

Estudo da associação Li_2CO_3 e adoçante não-calórico, $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3\text{S}$, em células de medula óssea de camundongos

Juida de Deus Palma-Contar^{1*}, Luciana Oliveira dos Santos², Simone Busko Valim¹ e Terezinha Aparecida Guedes³

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. e-mail: juida@teracom.com.br. ²Departamento de Psicologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. ³Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. A apresentação destes resultados é uma consequência da linha de pesquisa desenvolvida com o carbonato de lítio - Li_2CO_3 (Li) - e adoçantes não-calóricos, em animais de laboratório em fase de estudos, acrescentando-se sacarina (Sc) e utilizando-se camundongos Swiss fêmeas. O objetivo foi avaliar diferenças estatisticamente significantes como indicadores de mutagenicidade, quando grupos de camundongos receberam os tratamentos. Em nove tabelas, analisou-se o percentual de micronúcleos (MN) calculados em eritrócitos policromáticos (EP) e normocromáticos (EN), isoladamente, e na soma total. Os animais foram tratados por dez dias, v.o. com Li, na dose de 100mg/kg, ou Li associado à sacarina (Sc), nesta mesma diluição. Os resultados obtidos foram comparados com os grupos tratados com ciclofosfamida - Ci. (+) e água - controle (-). A análise de variância seguida do teste de Tukey mostrou diferenças estatisticamente significativas para as médias do percentual de MN em EP, EN e na soma dos totais com valores de F iguais a 16,57**, 9,67** e 15,63**, respectivamente. A comparação dois a dois foi analisada pelos testes "t" de Student ($p < 0,05$). Diferença significativa só se apresentou para o grupo Ci (+). Considerando-se a metodologia usada em camundongos fêmeas e pela análise estatística estudada, não foi encontrada indicação de mutagenicidade com a contagem de MN em células de medula óssea para esta espécie de animal.

Palavras-chave: camundongos, lítio, sacarina, células de medula óssea, micronúcleo.

ABSTRACT. A study of Li_2CO_3 and $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3\text{S}$ noncaloric sweetener association in mice bone marrow cells. This article presents the results of a research, project designed to evaluate the association of lithium carbonate and noncaloric sweetener in laboratory Swiss albino female mice, in a study phase using saccharin (Sc). The aim of this study was to evaluate significant differences as indicators of mutagenesis in treated mice groups. In nine tables, the micronucleus (MN) rate calculated in polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) was assessed. The animals were lithium orally treated for 10 days at the concentration of 100mg/kg or lithium treated in association with saccharin at the same concentration. The results were compared to groups treated with cyclophosphamide (Ci) (+) and water (-) - controls. Variance statistical analysis followed by Tukey's test showed significant differences ($p < 0.05$) as for the mean MN rates in PCE and NCE and as for sum total with $F = 16.57$, 9.67 and $F = 15.63$ respectively. The by two comparison was analyzed by Student's "t" test and significant differences were observed for Ci (+) group only. Considering the methodology used in female mice and the statistical analysis employed no mutagenesis indication was found MN frequency in bone marrow cells for this species.

Key words: mice, lithium, saccharin, bone marrow cells, micronucleus.

O lítio, muito usado no tratamento de doenças mentais desde a antiguidade, teve seus efeitos profiláticos descobertos na década de 40 por Cade -

efeitos estes que, relacionados aos distúrbios afetivos e à mania, vem sendo registrados amplamente na bibliografia (Bevan, 1979).

Seus sais, produtos naturais e de fácil exploração, foram utilizados até mesmo como substitutos do cloreto de sódio (NaCl) - em especial, o cloreto de lítio, destinado a pacientes cardíacos. Experiência esta não aprovada, visto que os íons de lítio não são excretados tão rapidamente quanto os de sódio. E causaram intoxicações, registrando-se mortes (Gilman, Goodman e Gilman, 1991).

Logo, pela toxicidade apresentada, o lítio sofreu restrições no campo médico, retardando a sua aceitação na psiquiatria. A aprovação nesta área médica data somente a partir da década de 70, após a realização de estudos comprobatórios e respectivas publicações (Schou, 1997).

O lítio, sob forma de carbonato (Li), atualmente, é usado para o tratamento da mania e controle das oscilações de humor apresentadas na psicose maníaco-depressiva (PMD).

Seus efeitos, resumidamente, são registrados na atividade motora e na psíquica, sem causar sedação; impede o aparecimento da fase maníaca e atenua o surto de depressão.

No início do tratamento, o paciente pode apresentar sinais de sonolência, cansaço, fraqueza e tremor, muitas vezes acompanhados por náusea, vômito, diurese, diarreia e sede intensa. Tais efeitos visíveis após 10 dias do início do tratamento, e quando continuado, a maioria deles desaparece.

O Li é absorvido pelo trato gastrointestinal, chegando aos níveis plasmáticos entre 1 a 3 horas. É excretado pelos rins, com meia-vida de aproximadamente 24 horas. Os melhores resultados, devem encontrar-se, com nível plasmático entre 0,9 e 1,4 mEq/l - intervalo, que necessita de controle contínuo de seus níveis (Zanini e Oga, 1982).

Estudos correlacionados do íon lítio com o íon sódio (Na), registram que este último pode ser substituído, no líquido extracelular, pelo lítio. Logo, sua ação sobre o sistema nervoso central (SNC) se dá sob formas de alterações bioquímicas. Conseqüentemente, afeta as proporções de sódio (Na)/potássio (K) no ambiente celular, causando modificações nas atividades de membrana, dependentes da bomba Na/K. A distribuição de Na e de K sendo alterada, pode levar à perda de outros íons, originando intoxicação por acúmulo de lítio (Gilman, Goodman e Gilman, 1991).

Quanto à farmacocinética e à toxicidade, segundo estudos de Linden e Rich, (1983), conhece-se que um efeito colateral na terapia do Li é o ganho de peso do paciente. Há registro que este efeito, em tratamento após 1 ano, conforme a resposta metabólica, pode alcançar aumento de 5kg. E, até mesmo, atingir o acréscimo correspondente a 1/3 do

peso normal do doente (Mellreup, 1975; Dempsey, 1976; Schou, 1989).

Em face destes registros, propusemo-nos a trabalhar com Li, associando-o, pelo mínimo, a um adoçante não-calórico. A escolha do adoçante recaiu sobre a sacarina (Sc) - $C_7H_5NO_3S$, substância sintética, usada amplamente na dieta alimentar (Martindale, 1982). Em alguns países, seu uso é permitido com recomendação, sob advertência (Carrasco *et al.*, 1992). Acrescente-se a estes registros trabalhos anteriores, em nosso laboratório de pesquisa, quando grupo de animais tratados com Sc apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle (Vardanega *et al.*, 1994).

Como controle positivo - Ci (+) foi usada uma substância antineoplásica que aumenta a frequência de MN na medula óssea do modelo animal, camundongos. (Adler e Kliesdh, 1990; Vanprays, 1992; Liu e Chen, 1998).

Devemos também considerar condições de protocolo, espécie e linhagem dos animais utilizados (Palma-Contar, 1992). Registros na linha de pesquisa desenvolvida não foram suficientes para nossos estudos. Outro objetivo foi somado, isto é, incluir pesquisa em nível celular. Usamos, então, técnicas já bem estabelecidas para determinar se as células da medula óssea de camundongos apresentavam anormalidades em seu núcleo, após tratamentos previamente estabelecidos com as substâncias-alvo.

Seguiu-se análise estatística dos dados obtidos pela contagem dos micronúcleos (MN), em eritrócitos policromáticos (EP) e eritrócitos normocromáticos (EN), a fim de serem identificadas diferenças significantes, indicadoras de mutagenicidade (Nick e Kellner, 1971).

Materiais e métodos

Animais. Camundongos: Swiss, fêmeas adultas, em grupos de 5 animais cada, com idade de 60-70 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, que, após sofrerem uma aclimatação por 7 dias no Biotério Experimental do Departamento de Biologia Celular e Genética, foram submetidos a um tratamento diário por 10 dias.

Drogas. Carbonato de lítio - : Li_2CO_3 (Li) - marca Vetec.; sacarina (Sc) - marca Lowçucar, que foram administrados por v.o. na concentração de 100mg/kg, isoladamente ou associados. Ciclofosfamida (Ci +) - Genuxal[®], 50mg/kg e água destilada (C -), foram as drogas consideradas controles para os grupos de animais tratados pela mesma via.

Métodos

Teste do Micronúcleo. Os animais previamente tratados por 10 dias, e marcados individualmente, foram sacrificados 24 horas após a última administração por deslocamento cervical. Retirado o fêmur, limpo e cortadas as epífises. Com soro fetal bovino lavou-se a medula femural. Centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante. Homogeneizando o conteúdo do tubo e suspendendo-se o botão de células, as lâminas foram confeccionadas.

Preparação de lâminas. Transferiu-se uma gota da suspensão celular para uma lâmina limpa, seca e desengordurada. Fez-se um esfregão, seguindo-se a bateria para montagem das lâminas. Esta compreendeu as etapas de secagem, coloração com Giemsa, lavagem com água destilada, Xilol e Entelan, da marca Merck. A observação das mesmas para leitura foi desenvolvida com objetiva de imersão, em teste cego (Heddle, 1991; Vivagni e Norpa, 1995).

Testes Estatísticos. Após a contagem de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EP) e em eritrócitos normocromáticos (EN) num total, de no mínimo, 3.000 células contidas nas lâminas permanentes, anteriormente montadas. Os dados registrados resultaram em nove tabelas. Estas contêm a análise de variância, seguida dos testes “T” de Tukey e “t” de Student, na comparação dos tratamentos, dois a dois, do percentual de MN em EP, EN e na soma total de ambos (Mood e Graybill, 1974; Bussab e Mounttin, 1990; Soares, Farias e Cesar, 1991; Rabello-Gay, 1991).

Resultados e discussão

O carbonato de lítio (Li) tem efeito satisfatório não só em tratamento da síndrome de PMD (psicose maníaco-depressiva), como também apresenta resultados similares na mania (Hudson, 1989). Em face dos nossos objetivos, foi estudada a magnitude de seus efeitos. Correlacionamos resultados em nível de células eritrocitárias, uma vez que pode afetar as proporções do íon sódio (Na)/potássio (K) (Gilman, Goodman e Gilman, 1991).

E pelo efeito colateral na Litoterapia, isto é, o ganho de peso dos pacientes usuários da referida droga, que, durante um ano, pode aumentar até 5kg na curva ponderal, (Mellreup, 1975; Dempsey, 1976; Schou, 1989) a associação de um adoçante não-calórico foi acrescentado nos tratamentos dos animais em analogia ao que ocorre frequentemente em humanos. Consideramos o estudo simultâneo

com a sacarina como auxiliar, quanto ao raciocínio de que terapias concomitantes, raramente pesquisadas, devem merecer atenção especial em estudos específicos.

Na Tabela 1, está registrado o número de MN verificados quando da leitura de eritrócitos policromáticos, em total de, no mínimo, 3.000 células, por tratamento. Verifica-se que, no grupo Li ou naquele administrado concomitantemente com sacarina (Sc), mesmo em mais de 8.000 células, os percentuais de MN apresentaram-se semelhantes ao da água - controle (-).

Tabela 1. Percentual de Micronúcleo (MN) calculado em eritrócitos policromáticos (EP) com diferentes tratamentos, por via oral, durante 10 dias, em camundongos fêmeas

Tratamentos	EP	MN	%	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Controle (-)	1355		1,1070	1,1561	0,1886
	1026	14	1,3645		
	1003	10	0,9970		
Ci (+)	1087	77	7,0837	5,1536	2,0872
	1183	35	2,9585		
	1056	40	3,7878		
	1017	69	6,7846		
Lítio	1000	10	1,0000	0,9443	0,2564
	1053	07	0,6647		
	1027	12	1,1684		
Li e Sc	1038	07	0,6743	1,1155	0,4201
	1051	15	1,4272		
	1012	19	1,8774		
	1008	08	0,7936		
	1006	07	0,6958		
	1008	10	0,9920		
	1018	14	1,3752		
	1010	11	1,0891		
Σ	18.958,00				
n	18				
$\bar{X}$	1.053,2222				
σ	89,9486				

Legenda: Controle (-) = Água; Ci (+) = Ciclofosfamida; Li = Lítio; Sc = Sacarina

Entretanto, o aumento da frequência dos MN só foi encontrada quando o grupo de animais havia sido tratado com ciclofosfamida - Ci (+).

A Tabela 2 resume a análise de variância com o valor de F = 16,57 e um P = 0,0001. Segue a Tabela 3, que registra valores do teste T de Tukey e compara os valores dois a dois, pelo teste “t” de Student, das médias do percentual de MN em EP.

Tabela 2. Análise de variância do percentual de micronúcleos (MN) calculado em eritrócitos policromáticos (EP) com diferentes tratamentos, por via oral, durante 10 dias, em camundongos fêmeas.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	3	51,5175	17,1725	16,57**	0,0001
Erro	14	14,507	1,0362		
Total	17	66,025			

Coefficiente de Correlação = 0,7802; F_{3, 14; 5 %} = 3,34; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma de Quadrados; QM = Quadrado Médio

A resposta do percentual de MN nos eritrócitos normocromáticos está contida na Tabela 4. Os mesmos tratamentos por v.o., tanto

com o Li como com o Li + Sc, foram semelhantes àqueles registrados na resposta ao percentual de MN em EP.

Tabela 3. Comparação, dois a dois, das diferenças entre as médias do percentual de MN em EP por dois testes estatísticos, em tratamentos com camundongos fêmeas, durante 10 dias

Comparações de grupos de tratamento	Diferença entre médias	Limites de Confiança		
		Teste "t" de Student ($\alpha = 0,05$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,1$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)
H2O e Li	0,212	- 1,571 a 1,994	- 1,882 a 2,306	- 2,204 a 2,628
H2O e Li + Sc	0,041	- 1,438 a 1,519	- 1,696 a 1,777	- 1,963 a 2,044
H2O e Ci	- 3,997***	- 5,665 a - 2,330	- 5,956 a - 2,039	- 6,257 a - 1,738
Ci e Li	4,209***	2,542 a 5,877	2,251 a 6,168	1,949 a 6,469
Ci e Li + Sc	4,038***	2,701 a 5,375	2,468 a 5,608	2,226 a 5,850

"t" de Student: $\alpha = 0,05$; $t_{\text{tab}} = 2,14$; gl. = 14; "T" de Tukey: $\alpha = 0,1$; $q = 3,563$; $\Delta_1 = 1,9588$; $\Delta_2 = 1,9588$; $\Delta_3 = 1,5705$; $\alpha = 0,05$; $q = 4,111$; $\Delta_1 = 2,2600$; $\Delta_2 = 2,2600$; $\Delta_3 = 1,8120$

Legenda: MN = Micronúcleos; EP = Eritrócitos Policromáticos

Tabela 4. Eritrócitos normocromáticos (EN) contendo micronúcleo (MN) e sua respectiva porcentagem, quando camundongos fêmeas receberam, por via oral, diferentes tratamentos por 10 dias

Tratamentos	EN	MN	%	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Controle (-)	1015	19	1,8719	1,0235	0,7346
	1001	06	0,5994		
	1001	06	0,5994		
Ci (+)	1019	41	4,0235	3,9455	1,5643
	1031	38	3,6857		
	1360	29	2,1323		
	1010	60	5,9405		
Lítio	1011	22	2,1760	1,6854	0,5550
	1108	12	1,0830		
	1224	22	1,7973		
Li e Sc	1030	10	0,9708	1,1877	0,5557
	1051	22	2,0932		
	1015	09	0,8866		
	1006	11	1,0934		
	1006	05	0,4970		
	1013	15	1,4807		
	1000	18	1,8000		
	1029	07	0,6802		
Σ	18.930,00				
n	18				
$\bar{X}$	1.051,6666				
σ	93,9236				

Legenda: Controle (-) = Água; Ci = Ciclofosfamida; Li = Lítio; Sc = Sacarina

Então, a Tabela 5 da mesma forma registra a análise de variância para análise de MN em EN, apresentando o valor de $F = 9,67$. Idêntica significância foi encontrada na Tabela 6, quando a administração com o controle positivo esteve presente para as comparações dois a dois.

Tabela 5. Análise de variância do percentual de MN calculado em EN nos tratamentos contidos na Tabela 4

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	3	23,2027	7,7342	9,67**	0,0001
Erro	14	11,1988	0,7999		
Total	17	34,4015			

Coefficiente de correlação = 0,6744; $F_{3,14;5\%} = 3,34$; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma de Quadrados; QM = Quadrado Médio

Legenda: MN = Micronúcleos; EN = Eritrócitos Normocromáticos

Tabela 6. Comparação, dois a dois, das diferentes médias do percentual MN em EN pelos testes "t" de Student e Teste de Tukey, no tratamento de camundongos fêmeas, por 10 dias

Comparações de grupos de tratamento	Diferença entre médias	Limites de Confiança		
		Teste "t" de Student ($\alpha = 0,05$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,1$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)
H2O e Li	- 0,662	- 2,228 a 0,904	- 2,502 a 1,178	- 2,784 a 1,461
H2O e Li + Sc	- 0,164	- 1,463 a 1,134	- 1,690 a 1,361	- 1,924 a 1,596
H2O e Ci	- 2,922***	- 4,387 a - 1,457	- 4,643 a - 1,201	- 4,907 a - 0,936
Ci e Li	2,260***	0,795 a 3,725	0,539 a 3,981	0,275 a 4,246
Ci e Li + Sc	2,758***	1,583 a 3,932	1,378 a 4,138	1,166 a 4,350

"t" de Student: $\alpha = 0,05$; $t_{\text{tab}} = 2,14$; gl. = 14; "T" de Tukey: $\alpha = 0,1$; $q = 3,563$; $\Delta_1 = 1,7210$; $\Delta_2 = 1,7210$; $\Delta_3 = 1,3798$; $\alpha = 0,05$; $q = 4,111$; $\Delta_1 = 1,9856$; $\Delta_2 = 1,9856$; $\Delta_3 = 1,5920$

Legenda: MN = Micronúcleos; EN = Eritrócitos Normocromáticos

A análise registrada, na Tabela 7, confirma os resultados anteriores, quando juntou-se a soma dos percentuais de MN em EP + EN, sofrendo os mesmos tratamentos estatísticos. A Tabela 8 nesta análise de variância mostra um $F = 15,63$. E a Tabela 9, significativamente, confirma diferenças somente quando os grupos de tratamento dos animais foram tratados por Ci (+), efetivo indutor de clastogênese em células de medula óssea.

Tabela 7. Percentual total de micronúcleos (MN) na soma dos eritrócitos policromáticos (EP) e eritrócitos normocromáticos (EN), no tratamentos de camundongos fêmeas, por 10 dias

Tratamentos	EP + EN	MN	%	Média (%)	Desvio Padrão (%)
Controle (-)	2370	34	1,4345	1,0731	0,3267
	2027	20	0,9866		
	2004	16	0,7984		
Ci (+)	2106	118	5,6030	4,5300	1,7163
	2214	73	3,2971		
	2416	69	2,8559		
	2027	129	6,3640		
Lítio	2011	32	1,5912	1,3269	0,3898
	2161	19	0,8792		
	2251	34	1,5104		
Li e Sc	2068	17	0,8220	1,1510	0,4055
	2102	37	1,7602		
	2027	28	1,3813		
	2014	19	0,9433		
	2012	12	0,5964		
	2021	25	1,2370		
	2018	32	1,5857		
	2039	18	0,8827		
Σ	37.888,00				
n	18				
$\bar{X}$	2.104,8888				
σ	127,8459				

Legenda: Controle (-) = Água; Ci = Ciclofosfamida; Li = Lítio; Sc = Sacarina

Tabela 8. Análise de variância do percentual da soma de micronúcleos (MN) calculado em eritrócitos policromáticos (EP) e eritrócitos normocromáticos (EN) com diferentes tratamentos, por via oral, durante 10 dias, em camundongos fêmeas

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Modelo	3	35,1848	11,7282	15,63**	0,0001
Erro	14	10,156	0,7504		
Total	17	45,191			

Coefficiente de correlação = 0,7700; $F_{3,14;5\%} = 3,34$; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma de Quadrados; QM = Quadrado Médio

Tabela 9. Comparação, dois a dois, das diferenças entre as médias na soma dos percentuais de MN em EP + EN, por dois testes estatísticos, no tratamento de camundongos fêmeas, por 10 dias

Comparações de grupos de tratamento	Diferença entre médias	Limites de Confiança		
		Teste "t" de Student ($\alpha = 0,05$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,1$)	Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)
H ₂ O e Li	- 0,254	- 1,771 a 1,263	- 2,036 a 1,528	- 2,310 a 1,802
H ₂ O e Li + Sc	- 0,078	- 1,336 a 1,180	- 1,555 a 1,400	- 1,783 a 1,627
H ₂ O e Ci	- 3,457***	- 4,476 a - 2,038	- 5,124 a - 1,790	- 5,380 a - 1,534
Ci e Li	3,203***	1,784 a 4,622	1,536 a 4,870	1,280 a 5,126
Ci e Li + Sc	3,379***	2,241 a 4,517	2,042 a 4,715	1,837 a 4,921

"t" de Student: $\alpha = 0,05$; $t_{\text{tab}} = 2,14$; gl. = 14; "T" de Tukey: $\alpha = 0,1$; $q = 3,563$; $\Delta_1 = 1,6669$; $\Delta_2 = 1,6669$; $\Delta_3 = 1,3365$; $\alpha = 0,05$; $q = 4,111$; $\Delta_1 = 1,9233$; $\Delta_2 = 1,9233$; $\Delta_3 = 1,5421$

Legenda: MN = Micronúcleos; EP = Eritrócitos Policromáticos; EN = Eritrócitos Normocromáticos

O regime de protocolo usado, em que foi usado isoladamente o Li e associado a Sc, consideramos ainda precisar maiores investigações. Citotoxicidade não houve, demonstrado nos resultados, isto é, não afetou as células-alvo, que, em medula óssea, cumprem um período de formação, modelo para mutagenicidade.

Logo, sugerimos observações semelhantes em sangue periférico. E, se confirmados os resultados neste mesmo modelo de células, isto é, de medula óssea de camundongos, deve-se considerar a afirmação negativa, no que diz respeito à toxicidade celular, quanto à formação de MN.

Ambas as drogas, Li e Li+Sc, em período de 10 dias, de tratamento, por v.o, usando-se camundongos fêmeas, que foram sacrificados 24 horas após a última administração e apresentaram percentual de MN em EP e EN, nas células da medula óssea, muito aquém daquele percentual mostrado pelo controle (+), substância antineoplásica que aumenta a frequência de MN na medula óssea do modelo animal, camundongos. (Adler e Kliesdh, 1990; Vanprays, 1992; Liu e Chen, 1998).

Concluimos, através do presente estudo, com o objetivo em pesquisa citológica, que os tratamentos dos grupos tratados com as drogas alvo, Li e Li+Sc, não apresentaram índice de mutagenicidade em células eritrocitárias de medula óssea, de camundongos fêmeas adultas, no protocolo estabelecido.

Agradecimentos

Ao CNPq juntamente com a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, fornecendo o apoio financeiro. E um agradecimento muito especial ao Tecpar na pessoa de José Maurício Monteiro, auxiliando na leitura e interpretação de resultados.

Referências bibliográficas

- Adler, D.; Kliesdh, U. Comparison of single and multiple treatment regimens in the mouse bone marrow micronucleus assay for Hidroquinone (HQ) and Cyclophosmamide (CP). *Mutat. Res.*, 234:115-123, 1990.
- Bevan, J. A. et al. *Fundamentos de farmacologia*. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979.
- Bussab, W.O.; Morettin, P.A. *Métodos quantitativos: estatística básica*. 4 ed. São Paulo: Atual, 1990.
- Carrasco, E.P.; Becker, P.C.; Caceres, E.G. Edulcorantes y productos dieteticos. *Bol. Hosp. S.J.de Dios*, 39(2):80-84, 1992.
- Dempsey, G. M. Treatment of excessive weight gain in patients taking lithium. *Am. J. Psychiat.*, 133:1082-1082, 1976.
- Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Gilman, A. *The pharmacological basis of therapeutics*. 8.ed. New York: MacMillan, Publ. Co., 1991.
- Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, P.H.; MacGregor, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Env. Molec. Mutag.*, 18:277-291, 1991.
- Hudson, J.I.; Lipinski, J.F.; Frankenburg, F.R.; Tohen, M.; Kupfer, D.J. Effects of Lithium on sleep in mania. *Biol. Psychiat.*, 25:665-668, 1989.
- Liu, Y.; Wu, Z.; Chen, J. Differential effects of aneugens and clastogens on incidences of multinucleated cells and of micronucleate cells in chinese hamster lung (V79) cell line in vitro. *Mutat. Res.*, 413:39-45, 1998.
- Martindale: *the extra pharmacopoeia*. 28.ed. London: Pharmaceutical Press, 1982. 2077p.
- Mellreup, E.T. Lithium and carbohydrate metabolism. In: Johnson, F.N. (Ed.) *Lithium: research and therapy*. New York: Academic Press, 1975.p. 381-389.
- Mood, A.M.; Graybill, F.A. *Introduction to the theory of statistics*. São Paulo: McGraw-Hill, 1974.
- Nick, E.; Kellner, S.R. O. *Fundamentos de estatística para as ciências do comportamento*. 3.ed. Rio de Janeiro: Renes, 1971.
- Palma-Contar, J.D. Efeito dos produtos naturais da *Stevia Rebaudiana* (Bert) Bertonni no trânsito intestinal de camundongos. *Rev. Unimar*, 14(2):19-24, 1992.
- Rabello-Gay, M.N. Teste de micronúcleos em medula óssea: mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: SP - RBG/RBG, 1991.
- Schou, M. Lithium prophylaxis: myths and realities. *Am. J. Psychiat.*, 146: 573-576, 1989.
- Schou, M Forty years of Lithium treatment. *Arch. Gen. Psychiat.*, 54:9-23, 1997.
- Siegel, S. Estatística não-paramétrica (para as ciências do comportamento). São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.

- Soares, J.F.; Farias, A. A.; Cesar, C.C. *Introdução à estatística*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1991.
- Vanprays, P.; Deknuddt, G.; Vermeiren, F.; Sysmans, M.; Marsboom, R. Sampling times in micronucleus testing. *Mutat. Res.*, 282: 191-196, 1992.
- Vardanega, M.; Fedatto Jr, Z.; Palma-Contar, J.D. Avaliação dos efeitos do lítio, associado com adoçantes, no tratamento com camundongos. In: SBPC, 46, G.1.5-003, 1994, Vitória. *Anais...* Vitória, 1994.
- Vivagni, F.; Norppa, H. Comparison of separated erythrocyte preparations and manual smears of bone marrow in showing micronucleus induction by clastogenesis and aneuploidogens in mouse. *Mutagenesis*, 10(4):365-369, 1995.
- Zanini, A.C.; Oga, S. *Farmacologia aplicada*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1982.

Received on January 08, 1999.

Accepted on May 18, 1999.