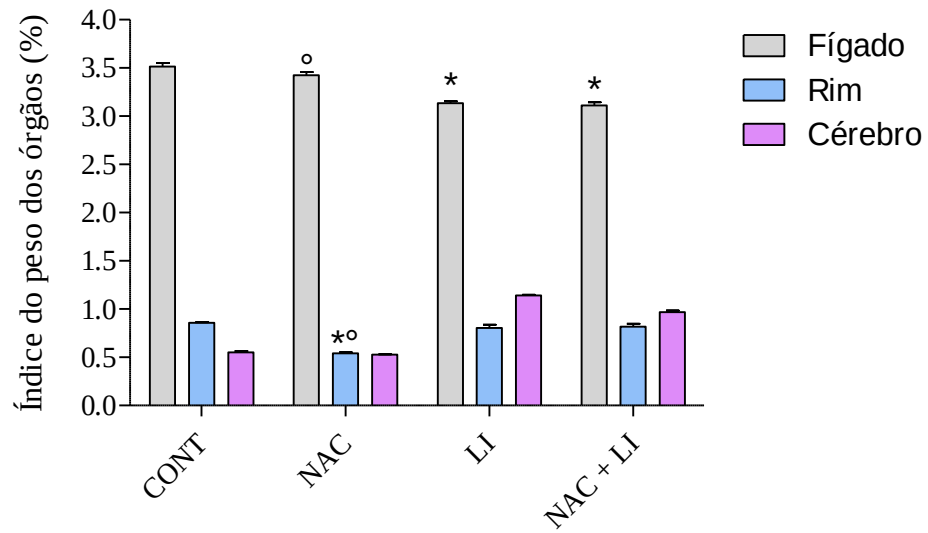


Fig. 2 Efeito do tratamento sobre o índice do peso dos órgãos. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li.

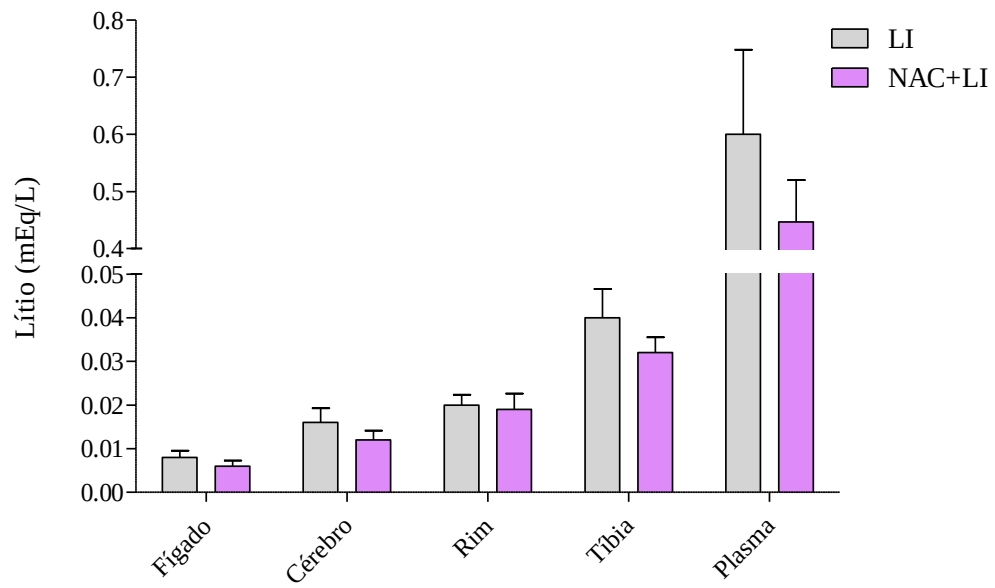


Fig. 3 Análise do efeito da coadministração de NAC sobre a quantificação do lítio. Não houve alterações significativas entre os grupos. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM

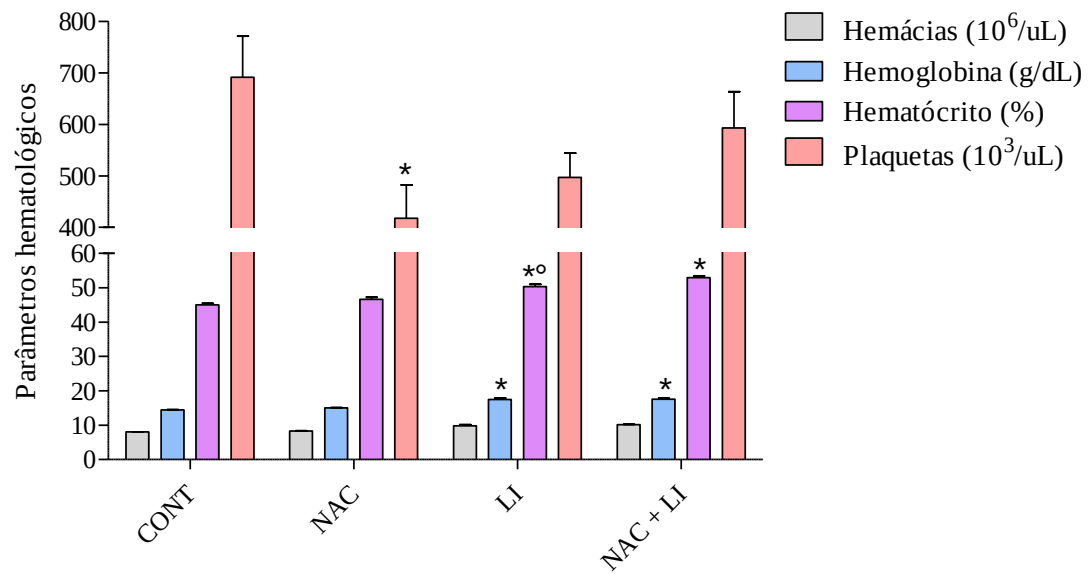


Fig. 4 Análise dos parâmetros hematológicos, e seus perfis na administração de Li, NAC e na coadministração de NAC + Li. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle, ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

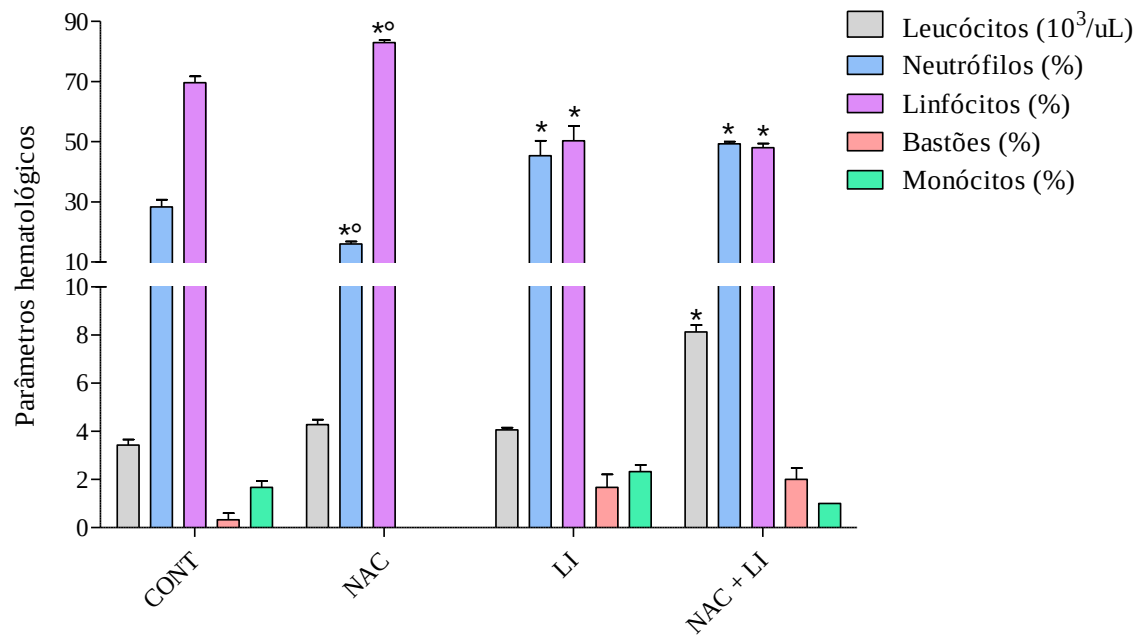


Fig. 5 Contagem e diferencial de leucócitos, e o efeito da administração de NAC, Li e NAC + Li sobre eles. Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

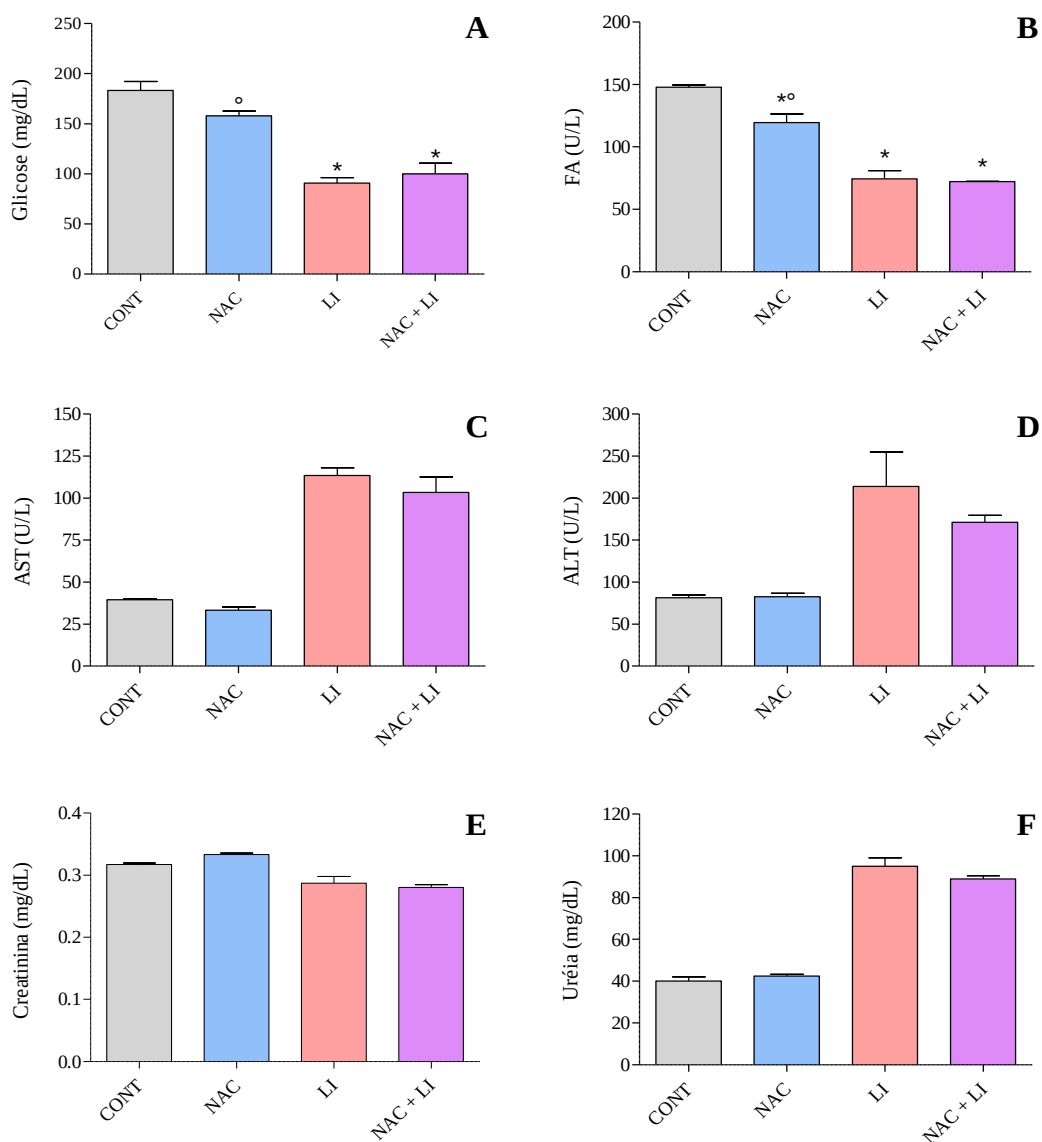


Fig. 6 Dosagens bioquímicas realizadas no plasma de ratos machos conforme o tratamento exposto no gráfico. Foram realizadas a dosagem de (A) glicose, de indicadores de distúrbios hepáticos, como a FA (B), AST (C) e ALT (D), e parâmetros da função renal, como a creatinina (E) e ureia (F). Cada barra representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ^o $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

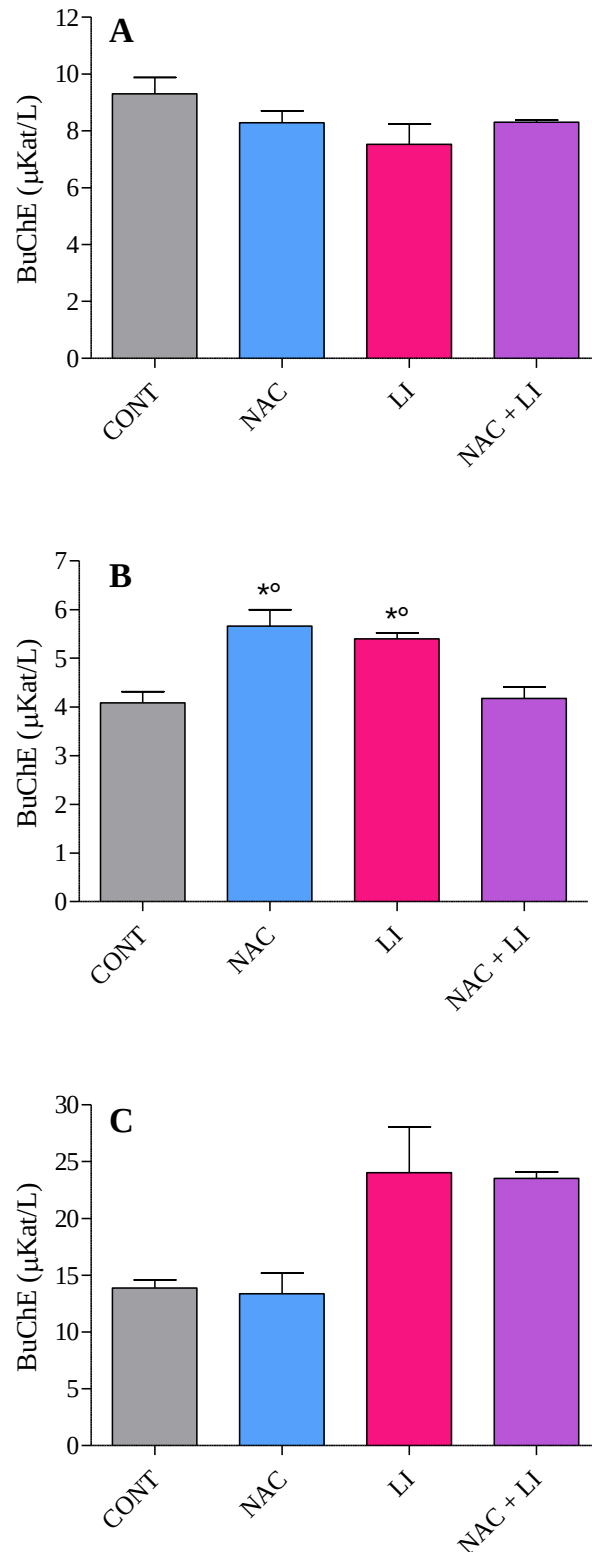


Fig. 7 Efeito da administração de NAC, e Li e da coadministração de ambos na atividade da butirilcolinesterase presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

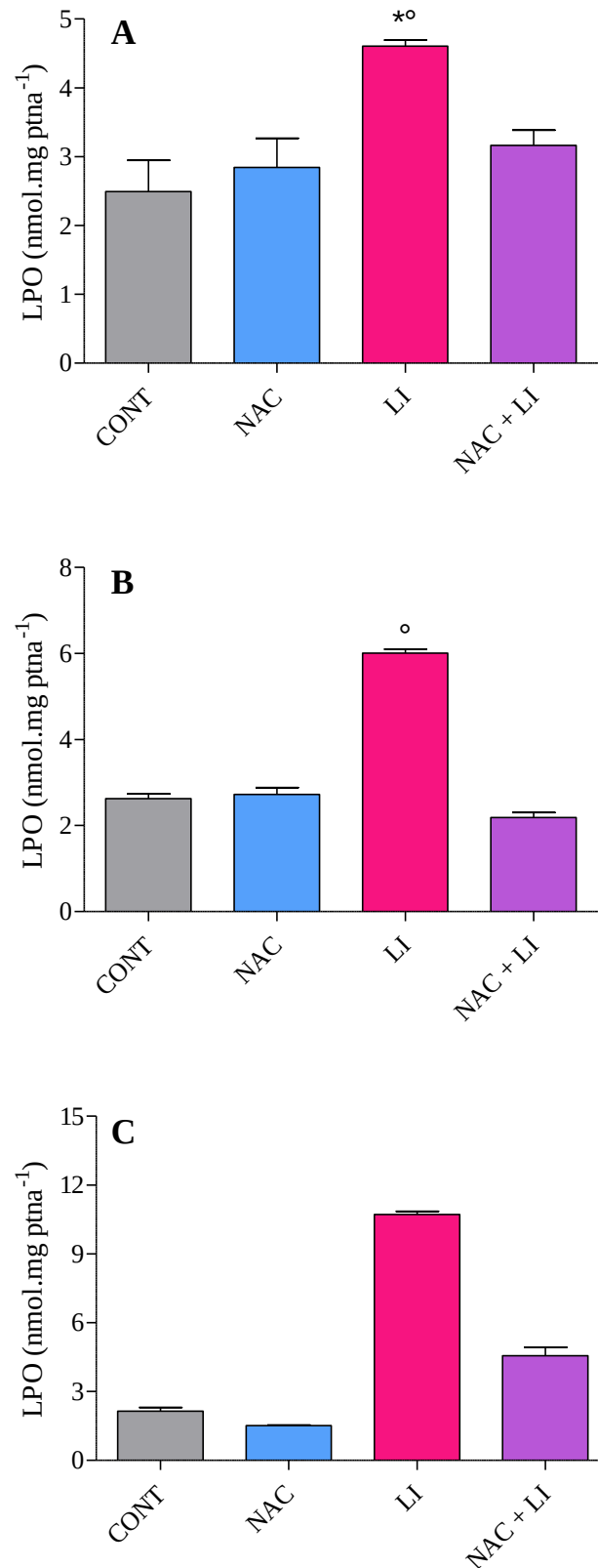


Fig. 8 Efeito da administração de NAC, e Li e da coadministração de ambos na peroxidação lipídica (LPO) em homogenatos de fígado (A), de rim (B) e de cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. *p < 0,05 em relação ao controle e ^op < 0,05 em relação a NAC + Li

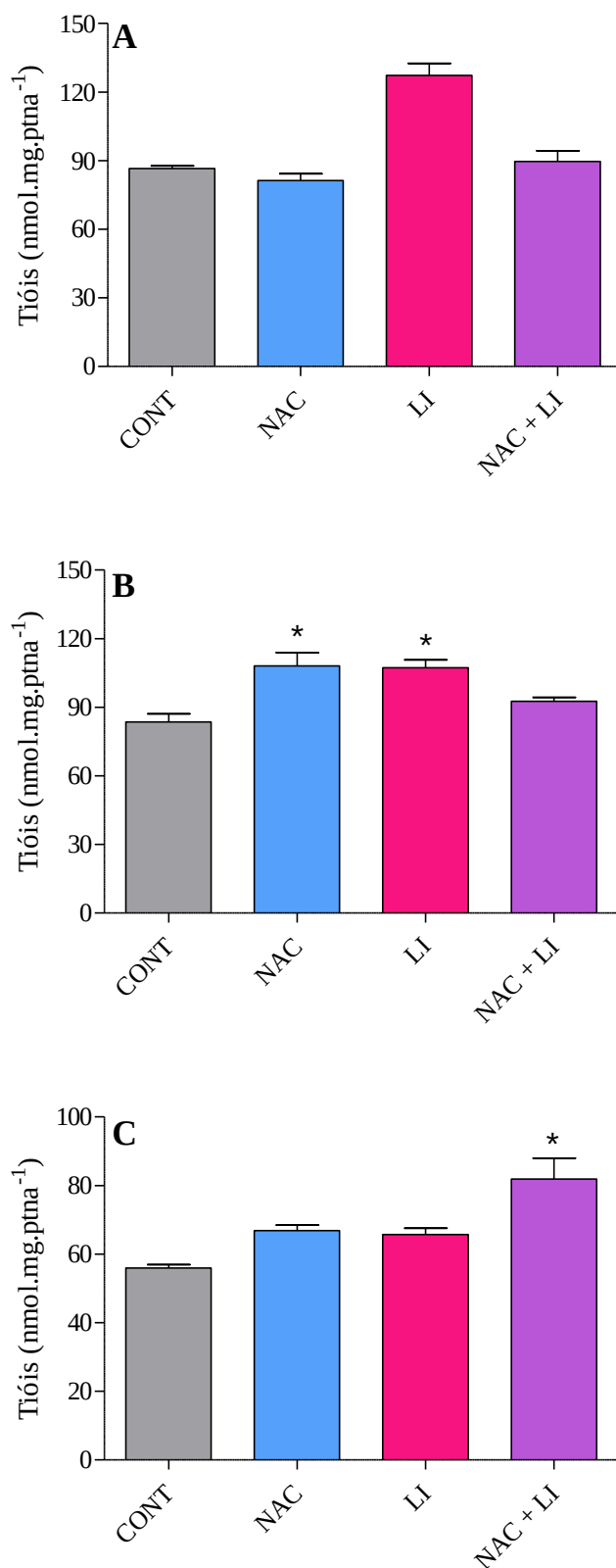


Fig. 9 Efeito da administração de NAC, e Li e da coadministração de ambos na quantidade de tióis em homogenatos de fígado (A), de rim (B) e de cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. *p < 0,05 em relação ao controle e °p < 0,05 em relação a NAC + Li

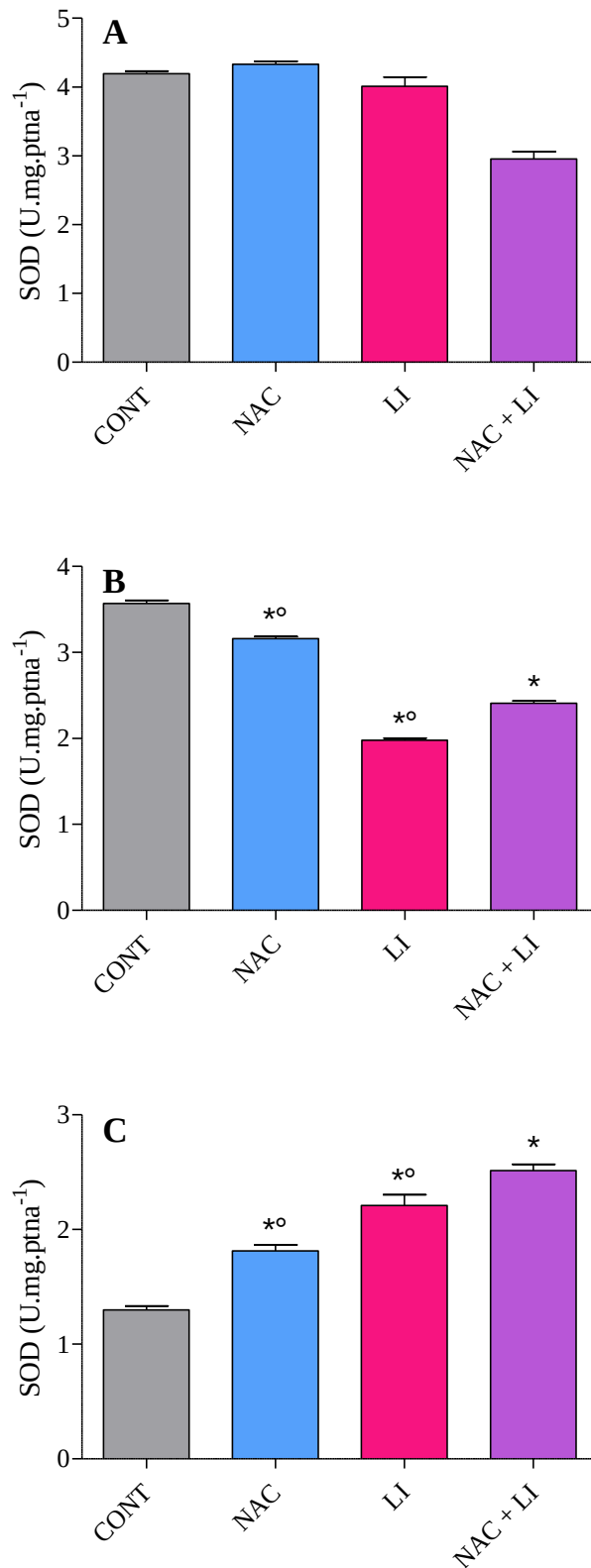


Fig. 10 Efeito da administração de NAC, e Li e da coadministração de ambos na atividade da superóxido dismutase (SOD) presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ° $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

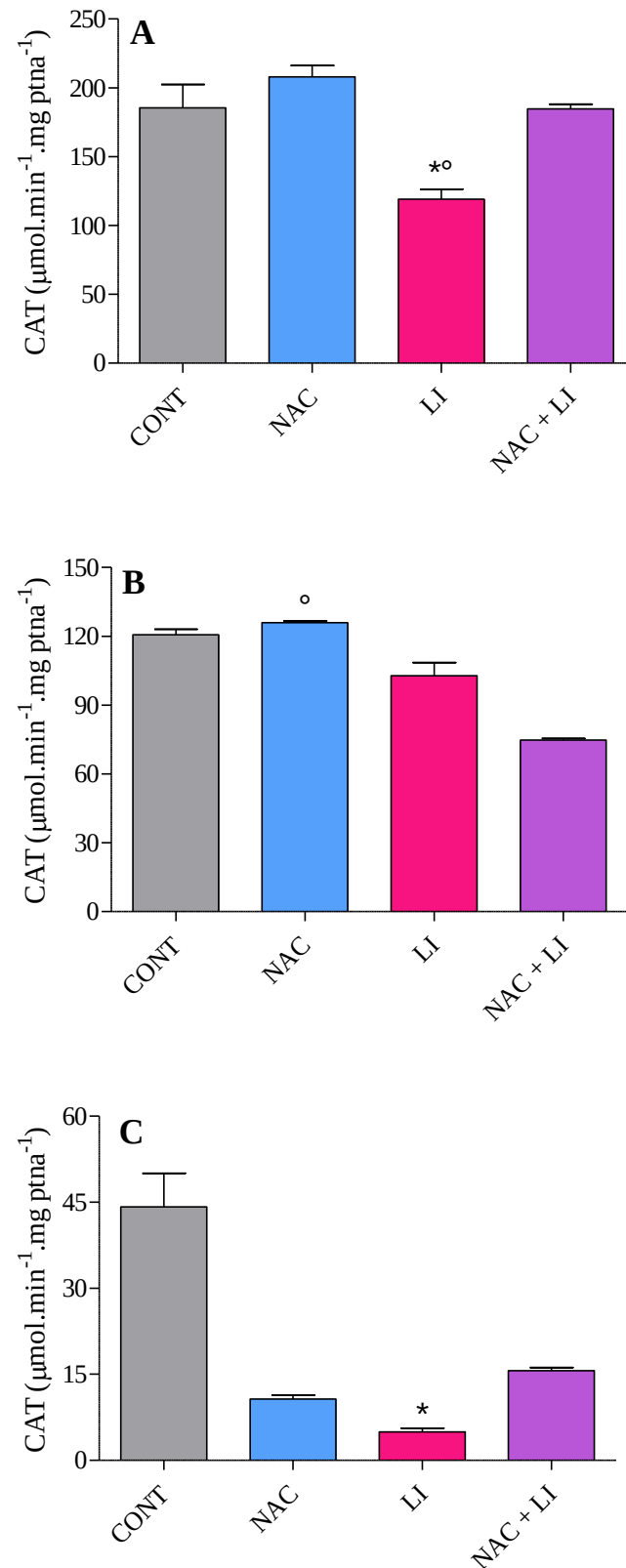


Fig. 11 Efeito da administração de NAC, e Li e da coadministração de ambos na atividade da butirilcolinesterase presente no fígado (A), no rim (B) e no cérebro (C). Cada ponto representa a média do grupo $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ em relação ao controle e ^o $p < 0,05$ em relação a NAC + Li

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia proposta para quantificar lítio, utilizando o FAAS no modo emissão, foi considerada aprovada e devidamente validada, possibilitando a sua utilização para medir o lítio plasmático dos ratos tratados. Além disso, os resultados desse estudo apontaram que o uso subcrônico do lítio provocou vários efeitos adversos como, perda de peso, alteração de parâmetros hematológicos, aumento dos níveis de BuChE no rim, e causando estresse oxidativo pelo aumento de peroxidação lipídica e afetando as enzimas antioxidantes, no fígado, rim e cérebro. A utilização em conjunto da NAC, mostrou melhorar os efeitos tóxicos causados pelo lítio, porém, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer essa relação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDA, M.; HAJEK, T.; CALKIN, C.; O'DONOVAN, C. Treatment of bipolar disorder: new perspectives. **Ann. Med**, v.41, n.3, p. 186-196, 2009.
- ALEXANDER, M.P.; FARAG, Y.M.; MITTAL, B.V.; RENNKE, H.G.; SINGH, A.K. Lithium toxicity: a double-edged sword. **Kidney Int**, v.73, n.2, p. 233-237, 2008.
- ALTAN, N.; ENGIN, A.; HIZEL, N.; ONGUN, O.; CEVIK, C. The effect of short term lithium treatment on the leukocyte, liver and muscle carbohydrate metabolism of guinea-pigs. **Gen. Pharmacol**, v.24, n.6, p. 1491-1493, 1993.
- ANDREAZZA, A.C.; CASSINI, C.; ROSA, A.R.; LEITE, M.C.; DE ALMEIDA, L.M.; NARDIN, P.; CUNHA, A.B.; CERESÉR, K.M.; SANTIN, A.; GOTTFRIED, C.; SALVADOR, M.; KAPCZINSKI, F.; GONÇALVES, C.A. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **J. Psychiatri**, v.41, n.6, p. 523-529, 2007.
- ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; BOND, D.J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **J. Affect. Disord**, v.111, n.2, p. 135-144, 2008.
- APRAHAMIAN, I.; DE SOUSA, R.T.; COSTA, L.; VALIENGO, L.; MACHADO-VIEIRA, R.; FORLENZA, O.V. Lithium safety and tolerability in mood disorders: a critical review. **Rev. Psiqu. Clín**, v.41, n.1, p. 9–14, 2014.
- AYORECH, Z.; TRACY, D.K.; BAUMEISTER, D.; GIAROLI, G. Taking the fuel out of the fire: Evidence for the use of anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar disorders. **J. Affect. Disord**, v.174, n.15, p. 467-478, 2015.
- BAKER, D. A.; XI, Z. X.; SHEN, H.; SWANSON, C. J.; KALIVAS, P. W. The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. **J. Neurosci**, v.22, n.20, p.9134-9141, 2002.
- BALDESSARINI, R.J.; VOGT, M. Release of 3H-dopamine and Analogous monoamines from rat striatal tissue. **Cell. Mol. Neurobiol**, v.8, n.2, p. 205-216, 1988.
- BAUER, M.; GOETZ, T.; GLENN, T.; WHYBROW, P.C. The Thyroid-Brain Interaction in Thyroid Disorders and Mood Disorders. **J. Neuroendocrinol**, v.20, n.10, p. 1101-1114, 2008.

BAUER, M.S.; MITCHNER, L. What is a “mood stabilizer”? An evidence-based response. **Am J Psychiatry**, v.161, n.1, p. 3-18, 2004.

BEAULIEU, J.M.; CARON, M.G. Looking at lithium: molecular moods and complex behavior. **Mol. Interv**, v.8, n.5, p. 231-241, 2008.

BERGER, G.E.; WOOD, S.J.; ROSS, M.; HAMER, C.A.; WELLARD, R.M.; PELL, G.; PHILLIPS, L.; NELSON, B.; AMMINGER, G.P.; YUNG, A.R.; JACKSON, G.; VELAKOULIS, D.; PANTELIS, C.; MANJI, H.; MCGORRY P. Neuroprotective effects of low-dose lithium in individuals at ultra-high risk for psychosis. A longitudinal MRI/MRS study. **Curr. Pharm. Des.** v.18, n.4, p. 570-575, 2012.

BERK, M.; DEAN, O.; COTTON, S. M.; GAMA, C. S.; KAPCZINSKI, F.; FERNANDES, B. S.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; HEWITT, K.; ALLWANG, C.; COBB, H.; BUSH, A.I.; SCHAPKAITZ, I.; DODD, S.; MALHI, G.S. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. **J. Affect. Disord**, v.135, n.1, p.389-394, 2011a.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A.C.; DEAN, O.M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YUCEL, M.; GAMA, C.S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P.V.; AMMINGER, P.; MCGORRT, P.; MALHI, G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v.35, n.3, p. 804-817, 2011b.

BERK, M.; MALHI, G.S.; CAHILL, C.; CARMAN, A.C.; HADZI-PAVLOVIC, D.; HAWKINS, M.T.; TOHEN, M.; MITCHELL, P.B. The Bipolar Depression Rating Scale (BDRS): its development, validation and utility. **Bipolar Disord**, v.9, n.6, p. 571-579, 2007.

BORA, E.; FORNITO, A.; YUCEL, M.; PANTELIS, C. Voxelwise meta-analysis of gray matter abnormalities in bipolar disorder. **Biol. Psychiatry**, v.67, n.11, p. 1097-1105, 2010.

BOSCH, F.; GÓMEZ-FOIX, A.M.; ARIÑO, J.; GUINOVART, J.J. Effects of lithium ions on glycogen synthase and phosphorylase in rat hepatocytes. **J. Biol. Chem**, v.261, n.36, p. 16927-16931, 1986.

BRUNELLO, N.; TASCEDDA, F. Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v.6, n.2, p. 181–189, 2003.

BUSBY, K.K.; SAJATOVIC, M. Review: Patient, treatment, and systems-level factors in bipolar disorder nonadherence: A summary of the literature. **CNS Neurosci. Ther**, v.16, n.5, p. 308–15, 2010.

CASARETT, L.J.; KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2008. p. 1309.

CHADHA, V.D.; BHALLA, P.; DHAWAN, D. Uptake and retention of ^{65}Zn in lithium-treated rat liver: role of zinc. **Dig. Liver Dis**, v.42, n.6, p. 446-450, 2010.

CHADHA, V.D.; BHALLA, P.; DHAWAN, D.K. Zinc modulates lithium-induced hepatotoxicity in rats. **Liver Int**, v.28, n.4, p. 558-565, 2008.

CHALECKA-FRANASZEK, E.; CHUANG, D.M. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.96, n.15, p. 8745-8750, 1999.

CHEN, K.P.; SHEN, W.W.; LU, M.L. Implication of serum concentration monitoring in patients with lithium intoxication. **Psychiatry Clin. Neurosci**, v.58, n.1, p. 25-29, 2004.

CHUANG, D.M.; WANG, Z.; CHIU, C.T. GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke. **Front. Mol. Neurosci**, v.4, n.15, p. 1-12, 2011.

CUI, J.; SHAO, L.; YOUNG, L.T.; WANG, J.F. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. **Neuroscience**, v.144, n.4, p. 1447-1453, 2007.

DE SOUZA, C.; VEDANA, K.G.G.; MERCEDES, B.P.C.; MIASSO, A.I. Transtorno bipolar e medicamentos: adesão, conhecimento dos pacientes e monitorização sérica do carbonato de lítio. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.21, n.2, p. 624-631, 2013.

DHOUIB, I. E.; JALLOULI, M.; ANNABI, A.; GHARBI, N.; ELFAZAA, S.; LASRAM, M. M. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sci**, v.151, n.15, p.359-363, 2016. → 10.1016

DIXON, J.F.; HOKIN, L.E. Lithium acutely inhibits and chronically up-regulates and stabilizes glutamate uptake by presynaptic nerve endings in mouse cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.95, n.14, p. 8363–8368, 1998.

DIXON, J.F.; HOKIN, L.E. The antibipolar drug valproate mimics lithium in stimulating glutamate release and inositol 1, 4, 5-trisphosphate accumulation in brain cortex slices

but not accumulation of inositol monophosphates and bisphosphates. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.94, n.9, p. 4757-4760, 1997.

DODD, S.; MAES, M.; ANDERSON, G.; DEAN, O.M.; MOYLAN, S.; BERK, M. Putative neuroprotective agents in neuropsychiatric disorders. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.5, n.42, p. 135-145, 2013.

EFRATI, S.; AVERBUKH, M.; BERMAN, S.; FELDMAN, L.; DISHY, V.; KACHKO, L.; WEISSGARTEN, J.; GOLIK, A.; AVERBUKH, Z. N-Acetylcysteine ameliorates lithium-induced renal failure in rats. **Nephrol. Dial. Transplant**, v.20, n.1, p. 65-70, 2005.

ESKANDARI, M.R.; FARD, J.K.; HOSSEINI, M.J.; POURAHMAD, J. Glutathione mediated reductive activation and mitochondrial dysfunction play key roles in lithium induced oxidative stress and cytotoxicity in liver. **Biometals**, v.25, n.5, p. 863-873, 2012.

ESTADOS UNIDOS. American Psychiatric Association. **Practice guideline for the Treatment of Patients With Bipolar Disorder**, Arlington, TX, p. 1-82, 2010.

EVANS, W.E.; SCHENTAG, J.J.; JUSKO, W.J. **Applied Pharmacokinetics: Principles of therapeutic drug monitoring**. 3. ed. Vancouver, WA: Applied Therapeutics. 1992. p. 1-25.

FINLEY, P.R.; WARNER, M.D.; PEABODY, C.A. Clinical relevance of drug interactions with lithium. **Clin. Pharmacokinet**, v.29, n.3, p. 172–191, 1995.

FYRO, B.; PETTERSSON, U.; SEDVALL, G. Serum lithium levels and side effects during administration of lithium carbonate and two slow release lithium preparations to human volunteers. **Pharmacol. Clin**, v.2, n.4, p. 236-240, 1970.

GAO, X.M.; FUKAMAUCHI, F.; CHUANG, D.M. Long-term biphasic effects of lithium treatment on phospholipase C-coupled m 3-muscarinic acetylcholine receptors in cultured cerebellar granule cells. **Neurochem. Int**, v.22, n.4, p. 395-403, 1993.

GAWRYLUK, J.W.; WANG, J.F.; ANDREAZZA, A.C.; SHAO, L.; YOUNG, L.T. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v.14, n.01, p. 123-130, 2011.

GITLIN, M. Lithium and the kidney: na updated review. **Drug Saf**, v.20, n.3, p. 231-243, 1999.

GRANDJEAN, E.M.; AUBRY, J.M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: Part III: clinical safety. **CNS Drugs**, v.23, n.5, p. 397–418, 2009a.

GRANDJEAN, E.M.; AUBRY, J.M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach: Part II: clinical pharmacology and therapeutic monitoring. **CNS Drugs**, v.23, n.4, p. 331-349, 2009b.

GRUNFELD, J.P.; ROSSIER, B.C. Lithium nephrotoxicity revisited. **Nat. Rev. Nephrol**, v.5, n.5, p. 270-276, 2009.

HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.L. **Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 1808.

HATOFF, D.E.; HARDISON, W.G. Bile acids modify alkaline phosphatase induction and bile secretion pressure after bile duct obstruction in the rat. **Gastroenterology**, v.80, n.4, p. 666–672, 1981.

HONIG, A.; ARTS, B.M.; PONDS, R.W.; RIEDEL, W.J. Lithium induced cognitive side-effects in bipolar disorder: a qualitative analysis and implications for daily practice. **Int. Clin. Psychopharmacol**, v.14, n.3, p. 167-171, 1999.

IKONOMOV, O.C.; MANJI, H.K. Molecular mechanisms underlying mood stabilization in manic-depressive illness: the phenotype challenge. **Am. J. Psychiatry**, v.156, n.10, p. 1506-1514, 1999.

JOHNSTON, A.M.; EAGLES, J.M. Lithium-associated clinical hypothyroidism. Prevalence and risk factors. **Br. J. Psychiatry**, v.175, n.4, p. 336-339, 1999.

JOPE, R.S. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. **Mol. Psychiatry**, v.4, n.2, p. 117-128, 1999.

KALANTARI, H.; SALIMI, A.; REZAIE, A.; JAZAYERI, S.; GOUDARZI, M. Evaluation of Sub-acute Oral Toxicity of Lithium Carbonate Microemulsion (Nano Size) on Liver and Kidney of Mice. **Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod**, v.10, n.1, p. e22312, 2015.

KECK, P.E.J.R.; MCELROY, S.L. Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of antimanic and mood-stabilizing medications. **J. Clin. Psychiatry**, v.63, n.4, p. 3-11, 2002.

KSZOS, L.A.; STEWART, A.J. Review of lithium in the aquatic environment: Distribution in the United States, toxicity and case example of groundwater contamination. **Ecotoxicology**, v.12, n.5, p. 439–447, 2003.

KUSALIC, M.; ENGELSMANN, F. Effect of lithium maintenance therapy on thyroid and parathyroid function. **J. Psychiatry Neurosci**, v.24, n.3, p. 227-233, 1999.

LAROUDIE, C.; SALAZAR, D.E.; COSSON, J.P.; CHEUVART, B.; ISTIN, B.; GIRAULT, J.; INGRAND, I.; DECOURT, J.P. Pharmacokinetic evaluation of co-administration of nefazodone and lithium in healthy subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol**, v.54, n.12, p. 923-928, 1999.

LAZARUS, J.H. The effects of lithium therapy on thyroid and thyrotropin-releasing hormone. **Thyroid**, v.8, n.10, p. 909-913, 1998.

LENOX, R.H.; HAHN, C.G. Overview of the mechanism of action of lithium in the brain: fifty-year update. **J. Clin. Psychiatry**, v.61, n.9, p. 5-15, 2000.

LEWITZKA, U.; SEVERUS, E.; BAUER, R.; RITTER, P.; MULLER-OERLINGHAUSEN B.; BAUER, M. The suicide prevention effect of lithium: more than 20 years of evidence—a narrative review. **Int. J. Bipolar Disord**, v.3, n.1, p. 1-16, 2015.

LOGHIN, F.; OLINIC, A.; POPA, D.S.; SOCACIU, C.; LEUCUTA, E. Effects of long-term administration of lithium and hydrochlorothiazide in rats. **Met. Based Drugs**, v.6, n.2, p. 87-93, 1999.

LOMBARDI, G.; PANZA, N.; BIONDI, B.; DI LORENZO, L.; LUPOLI, G.; MUSCETTOLA, G.; CARELLA, C.; BELLASTELLA, A. Effects of lithium treatment on hypothalamic-pituitary-thyroid axis: a longitudinal study. **J. Endocrinol. Invest**, v.16, n.4, p. 259-263, 1993.

LYDIARD, R.B.; GELENBERG, A.J. Hazards and adverse effects of lithium. **Annu. Rev. Med**, v.33, n.1, p. 327-344, 1982.

MACHADO-VIEIRA, R.; ANDREAZZA, A.C.; VIALE, C.I.; ZANATTO, V.; CERESER, V.J.R.; DA SILVA, V.R.; KAPCZINSKI, F.; PORTELA, L.V.; SOUZA, D.O.; SALVADOR, M.; GENTIL, V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. **Neurosci. Lett**, v.421, n.1, p. 33-36, 2007.

MAGALHÃES, P.V.; DEAN, O.M.; BUSH, A.I.; COPOLOV, D.L.; MALHI, G.S.; KOHLMANN, K.; JEAUVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BERK, M. A preliminary investigation on the efficacy of N-acetyl cysteine for mania or hypomania. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v.47, n.6, p. 564-568, 2013.

MALHI, G.S.; ADAMS, D.; CAHILL, C.M.; DODD, S.; BERK, M. The management of individuals with bipolar disorder: a review of the evidence and its integration into clinical practice. **Drugs**, v.69, n.15, p. 2063–2101, 2009.

MALHI, G.S.; TANIOUS, M. Optimal Frequency of Lithium Administration in the Treatment of Bipolar Disorder. **CNS Drugs**, v.25, n.4, p. 289-298, 2011.

MALHI, G.S.; TANIOUS, M.; DAS, P.; BERK, M. The science and practice of lithium therapy. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v.46, n.3, p. 192-211, 2012.

MARKOWITZ, G.S.; RADHAKRISHNAN, J.; KAMBHAM, N.; VALERI, A.M.; HINES, W.H.; D'AGATI, V.D. Lithium nephrotoxicity a progressive combined glomerular and tubulointerstitial nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol**, v.11, n.8, p. 1439-1448, 2000.

NCIRI, R.; ALLAQUI, M.S.; BOUROGAA, E.; SAOUDI, M.; MURAT, J.C.; CROUTE, F.; ELFEKI, A. Lipid peroxidation, antioxidant activities and stress protein (HSP72/73, GRP94) expression in kidney and liver of rats under lithium treatment. **J. Physiol. Biochem**, v.68, n.1, p. 11-18, 2012.

NCIRI, R.; ALLAQUI, M.S.; VINCENT, C.; MURAT, J.C.; CROUTE, F.; ELFEKI, A. Chronic lithium administration triggers an over-expression of GRP94 stress protein isoforms in mouse liver. **Food Chem. Toxicol**, v.48, n.6, p. 1638-1643, 2010.

NYFELER, F.; FASEL, P.; WALTER, P. Short-term stimulation of net glycogen production by insulin in rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.675, n.1, p. 17-23, 1981.

OLIVEIRA, J.L.; SILVA JÚNIOR, G.B.; ABREU, K.L.; ROCHA, N.DE.A.; FRANCO, L.F.; ARAÚJO, S.M.; DAHER, E.DE.F. Lithium nephrotoxicity. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.56, n.5, p. 600-606, 2010.

PACHET, A.K.; WISNIEWSKI, A.M. The effects of lithium on cognition: an updated review. **Psychopharmacology (Berl)**, v.170, n.3, p. 225-34, 2003.

PANDYA, C.D.; HOWELL, K.R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.46, n.1, p. 214-223, 2013.

PLENGE, P.; STENSGAARD, A.; JENSEN, H.V.; THOMSEN, C.; MELLERUO, E.T.; HENRIKSEN, O. 24-hour lithium concentration in human brain studied by Li-7 magnetic resonance spectroscopy. **Biol. Psychiatry**, v.36, n.8, p. 511-516, 1994.

QUIROZ, J.A.; GOULD, T.D.; MANJI, H.K. Molecular effects of lithium. **Mol. Interv**, v.4, n.5, p. 259–272, 2004.

RISBY, E.D.; HSIAO, J.K.; MANJI, H.K.; BITRAN, J.; MOSES, F.; ZHOU, D.F.; POTTER, W.Z. The mechanisms of action of lithium: II. Effects on adenylate cyclase activity and β -adrenergic receptor binding in normal subjects. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.48, n.6, p. 513-524, 1991.

RODRIGUEZ-GIL, J.E.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; BARBERÁ, A.; GUINOVART, J.J. Lithium's effects on rat liver glucose metabolism in vivo. **Arch. Biochem. Biophys**, v.375, n.2, p. 377-384, 2000.

ROSA, A.R.; KAPCZINSKI, F.; OLIVA, R.; STEIN, A.; BARROS, H.M.T. Monitoramento da adesão ao tratamento com lítio. **Rev. Psiquiatr. Clín**, v.33, n.5, p. 249-61, 2006.

ROSA, A.R.; MARCO, M.; FACHEL, J.M.G.; KAPCZINSKI, F.; STEIN, A.; BARROS, H.M.T. Correlation between drug treatment adherence and lithium treatment attitudes and knowledge by bipolar patients. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v.31, n.1, p. 217-224, 2007.

SARRIS, J.; MISCHOULON, D.; SCHWEITZER, I. Adjunctive nutraceuticals with standard pharmacotherapies in bipolar disorder: a systematic review of clinical trials. **Bipolar Disord**, v.13, n.5-6, p. 454-465, 2011.

SASSI, R.B.; BRAMBILLA, P.; HATCH, J.P.; NICOLETTI, M.A.; MALLINGER, A.G.; FRANK, E.; KUPFER, D.J.; KESHAVAN, M.S.; SOARES, J.C. Reduced left anterior cingulate volumes in untreated bipolar patients. **Biol. Psychiatry**, v.56, n.7, p. 467-475, 2004.

SASSI, R.B.; NICOLETTI, M.; BRAMBILLA, P.; MALLINGER, A.G.; FRANK, E.; KUPFER, D.J.; KESHAVAN, M.S.; SOARES, J.C. Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients. **Neurosci. Lett**, v.329, n.2, p. 243-245, 2002.

SCHOU, M.; JUEL-NIELSEN, N.; STROMGREN, E.; VOLDDBY, H. The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v.17, n.4, p. 250-260, 1954.

SEVERUS, W.E.; KLEINDIENST, N.; SEEMULLER, F.; FRANGOU, S.; MOLLER, H.J.; GREIL, W. What is the optimal serum lithium level in the long-term treatment of bipolar disorder - a review. **Bipolar Disord**, v.10, n.2, p. 231–237, 2008.

SHAH, N.A.; BHAT, M.G.; SHADAD, S.; LONE, M.M. Lithium carbonate induced histopathological changes in the heart of albino rats. **World Int J Pharm Pharm Sci**, v.4, n.8, p. 1684-1692, 2015.

SHARMA, S.D.; IQBAL, M. Lithium induced toxicity in rats: a hematological, biochemical and histopathological study. **Biol. Pharm. Bull**, v.28, n.5, p. 834-837, 2005.

SHULMAN, K.I. Lithium for older adults with bipolar disorder: Should it still be considered a first-line agent? **Drugs Aging**, v.27, n.8, p. 607-615, 2010.

SPROULE, B. Lithium in bipolar disorder: Can drug concentrations predict therapeutic effect? **Clín Pharmacokinet**, v.41, n.9, p. 639-660, 2002.

SPROULE, B.A.; HARDY, B.G.; SHULMAN, K.I. Differential pharmacokinetics of lithium in elderly patients. **Drugs Aging**, v.16, n.3, p. 165-177, 2000.

STIP, E.; DUFRESNE, J.; LUSSIER, I.; YATHAM, L. A double-blind, placebo-controlled study of the effects of lithium on cognition in healthy subjects: mild and selective effects on learning. **J. Affect. Disord**, v.60, n.3, p. 147-57, 2000.

TIMMER, R.T.; SANDS, J.M. Lithium intoxication. **J. Am. Soc. Nephrol**, v.10, n.3, p. 666-674, 1999.

VAN ERP, T.G.; THOMPSON, P.M.; KIESEPPÄ, T.; BEARDEN, C.E.; MARINO, A.C.; HOFTMAN, G.D.; HAUKKA, J.; PARTONEN, T.; HUTTUNEN, M.; KAPRIO, J.; LONNGVIST, J.; POUTANEN, V.P.; TOGA, A.W.; CANNON, T.D. Hippocampal morphology in lithium and non-lithium-treated bipolar I disorder patients, non-bipolar co-twins, and control twins. **Hum. Brain. Mapp**, v.33, n.3, p. 501–510, 2012.

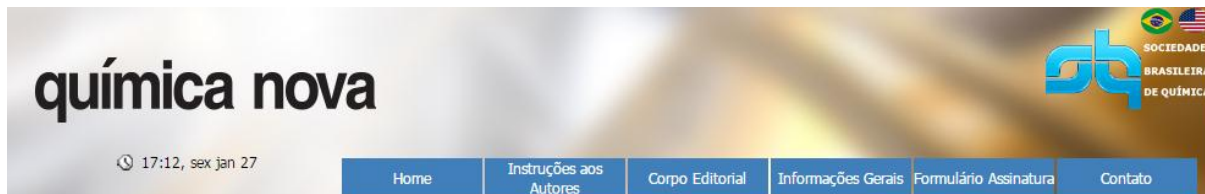
VIJAIMOHAN, K.; MALLIKA, J.; SHYAMALA, D.C. Chemoprotective effect of sobatum against lithium-induced oxidative damage in rats. **J. Young Pharm**, v.2, n.1, p. 68-73, 2010.

VISMARI, L.; PIRES, M.L.N.; BENEDITO-SILVA, A.A.; CALIL, H.M. Bioavailability of immediate and controlled release formulations of lithium carbonate. **Rev. Bras. Psiquiatr**, v.24, n.2, p. 74-79, 2002.

ZUNG, S.; MICHELON, L.; CORDEIRO, Q. O uso do lítio no transtorno afetivo bipolar. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo**, v.55, n.1, p. 30-37, 2010

7. ANEXOS

7.1. Normas da revista Química Nova



1. GERAL

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique [aqui](#) para acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados e Discussão*, *Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução*, *Parte Experimental*, *Resultados e Discussão*, *Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

2. ANTES DA SUBMISSÃO

2.1 Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

2.2 Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser incluídas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5x. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito.

Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- ☐ Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- ☐ Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- ☐ Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry*, *Abstracts Service*, *Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as

recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões]. Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.
2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar *DOI* da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)
6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)
7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbg.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbg.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

7.2. Normas da revista Archives of Toxicology



Title page

The biological system studied must be indicated in the title [in vivo/in vitro, humans/animal species, cell line(s), etc.]

Abstract

It is essential that the abstract contain a brief justification for the study. The biological system studied must be clearly indicated, and applied doses/concentrations of the test compound(s) must be specified. Failure to comply with these essentials in toxicology will result in the immediate rejection of the manuscript.

Text

In order to comply with Archives of Toxicology's high quality standards, the following criteria are essential for original articles:

In the introduction the justification for the study must be clearly explained, and its relevance for toxicology must be clear. It is not sufficient to state that the study was conducted simply because it had never been done before.

In the methodological section (Materials and Methods) the scientific procedure must be described in a way that, in principle, would allow others to reproduce the study. The doses/concentrations of test compound(s) must be clearly specified, and a straightforward justification of the dose selection must be provided. If authors perform their experiments according to standard operation procedures (SOPs) or protocols that are more detailed than the conventional Material and Methods section, they are encouraged to publish the SOPs or protocols as electronic supplements.

The Introduction and Discussion sections must make the essential points, must be concise and avoid repetitions.

Authors should use the option of including Electronic Supplementary Material. Doing so allows them to limit the length of the manuscript and make it more appealing to potential readers without sacrificing scientific information. Authors are encouraged to make the raw data available in an electronic supplement.

If genome-wide data is presented, the raw data must be publicly available.

The study design must be clear, including the number and type of replicas. Please clearly specify whether or not the results were reproduced in independent experiments. At least three independent experiments are required.

AUTHORSHIP POLICY

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

TYPES OF PAPERS

Short reports

Short reports on new results of special interest will be published out of turn as Short communications and will be given top priority in the editorial and production process.

Short communications should normally not exceed 2 printed pages (= 1,000 words), including tables, etc. The editors reserve the right to decide what constitutes a Short communication.

Editorials - please note: no Abstract required

Review Articles

Original Articles

Meeting Reports

Commentaries

Opinion Letters / Editorials

The Archives of Toxicology would like to officially invite our readers to submit letters and guest editorials to our journal. Authors are free to present their opinions on articles recently published in our journal or those published in other journals that would be of general interest to our readers. Moreover, comments on general topics relevant to toxicology are welcome, such as legislation or funding policy. Letters and guest editorials represent personal opinion and will therefore not be peer-reviewed. Nevertheless, the editorial board ask that the submissions adhere to the following standards:

- They should be sound, scientifically-founded and of general interest
- Critical contributions are welcome; however, ad hominem reasoning must be avoided.
- They should be no more than 1 printed page long, without an abstract, figures or tables. We accept a maximum of three references, and ask for short affiliations only (institute and country, no address).

If a letter or guest editorial addresses an article published in our journal, the corresponding author of that article will be invited to contribute a response letter. If the response is received within four weeks after the invitation is made, both the original opinion piece and the response letter will be published back to back in the same issue. If however, the response is received later than the allotted four weeks, it will be published as soon as it is technically feasible in a subsequent issue. Eventually, a second round of discussion (letter and response letter) may be arranged if all relevant arguments were not brought forward in the first round.

Special Issues

- Contributions that are part of a Special Issue must include the following footnote on the title page:

"This article is published as part of the Special Issue on [title of the Special Issue]"

Manuscript length

The maximum number of pages per original research article (including figures, tables and references) should be restricted to 10 printed pages (accounts for 750 words per printed page, figures and tables have to be counted as half a page). For reviews the maximum number should be 20 printed pages.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

Additional information

Authors should note that Archives of Toxicology complies with the recommendations of the Committee on Publishing Ethics (COPE):

COPE-website

Details of the publisher's procedures concerning duplication, fraud or other unethical procedures (of which Archives of Toxicology is compliant) can be found at:

Springer-website

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it,

it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that

were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

**7.3. Protocolo aprovado pelo comitê de Ética no Uso de Animais da
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE)**



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Estudo do efeito da N-acetilcisteína sobre a toxicidade induzida pelo lítio", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 28/09/2016

Prof. Dra. Luciana de Oliveira Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE