

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSE MARY CARVALHO PINHEIRO  
NADJA SCHRÖDER

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE NO  
PERÍODO NEONATAL EM UM MODELO ANIMAL  
DE MANIA E O USO DO ÁCIDO VALPRÓICO

---

**PORTO ALEGRE**

**29/01/2010**

**ROSE MARY CARVALHO PINHEIRO**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE NO PERÍODO NEONATAL  
EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA  
E O USO DO ÁCIDO VÁLPROICO**

Dissertação apresentada como  
requisito para obtenção do grau de  
Mestre pelo programa de pós-  
graduação da Faculdade de  
Medicina da PONTIFÍCIA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DO RIO GRANDE DO SUL

Orientador: Nadja Schröder

Porto Alegre

2010

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P654e Pinheiro, Rose Mary Carvalho

Efeitos da exposição ao estresse no período neonatal em um modelo animal de mania e o uso do ácido valpróico / Rose Mary Carvalho Pinheiro. – Porto Alegre, 2010.

69 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina) – Fac. de Medicina, PUCRS.

Orientadora: Prof. Dr. Nadja Schröder

1. Transtornos Mentais. 2. Transtorno Bipolar - quimioterapia. 3. Biologia Molecular. 4. Ácido Valpróico - administração e dosagem. 5. Anfetamina - administração e dosagem. 6. Modelos Animais. 7. Ratos Wistar. I. Schröder, Nadja. II. Título.

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza, CRB 10/1441

**ROSE MARY CARVALHO PINHEIRO**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE NO PERÍODO NEONATAL  
EM UM MODELO ANIMAL DE MANIA  
E O USO DO ÁCIDO VÁLPROICO**

Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre pelo  
programa de pós-graduação da Faculdade  
de Medicina da PONTIFÍCIA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO  
GRANDE DO SUL

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2010

Banca Examinadora:

Dra. Elke Bromberg - PUCRS

---

Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira - PUCRS

---

Dr. Alfredo Cataldo Neto - PUCRS

---

*Dedico esta Tese a minha mãe que foi  
uma grande mulher e ao meu pai que  
me proporcionou o gosto pela leitura.*

## *Agradecimentos*

Ao meu marido pelo apoio e compreensão durante os momentos difíceis.

A minha irmã Daiane, pelo incentivo, colaboração e apoio recebidos.

A professora Doutora Nadja Schröder que me acolheu como orientadora e tornou mais fácil esta caminhada.

Aos colegas de equipe que me auxiliaram durante esta jornada e transformaram-na mais leve, em especial a Vanessa Athaide Garcia e Arethuzia Dornelles.

A Maria Noêmia de Lima que foi uma das desbravadoras desta linha de pesquisa em conjunto com a Dra. Nadja Schröder.

A colega Ester Rosari Raphaeli Dalben que é uma multiplicadora de informações.

Aos professores da pós-graduação pelo conhecimento transmitido no transcorrer desta jornada.

Aos meus colaboradores em especial Ana Paula Sperb.

Obrigado a todos vocês, sem os quais, nada teria sido possível.

## RESUMO

### Introdução

Ao longo da história o homem busca entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos Transtornos Mentais. O principal objetivo do presente trabalho foi investigar o papel do Ácido Valpróico na prevenção do prejuízo cognitivo em ratos Wistar submetidos ao estresse neonatal, induzido por separação materna, combinado ao tratamento com Anfetamina na idade adulta.

### Metodologia

Os animais foram subdivididos em estressados e não estressados do primeiro ao décimo quarto dia de vida. Foram utilizados apenas animais machos para prevenir viés com relação a alterações hormonais em fêmeas.

Na idade adulta foram tratados com Anfetamina (D-AMPH) 2mg/kg e Ácido Valpróico (VAL, 400mg/kg/dia). Foram subdivididos em oito sub-grupos cada um contendo entre 10 a 13 animais por grupo. Um grupo recebeu solução Salina, outro recebeu D-AMPH e Salina, outro recebeu D-AMPH e Ácido Valpróico e outro grupo Ácido Valpróico e Salina, por um período de sete dias. Duas horas após a administração da última injeção de anfetamina foram realizados os testes comportamentais, os quais foram repetidos oito dias mais tarde, no sentido de verificar se os efeitos cognitivos induzidos pelo tratamento crônico com anfetamina seriam persistentes mesmo após a interrupção do tratamento.

### Resultados

O experimento I (realizado 2 horas após a administração da última injeção), ambos os grupos não separado (NS) e separado (S) de animais que receberam D-AMPH na idade adulta demonstraram no número de cruzamentos e número de explorações verticais quando comparados com o grupo NS que recebeu Salina na idade adulta. O VAL levou à redução do número de cruzamentos e explorações verticais quando comparados aqueles grupos de animais NS e S que receberam D-AMPH.

No experimento II (realizado sete dias após a última injeção), não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais quanto aos parâmetros analisados.

A administração de D-AMPH produziu prejuízos cognitivos severos, que foram mais pronunciados nos animais submetidos à privação materna, sugerindo que eventos adversos no início da vida podem aumentar a vulnerabilidade a um patógeno ambiental mais tardiamente. Além disso, nossos resultados indicaram que o VAL atenuou o prejuízo cognitivo induzido pela D-AMPH, mas não foi efetivo quando os animais foram expostos à privação materna e à D-AMPH.

### Conclusões

Nosso trabalho vem ao encontro dos trabalhos anteriores reforçando o papel dos estabilizantes do humor como Ácido Valpróico no mecanismo de neuroproteção dos transtornos do humor como o transtorno bipolar.

### Palavras-Chave

Ácido Valpróico, Anfetamina, Ratos Wistar, Modelo Animal de Mania, Memória.



## ABSTRACT

### Background

Along the history man tries to understand the mechanisms involved on the development of mental disorders. In the present study, we studied the role of Valproic Acid (VAL) in preventing cognitive impairment induced by maternal deprivation combined with a sub-chronic treatment with amphetamine (D-AMPH) in adult Wistar rats.

### Methods

Only the male animals were used, in order to prevent bias with hormonal alterations in females. In the adulthood, they were treated with D-AMPH (2mg/kg/day) and VAL (400mg/kg/day). The groups were sub-divided in 8 sub-groups, each one composed of 10-13 animals. The groups received: Saline (control); D-AMPH + Saline; D-AMPH + VAL and VAL + Saline, for 7 days. Two hours after the last injection, animals were submitted to behavioral tasks. In order to verify if D-AMPH-induced cognitive impairment persisted after the end of the treatment, the same rats were retrained and tested eight days later.

### Results

In Experiment I (performed 2 hours after the last injection), both Handled (H) and Maternal Deprived (MD) animals that received D-AMPH in the adulthood showed an increased number of crossings and number of rearings when compared to H animals that received Saline in the adulthood. VAL induced a reduction in the number of crossings and rearings when we compare those groups to H and MD animals that received D-AMPH.

In Experiment II (performed 7 days after the last injection), there were no statistically significant differences among all experimental groups regarding the parameters evaluated.

We found that repeated D-AMPH exposure produces severe cognitive impairment, which was more pronounced when the animals were maternal deprived,

suggesting that an early adverse life event may increase the vulnerability to an environmental pathogen later in life. In addition, we found that VAL ameliorated the cognitive deficits induced by D-AMPH, but it was not effective when the animals were exposed to both maternal deprivation and D-AMPH.

## Conclusions

Our results support previous studies strengthening the role of mood stabilizers such as Valproic Acid in the neuroprotection mechanism of mood disorders like bipolar disorder.

## Keywords:

Valproic Acid, Amphetamine, Wistar Rats, Animal Model of Mania, Memory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** ninhada dos ratos Wistar

**Figura 2:** teste no campo aberto

**Figura 3:** Teste de Reconhecimento do Objeto Novo (TRON): treino de 5 minutos

**Figura 4:** Atividade em campo aberto:

(A) Número de cruzamentos (2 horas após os tratamentos farmacológicos).

(B) Número de explorações verticais (2 horas após os tratamentos farmacológicos).

(C) Número de cruzamentos (24 horas após os tratamentos farmacológicos).

(D) Número de explorações verticais (24 horas após os tratamentos farmacológicos).

**Figura 5:**

(A) Reconhecimento do objeto I (24 horas após os tratamentos farmacológicos).

(B) Reconhecimento do objeto II (sete dias após os tratamentos farmacológicos).

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPH/D-AMPH:** anfetamina

**Bcl-2:** célula-B de linfoma 2, proteína oncogênica que inibe apoptose

**DAG:** diacilglicerol

**DM:** depressão maior

**DSM-IV:** Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders 4<sup>th</sup> edition

**ERK:** quinase dependente de sinalização extracelular

**GAP-43:** Proteína Gap-43 da Membrana do Cone de Crescimento de Nervos, Proteína B-50, Proteína GAP-43 da Membrana do Cone de Crescimento Neural, GAP-43 Neuromodulina, Proteína 43 Associada ao Crescimento

**GRP78:** proteína de estresse do retículo endoplasmático

**GSK-3:** glycogen synthase kinase 3 (glicogênio sintase quinase 3)

**IC<sub>95</sub>:** intervalo de confiança de 95%

**Ip:** intraperitoneal

**IP<sub>3</sub>:** inositol 1,4,5 trifosfato

**Li:** lítio

**mg/Kg:** miligramas por kilogramas de peso corporal

**p<0,01:** valor p estatisticamente significativo para erro alfa de 1%

**p<0,05:** valor p estatisticamente significativo para erro alfa de 5%

**PUCRS:** Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**TB:** transtorno bipolar

**TB1:** transtorno bipolar tipo 1

**TRON:** tarefa de reconhecimento do objeto novo

**USA:** Estados Unidos da América

**UTI:** unidade de tratamento intensivo

**VAL:** ácido valproíco, valproato de sódio

## Sumário

1. Introdução	13
2. Referencial Teórico	15
2. 1. Ácido Valpróico	15
3. Caracterização do Problema e Justificativa	17
3. 1. Modelos animais de Transtorno Bipolar (TB)	17
3. 2. Relação entre exposição ao estresse no período neonatal e a Manifestação de TB na fase adulta	19
3. 3. Justificativa da proposta	19
4. Objetivos	20
4.1. Objetivos Gerais	20
4.2. Objetivos Específicos	20
5. Metodologia	20
5.1 Animais	20
5.2 Exposição ao estresse no período neonatal (método da privação materna)	21
5.3 Indução de episódios de mania nos animais adultos (modelo de Transtorno Bipolar)	21
5.4 Reversão dos efeitos pelo Ácido Valpróico	21
5.5 Tarefas comportamentais	21
5.5.1 Atividade em Campo Aberto	22
5.5.2 Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (TRON)	23
6. Análise Estatística	24
7. Aspectos Éticos	25
8. Resultados	25
8.1. Atividade em campo aberto	25
8.2. Teste de Reconhecimento do Objeto Novo	29
9. Discussão	33
10. Conclusão	36
11. Perspectivas	37
12. Bibliografia	38
13. Anexos	44

## 1. INTRODUÇÃO

Assim como na história houve o Renascimento nas artes, também na psiquiatria ocorreram avanços que deram início ao “século do cérebro”, com a descoberta dos primeiros antipsicóticos. Foi apenas em 1940 com o surgimento da Clorpromazina que ingressamos nos tempos modernos e evoluímos até a Neuropsiquiatria com os neurotransmissores cerebrais, saindo do medieval para o futuro com a descoberta de vários outros medicamentos como, por exemplo: os antidepressivos tricíclicos, os serotoninérgicos, outros antipsicóticos típicos e atípicos, os moduladores do humor; inicialmente o Lítio e mais tarde os anticonvulsivantes como a Carbamazepina e o Ácido Valpróico.

Nosso interesse em especial recai sobre a droga moduladora do humor Ácido Valpróico, por ser uma nova perspectiva para os pacientes que sofrem do Transtorno do humor bipolar, pois assim como o Lítio, em trabalhos realizados previamente, esta droga também auxilia na plasticidade cerebral atuando como fator de proteção cerebral.<sup>1,2</sup>

Também, escolhemos trabalhar com o Transtorno do humor bipolar, por ser um transtorno com uma alta prevalência. Segundo um estudo epidemiológico multicêntrico realizado em diversas capitais brasileiras, em 1982 em Porto Alegre (POA) os estados depressivos e mania tiveram, respectivamente, uma prevalência de 6,7% e 1%, e somando todos os transtornos mentais avaliados chegamos a 33,7% de transtornos mentais entre adultos em POA. Quanto a adolescentes e crianças, neste mesmo estudo foi encontrada nesta população uma elevada incidência de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade assim como transtornos de conduta, com uma incidência de 47,8%.<sup>1,3</sup>

O Transtorno Bipolar (TB) é um dos tipos de transtorno do humor mais comuns entre a população de adultos. Um indício do aspecto incapacitante dessa desordem pode ser evidenciado através da incidência de altos índices de desemprego e de suicídio entre as pessoas que sofrem de TB.<sup>4,5,6</sup> O TB é caracterizado por sintomas afetivos, cognitivos e comportamentais que geralmente ocorrem em conjunto, sendo que a sua principal marca está na alternância de

episódios de depressão e mania.<sup>7</sup>

Em estudos epidemiológicos de base populacional com métodos semelhantes, as taxas de Depressão Maior (DM) foram maiores em mulheres que em homens. Insônia e perda de energia foram comuns em DM, e também houve mais risco de comorbidade com abuso de substâncias e Transtornos de ansiedade. Os indivíduos separados ou divorciados tiveram maiores taxas de DM em todos os países.<sup>4</sup>

Quanto ao gênero, os homens são mais significativamente associados à mania unipolar, início precoce da doença e maior duração dos episódios maníacos, enquanto as mulheres apresentam mais estados mistos e episódios depressivos, e mais tratamentos para episódios maníacos mistos e depressão maior ( $p < 0,05$ ). O TB tipo 1 (TB1) foi significativamente relacionado à abusos de substâncias psicoativas, transtornos de ansiedade e personalidade, em ambos os sexos.<sup>5,8</sup>

Em adultos, o risco de suicídio também aumenta em associação com o TB. Já nas crianças e adolescentes encontramos dificuldade escolar, repetência, drogadição e dificuldades de relacionamentos. Na infância, muitas vezes os primeiros sintomas encontrados são o comportamento agressivo e impulsivo que podem permanecer com estes indivíduos na idade adulta, e estar associado ao Transtorno instável *Borderline*, agravando ainda mais o quadro do portador de transtorno mental.

Em um estudo global da Organização Mundial de Saúde sobre doenças que levam à incapacidade para o trabalho, em 1990, o TB ocupava a sexta posição entre as 10 principais doenças relacionadas, totalizando 3%, e DM foi o primeiro lugar, representando 10.7% das causas de afastamento para o trabalho.<sup>9</sup>

Quanto ao tratamento, o objetivo principal é manter a estabilidade do humor e atingir a remissão e evitar recidivas da doença. Pouco é conhecido sobre o perfil clínico para risco de recorrência em pacientes portadores de TB tratados conforme os padrões convencionais. Num estudo multicêntrico longitudinal que buscou estudar recidiva e remissão em 1459 participantes, a recidiva foi freqüente e

associada com a presença de sintomas residuais.<sup>9</sup>

Portanto é crucial para estes pacientes o desenvolvimento de drogas que possuam um efeito de proteção cerebral associado à estabilização do humor destes indivíduos.

## 2. Referencial Teórico

### 2. 1. Ácido Valpróico

É por termos esta visão panorâmica sobre o Transtorno Bipolar (TB) que nos interessamos em estudar o papel do Ácido Valpróico (VAL) como estabilizador do humor e a possibilidade de obtermos uma neuroproteção para estes pacientes, pois, ao acompanharmos estes pacientes ao longo dos anos, sabemos que quanto mais viradas maníacas apresentarem, mais perdas cognitivas eles terão.

O TB é uma doença particularmente desafiadora para o desenvolvimento de modelos animais adequados para estudos neurobiológicos. Estas dificuldades são largamente relacionadas às características clínicas peculiares desta doença, com estados alternantes de mania, depressão, eutimia e estados mistos, cuja etiologia e mecanismos cerebrais envolvidos permanecem desconhecidos.

Estudos pré-clínicos com modelos animais para mania ou depressão têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia potencial de novos psicotrópicos e para gerar informações sobre efeitos bioquímicos destas drogas nos alvos específicos. Estes modelos tentam mimetizar os componentes comportamentais da mania e da depressão em humanos e examinam as respostas farmacológicas e os mecanismos de ação das novas drogas em potencial. A principal limitação é que não há modelo semelhante à ciclicidade do humor, o que é característico do TB. Logo, estes modelos não representam paradigmas válidos para o estudo do TB.<sup>10</sup>

O VAL apresenta um efeito no controle das mudanças dos ciclos, ou seja, da mania para a depressão e da depressão para a mania, assim como na impulsividade e na agressividade. Acredita-se que possa inibir a função dos canais de cálcio e ou



sódio, e desta forma potencializar a ação inibitória do GABA, além de reduzir a ação excitatória do glutamato.<sup>1,11,12,13</sup>

O VAL é correntemente usado no tratamento do TB, embora seu mecanismo de ação permaneça incerto. Um estudo *in vitro* utilizando *Caenorhabditis elegans*, um nematódio que serve de modelo genético devido ao seu SNC com muitos componentes iguais aos da transmissão sináptica em mamíferos, demonstrou que o VAL inibe tanto a via do inositol quanto a do diacilglicerol (DAG), ambos da via do inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>).<sup>14</sup>

Foi sugerido que VAL age por inibir a produção de DAG; também reduz níveis de DAG e inositol, mas o PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato) é aumentado, sugerindo que a hidrólise de PIP<sub>2</sub> mediada por fosfolipase C, e que forma DAG e IP<sub>3</sub>, é defeituosa na presença de VAL. Esses resultados levantam a hipótese de que o VAL alivia os sintomas bipolares através da via DAG, que regula a liberação de neurotransmissores; também, DAG e inositol são implicados na regulação de funções neurais, indicando que o VAL também age neste sentido.<sup>1,14</sup>

Estudos com modelos animais reforçam estas teorias, pois o uso crônico do VAL exerce efeito neuroprotetor, inibindo o estresse oxidativo em culturas de células corticais de ratos.<sup>2</sup> Wang e colaboradores (2003) estudaram o VAL e encontraram que o tratamento crônico por 7 dias, em ratos, inibiu a peroxidação lipídica e oxidação protéica induzida por FeCl<sub>3</sub>, sugerindo que tratamento crônico com VAL pode proteger neurônios contra o estresse oxidativo e que isto pode estar envolvido em seu mecanismo de ação.<sup>12</sup>

Em concordância, estudos recentes demonstraram que VAL aumenta a expressão do GRP78 (proteína de estresse do retículo endoplasmático) e aumenta a expressão do fator Bcl-2 antiapoptótico, ambos em córtex de ratos. O GRP78 liga cálcio e dobra proteínas lesadas; o Bcl-2 estabiliza o potencial de membrana mitocondrial e inibe liberação de citocromo-c, e ambos inibem acumulação de oxirradicais.<sup>12,15</sup>

Estudos sugerem o que VAL tem efeito neurotrófico sobre a via ERK, e pode estar envolvido na modulação da GAP-43, uma proteína relevante para o crescimento de axônios e para a modulação de novas conexões; também esteve implicado com outros efeitos do aumento da expressão GRP78 tais como crescimento de axônios e modulação contra efeitos do estresse metabólico. O VAL crônico está associado com aumento da expressão Bcl-2 no cérebro. Juntos, todos estes achados sugerem o papel do VAL como neuroprotetor.<sup>11,12,15</sup>

### 3. Caracterização do Problema e Justificativa

#### 3.1 Modelos animais de Transtorno Bipolar (TB).

Os transtornos do humor estão entre as formas mais prevalentes das doenças psiquiátricas. Os modelos animais são essenciais para o estudo dos processos envolvidos na manifestação desses quadros, bem como para a elaboração de tratamentos farmacológicos adequados. Contudo, sabe-se relativamente pouco sobre a patogênese dos transtornos do humor, o que dificulta a criação de um modelo animal que reproduza de forma adequada aspectos bioquímicos, genéticos e comportamentais dessas doenças.

Geralmente, os modelos animais de TB concentram-se na manifestação de um único episódio de mania. A indução da mania em animais pode ser obtida através de diferentes maneiras: administração de drogas psicoestimulantes, privação do sono e estimulação química (ou elétrica) da amígdala.<sup>16,17,18,19</sup>

Os modelos animais existentes para TB não conseguem completar três critérios básicos: serem semelhantes a clínica, apresentarem bases etiológicas e responderem ao tratamento padrão.<sup>10</sup>

Segundo Machado-Vieira (2004), os modelos que melhor cumprem estes requisitos são aqueles de estimulação química da mania através de modulação dopaminérgica, mas também há modelos de mania com privação do sono, lesão cerebral, estimulação elétrica e modelos genéticos. Já para modelos de depressão, é fundamental mimetizar sinais/sintomas da depressão em humanos ou que seja

responsivo aos tratamentos farmacológicos; alguns dos modelos simulam desespero, avaliam teorias comportamentais e desenvolvimentais, ou permitem o estudo dos mecanismos neuropatológicos, e a maioria foi proposta para avaliar a efetividade de novas drogas pré-clínicas.

Os modelos disponíveis para TB são: comportamento predatório, estimulação elétrica (*Kindling*), potenciação DOPA, depressão induzida por 5-HTP, bulbectomia olfatória, hiperatividade induzida por isolamento, desespero, estresse crônico, modelos de separação, auto-estimulação intracraniana, "auto-socorro" apreendido, teste de natação forçada, linha de natação hipoativa, teste *Flinders*.<sup>20,21,22,23</sup>

Contudo, é a característica da ciclagem entre mania e depressão que constitui o maior desafio; há o modelo de Altelman com uso cíclico de cocaína em alta dose que relacionou respostas hiper e hipoativas em dias alternados; porém além de poucos, os modelos cíclicos também são poucos efetivos para demonstrar e determinar a transição entre os estados de humor, fato importante para TB.

Ambientes e condições de privação ou de estímulos, associados à estresse agudo ou crônico, tanto em animais quanto em humanos, devem ser avaliados devido aos seus efeitos peculiares no desenvolvimento.<sup>16,17</sup> Os modelos de lesão cerebral, que induzem hiperatividade como sintoma maníaco, são limitados, pois podem alterar a sensibilidade e a resposta às drogas estabilizadoras; contudo as lesões em cérebros imaturos podem produzir ratos instáveis, com implicações genéticas inclusive, devendo ser observados por gerações, com implicações na etiologia da doença. Em suma, é necessário desenvolver um modelo que integre mania e depressão.<sup>12</sup>

O modelo animal que utiliza a administração de anfetamina para induzir um episódio de mania tem demonstrado ser um modelo adequado em estudos sobre as possíveis alterações bioquímicas envolvidas na patogênese de TB, bem como nas investigações sobre possíveis estratégias terapêuticas.<sup>24-31</sup>

### 3. 2. Relação entre exposição ao estresse no período neonatal e a manifestação de TB na fase adulta.

A exposição a diferentes tipos de estressores psicossociais nos estágios iniciais de desenvolvimento tem sido apontada como um possível precipitador dos transtornos do humor. Já foi demonstrado que a privação materna no período neonatal em roedores pode induzir um aumento na ansiedade e nos níveis de hormônios do estresse; mudanças nas taxas de neurogênese e apoptose; decréscimo em fatores neurotróficos e enzimas responsáveis pela transdução de sinais importantes para o aprendizado e a cognição.<sup>32,33</sup>

A investigação da relação entre a exposição a eventos estressantes no período de desenvolvimento e a manifestação de episódios de mania na fase adulta em modelos animais pode contribuir para a identificação de mecanismos neurais através dos quais a exposição ao estresse pode estar contribuindo para o desenvolvimento dos transtornos do humor na fase adulta.

### 3. 3. Justificativa

Assim como Frey (2006) demonstrou ser possível a reprodução de quadros de mania em ratos após o uso da anfetamina, também outros estudos realizados previamente em nosso laboratório com modelos animais foram efetivos para o desenvolvimento do Transtorno do humor Bipolar em ratos.

O desenvolvimento de um modelo animal de mania nos permitirá ampliar nossas pesquisas para o estudo de uma possível interação entre a exposição ao estresse no período neonatal e à anfetamina na idade adulta (indução de episódio de mania) sobre aspectos cognitivos. Ainda, com o estabelecimento deste modelo pretendemos investigar o possível efeito neuroprotetor de medicamentos estabilizadores do humor como o Ácido Valpróico.<sup>1,25</sup>

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivos Gerais

Avaliar a relação entre a exposição ao estresse no período neonatal e a indução de episódios de mania (modelo de Transtorno Bipolar) na fase adulta, e os efeitos do tratamento com Ácido Valpróico em ratos.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos comportamentais (através da medida da atividade em campo aberto e da tarefa de reconhecimento do objeto novo) da exposição ao estresse no período neonatal (através do método de privação materna) e da indução de episódios de mania (através do tratamento crônico com anfetamina) na fase adulta.
- Avaliar os efeitos do tratamento com Ácido Valpróico sobre as alterações comportamentais induzidas pela combinação da exposição ao estresse no período neonatal e à anfetamina na idade adulta.

## 5. Metodologia

### 5.1 Animais

Ratas Wistar prenhas foram obtidas da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS-RS). Cada rata foi acomodada individualmente em uma caixa de moradia. Cada ninhada foi ajustada em 8 filhotes de ambos os sexos e mantida com sua respectiva mãe em sua caixa de moradia em ambiente climatizado com ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo alimentação comercial e água *ad libitum*.

Os filhotes foram desmamados com 30 dias de vida e os machos foram colocados em grupos de 3 a 5 ratos por caixa. Em todos os experimentos, foram utilizados somente os animais machos. Os grupos experimentais foram compostos

por 10 a 12 animais em cada um para as tarefas comportamentais, visto que esse tamanho de amostra demonstrou ser adequado para os tipos de experimentos realizados.<sup>18,24-26,29-31,34-38</sup>

Ao total foram 8 grupos experimentais subdivididos em 2 grupos de animais: não-separados (NS) e separados (S) da mãe.

## 5.2. Exposição ao estresse no período neonatal (método da privação materna)

Os filhotes (Figura1) foram divididos em dois grupos experimentais:

- 1) manipulados, não separados (NS) (grupo controle): os que não foram separados de suas mães, exceto diariamente por 15 minutos para serem pesados, e
- 2) os que foram separados (S) de suas mães diariamente por um período de 180 minutos do 1° ao 14° dia de vida pós-natal das ninhadas.



Figura 1: ninhada dos ratos Wistar

Durante o período de separação, as caixas de moradia das ninhadas foram colocadas sobre uma superfície aquecida, a 30-33°C (graus centígrados), em uma sala com as mesmas condições de temperatura e luminosidade que a sala onde os outros animais da colônia foram mantidos. Nesse período, as ninhadas não tiveram acesso à água e à ração.<sup>39-41</sup>

### 5.3 Indução de episódios de mania nos animais adultos (modelo de Transtorno Bipolar)

Os mesmos animais expostos ao estresse no período neonatal (com seu respectivo grupo controle) foram subdivididos em dois outros grupos, submetidos a um tratamento com uma solução Salina (grupo controle) ou D-anfetamina (Sigma, St. Louis, MO/USA) na dose de 2,0 mg/Kg/ip (intra-peritoneal) por 7 dias consecutivos, a fim de induzir a manifestação de um episódio de mania.<sup>24-31</sup>

### 5.4 Reversão dos efeitos pelo Ácido Valpróico

Alguns trabalhos com culturas de células de animais tem demonstrado que o Ácido Valpróico (VAL) possui um papel neuroprotetor uma vez que inibe o estresse oxidativo, desta forma contribuindo para uma diminuição no dano cerebral, pois sabemos que durante os quadros de mania existe um aumento do estresse oxidativo que colabora para que haja um maior dano cerebral nestes indivíduos.<sup>1,42</sup>

Os grupos de ratos foram subseqüentemente divididos em dois grupos na fase adulta: um grupo recebeu 200mg/Kg/ip de VAL duas vezes ao dia por 7 dias e o outro grupo a mesma quantidade correspondente em mililitros/ip de solução Salina.

### 5.5 Tarefas comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados, respectivamente, 2 (duas) horas e 7 (sete) dias após o término dos tratamentos farmacológicos.

#### 5.5.1 Atividade em Campo Aberto

Os animais foram colocados no canto esquerdo de uma caixa de campo aberto (caixa de madeira com a face frontal de vidro medindo 45 x 40 x 60 cm) cujo assoalho é dividido em 12 quadrados iguais por linhas pretas (Figura 2).

A sessão de treinamento teve duração de 5 (cinco) minutos, durante os quais o animal pode explorar a caixa livremente.

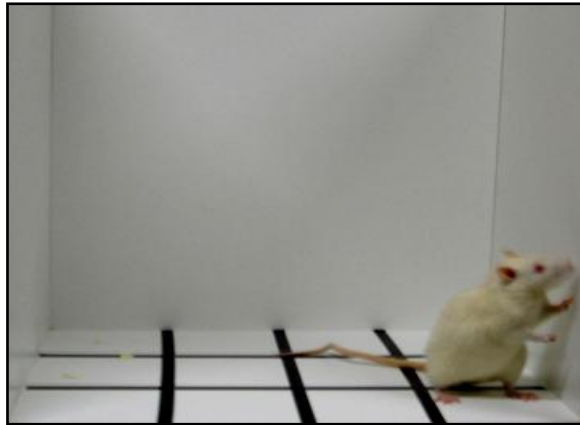


Figura 2: teste no campo aberto

Durante o teste foram registrados o número de cruzamentos, o número de respostas de orientação e de exploração vertical (quando o animal estiver explorando o ambiente apoiado somente nas patas traseiras, estando as patas dianteiras livres e não apoiadas no fundo da caixa –ereto).<sup>37,38,43</sup>

#### 5.5.2 Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo

Os animais foram submetidos à Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo (TRON) em 24 (vinte e quatro) horas após a medida da atividade em campo aberto. A tarefa foi realizada na mesma caixa utilizada para medir a atividade em campo aberto, acrescida de serragem sobre o seu assoalho.

No primeiro dia de execução da tarefa, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos serão colocados no campo aberto e o animal pode explorá-los durante 5 minutos (Figura 3).

O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi registrado, utilizando-se dois cronômetros.

Durante as sessões de teste de retenção, uma de Memória de Curta Duração (STM) realizada 1,5 horas após o treino e outra de Memória de Longa Duração (LTM) realizada 24 horas após o treino, o rato foi colocado novamente na mesma caixa, onde um dos objetos já familiares utilizado na sessão de treino foi substituído por um objeto novo.



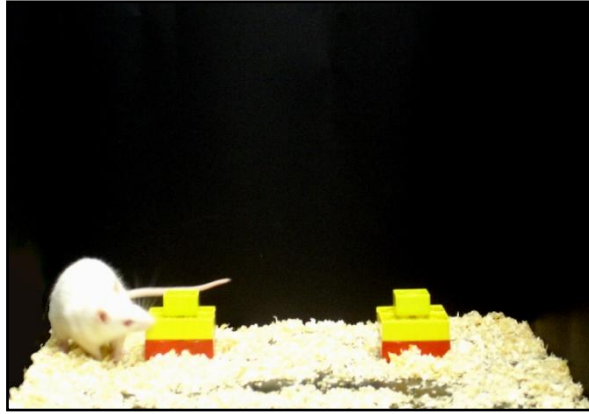


Figura 3: TRON treino de 5 minutos

As sessões de teste tiveram duração de 5 minutos cada uma. Um índice de referência (IR), a razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou o objeto novo (sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento, calculado conforme a fórmula abaixo:<sup>18,34-38</sup>

$$IR = \frac{\text{Tempo gasto explorando o objeto novo}}{\text{Tempo gasto de exploração dos dois objetos}}$$

## 6. Análise Estatística

Os resultados do comportamento em campo aberto foram expressos como média  $\pm$  (mais ou menos) erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey.

Os resultados da Tarefa de Reconhecimento de Objeto Novo estão expressos através da mediana (intervalos interquartis). As comparações entre os grupos foram feitas através de análise de variância de Kruskal-Wallis seguida pelo teste U de Mann-Whitney, quando necessário. As comparações dentro do grupo foram feitas utilizando-se o teste de Wilcoxon. Em todas as comparações,  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.<sup>18,34-38</sup>

## 7. Aspectos Éticos

Todos os experimentos foram desenvolvidos seguindo o Guia para Cuidados Animais e Utilização de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América e as recomendações para utilização de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNec). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA) da PUCRS (ofício nº 424/08).

## 8. Resultados

### 8.1. Atividade em campo aberto

No experimento I (realizado 2 horas após a administração da última injeção), ambos os grupos não separado (NS) e separado (S) de animais que receberam Anfetamina (D-AMPH) na idade adulta apresentaram aumento no número de cruzamentos ( $p = 0.015$  e  $p = 0.004$ , respectivamente) e no número de explorações verticais ( $p = 0.023$  e  $p = 0.044$ , respectivamente) quando comparados ao grupo NS que recebeu Salina na idade adulta (Figuras 4A e B).

O grupo NS e o grupo S que receberam VAL não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao número de cruzamentos e explorações verticais quando comparados aos grupos NS e S que receberam Salina ( $p = 0.217$  e  $p = 0.259$ , respectivamente para o número de cruzamentos;  $p = 0.995$  e  $p = 0.591$ , respectivamente para o número de explorações verticais) indicando que o tratamento com VAL por si não afetou a performance dos grupos nos parâmetros analisados.

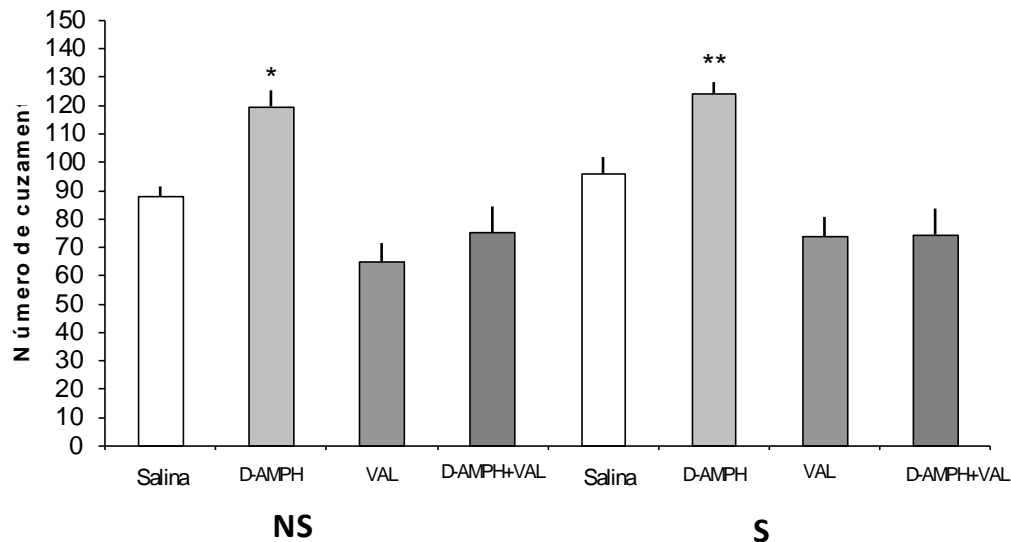
Em contraste, quando os animais NS e S receberam o tratamento combinado (D-AMPH e VAL), o VAL levou a redução do número de cruzamentos e explorações verticais quando comparados aqueles grupos de animais NS e S que receberam D-AMPH ( $p < 0.001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente para comparação com relação aos grupos: NS + D-AMPH + VAL;  $p < 0.001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente comparados aos S + D-AMPH + VAL quanto ao número de cruzamentos;  $p = 0.002$  e  $p = 0.006$ ,

respectivamente; comparando o NS + D-AMPH + VAL;  $p = 0.001$  e  $p = 0.002$ , respectivamente e comparando o S + D-AMPH + VAL quanto ao número de explorações verticais).

No experimento II (realizado 7 dias após a aplicação da última injeção), não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos experimentais quanto aos parâmetros analisados (Figuras 4C e D).

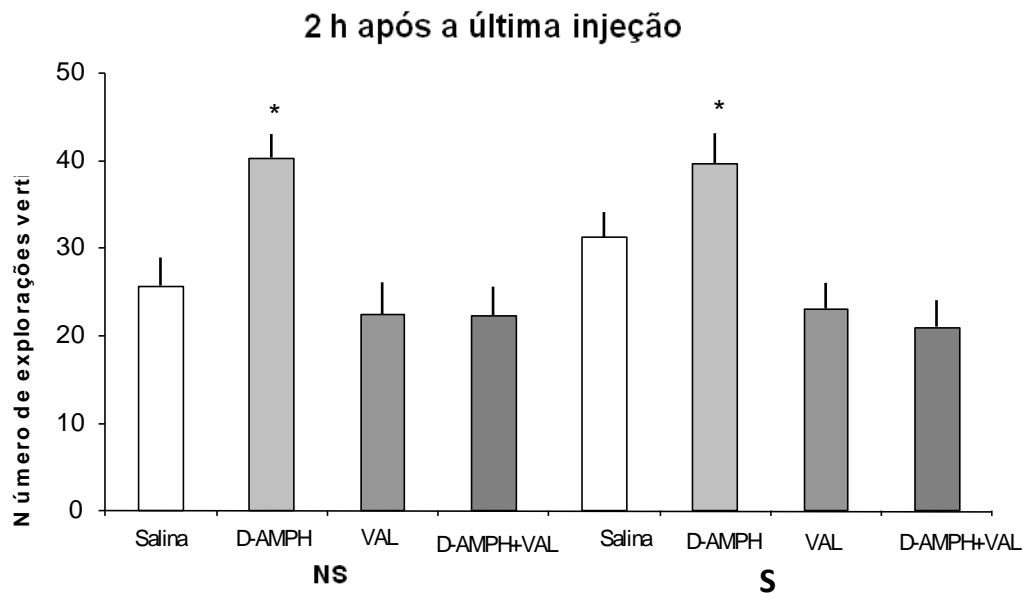
Atividade em campo aberto quanto ao número de cruzamentos (2 horas após o término dos tratamentos farmacológicos):

### 2 h após a última injeção



**Figura 4 A:** Parâmetro de número de cruzamentos no campo aberto em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 2 horas após o término dos tratamentos farmacológicos. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre Salina+Salina versus outros grupos estão indicadas como: \* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos.

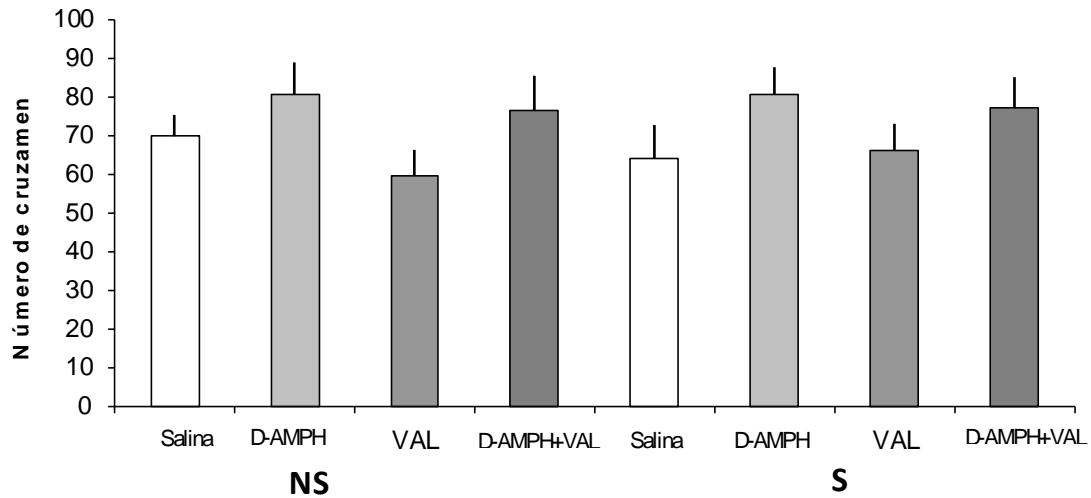
Atividade em campo aberto quanto ao número de explorações verticais (2 horas após o término dos tratamentos farmacológicos):



**Figura 4B:** Parâmetro de número de explorações verticais no campo aberto em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 2 horas após o término dos tratamentos farmacológicos. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre Salina+Salina versus outros grupos estão indicadas como: \* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos.

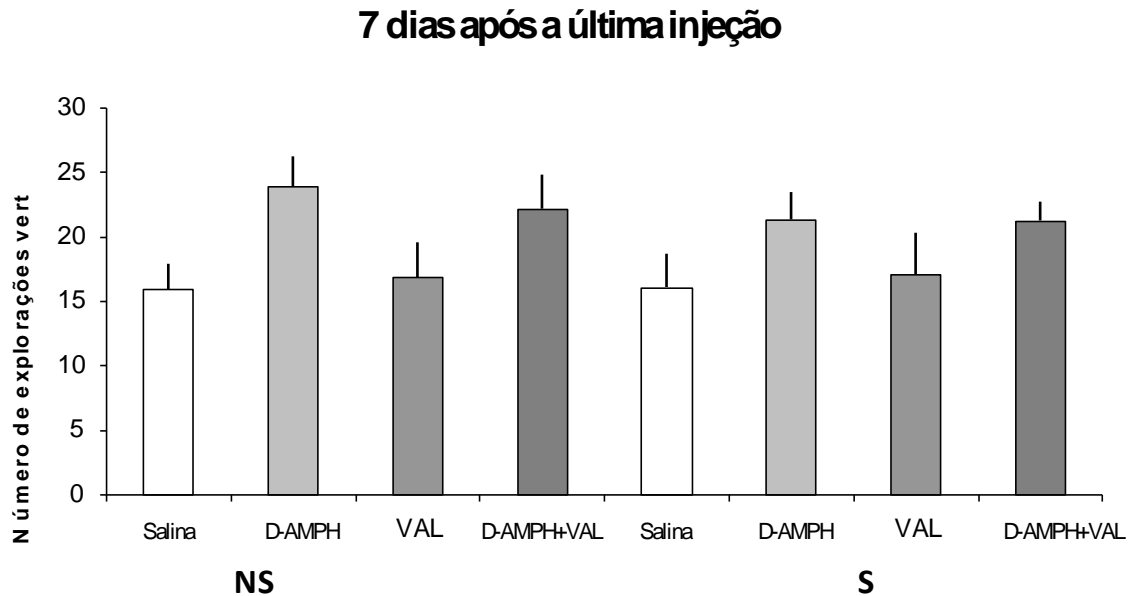
Atividade em campo aberto quanto ao número de cruzamentos (7 dias após término dos tratamentos farmacológicos):

### 7 dias após a última injeção



**Figura 4C:** Parâmetro de número de cruzamentos no campo aberto em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 7 dias após a aplicação da última injeção. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre sal+sal versus outros grupos estão indicadas como: \* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos; \*\* $p < 0,01$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos "+"  $p < 0,05$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos.

Atividade em campo aberto quanto ao número de explorações verticais (7 dias após os tratamentos farmacológicos):



**Figura 4D:** Parâmetro do número de explorações verticais no campo aberto em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Salina + Anfetamina (D-AMPH); Salina + Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 7 dias após a aplicação da última injeção. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre sal+sal VS outros grupos estão indicadas como: \* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos; \*\* $p < 0,01$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos "+"  $p < 0,05$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos.

## 8.2. Teste de Reconhecimento do Objeto Novo

No experimento I, realizado 24 horas após a aplicação da última injeção (Figura 5A), o teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre grupos nas preferências exploratórias e no teste de retenção memória de curta duração (STM) e de longa duração (LTM) ( $df = 7$ ,  $NS = 24.681$ ,  $p = 0.001$  para STM e  $df = 7$ ,  $H = 43.172$ ,  $p < 0.001$  para LTM, mas não no treino ( $df = 7$ ,  $NS = 3.189$ ,  $p = 0.867$ ).

Além disso, análises com teste de Mann-Whitney demonstraram que os grupos NS ( $p < 0.001$ ) e S ( $p < 0.001$ ) tratados com D-AMPH na idade adulta apresentaram prejuízo de LTM quando comparados com o grupo NS que recebeu salina.

Interessantemente, nós encontramos que os efeitos da D-AMPH foram mais

pronunciados no grupo S, após eles também apresentaram STM prejudicada quando comparado ao grupo de animais NS que receberam salina ( $p = 0.015$ ), e S animais que receberam somente D-AMPH ( $p = 0.011$ ).

Animais S que receberam Salina demonstraram apenas prejuízos na LTM quando comparados com animais NS que receberam Salina ( $p < 0.001$ ).

Ambos os grupos NS que receberam VAL e o tratamento combinado de D-AMPH + VAL apresentaram prejuízos na LTM quando comparados aos animais NS que receberam salina ( $p = 0.001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente). Mas o grupo NS que recebeu o tratamento combinado apresentou escores mais altos no teste de retenção de LTM do que o grupo NS que recebeu D-AMPH ( $p = 0.001$ ), indicando que o tratamento com VAL pode ter exercido efeito protetor contra a toxicidade induzida pela D-AMPH.

Igualmente uma LTM prejudicada foi verificada no grupo S que recebeu VAL e o tratamento combinado de D-AMPH + VAL quando comparado aos animais NS que receberam salina ( $p = 0.010$  e  $p < 0.001$ , respectivamente).

É importante ressaltar que o VAL não foi capaz de proteger contra a toxicidade induzida pela D-AMPH no grupo S que recebeu o tratamento combinado, após estes grupos apresentaram STM e LTM prejudicada quando comparados aos animais NS que receberam salina ( $p = 0.001$  e  $p < 0.000$ , respectivamente) e STM prejudicada quando comparados com animais S que receberam salina ( $p = 0.001$ ).

Adicionalmente, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo S que recebeu D-AMPH e o grupo S que recebeu o tratamento combinado nos testes de retenção de STM e LTM ( $p = 0.809$  e  $p = 918$ , respectivamente).

Para determinar, se os déficits de memória persistiriam por mais de uma semana após o tratamento com D-AMPH, os ratos foram retreinados e testados 8 dias após a última injeção (Experimento II, Figura 5B).

O teste Kruskal-Wallis demonstrou diferença significativa entre os grupos na

preferência exploratória nos testes de STM e LTM ( $df = 7$ ,  $NS = 23.425$ ,  $p = 0.001$  para STM e  $df = 7$ ,  $NS = 37.601$ ,  $p < 0.001$  para LTM, só não no treino ( $df = 7$ ,  $NS = 5.776$ ,  $p = 0.566$ ).

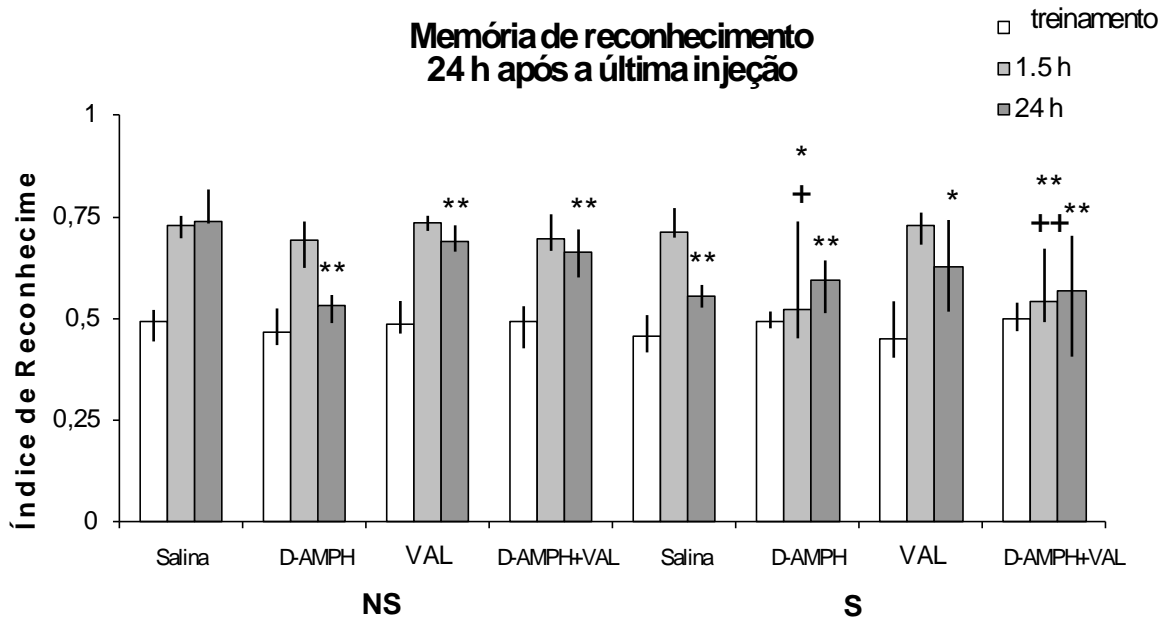
Além disso, análises com teste de Mann-Whitney demonstraram que animais NS e S tratados com D-AMPH no período adulto ainda mostraram STM e LTM prejudicadas quando comparados com animais NS que receberam salina ( $p < 0.001$  para LTM no grupo NS;  $p < 0.001$  para STM e  $p < 0.001$  para LTM no grupo S).

Animais S que receberam salina também conservaram a LTM prejudicada quando comparados aos animais NS que receberam salina ( $p < 0.001$ ). Ambos os grupos NS que receberam VAL e o tratamento combinado de D-AMPH + VAL não mostraram diferenças estatísticas quando comparados aos animais NS que receberam salina. Igualmente o efeito não foi notado nos grupos S que receberam VAL e o tratamento combinado de D-AMPH + VAL quando comparados aos animais NS que receberam salina considerando o teste de retenção LTM ( $p = 0.001$  e  $p < 0.001$ , respectivamente).

Além disso, o prejuízo de LTM persistiu no grupo S que recebeu o tratamento combinado quando comparado aos animais NS que receberam salina, o prejuízo de STM não foi encontrado 8 dias após a última injeção ( $p = 0.630$ ). Também, o grupo S, que recebeu o tratamento combinado apresentou um melhor desempenho no teste de retenção STM quando comparado aos animais S que receberam D-AMPH ( $p < 0.001$ ).



Tarefa de Reconhecimento do Objeto I (24 horas após os tratamentos farmacológicos):



**Figura 5A:** Teste de memória de reconhecimento do objeto em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 24 horas após o término dos tratamentos farmacológicos. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre Salina+Salina versus outros grupos estão indicadas como: \* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos.

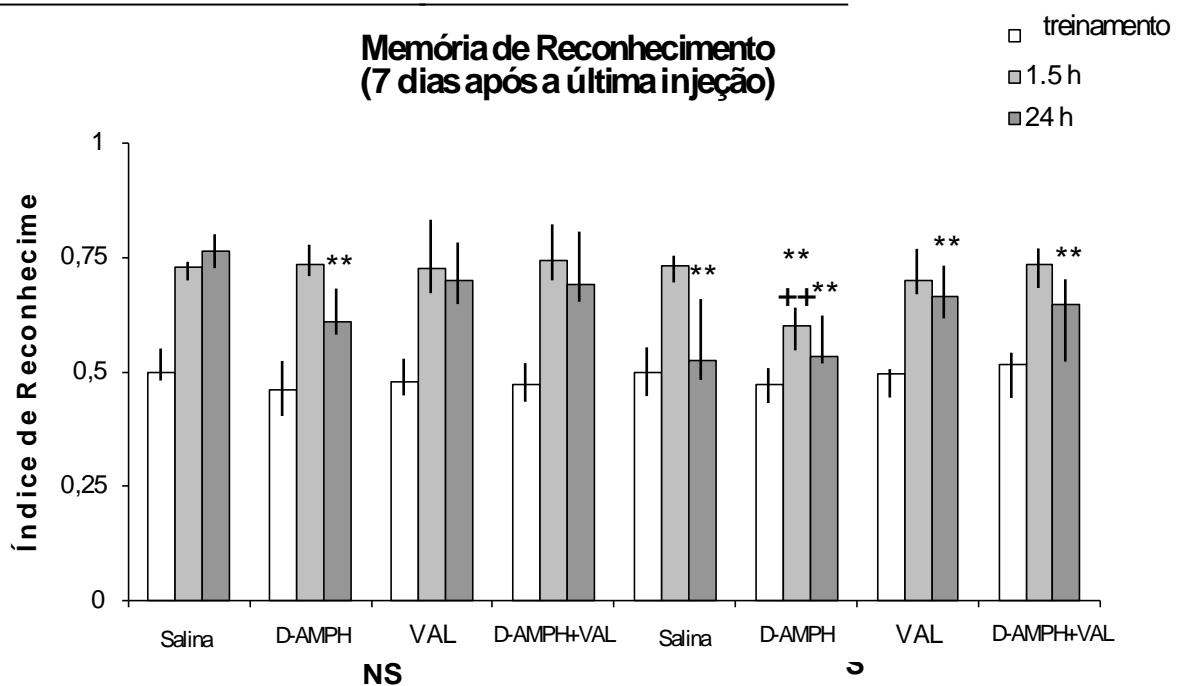
\* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos

\*\* $p < 0,01$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos

+ $p < 0,05$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos

++ $p < 0,01$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos

Tarefa de Reconhecimento do Objeto II (7 dias após os tratamentos farmacológicos):



**Figura 5B:** Teste para memória de reconhecimento em ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL. Experimento realizado 7 dias após o término dos tratamentos farmacológicos. Dados expressos como médias  $\pm$  E.P. N=10-13 animais por grupo. Diferenças entre os grupos estão indicadas como:

\* $p < 0,05$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos

\*\* $p < 0,01$  na comparação entre NS+Salina versus outros grupos

+ $p < 0,05$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos

++ $p < 0,01$  na comparação entre S+Salina versus outros grupos

## 9. Discussão

Apesar de extensa investigação, as bases celulares e moleculares do Transtorno Bipolar (TB) ainda não foram completamente elucidadas.

Dados recentes demonstraram que os estabilizadores do humor exercem efeitos importantes sobre a sinalização nas vias que regulam a plasticidade celular, no entanto, uma extrapolação direta aos mecanismos da doença exige a prova de que a manipulação de genes candidatos e proteínas podem resultar em vias relevantes para mudanças comportamentais.<sup>2</sup>

Não surpreendentemente, os dados comportamentais sugerem que várias importantes moléculas sinalizadoras poderiam desempenhar um papel importante na mediação da sintomatologia complexa do TB.<sup>11,15</sup> Vários estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel nas alterações neuroquímicas e comportamentais observados após a administração de anfetaminas (AMPH).

Períodos mais longos de exposição à AMPH foram associados com aumento do estresse oxidativo no cérebro de ratos. Isso acrescenta evidências à noção de que repetidos episódios de mania podem estar associados com maior dano cerebral e, portanto, resultados mais pobres.<sup>18-20,27,28,35</sup>

Em nossa pesquisa investigamos a atividade em campo aberto com ratos Wistar adultos que foram submetidos a duas condições no período neonatal: não separados (NS) e separados (S) da mãe. Na idade adulta estes animais foram subdivididos em grupos que receberam os seguintes tratamentos farmacológicos: Salina; Anfetamina (D-AMPH); Valproato (VAL) e D-AMPH + VAL.

Nos testes comportamentais que foram realizados 2 horas após o término dos tratamentos farmacológicos, os grupos de animais que foram tratados com AMPH apresentaram um aumento do número de cruzamentos e explorações verticais tanto no grupo NS como no grupo S, sugerindo que o modelo animal cumpre requisitos de perfil adequado, construção e validade preditiva para um modelo mania.

Existem janelas de tempo críticas para o desenvolvimento, durante o qual a exposição ao estresse imprevisível pode afetar o adulto quanto às funções emocionais e sociais, sem afetar a função cognitiva. O impacto de experiências adversas precoces no comportamento emocional adulto tem sido descrito tanto clínica quanto experimentalmente.<sup>44,45</sup>

Estudos clínicos resultaram na hipótese de "*two-hits*" (2 eventos críticos): distúrbios emocionais (stress, negligência, abusos) muito precoces (primeiro *hit*), podem levar a uma vulnerabilidade à longo-prazo que propicia o segundo hit (stress e abusos em idades mais tardias), e que então podem induzir o surgimento de transtornos mentais, tal como depressão ou esquizofrenia.<sup>44-47</sup>

Consideramos este fato relevante, pois em nossa pesquisa o somatório de danos (AMPH+Estresse neonatal) implicou na incapacidade da reversão dos déficits cognitivos quando da idade adulta dos animais testados e tratados com VAL.

Avaliamos a Memória de Curto-prazo (STM) e Memória de Longo-prazo (LTM) 8 dias após o término dos tratamentos farmacológicos. O VAL reverteu o efeito apenas da D-AMPH e não conseguiu reverter os efeitos quando associamos os efeitos deletérios da D-AMPH e da separação materna. O que nos faz pensar que os danos cerebrais ocorridos na vigência de estresse neonatal infelizmente talvez não consigam ser revertidos totalmente pelos moduladores do humor na idade adulta.

McPherson e colaboradores (2007) observaram que crianças expostas ao estresse em UTI - Neonatal podem apresentar efeitos permanentes na saúde quando adultos e considerou ser necessário um modelo animal que simulasse o impacto desta experiência para entender o impacto de determinados estressores, ao fazê-lo, observaram que o estresse neonatal significativamente aumentou a mortalidade enquanto estresse neonatal e morfina retardaram o crescimento infantil, em ratos.<sup>46</sup>

Portanto estudos que procurem relacionar os danos ocorridos em virtude de eventos ocorridos no transcorrer do período de desenvolvimento materno infantil são de uma relevância crucial.

Em nosso trabalho, ao testarmos a Memória de Reconhecimento de Curta duração (STM) e Longa duração (LTM), encontramos que tanto a STM quanto a LTM são afetadas pelo estresse neonatal assim como também pelo uso de drogas como a D-AMPH.

O VAL é usado como estabilizador do humor e cada vez mais existem sugestões quanto ao fato de ser neuroprotetor. Um estudo experimental controlado, sugeriu que o tratamento crônico com VAL pode proteger neurônios contra o estresse oxidativo e que este fato pode estar envolvido em seu mecanismo de ação.<sup>12</sup>

Frey e colaboradores (2006) também investigaram os efeitos do lítio (Li) e VAL, em um modelo animal de TB baseado em D-AMPH, sobre atividade motora (em campo aberto) e níveis BDNF no hipocampo. Li e VAL reverteram efeitos comportamentais locomotores induzidos pela D-AMPH.<sup>23,24,30,48</sup>

Em nosso modelo animal de mania o VAL no teste comportamental realizado 2 horas após os tratamentos farmacológicos conseguiu reverter os efeitos quanto ao número de cruzamentos e explorações verticais aumentados após o uso da D-AMPH e também quando em associação com o estresse neonatal, o que nos reafirma o seu efeito como modulador do humor.

Mas ao associarmos estresse neonatal e D-AMPH o tratamento com VAL não conseguimos observar uma reversão dos efeitos nos testes realizados 8 dias após os tratamentos farmacológicos. Reforçando a importância do período de vida neonatal como fator relevante na prevenção do surgimento de patologias mentais na idade adulta.

Gostaríamos de salientar que se faz necessário que surjam novos estudos nesta área no intuito de que se possa vislumbrar melhor os mecanismos envolvidos nos transtornos mentais e nas drogas a serem usadas.

Os resultados obtidos pelo nosso grupo estão de acordo com as linhas de pesquisa desenvolvidas anteriormente e reafirmam os dados encontrados na literatura, em virtude do crescente interesse nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos transtornos mentais, e conseqüentemente na busca de modelos animais e novas drogas que nos façam compreender melhor os mecanismos envolvidos no sofrimento mental.

## 10. Conclusão

Nosso trabalho vem ao encontro dos trabalhos anteriores reforçando o papel dos Estabilizantes do Humor como o Ácido Valpróico no mecanismo de Neuroproteção dos Transtornos do Humor como o Transtorno Bipolar.

Os dados apóiam a idéia de que a regulação da plasticidade celular está envolvida no desenvolvimento de mudanças de comportamento afetivos, como observadas no Transtorno Bipolar. Estas descobertas estão levando ao desenvolvimento de novas terapêuticas para esta doença devastadora.

A conclusão mais relevante ao nosso entender é que o estresse quando ocorrido no período neonatal poderá vir a ocasionar danos na idade adulta. Danos estes que infelizmente talvez os fármacos atualmente disponíveis não consigam reverter.

## 11. Perspectivas

Estudos na área da neuroproteção cerebral são necessários, pois nos auxiliam a compreender melhor os fatores envolvidos nos transtornos mentais, pois com base nos dados obtidos no presente momento não nos é possível extrapolar os resultados ainda para seres humanos.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. Robin S. B. Williams, Lili Cheng, et al. (2002). "A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs." Nature **417**: 292-295.
2. Li Shao, Trevor Young, et al. (2005). "Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells." Biological Psychiatry **58**: 879-884.
3. Marcelo Feijó de Mello, Andrea de Abreu Feijó de Mello, et al. (2007). Epidemiologia da Saúde Mental no Brasil. Porto Alegre: Artmed.
4. Myrna M. Weissman, Roger C. Bland, et al. (1996). "Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder." Journal of American Medical Association **276**(4): 293-9.
5. Bridget F. Grant, Frederick S. Stinson, et al. (2005). "Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I and II disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions." Journal of Clinical Psychiatry **66**(10): 1205-1215.
6. Michael Bauer, Bruno Muller-Oerlinghausen, et al. (2002). "Bipolar disorder." The Lancet **359** (9302): 241-247.
7. Association, A. P. (2000). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4<sup>th</sup> Edition. Washington, D.C, American Psychiatric Association.
8. Yatham LN, Kennedy SH, et al. (2005). "Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) guidelines for the management of patients with bipolar disorder: consensus and controversies." Bipolar Disorders **7**(suppl 3): 5-69.

9. Roy H. Perlis, Michael J. Ostacher, et al. (2006). "Predictors of recurrence in bipolar disorder: primary outcomes from the Systematic Treatment Enhancement Program for Bipolar Disorder (STEP-BD)." American Journal of Psychiatry **163**: 217-224.
10. Rodrigo Machado-Vieira, Flavio Kapczinski, et al. (2004). "Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **28**(2204): 209 - 224.
11. Kenji Hashimoto, Eiji Shimizu, et al. (2004). "Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders." Brain Research Reviews **45**: 104-114.
12. Wang JF, Azzam JE, et al. (2003). "Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells." Neuroscience **116**: 485-489.
13. Macritchie K, Geddes JR, et al. (2002). "Valproate for acute mood episodes in bipolar disorder." The Cochrane Library **2008**(2).
14. Suzumi Tokuoka, Adolfo Saiardi, et al. (2008). "The mood stabilizer valproate inhibits both inositol- and diacylglycerol-signaling pathways in *Caenorhabditis elegans*." Molecular Biology of the Cell **19**: 2241-2250.
15. Haim Einat and H. K. Manji (2006). "Cellular plasticity cascades: genes-to-behavior pathways in animal models of bipolar disorder." Biological Psychiatry **59**: 1160-1171.
16. Cryan JF and S. DA (2007). "Animal models of mood disorders: Recent developments." Current Opinion Psychiatry **20**(1): 1-7.
17. Gessa GL, Pani L, et al. (1995). "Animal Models of Mania." Advances in Biochemical Psychopharmacology **49**: 43-66.
18. Schröder N, O'Dell SJ, et al. (2003). "Neurotoxic methamphetamine regimen



severely impairs recognition memory in rats." Synapse **49**(2): 89-96.

19. Emily J. Jaehne, Abdallah Salem, et al. (2005). "Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related amphetamines on autonomic and behavioral thermoregulation." Pharmacology, biochemistry, and behavior **81**: 485-496.

20. K. Antoniou, E. Kafetzopoulos, et al. (1998). "D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats." Neuroscience and biobehavioral reviews **23**(2): 189-196.

21. Patricia K. Sonsalla, William J. Nicklas, et al. (1989). "Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity." Science **243**(4889): 398-400.

22. Dennis L. Murphy, H. Keith H. Brodie, et al. (1971). "Regular induction of hypomania by L-Dopa in "Bipolar" Manic-depressive patients." Nature **229**: 136-137

23. Francesco Angelucci, Luigi Aloe, et al. (2003). "Lithium treatment alters brain concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression." The International Journal of Neuropsychopharmacology **6**: 225-231.

24. Frey BN, Valvassori SS, et al. (2006). "Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania." Journal of Psychiatry Neuroscience **31**(5): 326-32.

25. Frey BN, Valvassori SS, et al. (2006). "Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania." Neurochemical Research **31**(5): 699-703.

26. Frey BN, Andreazza AC, et al. (2006). "Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania." Behavioural Pharmacology **17**(4): 311-8.

27. Frey BN, Valvassori SS, et al. (2006). "Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure." Brain Research **1097**(1): 224-9.
28. Frey BN, Martins MR, et al. (2006). "Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania." Bipolar Disorders **8** (3): 275-80.
29. Frey BN, Andreazza AC, et al. (2006). "Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania." Life Science **79**(3): 281-6.
30. Walz JC, Frey BN, et al. (2008). "Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania." Journal of Psychiatric Research **42**(5): 416-21.
31. Correa C, Amboni G, et al. (2007). "Effects of lithium and valproate on hippocampus citrate synthase activity in an animal model of mania." Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry **31**(4): 887-91.
32. Post RM, Leverich GS, et al. (2001). "Developmental vulnerabilities to the onset and course of bipolar disorder." Development and Psychopathology **13**(3): 581-98.
33. Bremne JD and V. E. (2001). "Stress and development: behavioral and biological consequences." Development and Psychopathology **13**(3): 473-89.
34. De Lima MN, Luft T, et al. (2006). " Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory." Neuroscience Letters **405**(1-2): 142-6.
35. De Lima MN, Polydoro M, et al. (2005). "Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration." European Journal of Neuroscience **21**(9): 2521-8.
36. De Lima MN, Laranja DC, et al. (2005). "Selegiline protects against recognition

memory impairment induced by neonatal iron treatment." Experimental Neurology **196**(1): 177-83.

37. De Lima MN, Dias CP, et al. (2008). "Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats." Neurobiology of Aging **29**(7): 1052-9.

38. De Lima MN, Presti-Torres J, et al. (2007). "Differential effects of low and high doses of topiramate on consolidation and retrieval of novel object recognition memory in rats." Epilepsy and Behavior **10**(1): 32-7.

39. S., Levine. (1967). "Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats." Science **156**(772): 258-60.

40. Francis DD, Diorio J, et al. (2002). "Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity." Journal of Neuroscience **22**(18): 7840-3.

41. Pryce CR, Bettschen D, et al. (2003). "Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats." Behavioural Neuroscience **117**(5): 883-93.

42. Teng, C.-T. and F. N. Demetrio (2006). Psicofarmacologia Aplicada. São Paulo, Atheneu.

43. De Lima MN, Laranja DC, et al. (2005). "Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl." Experimental Gerontology **40**(6): 506-11.

44. Erika Toth, Avi Avital, et al. (2008). "Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function." Behavioural Brain Research **190**: 135-139.

45. De Lima MN, Presti-Torres J, et al. (2009). "Cognitive deficits induced by maternal deprivation in an animal model of mania: possible relation with brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels." Bipolar Disorders (*in press*)

46. McPherson RJ, Gleason C, et al. (2007). "A new model of neonatal stress which produces lasting neurobehavioral effects in adult rats." Neonatology **92**: 33-41.
47. Staci D. Bilbo, Nicholas J. Newsom, et al. (2007). "Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood." Brain, behavior, and immunity **21**: 332-342.
48. Benjamin D. Phillis, Jennifer Ong, et al. (2001). "Modification of d-amphetamine-induced responses by baclofen in rats." Psychopharmacology **153**: 277-284.

### 13. Anexos

Elsevier Editorial System(tm) for Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid

Article Type: Research Paper

Keywords: bipolar disorder; D-amphetamine; maternal deprivation; recognition memory; valproic acid

Corresponding Author: Dr. Nadja Schröder,

Corresponding Author's Institution: Pontifical Catholic University

First Author: Rose Mary C Pinheiro

Order of Authors: Rose Mary C Pinheiro; Maria M de Lima, Ph.D.; Vanessa A Garcia; Juliana Presti-Torres; Luis H Hallmenschlager; Luisa A Alcalde; Rafael Roesler, PhD; Monica L Andersen, PhD; João Quevedo, PhD; Flavio Kapczinski, PhD; Nadja Schröder

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: It has been suggested that experiences taking place early in life have a profound influence on brain development, determining individual differences in the vulnerability to environmental pathogens later in life. Here, we investigated the effects of exposure to early life stress (maternal deprivation) and to an environmental pathogen in adulthood (D-amphetamine administration) on cognition. We found that repeated D-amphetamine exposure produces severe cognitive impairment, which was more pronounced when the animals were maternally deprived, suggesting that an early adverse life event may increase the vulnerability to an environmental pathogen later in life. In addition, we found that valproic acid ameliorated the cognitive deficits induced by D-amphetamine, but it was not effective when the animals were exposed to both maternal deprivation and D-amphetamine.

Suggested Reviewers: Robert M Post PhD  
George Washington University School of Medicine  
robert.post@speakeasy.net

Dr. Post is a world leader in the field of the relation between stress and bipolar disorder.

Benicio N Frey PhD  
McMaster University  
Benicio.frey@gmail.com

Dr. Frey is an expert in the field and was one of the researchers leading the development of the animal model used in this study.

Opposed Reviewers:

## **ETHICAL STATEMENT**

for manuscript entitled ***“Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid”***

**By Rose Mary Carvalho Pinheiro, Maria Noêmia Martins de Lima, Vanessa Atháide Garcia, Juliana Presti-Torres, Luis Henrique Hallmenschlager, Luisa Azambuja Alcalde , Rafael Roesler, Monica Levy Andersen, João Quevedo, Flávio Kapczinski, Nadja Schröder**

We hereby confirm that all the experimental procedures described in this study were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication number 80-23 revised 1996) and approved by the Institutional Animal Care Committee of the Pontifical Catholic University. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Nadja Schröder, PhD (Corresponding author)  
Faculty of Biosciences  
Pontifical Catholic University (PUC-RS)  
Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12C, Sala 340  
90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.  
Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612  
E-mail address: nadja.schroder@puccrs.br

## Original Article

**Title:** Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid

**Authors:** Rose Mary Carvalho Pinheiro<sup>1</sup>, Maria Noêmia Martins de Lima<sup>2,3</sup>, Vanessa Athaíde Garcia<sup>1</sup>, Juliana Presti-Torres<sup>1</sup>, Luis Henrique Hallmenschlager<sup>1</sup>, Luisa Azambuja Alcalde<sup>1</sup>, Rafael Roesler<sup>3,4,5</sup>, Monica Levy Andersen<sup>6</sup>, João Quevedo<sup>3,7</sup>, Flávio Kapczinski<sup>3,8</sup>, Nadja Schröder<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>2</sup>*NeuroAssay Ltd., 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>3</sup>*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>4</sup>*Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>5</sup>*Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>6</sup>*Department of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 04024-002 São Paulo, SP, Brazil*

<sup>7</sup>*Laboratory of Neurosciences, Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil*

<sup>8</sup>*Bipolar Disorders Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>5</sup>*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil*

\*Correspondence to: N. Schröder, Department of Physiological Sciences, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203545; fax: +55 51 33203612.

E-mail address: [nadja.schroder@pucrs.br](mailto:nadja.schroder@pucrs.br)

## Abstract

It has been suggested that experiences taking place early in life have a profound influence on brain development, determining individual differences in the vulnerability to environmental pathogens later in life. Here, we investigated the effects of exposure to early life stress (maternal deprivation) and to an environmental pathogen in adulthood (D-amphetamine administration) on cognition. We found that repeated D-amphetamine exposure produces severe cognitive impairment, which was more pronounced when the animals were maternal deprived, suggesting that an early adverse life event may increase the vulnerability to an environmental pathogen later in life. In addition, we found that valproic acid ameliorated the cognitive deficits induced by D-amphetamine, but it was not effective when the animals were exposed to both maternal deprivation and D-amphetamine.

**Keywords:** bipolar disorder, D-amphetamine, maternal deprivation, recognition memory, valproic acid.

## Abbreviations

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BP: bipolar disorder

D-AMPH: D-amphetamine

H: *hadled* (rearing condition from post-natal day 1 to 14)

LTM: long-term memory

MD: *maternal deprived* (rearing condition from post-natal day 1 to 14)

NGF: nerve growth factor

NT-3: neurotrophin-3

STM: short-term memory

VPA: valproic acid



## 1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a devastating illness characterized by recurrent episodes of mania and depression. In addition to these cyclic episodes, individuals with BD exhibit changes in psychovegetative function, cognitive performance, and general health and well being (Zarate et al., 2000; Martinowich et al., 2009). The prevention of future episodes (recurrences) and the acute management of depressive and manic episodes with less adverse side effects are the major goals in the treatment of BD. Lithium salts still are the first choice long-term preventive treatment for BD. Anticonvulsant and second-generation antipsychotic drugs have increasingly been proposed as alternatives, although their long-term safety and efficacy compared with lithium remains uncertain (Tohen and Vieta, 2009; Bowden, 2009; Haddad et al., 2009; The BALANCE investigators and collaborators, 2010).

The development of animal models represents an important tool in the investigation of new intracellular systems that may be involved in the pathogenesis of BD as well as in the search of novel pharmacological approaches. However, animal models that reliably reproduce the characteristic cyclic episodes of mania and depression of BD are not available so far. The current available animal models of BD permit the controlled study of a particular aspect of the illness, i.e. manic episodes, and its treatment (Machado-Vieira et al., 2004; O'Donnell and Gould, 2007; Malkesman et al., 2009).

Over the years, our research group has used an animal model of mania based on chronic D-amphetamine (D-AMPH) exposure in order to investigate the neurochemical alterations associated with the pathogenesis of BD as well as new pharmacological strategies. We have shown that brain oxidative stress (Frey et al., 2006a, c, e; Valvassori et al., 2008), neurotrophic factors' levels [brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) and neurotrophin-3 (NT-3)] (Frey et al., 2006b, f; Walz et al., 2008), hippocampal DNA damage (Andreazza et al., 2008), and hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity (Zugno et al., 2009) were altered in this model. We also showed that lithium and valproate [mood stabilizers currently used in the treatment of bipolar disorder] (Frey et al., 2006a, f; Correa et al., 2007; Walz, et al., 2008; Andreazza et al., 2008; Zugno et al., 2009) were able to reverse/block the effects of D-AMPH, indicating a good predictive validity of this animal model. A number of studies, performed by other research groups, have also demonstrated that antimanic agents are able to reverse the hyperlocomotion induced by repeated exposure to psychostimulants in rodents (Fessler et al., 1982; Vale and Ratcliffe, 1987; Cappeliez and Moore, 1990; Arban et al., 2005; Einat et al., 2007; Kim et al., 2008; Dencker et al., 2008; Marston et al., 2009; Redrobe and Nielsen, 2009).

Although our knowledge of the pathogenesis of BD has increased in recent years, the precise mechanisms that trigger the episodes of mania and depression remain unclear. It has been suggested that exposure to early adverse life events may interact with individual genetic background ("first hit") increasing the vulnerability for developing a psychiatric disease in adult life when the individual are exposed to a "second hit" that then leads to the onset of psychiatric symptoms (Post et al., 2001; Maynard et al., 2001; Caspi and Moffitt, 2006; Fumagalli et al., 2007; McEwen, 2007; Van Winkel et al., 2008; Toth et al., 2008; Le Strat et al., 2009). Based on this concept, in a previous study (data not published), we decided to investigate if the exposure to an environmental risk factor, such as deprivation of normal parental care, would make rats less resilient to an environmental pathogen (D-AMPH exposure) in adulthood. Moreover, in this previous study, we also investigated the effects of exposure to an early adverse life event on cognition in animals exposed to D-AMPH, since there are important cognition disturbances associated with the exposure to early adverse life events (Bremner and Narayan, 1998; Bremner and Vermetten, 2001) and in patients affected by BD (Wingo et al., 2009; Goldberg and Chengappa, 2009). Here, we extended our findings evaluating the possible therapeutic effects of valproic acid (VPA) on this "two-hit" animal model of mania.

## **2. Methods**

### **2.1 Animals**

Pregnant Wistar rats were obtained from Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil. After birth, each litter was adjusted within 48 h to contain eight rat pups and the same proportion of male and female individuals. Pups were maintained together with its respective mother in individually ventilated cages with sawdust bedding in a room at temperature of 22±1°C and a 12 h light/dark cycle. At the age of 4 weeks the pups were weaned and the males were selected and raised in groups of 3 rats. The animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All behavioral experiments took place between 9:00 and 17:00. The experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication number 80-23 revised 1996) and approved by the Institutional Animal Care Committee of the Pontifical Catholic University. All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering. The experimental design is depicted in Figure 1.

### **2.2 Maternal Deprivation**

Male rat pups were exposed to one of the following rearing conditions from post-natal day 1 to 14: (1) handled (H), animals were exposed to a daily 15-min period in which the dam

was removed and the litter was weighed or (2) maternal deprived (MD), animals were exposed to the same conditions for a 180-min period of separation. During the separation period, male rat pups of each litter were maintained together in a plastic cage with standard bedding material in an adjacent room to its dams on an incubator at the temperature of 35°C to avoid hypothermia (Levine, 1967; Francis et al., 2002; Pryce et al., 2003).

### **2.3 Treatments**

When the animals reached the age of 3 months, both groups were divided in 4 other groups of treatments that received daily intraperitoneal injections of: (1) saline, (2) D-AMPH 2.0 mg/Kg (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), (3) VPA 200 mg/Kg twice a day (Sanofi-Aventis, SP, Brazil), (4) a combination of D-AMPH 2 mg/Kg and VPA 200 mg/Kg twice a day for 7 consecutive days. The doses of D-AMPH and VPA were selected on the basis of previous studies from our laboratories (Frey et al., 2006a, b, c, d, e, f; Correa et al., 2007; Valvassori et al., 2008; Walz et al., 2008; Andreazza et al., 2008; Streck et al., 2008; Zugno et al., 2009).

We assessed open-field behavior 2 h [Experiment I] and 7 days [Experiment II] after the last injection. Recognition memory was assessed 24 h after open-field exploration in both Experiments I and II in the same apparatus used to assess open-field behavior, in the same groups of animals.

### **2.4 Open-field Behavior**

Open-field behavior was assessed 2 h [Experiment I] and 7 days [Experiment II] after the last injection in the same animals, as previously described (de Lima et al., 2005c, 2008a). The open field was a 40 X 45 X 60 cm arena surrounded by 50 cm high walls, made of plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into 12 equal squares by black lines. Animals were placed in the rear left corner and left to explore the field freely for 5 min. The number of line crossings and rearings were registered.

### **2.5 Novel Object Recognition Task**

The novel object recognition task was performed as previously described (Schröder et al., 2003; de Lima et al., 2005a, b, 2007, 2008a, b). Recognition memory was assessed 24 h after open-field behavior evaluations in the same apparatus except that the arena floor was covered with sawdust during the recognition memory training and test trials. The open field exploration was thus used as a context habituation trial for the recognition memory task. On the first day, rats were given one training trial in which they were exposed to two identical objects: A1 and A2 (Duplo Lego toys). The objects were positioned in two adjacent corners,

9 cm from the walls. The rats were allowed to freely explore the objects until they had accumulated 30 s of total inspection time or for a maximum of 20 min. On the short-term memory (STM) testing trial (1.5 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a novel object B.

On the long-term memory (LTM) testing trial (24 h after the training session), rats were allowed to explore the open field for 5 min in the presence of two objects: the familiar object A and a third novel object C. These were placed in the same locations as in the training session. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. Between trials the objects were washed with 10% ethanol solution. In Experiment II animals were retrained and tested using a distinct set of objects (i.e., objects D, E and F) eight days after D-AMPH or saline treatments. Object exploration was measured using two stopwatches to record the time spent exploring the objects during the experimental sessions. Exploration was defined as follows: sniffing or touching the object with the nose. Sitting on the object was not considered as exploration. Animals that did not explore the objects during the training or retention testing sessions were excluded of the study. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio  $TN/(TF+TN)$  [TF= time spent exploring the familiar object; TN= time spent exploring the novel object].

## **2.6 Statistical Analysis**

Results of open-field behavior were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Comparisons among groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc tests. Results of recognition indexes were expressed as median (interquartile ranges). Comparisons among groups were performed using a Kruskal-Wallis analysis of variance and Mann-Whitney U-tests. Wilcoxon tests were performed in order to compare recognition indexes of the training and retention test sessions within each individual group. P values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

## **3. Results**

### **3.1 Open-field Behavior**

Results for open-field behavior are shown in Figure 2. In Experiment I (performed 2 h after the last injection), both H and MD animals that received D-AMPH in the adulthood showed an increased number of crossings ( $p = 0.015$  and  $p = 0.004$ , respectively) and number of rearings ( $p = 0.023$  and  $p = 0.044$ , respectively) when compared to H animals that received saline in the adulthood (Fig. 2A and B). The H and MD animals that received VPA showed no statistical differences in the number of crossings and rearings when compared to H and MD animals that received saline ( $p = 0.217$  and  $p = 0.259$ , respectively for number of

crossings;  $p = 0.995$  and  $p = 0.591$ , respectively for number of rearings) indicating that VPA treatment per se have not affected the motor and exploratory performance of those groups. In contrast, when H and MD animals received the combined treatment (D-AMPH plus VPA), VPA induced a reduction in the number of crossings and rearings when we compare those groups to H and MD animals that received D-AMPH only ( $p$ 's  $< 0.001$  for comparisons to H treated with D-AMPH plus VPA;  $p$ 's  $< 0.001$  for comparisons to MD treated with D-AMPH plus VPA regarding the number of crossings;  $p = 0.002$  and  $p = 0.006$ , respectively for comparisons to H treated with D-AMPH plus VPA;  $p = 0.001$  and  $p = 0.002$ , respectively for comparisons to MD treated with D-AMPH plus VPA regarding the number of rearings), showing that VPA was able to reverse D-AMPH-induced hyperlocomotion.

In Experiment II (performed 7 days after the last injection), there were no statistically significant differences among all experimental groups regarding the parameters evaluated (Fig. 2C and D).

### 3.2 Novel Object Recognition Task

Results for recognition memory are shown in Figure 3. In Experiment I (performed 24h after the last injection) (Fig. 3A), Kruskal-Wallis tests showed a significant difference among groups in exploratory preferences in the STM and LTM retention trials ( $df = 7$ ,  $H = 24.681$ ,  $p = 0.001$  for STM retention trial and  $df = 7$ ,  $H = 43.172$ ,  $p < 0.001$  for LTM retention trial), but not in the training trial ( $df = 7$ ,  $H = 3.189$ ,  $p = 0.867$ ). Further analyses with Mann-Whitney U tests showed that H ( $p < 0.001$ ) and MD ( $p < 0.001$ ) animals treated with D-AMPH in the adulthood presented LTM impairments when compared with H animals that received saline. Interestingly, we found that the effects of D-AMPH were more pronounced in the MD group since they also presented STM impairments when compared to H animals that received saline ( $p = 0.015$ ), and MD animals that received D-AMPH ( $p = 0.011$ ). MD animals that received saline showed only LTM impairments when compared to H animals that received saline ( $p < 0.001$ ). Both H groups that received VPA and the combined treatment of D-AMPH plus VPA presented LTM impairments when compared to H animals that received saline (both  $p$ 's = 0.001). However, the H group that received the combined treatment (VPA plus D-AMPH) presented higher recognition index in LTM retention test than the H group that received D-AMPH only ( $p = 0.001$ ), indicating that the VPA treatment was able to reverse D-AMPH-induced long-term memory impairment. A similar LTM impairment was observed in the MD groups that received VPA and the combined treatment (D-AMPH plus VPA) when compared to H animals that received saline ( $p = 0.010$  and  $p < 0.001$ , respectively). It is important to note that VPA was not able to protect against the D-AMPH-induced cognitive impairment in the MD group that received the combined treatment, since this group

presented STM and LTM impairments when compared to H animals that received saline ( $p = 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively), and STM impairment when compared to MD animals that received saline ( $p = 0.001$ ). Additionally, there were no statistical differences between the MD group that received D-AMPH and the MD group that received the combined treatment in STM and LTM retention tests ( $p = 0.809$  and  $p = 0.918$ , respectively). Kruskal-Wallis tests revealed no differences among all groups regarding the latency to reach the criteria of 30 s of total time exploring the objects in the training trial ( $df = 7$ ,  $H = 6.716$ ,  $p = 0.459$ , data not shown).

To determine if these memory deficits persisted for more than a week after D-AMPH treatment, rats were retrained and tested 8 days after the last injection (Experiment II, Fig. 3B). Kruskal-Wallis test showed a significant difference among groups in exploratory preferences in the STM and LTM retention trials ( $df = 7$ ,  $H = 23.425$ ,  $p = 0.001$  for STM retention trial and  $df = 7$ ,  $H = 37.601$ ,  $p < 0.001$  for LTM retention trial), but not in the training trial ( $df = 7$ ,  $H = 5.776$ ,  $p = 0.566$ ). Further analyses with Mann-Whitney U tests showed that H and MD animals treated with D-AMPH in the adulthood still present STM and LTM impairments when compared to H animals that received saline ( $p < 0.001$  for LTM in H group;  $p$ 's  $< 0.001$  for STM and LTM in MD group). MD animals that received saline also preserved the LTM impairments when compared to H animals that received saline ( $p < 0.001$ ). H groups that received VPA and the combined treatment of D-AMPH plus VPA showed no statistically significant differences when compared to H animals that received saline. The same was not observed in MD groups that received VPA and the combined treatment of D-AMPH plus VPA when compared to H animals that received saline in the LTM retention test (both  $p$ 's = 0.001).

Although results indicated that the LTM impairment persisted in the MD group that received the combined treatment when compared to H animals that received saline, the STM impairment was not seen anymore 8 days after the last injection ( $p = 0.630$ ). Moreover, the MD group that received the combined treatment presented a better performance in the STM retention test when compared to MD animals that received D-AMPH ( $p < 0.001$ ). Kruskal-Wallis tests revealed that there were no statistically significant differences among all groups regarding the latency to reach the criteria in the training trial ( $df = 7$ ,  $H = 7.868$ ,  $p = 0.344$ , data not shown).

#### **4. Discussion**

The present findings are in agreement with our previous results indicating that D-AMPH treatment induces locomotor hyperactivity (Frey et al., 2006a, b, c, d, e, f; Kauer-Sant'Anna et al., 2007; Correa et al., 2007; Valvassori et al., 2008; Andreatza et al., 2008;

Streck et al., 2008; Zugno et al., 2009). Here, as in our previous study using this two-hit animal model (de Lima et al., submitted manuscript), we demonstrated that the hyperactivity is accompanied by severe memory impairments, which persist at least for 8 days after the last D-AMPH injection in both H and MD groups. More importantly, the present results indicate that the D-AMPH-induced cognitive dysfunction was more pronounced in the group that was exposed to an environmental risk factor, i.e. maternal deprivation, suggesting that the adverse experiences early in life may sensitize specific neurocircuits to subsequent stressors, producing synergistic effects in the group submitted to these two stressors. Here, for the first time, we showed that VPA was able to prevent hyperactivity and ameliorate recognition memory deficits induced by D-AMPH, but it was not effective (at least at the dose used) when the animals were exposed to both stressors: MD and D-AMPH.

It is important to point out that, although VPA did not completely reverse the memory deficits induced by D-AMPH in H animals in Experiment I (performed 24 h after the last injection), the recognition indexes of these groups were higher than the H plus D-AMPH group. Moreover, in Experiment II (performed with the same animals 8 days after the last injection), the H groups that received VPA presented normal recognition index (i.e., they were not statistically different from H plus saline group), while the H plus D-AMPH group still presented memory deficits. Thus, it is reasonable to assume that VPA might be exerting acute detrimental effects on memory consolidation. In fact, reports have shown a range of mild to moderate cognitive impairments, including memory deficits, in patients taking VPA (Gualtieri and Johnson, 2006; Senturk et al., 2007; Holmes et al., 2008). However, to date it has not been established whether the cognitive impairments are related to the use of the VPA or to the psychiatric illnesses by itself. In the case of BD, reports have shown that individuals with BD exhibit changes in psychovegetative function, cognitive performance, and general health and well being (Zarate et al., 2000; Martinowich et al., 2009). It is important to consider that the training protocol used in the present study, in which animals are trained to meet the criterion of 30 seconds exploring objects, was chosen to overcome the possible motor and motivational/exploratory effects induced by the treatments. Comparison of the time required to reach criterion among groups was not statistically different, suggesting that the cognitive impairment found in the present study are probably related to memory formation/consolidation processes rather than acquisition.

Moreover, when the H treated with D-AMPH plus VPA group was trained and tested 8 days after the last injection [Experiment II], it presented recognition indexes similar to those seen in H plus saline group, suggesting that VPA was able to protect against the D-AMPH toxicity when administered concomitantly. Over the years, preclinical and clinical studies have shown that repeated exposure to amphetamine derivatives, such as methamphetamine

and 3,4-methylenedioxy-N-methamphetamine (MDMA), impair recognition memory as well as dopaminergic neural transmission (Schröder et al., 2003; Belcher et al., 2005, 2006; 2008; Herring et al., 2008; McCann et al., 2008a, b; Salo et al., 2009). In addition to a previous study performed by our research group with D-AMPH, only Bisagno et al. (2003) have reported that D-AMPH impairs short-term recognition memory tested seven days after drug treatment. Thus, we could hypothesize that, even if VPA can induce acute cognitive impairments, it can also exerts long-lasting neuroprotective effects when the individual is being exposed to a neurotoxic agent, such as D-AMPH. It has been demonstrated that VPA could exerts neuroprotective effects via distinct biochemical, molecular and epigenetic mechanisms in vitro and in vivo models of neurodegenerative diseases (Shao et al., 2005; Chen et al., 2007; Monti et al., 2009; Sgobio et al., 2010). According to our previous reports, VPA could be exerting neuroprotective effects against D-AMPH by increasing hippocampal BDNF, NGF and NT-3 levels (Frey et al., 2006a, f, Walz et al., 2008); by reversing citrate synthase activity inhibition (Correa et al., 2007); by preventing DNA damage (Andreazza et al., 2008); and by reversing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity increasement (Zugno et al., 2009). Moreover, it has been recently shown that VPA can enhance memory processes by epigenetic mechanisms through its action as a histone deacetylase inhibitor (Bredy and Barad, 2008).

In the present study, VPA was not able to restore recognition memory in MID animals in Experiments I and II (in which the animals had more severe memory deficits), indicating that the exposure to stress early in life have might have caused neurodevelopmental disturbances that could not be restored by VPA when they were exposed to a second stressor later in life. A number of preclinical reports in the literature have examined the relationship between exposure to early adverse life events and cognitive performance in adulthood (Bilbo et al., 2007; McPherson et al., 2007; Aisa et al., 2007, 2008, 2009a; Toth et al., 2008). It has been suggested that environmental factors along the neurodevelopmental trajectory could be influencing neurotrophins expression and learning and memory later in life (Pham et al., 1997; Choy et al., 2008; Gatt et al., 2009; Aisa et al., 2009b; Angelucci et al., 2009). In a further study we intend to investigate the mRNA expression of neurotrophic factors and histone acetylation in key brain regions for learning and memory in this “two-hit” animal model of mania also investigating the VPA role on these molecular mechanisms.

## **5. Conclusion**

In conclusion, the present results support the view that exposure to an environmental risk factor make the individuals more susceptible to adverse life events in adulthood, possibly having implications for the development of mood disorders, and extend our previous findings



by showing that D-AMPH treatment also induces cognitive deficits, which are exacerbated by exposure to MD. VPA administration ameliorated recognition memory deficits induced by D-AMPH, but it was not effective when the animals were exposed to both stressors (MD and D-AMPH). Further studies will be required to determine the mechanisms by which exposure to an environmental risk factor might act as a precipitator of mood disorders in the adulthood as well as the cognition impairment associated with these psychiatric illnesses.

### **Acknowledgements**

Funding for this study was provided by CAPES- MEC, Brazil (AUX-PE-Procad grant 657/2008). J.P.T. and V.A.G are supported by a CAPES/MEC fellowship. L.H.H. is supported by a IC/CNPq fellowship. L.A.A. is supported by a PIBIC/CNPq fellowship. R.R., M.L.A., J.Q., F.K., and N.S. are CNPq Research fellows. R.R. is also supported by the South American Office for Anticancer Drug Development and the Children's Cancer Study.

## References

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(3):256-66.

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 2008;154(4):1218-26.

Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. *Hippocampus* 2009a;19(12):1222-31.

Aisa B, Gil-Bea FJ, Marcos B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, et al. Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: Involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 2009b;34(10):1495-505.

Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Frey BN, Stertz L, Zanotto C, Ribeiro L, et al. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2008;33(6):516-24.

Angelucci F, Ricci V, Spalletta G, Caltagirone C, Mathé AA, Bria P. Effects of psychostimulants on neurotrophins implications for psychostimulant-induced neurotoxicity. *Int Rev Neurobiol* 2009;88:1-24.

Arban R, Maraia G, Brackenborough K, Winyard L, Wilson A, Gerrard P, et al. Evaluation of the effects of lamotrigine, valproate and carbamazepine in a rodent model of mania. *Behav Brain Res* 2005;158(1):123-32.

Belcher AM, O'Dell SJ, Marshall JF. Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine- or d-amphetamine-induced neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:2026-34.

Belcher AM, O'Dell SJ, Marshall JF. A sensitizing regimen of methamphetamine causes impairments in a novelty preference task of object recognition. *Behav Brain Res* 2006;170(1):167-72.

Belcher AM, Feinstein EM, O'Dell SJ, Marshall JF. Methamphetamine influences on recognition memory: comparison of escalating and single-day dosing regimens. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(6):1453-63.

Bilbo SD, Newsom NJ, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. *Brain Behav Immun* 2007;21:332-42.

Bisagno V, Ferguson D, Luine VN. Chronic D-amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion, recognition memory, and brain monoamines. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74(4):859-67.

Bredy TW, Barad M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 2008;15(1):39-45.

Bremner JD, Narayan M. The effects of stress on memory and the hippocampus throughout the life cycle: implications for childhood development and aging. *Dev Psychopathol* 1998;10:871-85.

Bremner JD, Vermetten E. Stress and development: behavioral and biological consequences. *Dev Psychopathol* 2001;13(3):473-89.

Bowden CL. Anticonvulsants in bipolar disorders: current research and practice and future directions. *Bipolar Disord* 2009;11(Suppl 2):20-33.

Cappeliez P, Moore E. Effects of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1990;14(3):347-58.

Caspi A, Moffitt TE. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(7):583-90.

Chen PS, Wang CC, Bortner CD, Peng GS, Wu X, Pang H, et al. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience* 2007;149(1):203-12.

Choy KHC, Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M. Combined neonatal stress and youngadult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Hippocampus* 2008;18:655-67.

Correa C, Amboni G, Assis LC, Martins MR, Kapczinski F, Streck EL, et al. Effects of lithium and valproate on hippocampus citrate synthase activity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31(4):887-91.

de Lima MN, Polydoro M, Laranja DC, Bonatto F, Bromberg E, Moreira JC, et al. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci* 2005a;21(9):2521-8.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Grazziotin MM, Garcia VA, Dal-Pizzol F, et al. Selegiline protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol* 2005b;196(1):177-83.

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schröder N. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 2005c;40(6):506-11.

de Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco FS, Guimarães MR, et al. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2007;570(1-3):111-4.

de Lima MN, Dias CP, Torres JP, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, et al. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging* 2008a;29(7):1052-9.

de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R, et al. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 2008b;55(5):788-92.

Dencker D, Dias R, Pedersen ML, Husum H. Effect of the new antiepileptic drug retigabine in a rodent model of mania. *Epilepsy Behav* 2008;12(1):49-53.

Einat H, Yuan P, Szabo ST, Dogra S, Manji HK. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. *Neuropsychobiology* 2007;55(3-4):123-31.

Fessler RG, Sturgeon RD, London SF, Meltzer HY. Effects of lithium on behaviour induced by phencyclidine and amphetamine in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 1982;78(4):373-6.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J Neurosci* 2002;22(18):7840-3.

Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. *Neurochem Res* 2006a;31(5):699-703.

Frey BN, Valvassori SS, Gomes KM, Martins MR, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, et al. Increased oxidative stress in submitochondrial particles after chronic amphetamine exposure. *Brain Res* 2006b;1097(1):224-9.

Frey BN, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disord* 2006b;8(3):275-80.

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 2006d;79(3):281-6.

Frey BN, Andreazza AC, Rosa AR, Martins MR, Valvassori SS, Réus GZ, et al. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol* 2006e;17(4):311-8.

Frey BN, Valvassori SS, Reus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006f;31(5):326-32.

Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Prog Neurobiol* 2007;81:197-217.

Gatt JM, Nemeroff CB, Dobson-Stone C, Paul RH, Bryant RA, Schofield PR, et al. Interactions between BDNF Val66Met polymorphism and early life stress predict brain and arousal pathways to syndromal depression and anxiety. *Mol Psychiatry* 2009;14(7):681-95.

Goldberg JF, Chengappa KN. Identifying and treating cognitive impairment in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2009;11(Suppl 2):123-37.

Gualtieri CT, Johnson LG. Comparative neurocognitive effects of 5 psychotropic anticonvulsants and lithium. *MedGenMed* 2006;8(3):46.

Haddad PM, Das A, Ashfaq M, Weck A. A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5(5):539-51.

NR, Schaefer TL, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT. Effects of +-methamphetamine on path integration learning, novel object recognition, and neurotoxicity in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;199(4):637-50.

Holmes MK, Erickson K, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Bain EE, Cannon DM, et al. A comparison of cognitive functioning in medicated and unmedicated subjects with bipolar depression. *Bipolar Disord*. 2008;10(7):806-15.

Kauer-Sant'Anna M, Andreazza AC, Valvassori SS, Martins MR, Barbosa LM, Schwartsmann G, et al. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. *Peptides* 2007;28(7):1447-52.

Kim WY, Kim S, Kim JH. Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity *Neurosci Lett* 2008;432(1):54-7.

Le Strat Y, Ramoz N, Gorwood P. The role of genes involved in neuroplasticity and neurogenesis in the observation of a gene-environment interaction (GxE) in schizophrenia. *Curr Mol Med* 2009;9(4):506-18.

Levine S. Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science* 1967;156(772):258-60.

Machado-Vieira R, Kapczinski F, Soares JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28(2):209-24.

Malkesman O, Austin DR, Chen G, Manji HK. Reverse translational strategies for developing animal models of bipolar disorder. *Dis Model Mech* 2009;2:238-45.

Marston HM, Young JW, Martin FD, Serpa KA, Moore CL, Wong EH, et al. Asenapine effects in animal models of psychosis and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;206(4):699-714.

Martinowich K, Schloesser RJ, Manji HK. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J Clin Invest* 2009;119(4):726-36.

Maynard TM, Sikich L, Lieberman JA, LaMantia AS. Neural development, cell-cell signaling, and the "two-hit" hypothesis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 2001;27(3):457-76.

McCann UD, Szabo Z, Vranesic M, Palermo M, Mathews WB, Ravert HT, et al. Positron emission tomographic studies of brain dopamine and serotonin transporters in abstinent (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") users: relationship to cognitive performance. *Psychopharmacology (Berl)* 2008a;200(3):439-50.

McCann UD, Kuwabara H, Kumar A, Palermo M, Abbey R, Brasic J, et al. Persistent cognitive and dopamine transporter deficits in abstinent methamphetamine users. *Synapse* 2008b;62(2):91-100.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 2007;87:873-904.

McPherson RJ, Gleason C, Mascher-Denen M, Chan M, Kellert B, Juul SE. A new model of neonatal stress which produces lasting neurobehavioral effects in adult rats. *Neonatology* 2007;92:33-41.

Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol* 2009;2(1):95-109.

O'Donnell KC, Gould TD. The Behavioral Actions of Lithium in Rodent Models: Leads to Develop Novel Therapeutics. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31(6):932-62.

Pham TM, Söderström S, Henriksson BG, Mohammed AH. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behav Brain Res* 1997;86:113-20.

Post RM, Leverich GS, Xing G, Weiss RB. Developmental vulnerabilities to the onset and course of bipolar disorder. *Dev Psychopathol* 2001;13(3):581-98.

Pryce CR, Bettschen D, Nanz-Bahr NI, Feldon J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. *Behav Neurosci* 2003;117(5):883-93.

Redrobe JP, Nielsen AN. Effects of neuronal Kv7 potassium channel activators on hyperactivity in a rodent model of mania. *Behav Brain Res* 2009;198(2):481-5.

Salo R, Ursu S, Buonocore MH, Leamon MH, Carter C. Impaired prefrontal cortical function and disrupted adaptive cognitive control in methamphetamine abusers: a functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 2009;65(8):706-9.

Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 2003;49(2):89-96.

Senturk V, Goker C, Bilgic A, Olmez S, Tugcu H, Oncu B, et al. Impaired verbal memory and otherwise spared cognition in remitted bipolar patients on monotherapy with lithium or valproate. *Bipolar Disord* 2009;9(Suppl 1):136-44.

Sgobio C, Ghiglieri V, Costa C, Bagetta V, Siliquini S, Barone I, et al. Hippocampal Synaptic Plasticity, Memory, and Epilepsy: Effects of Long-Term Valproic Acid Treatment. *Biol Psychiatry* 2010 (in press).

Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005;58(11):879-84.

Streck EL, Amboni G, Scaini G, Di-Pietro PB, Rezin GT, Valvassori SS, et al. Brain creatine kinase activity in an animal model of mania. *Life Sci* 2008;82(7-8):424-9.

The BALANCE investigators and collaborators. Lithium plus valproate combination therapy versus monotherapy for relapse prevention in bipolar I disorder (BALANCE): a randomized open-label trial. *Lancet* 2010 (in press).

Tohen M, Vieta E. Antipsychotic agents in the treatment of bipolar mania. *Bipolar Disord* 2009;11(Suppl 2):45-54.

Toth E, Avital A, Leshem M, Richter-Levin G, Braun K. Neonatal and juvenile stress induces changes in adult social behavior without affecting cognitive function. *Behav Brain Res* 2008;190:135-9.

Vale AL, Ratcliffe F. Effect of lithium administration on rat brain 5-hydroxyindole levels in a possible animal model for mania. *Psychopharmacology (Berl.)* 1987;91(3):352-5.

Valvassori SS, Petronilho FC, Réus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, et al. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32(4):1064-8.

Van Winkel R, Stefanis NC, Myin-Germeys I. Psychosocial stress and psychosis. A review of the neurobiological mechanisms and the evidence for gene-stress interaction. *Schizophr Bull* 2008;34(6):1095-105.

Walz JC, Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Cacilhas AA, Valvassori SS, et al. Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *J Psychiatric Res* 2008;42(5):416-21.

Wingo AP, Harvey PD, Baldessarini RJ. Neurocognitive impairment in bipolar disorder patients: functional implications. *Bipolar Disord* 2009;11(2):113-25.

Zarate CA Jr, Tohen M, Land M, Cavanagh S. Functional impairment and cognition in bipolar disorder. *Psychiatr Q* 2000;71(4):309-29.



Zugno AI, Valvassori SS, Scherer EBS, Mattos C, Matte C, Ferreira CL, et al. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in an animal model of mania. *J Neural Transm* 2009;116:431-6.

## Figure legends

Figure 1. Experimental Design. Male rat pups were exposed to one of the following rearing conditions from days 1-14: (1) handling or (2) maternal deprivation. At the age of 3 months, both groups were divided in 4 other groups of treatment that received daily intraperitoneal injections of: (1) saline, (2) D-amphetamine (D-AMPH) 2 mg/Kg, (3) valproic acid (VPA) 200 mg/Kg twice a day, (4) a combination of D-AMPH 2 mg/Kg and VPA 200 mg/Kg twice a day for 7 consecutive days. In Experiment I, open-field behavior was evaluated 2 h after the last injection and object recognition task was performed 24 h after the last injection. In Experiment II, open-field behavior was evaluated 7 days after the last injection and object recognition task was performed 8 days after the last injection.

Figure 2. Effects of valproic acid on open-field behavior after exposure to maternal deprivation and D-amphetamine (D-AMPH) treatment. In Experiment I, the number of (A) crossings and (B) rearings were evaluated in an open-field apparatus 2 h after the injections. In Experiment II, the number of crossings (C) and number of rearings (D) were evaluated 7 days after the last injections in the same animals. Data expressed as mean  $\pm$ S.E.M., N = 11-13 per group. Differences between H plus Saline group from other groups are indicated as: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ; between H plus D-AMPH group from H plus D-AMPH plus VPA group as: ++ $p < 0.01$ ; between MD plus D-AMPH group from MD plus D-AMPH plus VPA group as: ++ $p < 0.001$ .

Figure 3. Effects of valproic acid on recognition memory after exposure to maternal deprivation and D-amphetamine (D-AMPH) treatment. Recognition memory was evaluated (A) 24 h and (B) 8 days after the last injections. Short-term memory (STM) retention test was performed 1.5 h and long-term memory (LTM) retention test 24 h after training. The proportion of the total exploration time that the animal spent investigating the novel object was the "Recognition Index" expressed by the ratio  $TN/(TF+TN)$ , TF = time spent exploring the familiar object and TN = time spent exploring the novel object. Data expressed as median [interquartile ranges], N = 9-13 per group. Differences between H plus Saline group from other groups are indicated as: \*\* $p < 0.01$ ; between MD plus Saline group from other groups as: ++ $p < 0.01$ ; between H plus D-AMPH group from MD plus D-AMPH group as: ++ $p < 0.01$ .

Figure 1

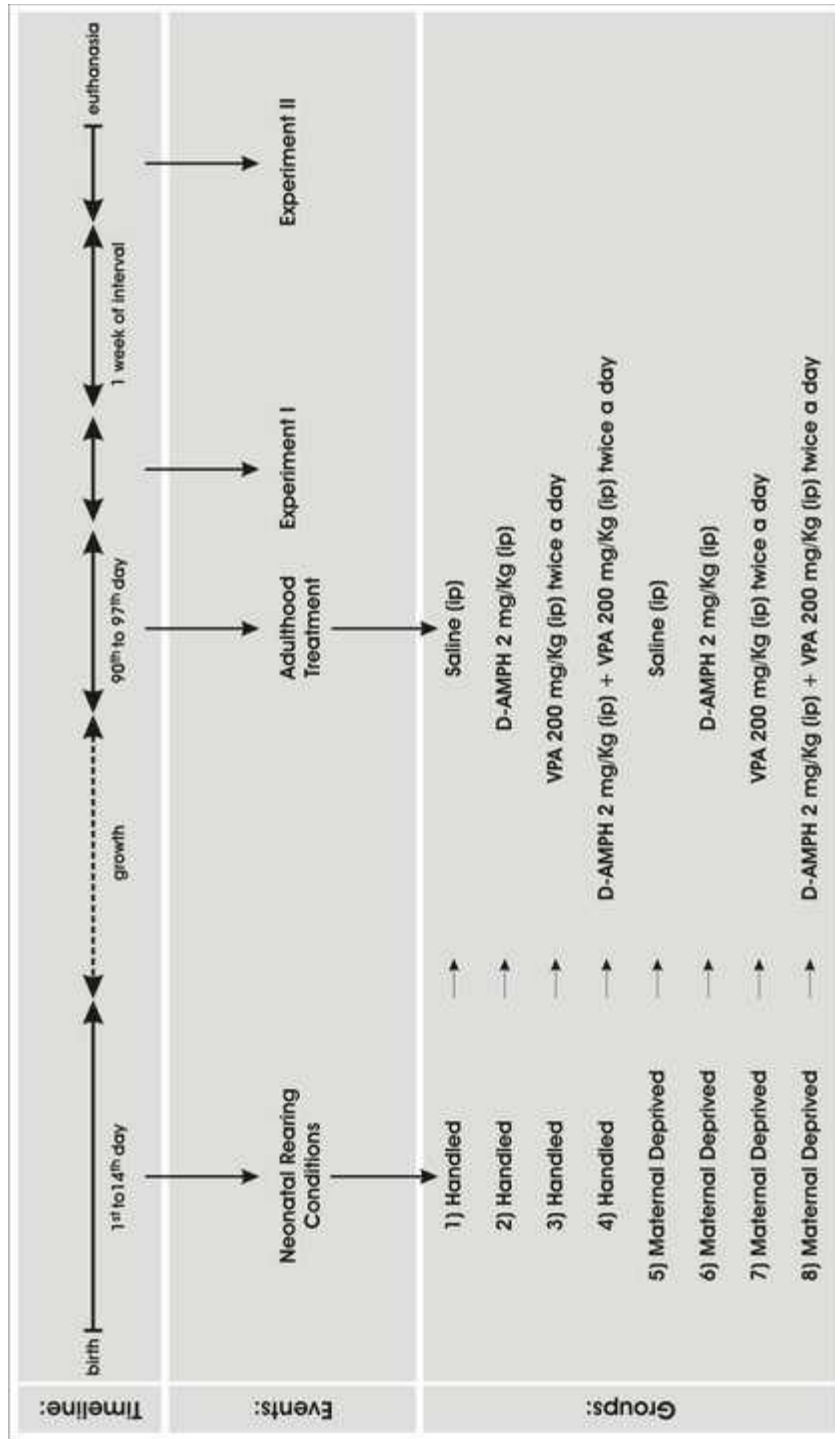


Figure 2

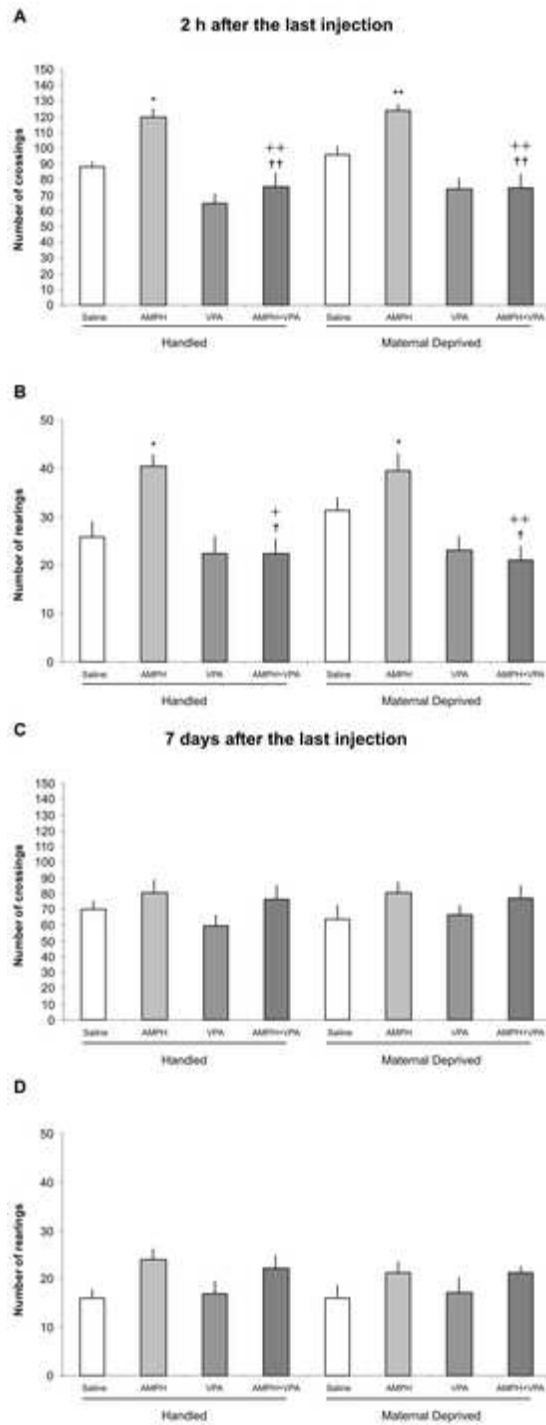
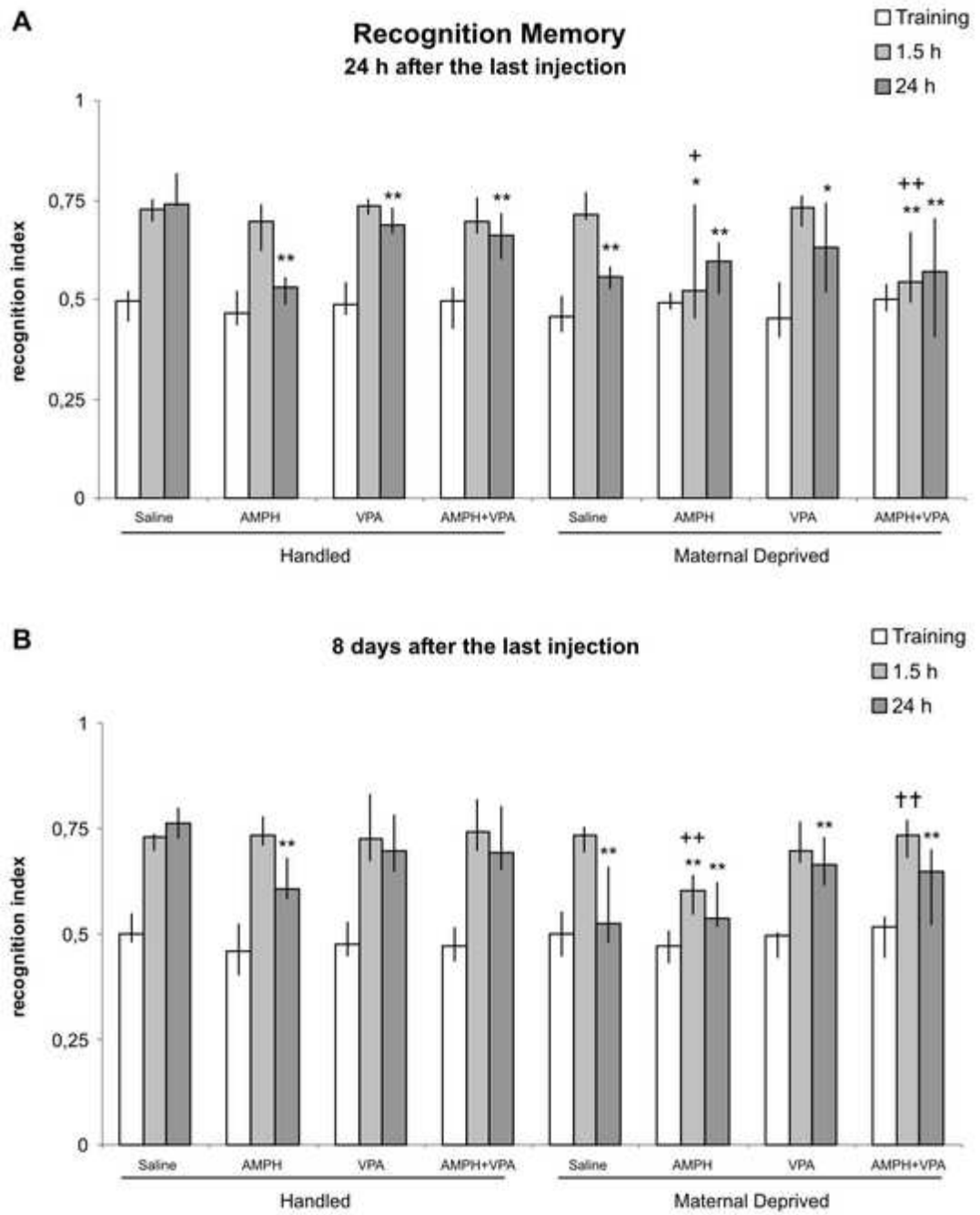


Figure 3



De: ees.pnp.0.6aaf1.fbffe46e@eesmail.elsevier.com em nome de Progress in NP & BP  
Enviada: qua 27/1/2010 22:32  
Para: Nadja Schroder  
Cc:  
Assunto: Editor handles PNP-D-10-00056  
Anexos:

Ms. Ref. No.: PNP-D-10-00056  
Title: Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid  
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Dear Nadja,

Your submission entitled "Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid" will be handled by Editorial Office Guy Drolet.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/pnp/>.

Your username is: nschroder  
Your password is: xxxxxxxx

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry