

EFFECTO *IN VITRO* DEL LITIO SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LA PREPARACIÓN FRENICO-DIAFRAGMA DE RATA Y SU RELACIÓN CON EL TEMBLOR

DARÍO FERNANDO RIASCOS BERNAL¹, HENRY ADOLFO ACEROS MUÑOZ^{1*}, ALEJANDRO OSSA E.², GABRIEL PASCUAL AMAYA¹, ESPERANZA HOLGUÍN HERNÁNDEZ¹ Y ARMANDO SÁNCHEZ GODOY^{1,3}

Resumen

En la práctica clínica un común efecto adverso del litio es la aparición de temblor en reposo. Actualmente no existe una explicación satisfactoria de este fenómeno, por lo que se dificulta su manejo. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del litio sobre la excitabilidad de la unión neuromuscular en una preparación *in vitro*, con el fin de dilucidar un mecanismo periférico que contribuya al entendimiento de la etiología del temblor inducido por litio. Para ello se expuso la preparación frénico diafragma de rata a concentraciones ascendentes de litio (0,25 mmol/l a 8 mmol/l). La preparación se sometió a estímulo directo e indirecto y se midieron, como indicadores de excitabilidad, la frecuencia de estímulo mínima necesaria para desencadenar un tétanos perfecto, el voltaje mínimo necesario para generar una respuesta regular y la presencia de actividad espontánea de la preparación. El grupo control se sometió al mismo tiempo y protocolo de estimulación en ausencia de litio. Se utilizaron pruebas no paramétricas para evidenciar diferencias significativas. Se observó un aumento en la frecuencia de estímulo mínima necesaria para desencadenar un tétanos perfecto, comparada con el control, tanto con estimulación directa ($p=0$) como indirecta ($p=0,014$); no se observó un cambio significativo en el voltaje mínimo necesario para generar una respuesta regular, ni se observó actividad espontánea en la preparación. Los resultados nos permitieron concluir que el litio no aumenta la excitabilidad de la preparación neuromuscular *in vitro* y, por lo tanto, no predispone a la aparición de temblor, lo cual sugiere que el temblor no se explica por un mecanismo periférico.

Palabras clave: litio, reacciones adversas, temblor, unión neuromuscular, músculo esquelético, preparación neuromuscular.

IN VITRO EFFECT OF LITHIUM ON THE EXCITABILITY OF A RAT PHRENIC NERVE-DIAPHRAGM MODEL AND ITS RELATION WITH TREMOR

Abstract

One of the most common adverse effects detected with the use of lithium in clinical practice is tremor. Currently the explanation for this phenomenon is incomplete; therefore, its treatment

¹ Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

² Mayo Clinic, Rochester, Minnesota.

³ Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C.

* Correspondencia: haceros@javeriana.edu.co.

Dirección postal: Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 # 40-62 Edificio No. 31 Rafael Barrientos Conto, primer piso. Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: Noviembre 9 de 2006. Aceptado: Diciembre 18 de 2006.

is difficult. This study evaluated the lithium's effect on neuromuscular junction excitability using an in vitro preparation. In order to investigate a peripheral mechanism that could explain lithium induced tremor. The in vitro rat phrenic nerve-diaphragm preparation was exposed to increasing concentrations of Lithium (0,25-8 mmol/l). The preparation excitability was assessed under direct and indirect stimulation by measuring both the minimal stimulating frequency necessary to achieve a completely fused tetanus and the minimal stimulating voltage necessary to achieve a regular contractile response. We also looked for spontaneous contractile activity. Finally, nonparametric tests were used to detect differences between control and lithium groups. An increase on the minimal frequency necessary to achieve a completely fused tetanus compared with control was detected under direct stimulation ($p=0,000$) and under indirect stimulation ($p=0,014$). We did not detect a significant change on the minimal voltage necessary to achieve a regular contractile response nor a spontaneous activity in the preparation. In our experimental model Lithium does not increase the excitability of the neuromuscular phrenic nerve-diaphragm preparation; therefore, it does not predispose to tremor development. In view of our finding, our study suggests that lithium tremor is not caused by a peripheral mechanism of action of the drug.

Key words: lithium, adverse effects, tremor, neuromuscular junction, skeletal muscle, nerve muscle preparation.

Introducción

El litio, un fármaco que actualmente se prescribe con frecuencia, es de elección para el manejo del trastorno afectivo bipolar (1-4), también es efectivo en el tratamiento de la depresión (5), especialmente en la resistente al tratamiento (6) y su eficacia está bien demostrada en la terapéutica a corto plazo de la manía (3). Sin embargo, la mayoría de pacientes presentan efectos adversos o tóxicos, reflejando su estrecho índice terapéutico (7). El temblor es uno de los inconvenientes más molestos y frecuentes en los pacientes que lo reciben, no siendo necesario que las concentraciones de litio sean tóxicas para que este efecto se presente, pues se ha demostrado que pacientes con temblor inducido por litio presentan niveles séricos adecuados.

El temblor inducido por litio es irregular, no rítmico, de la porción distal de las extremidades, variable en intensidad y en frecuencia y puede presentarse tanto en reposo como en movimiento (aunque puede exacerbarse con la ejecución de movimientos finos de las manos) (8). Hallett clasificó el temblor producido por litio como postural y lo definió como un temblor fisiológico exagerado, con una frecuencia entre 8 y 12 Hz (9). Este temblor puede empeorar o generalizarse, a medida que la concentración sérica de litio se acerca a niveles tóxicos.

La incidencia del temblor inducido por litio varía entre un 4% y un 65% en trece estudios analizados, con una muestra total de pacientes superior a mil y un porcentaje promedio del 26% (9). Es un temblor que no responde a L-dopa o a agentes anticolinérgicos de acción central (10) y algunos estudios han sugerido que aunque los betabloqueadores pueden ser útiles, sus efectos colaterales limitan su uso (11, 12). La vitamina B6 puede ser una alternativa que hasta ahora se ha evaluado en estudios preliminares (13).

A pesar de la importancia y de la incidencia del temblor durante la terapia con litio, los mecanismos de acción que explican este fenómeno no son claros, hecho que dificulta su manejo. Y aunque existen estudios preliminares que sugieren una asociación entre la concentración de litio cerebral y el temblor en manos (14), la ausencia de estudios en tejidos periféricos no permite confirmar o descartar aún, un mecanismo periférico de manera conclusiva.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del litio sobre la excitabilidad de la unión neuromuscular y la contracción del músculo estriado esquelético en una preparación neuromuscular de rata *in vitro*, con el fin de dilucidar un posible mecanismo periférico que pueda contribuir al entendimiento de la etiología del temblor inducido por este fármaco.

Materiales y métodos

Previa autorización del comité de investigación y ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, veinte ratas Wistar, machos, con un peso entre 250 y 400 g, se dividieron en cuatro grupos: grupo de estudio con estimulación indirecta, grupo de estudio con estimulación directa, grupo control con estimulación indirecta y grupo control con estimulación directa. De cada animal experimental se obtuvo, según el procedimiento descrito por Bulbring (15) el hemidiafragma y frénico izquierdos. Cada preparación frénico-diafragma *in vitro* se sometió a siete diferentes concentraciones de litio en mmol/l (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 8) en el grupo de estudio, o a siete ensayos sin litio en el grupo control, bajo el mismo protocolo de tiempo y estimulación. Para evaluar la excitabilidad neuromuscular en cada concentración de litio o ensayo se registraron por lo menos seis veces cada una de las variables dependientes: voltaje de estímulo mínimo necesario para desencadenar una actividad contráctil regular (definido por la observación de al menos tres contracciones consecutivas) y la frecuencia de estímulo mínima necesaria para desencadenar un tétanos perfecto.

Preparación frénico-diafragma

Ratas Wistar machos (250 a 400 g) se sedaron y decapitaron rápidamente. La preparación frénico diafragma se aisló de acuerdo con la técnica descrita por Bulbring (15), y se colocó en una cámara para órgano aislado de 50 ml que contenía una solución de Tyrode a 37°C y pH fisiológico, verificado con un medidor de pH portátil Thermo Orion modelo 290A Plus. La composición de la solución de Tyrode en mmol/ fue la siguiente: NaCl 145,42; KCl 2,68; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 11,9; MgCl₂ 0,105; NaH₂PO₄ 0,416; D-glucosa 5,55. La solución se oxigenó de manera continua.

Estudio del voltaje de estímulo mínimo necesario para obtener una serie de contracciones continuas y regulares

La preparación de hemidiafragma se estimuló a través de un electrodo con punta de plata, directa o indirectamente (a través del nervio frénico), utilizando un estimulador Grass S44. Las contracciones

isotónicas del hemidiafragma, obtenidas tanto por estímulo directo como indirecto, se registraron por un transductor de tensión Grass FT 03C, conectado a un polígrafo Grass 7D y transmitidas a un polígrafo digital AD Instruments PowerLab/800, software Chart 4 para Windows. Cada preparación se mantuvo de manera rutinaria durante 20 minutos en el baño antes de iniciar los experimentos, bajo un estímulo de 5 V de intensidad, 2 minutos de duración y frecuencia de 0,1 Hz con estimulación directa, o bajo un estímulo de 1 V de intensidad, 2 minutos de duración y frecuencia de 0,1 Hz con estimulación indirecta. Durante este lapso la preparación se lavó varias veces, hasta obtener una estabilidad que permitiese ajustar la sensibilidad del preamplificador y amplificador del polígrafo. Una vez estable la preparación, se estimuló el músculo (estimulación directa) o el nervio frénico (estimulación indirecta) con pulsos de 2 minutos de duración, frecuencia de 1 Hz e intensidad progresiva partiendo de un voltaje de estímulo que no produce respuesta, hasta obtener una respuesta contráctil regular. Se registró el voltaje en milivoltios que inició la respuesta mecánica regular.

En los grupos de estudio, este protocolo de estimulación se realizó en presencia de las concentraciones de litio ya anotadas. La actividad contráctil se registró quince minutos después de agregar cada concentración a la preparación; no se utilizó un mayor número de concentraciones con el fin de minimizar la degradación tiempo dependiente de la preparación. En los grupos control el protocolo de estimulación se repitió el mismo número de veces y durante el mismo tiempo que en el grupo de estudio, pero en ausencia de litio.

Estudio de la frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto

La preparación se estabilizó como se explicó en el punto anterior. Una vez estuvo estable, se estimuló con pulsos de 5 V de intensidad y 2 minutos de duración en el grupo de estimulación directa, o con pulsos 1 V de intensidad y 2 minutos de duración en el grupo de estimulación indirecta, aumentando de manera progresiva la frecuencia de estímulo desde 1 Hz hasta una frecuencia que produjese un tétanos perfecto. La frecuencia que produjo tétanos perfecto se registró. En los grupos de estudio este protocolo de estimulación se realizó

en presencia de las concentraciones de litio ya anotadas. La actividad contráctil se registró quince minutos después de agregar cada concentración a la preparación. No se utilizó un mayor número de concentraciones con el fin de minimizar la degradación tiempo dependiente de la preparación. En los grupos control el protocolo de estimulación se repitió el mismo número de veces y durante el mismo tiempo que en el grupo de estudio, pero en ausencia de litio.

Reactivos

Para la preparación de las soluciones se utilizaron los siguientes elementos: cloruro de litio puro (PRS Panreac); cloruro de sodio (MERCK); cloruro de calcio.2H₂O (MERCK); cloruro de magnesio (MERCK); cloruro de potasio (MERCK); D(+)- glucosa monohidratada (MERCK); fosfato monobásico de sodio.2H₂O (SIGMA); bicarbonato de sodio (SIGMA).

Análisis estadístico

Se digitaron los datos de voltaje de estímulo mínimo necesario y frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto, contra las diferentes concentraciones de litio en una hoja

de cálculo de Excel, tanto con estimulación directa como indirecta, de los grupos de estudio y control. Se calcularon los porcentajes de cambio de las dos variables dependientes en los grupos de estudio y control, tomando como referencia los datos obtenidos en la concentración cero (0 meq/l) en el grupo de estudio, o los datos obtenidos en el ensayo uno en el grupo control. Se realizó la comparación del porcentaje de cambio de las dos variables entre el grupo de estudio y el grupo control, tanto con estimulación directa como indirecta, mediante un análisis no paramétrico de mediciones repetidas Kruskal Wallis; una comparación del porcentaje de cambio entre dos concentraciones de litio en el grupo de estudio o dos ensayos en grupo control y, entre una concentración de litio y el ensayo control correspondiente mediante el análisis no paramétrico entre dos muestras Mann Whitney. Se aceptó una diferencia con una significancia del 95% ($p < 0,05$).

Resultados

Los porcentajes de cambio en las dos variables dependientes analizadas en cada concentración de litio y su control correspondiente, tanto con estimulación directa como indirecta, se muestran en las tablas 1 y 2.

TABLA 1. Porcentaje de cambio de la frecuencia de estimulación mínima necesaria para alcanzar un tétanos perfecto y porcentaje de cambio del voltaje de estímulo mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil.

Concentración de litio en mmol/l	ESTIMULACIÓN INDIRECTA			
	GRUPO TRATAMIENTO n=5		GRUPO CONTROL n=5	
	% de cambio de frecuencia de estímulo	% de cambio de voltaje de estímulo	% de cambio de frecuencia de estímulo	% de cambio de voltaje de estímulo
0,25	10,1 ±16,8	23,1 ±38,4	5,0 ±3,6	-1,5 ±4,5
0,5	16,2 ±20,2	12,6 ±22,1	7,9 ±5,2	6,2 ±30,1
1	34,6 ±21,7	26,0 ±19,1	8,5 ±5,7	17,9 ±39,5
2	55,8 ±20,4	26,5 ±20,2	12,5 ±3,8	13,5 ±10,7
4	74,8 ±21,0	37,6 ±27,8	12,6 ±4,2	-8,8 ±10,5
8	82,0 ±19,4	36,9 ±40,2	10,5 ±5,3	-9,1 ±16,7

Se muestra la media ± error estándar.

TABLA 2. Porcentaje de cambio de la frecuencia de estimulación mínima necesaria para alcanzar un tétanos perfecto y porcentaje de cambio del voltaje de estímulo mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil.

Concentración de litio en mmol/l	ESTIMULACIÓN DIRECTA			
	GRUPO TRATAMIENTO n=5		GRUPO CONTROL n=5	
	% de cambio de frecuencia de estímulo	% de cambio de voltaje de estímulo	% de cambio de frecuencia de estímulo	% de cambio de voltaje de estímulo
0,25	8,4 ± 1,3	-6,5 ± 16,7	0,9 ± 1,3	45,2 ± 21,1
0,5	14,9 ± 4,3	8,1 ± 15,4	4,3 ± 2,4	37,8 ± 26,6
1	19,6 ± 4,1	-3,2 ± 11,7	7,3 ± 5,0	93,3 ± 61,2
2	27,5 ± 4,7	-1,5 ± 10,6	8,5 ± 5,0	95,5 ± 68,7
4	28,3 ± 4,4	2,4 ± 12,0	8,2 ± 6,6	105,3 ± 79,1
8	27,7 ± 4,5	13,3 ± 13,3	8,1 ± 7,2	104,7 ± 82,3

Se muestra la media ± error estándar.

Bajo estimulación indirecta

En las preparaciones tratadas con litio, a medida que se incrementó la concentración, se observó un aumento significativo de la frecuencia de estímulo mínima necesaria para alcanzar un tétanos perfecto ($p=0,017$), este aumento no se observó en el grupo control; la diferencia entre el grupo de tratamiento y control fue significativa ($p=0,014$). Al comparar cada concentración de litio con el control correspondiente, el aumento de la frecuencia de estímulo se hizo significativo en las concentraciones de 4 mmol/l ($p=0,008$) y 8 mmol/l ($p=0,008$) (Figura 1). No hubo un cambio significativo del voltaje de estímulo mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil regular, al analizar el porcentaje de cambio en el grupo de tratamiento, ni en el grupo control, ni al comparar cada concentración de litio con su control correspondiente (Figura 2).

Bajo estimulación directa

En las preparaciones tratadas con litio, a medida que se incrementó la concentración, se observó un aumento significativo de la frecuencia de estímulo mínima necesaria para alcanzar un tétanos perfecto ($p=0,001$), este aumento no se observó

en el grupo control; la diferencia entre el grupo de tratamiento y control fue significativa ($p=0$). Sin embargo, al comparar cada concentración con su control correspondiente, sólo la concentración de 0,25 mmol/l alcanzó una significancia aceptable ($p=0,008$) (Figura 3). No hubo un cambio significativo del voltaje de estímulo mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil regular bajo estimulación directa, al analizar su porcentaje de cambio en el grupo de tratamiento, en el grupo control, ni al comparar cada concentración de litio con su control correspondiente (Figura 4).

Comparación entre estímulo directo e indirecto

El aumento de la frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto en presencia de litio fue progresivamente mayor con la estimulación indirecta que con la estimulación directa, después de analizar sus porcentajes de cambio; esta diferencia se hace significativa con la concentración de 8 mmol/l ($p=0,016$) (Figura 5). No se observó una diferencia significativa en el porcentaje de cambio del voltaje de estímulo mínimo necesario para producir una respuesta, al comparar las preparaciones sometidas a estimulación directa e indirecta (Figura 6).

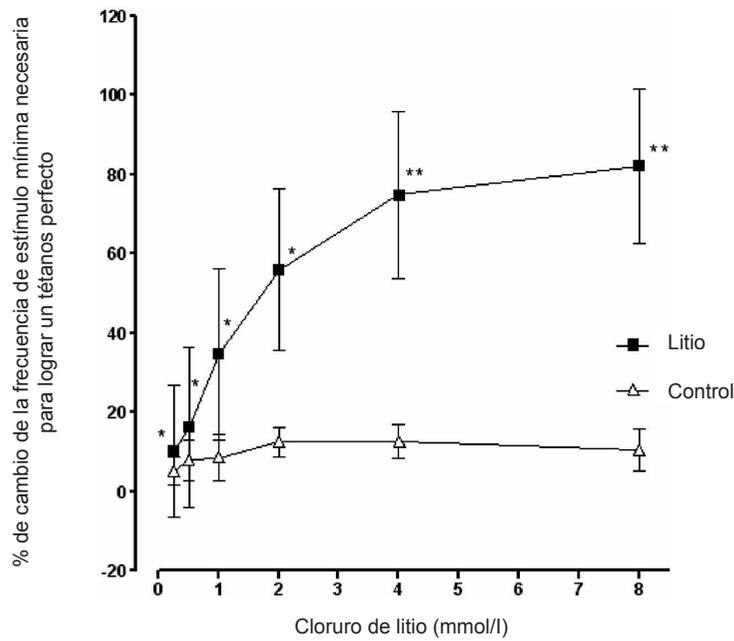


FIGURA 1. Estímulo indirecto: cambios inducidos por cloruro de litio sobre la frecuencia de estímulo mínima necesaria para lograr un tétanos perfecto con estímulo indirecto. Se observa un aumento significativo de la frecuencia en presencia de litio $p=0,017$; una diferencia significativa al comparar el grupo de tratamiento contra el control $p=0,014$. Los valores son la media \pm error estándar, los valores de p son: * $p>0,05$; ** $p=0,008$; al comparar cada concentración con el control correspondiente.

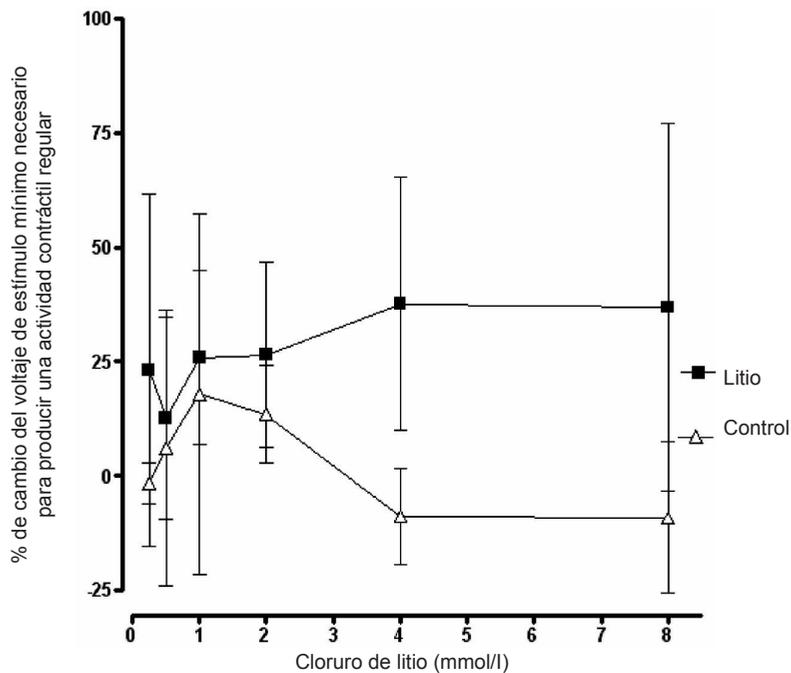


FIGURA 2. Estímulo indirecto: cambios en el voltaje de estímulo mínimo necesario para producir una respuesta contráctil regular observada en el grupo de litio y grupo control con estímulo indirecto. No hubo cambios significativos. Los valores son la media \pm error estándar.

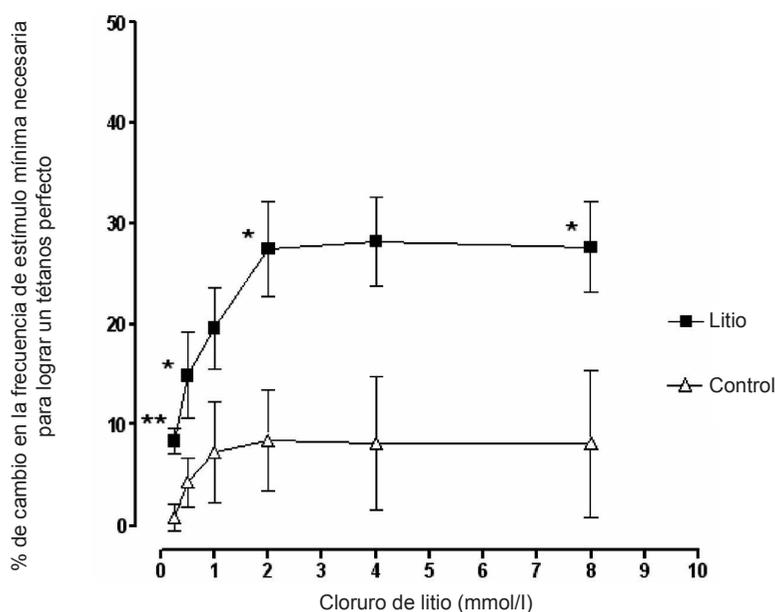


FIGURA 3. Estímulo directo: cambios inducidos por cloruro de litio sobre la frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto con estímulo directo. Se observa un aumento significativo de la frecuencia en presencia de litio $p=0,001$; una diferencia significativa al comparar el grupo de tratamiento contra el control $p=0$. Los valores son la media \pm error estándar. * $p=0,056$; ** $p=0,008$; cuando se compara cada concentración de litio con su control correspondiente.

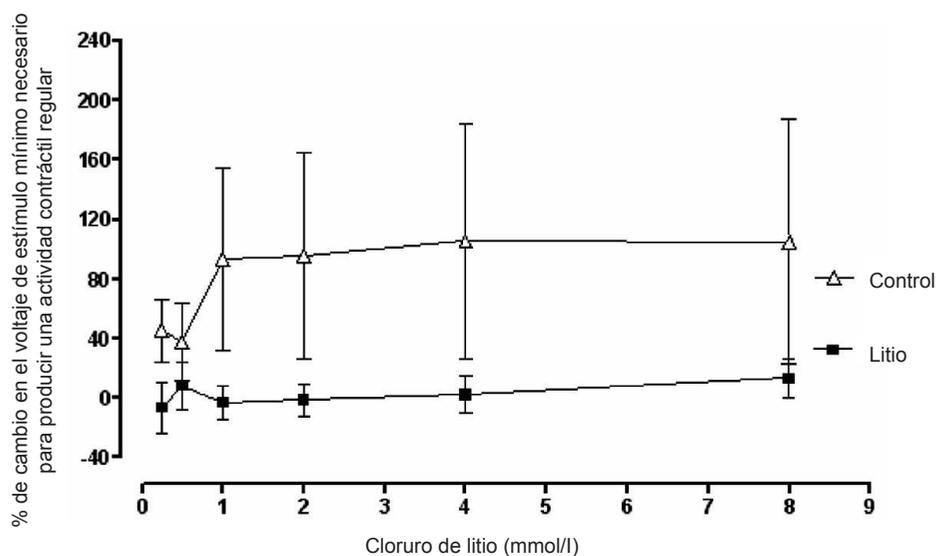


FIGURA 4. Estímulo directo: cambios en el voltaje de estímulo mínimo necesario para producir una respuesta regular, observados en el grupo de litio y grupo control con estímulo directo. No hubo cambios significativos. Los valores son la media \pm error estándar.

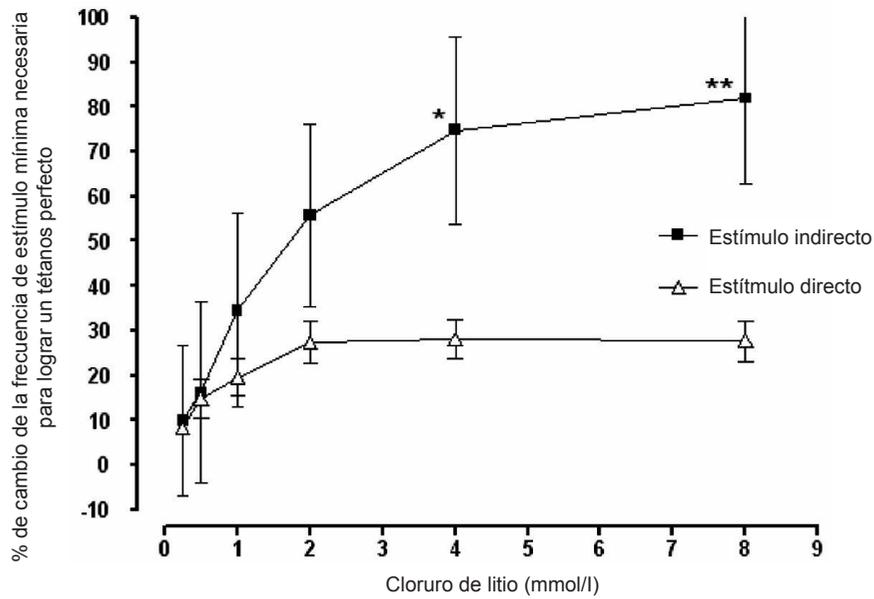


FIGURA 5. Cambios inducidos por cloruro de litio sobre la frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto, bajo estimulación directa e indirecta. El incremento en la frecuencia es mayor bajo estimulación indirecta. Los valores corresponden a la media \pm error estándar, los valores de p son: * $p=0,56$; ** $p=0,016$; cuando se comparan las concentraciones entre los dos grupos.

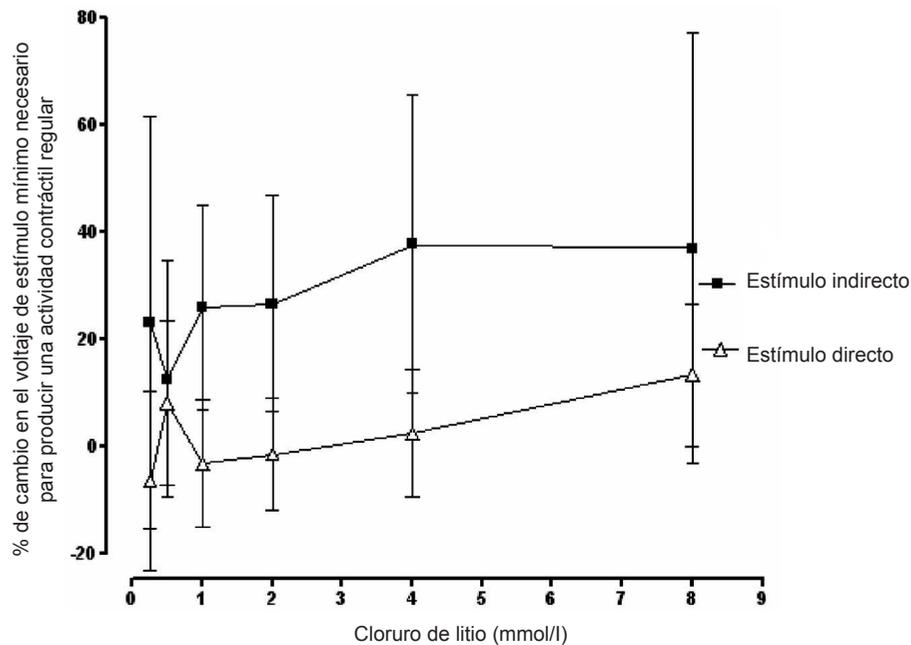


FIGURA 6. Cambio en el voltaje de estímulo mínimo necesario para producir una respuesta contráctil regular en presencia de cloruro de litio, con estimulación directa e indirecta. No hay cambios significativos ($p>0,3$) cuando se compara estimulación directa vs. indirecta. Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

Temblor espontáneo

En ninguna de las preparaciones del grupo de litio ni en el grupo control se evidenció la aparición de actividad muscular identificable como temblor.

Discusión

Los resultados de este estudio evidencian un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de estímulo mínima necesaria para lograr en el músculo un tétanos perfecto, en presencia de litio, tanto con estimulación directa como indirecta. Por lo tanto, en la preparación neuromuscular *in vitro*, la presencia de litio hace necesario un estímulo de mayor frecuencia para lograr una contracción tetánica perfecta, lo cual permite inferir que este catión lleva la preparación a un punto de menor excitabilidad, por lo tanto, la hace menos propensa a desarrollar temblor. Este efecto es más evidente bajo estimulación indirecta.

El hallazgo observado podría explicarse por un efecto en cualquier punto de la transmisión neuromuscular. A nivel presináptico se ha propuesto que el litio tiene un efecto inhibitorio en la amplitud de contracción de una preparación frénico diafragma de rata, a través de la activación de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (16); estos canales han sido ampliamente investigados en estudios de fatiga muscular (17). La activación de estos canales produce un efecto citoprotector al aumentar la conductancia de potasio en la membrana de la célula y, por consiguiente, hiperpolarizan la membrana (18). La salida de potasio acorta la duración del potencial de acción, hiperpolariza la membrana, e inhibe la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (19, 20); la entrada de calcio a través del axolema es esencial para la liberación de acetilcolina de la terminal nerviosa (19) cuando se realiza estimulación indirecta.

En la célula muscular la entrada de calcio activa la liberación de calcio inducida por calcio desde el retículo sarcoplásmico (21), la activación de K_{ATP} inducida por litio en el sarcolema inhibe esta entrada de calcio (20), inhibiendo por lo tanto la contracción muscular originada por estímulo directo (16). Esta inhibición de la contracción del músculo esquelético de rata inducida directa e indi-

rectamente, a través de la activación de K_{ATP} , podría explicar la necesidad de una mayor frecuencia de estimulación para lograr un tétanos perfecto en presencia de cloruro de litio. Sin embargo, otros estudios han propuesto que el litio puede potenciar la transmisión neuromuscular aumentando la liberación de acetilcolina (22, 23).

Se observó que el cloruro de litio aumenta la amplitud y el contenido de cuantos de acetilcolina de los potenciales de placa terminal evocados (EEPP) registrados en músculo sartorio de rana (23, 24). Se propuso que la habilidad del litio para incrementar los niveles intracelulares de fosfatos de inositol (IP) IP_3 e IP_4 (25, 26) podría explicar este efecto ya que IP_3 e IP_4 aumentan la movilización de calcio de depósitos intracelulares y la entrada de calcio a través de la membrana celular (27), aumentando así la liberación de acetilcolina. De igual forma, en un trabajo con unión neuromuscular de mamífero en el que se usó la frecuencia de los potenciales de placa terminal en miniatura (MEPP) como un índice de la liberación de acetilcolina (22), se evidenció que el litio aumenta la frecuencia de MEPP al reemplazar sodio por litio, en soluciones libres de calcio en la preparación neuromuscular de sóleo de rata. Los iones de litio inhiben la bomba de sodio-potasio (28, 29), la subsiguiente acumulación de sodio estimula la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, llevando a un aumento de la liberación del neurotransmisor. Adicionalmente, el litio inhibe el intercambiador Na-Ca, disminuyendo la extrusión de Ca y aumentando la liberación de acetilcolina (30).

En el presente estudio este efecto del litio que incrementa la liberación de acetilcolina hubiera permitido alcanzar un tétanos perfecto con una menor frecuencia de estímulo y requerir un menor voltaje de estímulo para desencadenar una respuesta contráctil regular en la preparación sometida a estimulación indirecta. Sin embargo, el hallazgo en la frecuencia de estimulación fue completamente contrario y el voltaje mínimo de estimulación no varió de manera significativa con respecto al control. Entonces, la necesidad de un estímulo de mayor frecuencia en presencia de litio se podría explicar por un efecto inhibitorio del litio en un punto distal a la liberación de la acetilcolina y la generación del potencial de placa terminal en la transmisión neuromuscular, pero la confirmación

de estas hipótesis requiere de modelos experimentales diferentes al presente.

Adicional al ya mencionado efecto inhibitorio del litio sobre la célula muscular mediado por K_{ATP} (16), el litio bloquea también la enzima inositol monofosfatasa a concentraciones de 0,5–1 mmol/l (31), lo que resulta en una depleción del inositol muscular y en una subsiguiente disminución en la generación de IP_3 (31,32); se conoce que el IP_3 puede liberar calcio desde el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético (33-35) y actuar como estimulador del receptor de dihidropiridina (36). Si el litio disminuye la generación de IP_3 (37), se podría explicar la necesidad de una mayor frecuencia de estímulo para lograr un tétanos perfecto, tanto por estimulación indirecta como directa; sin embargo, para confirmarlo se requiere de estudios adicionales.

Se conoce que la fatiga muscular puede ser una manifestación de una falla en la propagación del potencial de acción a lo largo del sarcolema y del sistema de túbulos T, de una falla en los mecanismos de acople entre el potencial de acción y la liberación de calcio, o producida por una alteración en la regulación del calcio sobre los elementos contráctiles (38). Los estudios que hablan sobre fatiga muscular la han clasificado en dos tipos diferentes: una, que resulta cuando se estimula el músculo con frecuencias altas y otra, que afecta el desarrollo de fuerza muscular a bajas frecuencias de estimulación. La fatiga de alta frecuencia se presenta después de 10 o 20 segundos de estimulación a 50 Hz (38), en este estudio el tiempo de estimulación continua nunca superó los cinco segundos.

Para descartar que los efectos observados en este estudio fueran secundarios a los mecanismos de fatiga y no al cloruro de litio, las preparaciones frénico-diafragma en el grupo control fueron sometidas al mismo protocolo de estabilización, estimulación y tiempo total de experimentación utilizados en el grupo de tratamiento pero en ausencia de cloruro de litio. En el grupo control no se evidenciaron cambios significativos en la frecuencia de estímulo mínima necesaria para producir un tétanos perfecto, ni en el voltaje mínimo de estímulo necesario para desencadenar una respuesta contráctil, lo que permite afirmar que el efecto inhibitorio observado en el grupo de tratamiento es secundario al cloruro de litio.

Por otra parte, el voltaje mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil regular en una preparación neuromuscular (umbral de contracción) señala de forma indirecta la excitabilidad de la misma; en el presente estudio las preparaciones bajo estimulación directa como indirecta sometidas a las concentraciones de litio señaladas no evidenciaron un cambio significativo en esta variable con respecto al control, lo que permite afirmar que en este diseño experimental el cloruro de litio no modificó el umbral de contracción de tal forma que pudiera predisponer la preparación al desarrollo de temblor. En ninguna preparación sometida a estimulación directa o indirecta en presencia de las concentraciones de cloruro de litio mencionadas se evidenció actividad muscular correspondiente a temblor.

Finalmente, basándonos en que no hubo una disminución de la frecuencia de estímulo necesaria para lograr un tétanos perfecto, sino todo lo contrario, que el voltaje mínimo necesario para desencadenar una respuesta contráctil regular no tuvo cambios significativos y que no se evidenció actividad muscular correspondiente a temblor en las preparaciones neuromusculares sometidas a estimulación directa e indirecta en presencia de cloruro de litio, podemos concluir que el cloruro de litio no aumenta la excitabilidad de la unión neuromuscular de rata y, por lo tanto, no la predispone al desarrollo de temblor. Estos hallazgos sugieren que el temblor, una de las reacciones adversas más frecuentes y molestas en los pacientes que reciben litio, no se explique probablemente por un mecanismo periférico. De hecho, en este modelo experimental, el litio disminuyó la excitabilidad de la unión neuromuscular, sin embargo para comprender completamente los mecanismos subyacentes a este cambio es necesario utilizar otro tipo de modelos experimentales.

Agradecimientos

Un sincero reconocimiento al doctor Iván Solarte por su apoyo incondicional para el desarrollo de este proyecto.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá y se financió con recursos

proprios de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana.

Referencias

- Goodwin FK, Jamison KR. Manic-depressive illness. 2 ed. New York: Oxford University Press; 1990.
- Schou M, Juel-Nielsen N, Stromgren E, Voldby H. The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1954;17:250-260.
- Goodwin FK, Murphy DL, Bunney WE Jr. Lithium-carbonate treatment in depression and mania: a longitudinal double-blind study. *Arch Gen Psychiatry*. 1969;21:486-496.
- Stokes PE, Shamoian CA, Stoll PM, Patton MJ. Efficacy of lithium as acute treatment of manic-depressive illness. *Lancet*. 1971;1:1319-1325.
- Souza FGM, Goodwin GM. Lithium treatment and prophylaxis in unipolar depression: a meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 1991;158:666-675.
- Price LH, Charney DS, Heninger GR. Variability of response to lithium augmentation in refractory depression. *Am J Psychiatry*. 1986;143:1387-1392.
- Dilsaver SC. Lithium's effects on muscarinic receptor binding parameters: a relationship to therapeutic efficacy?. *Biol Psychiatry*. 1984;19:1551-1565.
- Carroll JA, Jefferson JW, Greist JH. Treating tremor induced by lithium. *Hosp Comm Psychiatry*. 1987;38:1280-1288.
- Gelenberg AJ, Jefferson JW. Lithium Tremor. *J Clin Psychiatry*. 1995;56(7):283-287.
- Vacaflor L. Lithium side effects and toxicity: The clinical picture. In: Johnson FN, editor. *Lithium Research and Therapy*. London: Academic Press; 1975. p. 211-25.
- Gaby NS, Lefkowitz DS, Israel JR. Treatment of lithium tremor with metoprolol. *Am J Psychiatry*. 1983;140:593-5.
- Kirk L, Baastrup PC, Schou M. Propranolol treatment of lithium-induced tremor. *Lancet*. 1973;2:1086-7.
- Miodownik C, Witztum E, Lerner V. Lithium-induced tremor treated with vitamin B6: a preliminary case series. *Int J Psychiatry Med*. 2002;32(1):103-8.
- Kato T, Fujii K, Shioiri T, Inubushi T, Takahashi S. Lithium side effects in relation to brain lithium concentration measured by lithium-7 magnetic resonance spectroscopy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1996;20(1):87-97.
- Bulbring E. Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol*. 1946;1:539-43.
- Ahmed O. The myoneural effects of lithium chloride on the nerve-muscle preparations of rats. Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Pharmacological Research*. 2000;41(2):163-178.
- Renaud JM, Gramolini A, Light P, Comtois A. Modulation of muscle contractility during fatigue and recovery by ATP-sensitive potassium channel. *Acta Physiol Scand*. 1996;156:203-212.
- Ashcroft SJH, Ashcroft Fm. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal*. 1990; 2:197-214.
- Rudy B. Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience*. 1988;25:729-47.
- Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate sensitive-potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol*. 1991;261:1675-86.
- Smith JS, Coronado R, Meissner G. Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 1986;88:573-88.
- Nussinovitch I, Rahamimoff R. Ionic Basis of tetanic and post-tetanic potentiation at a mammalian neuromuscular junction. *Journal of Physiology*. 1988;396:435-455.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA. Interactions between adenosine and phorbol esters or lithium at the frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol*. 1990;100:55-62.
- Fatt P, Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol*. 1951; 115:320-37.
- Sekar MC, Hokin LE. The role of phosphoinositides in signal transduction. *J. Membr Biol*. 1986;89:193-210.
- Drummond AH, Hughes PJ. Perturbation by lithium of inositol phosphate metabolism in GH3 pituitary cells. In: *Inositol lipids in cellular signaling*. Mitchell RH, Putney JW, Jr, editors. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1987. p. 31-34.
- Putney J.W. Jr. Calcium-mobilizing receptors. *Trends Pharmacol. Sci*. 1987;8:481-486.
- Beauge LA. Activation by lithium ions of the inside sodium sites in (Na+K+) ATPase. *Biochimica et biophysica acta*. 1978;527:472-484.
- Ritchie JM, Straub RW. Observations on the mechanism for the active extrusion of lithium in mammalian non myelinated nerve fibers. *Journal of Physiology*. 1980;304:123-134.
- Hermoni M, Barzilat A, Rahamimoff H. Modulation of the Na-Ca antiport by its ionic environment: the effect of lithium. In: *The Languages of the brain*. Rahamimoff R, Abeles M, editors. Tel-Aviv: Israel Journal of Medical Sciences; 1987. p.44-48.
- Nahorski SR, Jenkinson S, Challis RA. Lithium-induced disruption of cell signalling in brain: evidence implicating the phosphoinositide cycle. *Pharmacol Toxicol*. 1992;71:42-48.
- Berridge JM, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 1989;341:197-205.
- Nosek TM, Williams MF, Zeigler ST, Godt RE. Inositol triphosphate enhances calcium release in skinned cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1986;250(19 Suppl 7):S807-811.
- Suárez-Isla B, Iribara V, Oberhause A, Larralde L, Bull R, Hidalgo C, et al. Inositol (1,4,5) triphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys J*. 1988;54:737-741.
- Volpe P, Salvati G, DiVirgilio F, Pozzan T. Inositol 1,4,5 triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature*. 1985; 316:347-349.
- Vilven J, Coronado R. Opening of dihydropyridine calcium channels in skeletal muscle membranes by inositol triphosphate. *Nature*. 1988;336:587-589.
- Tarnopolsky M, Hicks A, Winegard K. The effects of lithium on muscle contractile function in humans. *Muscle & Nerve*. 1996;19:311-318.
- Jones DA. High and Low frequency fatigue revisited. *Acta Physiol Scand*. 1996;156:256-270.