

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 ALVES

NADJA SCHRÖDER

**EFEITOS DO TOPIRAMATO SOBRE AS ALTERAÇÕES
NEUROCOMPORTAMENTAIS E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS INDUZIDOS
PELA SEPARAÇÃO MATERNA**

PORTO ALEGRE

2014

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E
MOLECULAR

TESE DE DOUTORADO

ROSE MARY CARVALHO PINHEIRO ALVES

**EFEITOS DO TOPIRAMATO SOBRE AS ALTERAÇÕES
NEUROCOMPORTAMENTAIS E PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS INDUZIDOS
PELA SEPARAÇÃO MATERNA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul para a obtenção do título de
Doutor em Medicina e Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dra. Nadja Schröder

PORTO ALEGRE

2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO

P654e Pinheiro, Rose Mary Carvalho

Efeitos do topiramato sobre as alterações neurocomportamentais e parâmetros inflamatórios induzidos pela separação materna / Rose Mary Carvalho Pinheiro. - Porto Alegre: PUCRS, 2014.

104 f.: il.: tab. Inclui artigo submetido ao periódico *Journal of Neural Transmission*.

Orientadora: Profa. Dra. Nadja Schröder.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

1. TOPIRAMATO. 2. ÁCIDO VALPRÓICO. 3. RATOS WISTAR. 4. SEPARAÇÃO MATERNA. 5. ESTRESSE NEONATAL. 6. MEMÓRIA. 7. CITOCINAS. 8. INTERLEUCINA 10. 9. INFLAMAÇÃO. 10. BDNF. 11. TNF α .
I. Schröder, Nadja. II. Título.

CDD 616.89

CDU 611.8:612.821.2(043.2)

NLM WL 337

*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.

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

À 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 mais leve.

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

À amiga Ester Rosari Raphaeli Dalben que é uma multiplicadora de informações com quem compartilhei esta trajetória.

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

Aos meus colaboradores em especial Ana Vieira S. B. Sperb.

Em especial a equipe da secretaria da Pós-graduação que nos auxilia com todo zelo e carinho.

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

E não poderia deixar de agradecer a PUCRS, por ter me

permitido voltar a aprender e principalmente por nos estimular a seguir nossa eterna busca por conhecimento.

RESUMO

Introdução: Os transtornos psiquiátricos estão entre as doenças mais comuns e representam um importante problema de saúde pública. Os processos neurobiológicos implicados na fisiopatologia dos transtornos neuropsiquiátricos ainda não são totalmente conhecidos. A exposição a eventos adversos no início da vida aumenta o risco de desenvolvimento de condições neuropsiquiátricas na idade adulta, incluindo transtornos afetivos e psicose. Em roedores, a separação materna (SM) tem sido correntemente utilizada como um modelo de exposição ao estresse no início da vida. A SM poder causar efeitos à longo prazo na função cerebral, incluindo alterações celulares, neuroquímicas e comportamentais. O envolvimento das citocinas pró e antiinflamatórias nas doenças psiquiátricas tem despertado cada vez mais o interesse dos pesquisadores. O topiramato é um medicamento anti-epiléptico que provou apresentar propriedades neuroprotetoras em modelos animais de lesão cerebral, reduzindo o dano neuronal em modelos animais de isquemia hipóxica neonatal e atenuando os déficits da memória.

Objetivos: Investigar o efeito do Topiramato (Top) na prevenção do prejuízo cognitivo em ratos Wistar submetidos a estresse neonatal, induzido pela SM e comparar com o Ácido Valpróico (Val). Investigar o efeito do estresse neonatal com e sem o tratamento com Top e Val sobre os níveis de BDNF, TNF- α e Interleucina 10 (IL-10).

Metodologia: Estudo com modelo animal de exposição a estresse no período neonatal (método SM), em ratos machos. Tratamento com Top e Val na idade adulta: um grupo recebeu 10mg/Kg via oral de Top uma vez ao dia por 14 dias, o outro grupo recebeu 100mg/kg de Top no mesmo período, outro grupo recebeu 200mg/kg via oral de Val no mesmo período, e o outro grupo recebeu a mesma quantidade correspondente em mililitros também por via oral de solução salina (grupo controle). Testes comportamentais (atividade motora/exploratória, memória), análises de BDNF, TNF α , IL10 foram realizados na idade adulta.

Resultados: A SM durante o período neonatal causa prejuízo de memória em ratos adultos. O tratamento na idade adulta com Top ocasionou prejuízo à memória quando utilizado independente da SM. Assim como, também não conseguiu reverter os danos ocasionados pela SM. O tratamento farmacológico com Valproato (Val) na vida adulta reverteu os déficits de memória de longa- duração (LTM) induzidos pela

privação materna e provocou uma melhora na memória de curta-duração (STM) nos ratos separados da mãe. A SM induziu um aumento significativo nos níveis de IL-10 quando o grupo separado-salina (S-Sal) foi comparado com o grupo controle não separado-salina (NS-Sal). As comparações estatísticas dos níveis de TNF- α , indicaram que o grupo submetido à SM que recebeu solução salina (S-Sal) apresentou um aumento significativo nos níveis de TNF- α no hipocampo quando comparado com o grupo de controle. Do mesmo modo, os níveis de TNF- α de animais do grupo S -Sal foram também aumentados no córtex, quando comparado com o grupo de NS-Sal. A SM induziu um decréscimo significativo nos níveis de BDNF no hipocampo, quando o grupo S-Sal foi comparado com o grupo controle. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na comparação do BDNF no córtex pré-frontal.

Conclusões: A SM induz a déficits de memória persistentes e aumenta os níveis da citocina anti-inflamatória, a IL-10, e da citocina pró - inflamatória, o TNF- α , e diminui os níveis de BDNF na idade adulta. O Val parcialmente amenizou esses déficits de memória, enquanto que o Top foi ineficaz. Surpreendentemente, as duas drogas foram capazes de recuperar os níveis das citocinas nas regiões cerebrais estudadas.

Palavras-Chaves: Topiramato, Ácido Valpróico, ratos Wistar, separação materna, estresse neonatal, memória, citocinas, inflamação, Interleucina 10, BDNF, TNF α .

ABSTRACT

Introduction: Psychiatric disorders are among the most common diseases and represent an important public health problem. The neurobiological processes implicated in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders are not fully known. Exposure to adverse events in early life increases the risk of developing neuropsychiatric conditions in adulthood, including affective disorders and psychosis. In rodents, maternal separation (MS) is commonly used as a model of exposure to stress in early life. MS may cause long-term effects on brain function, including cellular, neurochemical and behavioral changes. The involvement of pro-inflammatory cytokines in neuropsychiatric disorders has attracted increasing interest from researchers. Topiramate is an antiepileptic drug that has proven to exhibit neuroprotective properties in animal models of brain injury, reducing neuronal damage in animal models of neonatal hypoxic ischemia and attenuating memory deficits.

Objectives: To investigate the effect of Topiramate (Top) in reversing cognitive impairment in rats submitted to neonatal stress induced by MS and compare with Valproic Acid (Val), which was previously studied by our research group. Furthermore, to investigate the effects of neonatal stress with and without treatment with Val and Top on BDNF, TNF- α , and Interleukin 10 (IL-10) levels.

Methodology: Study on animal model of stress exposure in neonatal period (method of MS), in male rats. Treatment with Top and Val in adulthood: one group received 10mg/kg of Top orally once a day for 14 days, the other group received 100mg/kg of Top in the same period, another group received Val 200mg/kg orally in the same period, and the other group received the same corresponding amount in milliliters also orally of saline solution (control group). Behavioral tests (motor/exploratory activity, recognition memory), and analyzes of BDNF, TNF- α , and IL-10 levels were performed in adulthood .

Results: The MS during the neonatal period causes memory impairment in adult rats. The treatment in adults with Top caused injury to memory when used, independently of maternal separation. Likewise, it also failed to reverse the damage caused by MS. Pharmacological treatment with Val in adulthood reversed long-term (LTM) memory deficits induced by MS and caused an improvement in short-term

memory (STM) in rats separated from the mother. The MS induced a significant increase in IL -10 when the separated-saline (MS - Sal) was compared with the control group (non-separated-saline, NS-Sal). Statistical comparisons of TNF- α levels, indicated that the group subjected to MS which received saline (MS - Sal) showed a significant increase in the levels of TNF- α in the hippocampus when compared with the control group. Similarly, the levels of TNF- α in the group MS-Sal were also increased in cortex, compared to NS-Sal group. The MS induced a significant decrease in BDNF levels in the hippocampus, when the group MS-Sal was compared with the control group. No statistically significant difference was observed in the comparison of BDNF in prefrontal cortex.

Conclusions: MS leads to persistent memory deficits and increases levels of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, and of the pro-inflammatory cytokine, TNF- α , and decreases levels of BDNF in adulthood. Val partially alleviated these memory deficits, while Top was ineffective. Surprisingly, the two drugs were able to recover levels of cytokines in brain regions studied.

Key Words : Topiramate, Valproic Acid, Wistar rats, maternal separation, neonatal stress, memory, cytokines, inflammation, Interleukin 10, BDNF, TNF- α .

ABREVIÇÕES UTILIZADAS

AMPH/D-AMPH: anfetamina

ANOVA: análise de variância

AMPA: receptor glutamatérgico do tipo ácido amino-3-hidroxi-5- metilisoazole-4-propionico

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

BrdU: 5-bromo-3'-deoxiuridina, análogo da timidina sintética, marcador mitótico

BD: Transtorno Bipolar, sigla dos termos em inglês, *Bipolar Disorder*

BH4: tetrahidrobiopterina

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, sigla dos termos em inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*

CAPSI: Centro de Atenção Psicossocial Infanto-Juvenil

CUMS: Estresse Leve Crônico Imprevisível, sigla dos termos em inglês, *Chronic Unpredictable Mild Stress*

CA3: região hipocampal, corno de Ammon 3

CSIF: Fator de Inibição da Síntese de Citocinas, sigla dos termos em inglês, *cytokine synthesis inhibitory factor*

CD45RA/CD62L: linfócitos T virgens

CEUA: Comitê de Ética pra o uso de animais

CRF mRNA: fator de liberação de corticotropina, ácido ribonucleico mensageiro

DM: Depressão Maior

DC: células dendríticas

DAE: drogas antiepilépticas

EGF: Fator Estimulador de Eritropoietina e de Granulócitos, sigla dos termos em inglês, *Erythropoietin Stimulating Granulocyte Factor*

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EGTA: ácido etileno glicol tetraacético

FST: Teste do Nado Forçado, sigla dos termos em inglês *Forced Swim Test*

FEEPS-RS: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul

FEG: Fator Estimulante dos Granulócitos

GMCSF: Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos, sigla dos termos em inglês, *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

HPA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, sigla dos termos em inglês, *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*

5-HT: 5-hidroxitriptamina

IMC: Índice de Massa Corpórea

IL: interleucina

IDO: indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN – α / IFN – γ , interferon alfa/gama

IL-2R: receptores interleucina-2 solúvel

KA: cainato

LCR: líquido céfalo-raquidiano

LTM: memória de longa duração, sigla dos termos em inglês, *long-term memory*

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

mRNA/RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

NK: células natural killer

NCAM: molécula de adesão celular neuronal, sigla dos termos em inglês, *neuronal cell adhesion molecule*

NS-Sal: grupo experimental não separado – salina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: proteína C reativa

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PBS: solução salina tamponada

RS: Rio Grande do Sul

SERT: transportador de serotonina

SNC: sistema nervoso central

STM: memória de curta-duração, sigla dos termos em inglês, *short-term memory*

SM/S: Separação Materna

S-Sal: grupo experimental separado-salina

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa, sigla dos termos em inglês, *Tumor Necrosis Factor- α*

TOC: Transtorno Obsessivo-Compulsivo

TEPT: Transtorno do Estresse Pós Traumático

Top: Topiramato

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Separação Materna	16
1.1.1	Estudos pré-clínicos	16
1.1.2	Estudos clínicos.....	18
1.2	A interação do meio na geração dos transtornos neuropsiquiátricos	19
1.3	Estresse e Inflamação	20
1.4	Influência do estresse na memória e na aprendizagem	21
1.5	Sistema imune e neuroinflamação	22
1.6	BDNF	28
1.7	Tratamentos Farmacológicos	29
2	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....	34
2.1	Relação entre exposição ao estresse no período neonatal e manifestação de alterações neurocomportamentais na fase adulta.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivos Gerais	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Animais.....	36
4.2	Exposição ao estresse no período neonatal.....	36
4.3	Tratamento com Topiramato e Valproato na idade adulta.....	36
4.4	Tarefas comportamentais	37
4.4.1	Atividade em Campo Aberto.....	37
4.4.2	Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo	37
4.5	Análises Bioquímicas dos níveis de Citocinas.....	38

4.6	Análise Bioquímica dos níveis de BDNF	38
4.7	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Comportamento em Campo Aberto	40
5.2	Memória de Reconhecimento do Objeto	42
5.3	Citocinas.....	45
5.4	BDNF.....	49
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	56
8	BIBLIOGRAFIA.....	57
9	ANEXOS	69
9.1	Anexo 1 – Carta submissão artigo ao periódico Journal of Neural Transmission.....	69
9.2	Anexo 2 - Artigo submetido ao periódico Journal of Neural Transmission.....	70

1 INTRODUÇÃO

O período neonatal é de extrema importância para o desenvolvimento neuropsiquiátrico do indivíduo podendo influenciar a vida adulta tanto de uma maneira positiva ou negativa dependendo das vivências experimentadas durante este período. Estas experiências podem conferir efeitos duradouros sobre as estruturas e funções cerebrais. Durante a vida perinatal precoce a qualidade do meio ambiente e das experiências vividas tais como o estresse da Separação Materna (SM) ou maus tratos, estão associados com alterações no desenvolvimento emocional e cognitivo mais tarde na vida. Estas alterações no período neonatal no qual nos encontramos em desenvolvimento, podem ser mediadas por efeitos agudos e de longa duração. (1)

O impacto de experiências adversas precoces no comportamento emocional adulto tem sido descrito tanto clínica quanto experimentalmente. Existem janelas de tempo críticas para o desenvolvimento, durante as quais a exposição às situações de estresse pode afetar adultos, quanto às funções emocionais e sociais. (2)

Seguindo esta linha de pensamento, diversos estudos clínicos resultaram na hipótese de dois eventos críticos (“*two hits*”): distúrbios emocionais (estresse, negligência e abusos) muito precoces seriam o primeiro evento, podendo levar a uma vulnerabilidade em longo prazo, que propiciaria o segundo evento, também na vigência de estresse e abusos em idades mais tardias, e que então podem induzir o surgimento de transtornos mentais, tais como depressão ou esquizofrenia. (2)

1.1. Separação Materna

1.1.1 Estudos pré-clínicos

Em roedores ou primatas não-humanos, períodos prolongados de SM na vida precoce aumentam a magnitude da resposta neuroendócrina ao medo, estresse, assim como a vulnerabilidade às doenças relacionadas ao estresse. Estes efeitos persistem ao longo da vida. (3)

Situações estressantes em fase precoce da vida podem aumentar a vulnerabilidade aos déficits cognitivos e distúrbios psiquiátricos, como depressão. O modelo de SM tem sido utilizado para o estudo das alterações neuroquímicas e

comportamentais associadas com a exposição ao estresse na vida precoce. (4, 5, 6, 7)

A exposição ao estresse neonatal juvenil resulta em distintas alterações persistentes de competência emocional e social em cobaias adultas. Conforme estudos que compararam ratos submetidos e não submetidos ao estresse, aqueles expostos ao estresse neonatal e ao estresse neonatal e juvenil combinados apresentam interação social diminuída, mas também menores níveis de ansiedade, enquanto o estresse juvenil sozinho induziu encontros sociais mais frequentes, porém de menor duração, na vida adulta, indicando que pode estar relacionado a comportamentos mais impulsivos. (2)

O período neonatal é de extrema importância no desenvolvimento neuropsiquiátrico inclusive com efeitos deletérios em longo prazo portanto, se considerou a necessidade de um modelo animal para entender a relevância de determinados estressores no período neonatal e que simulassem o impacto das experiências de crianças expostas ao estresse em UTI-Neonatal, pois podem vir a manifestar efeitos permanentes na saúde na vida adulta. Foi observado que o estresse neonatal aumentou significativamente a mortalidade, bem como retardou o crescimento infantil, em ratos. (8)

Quanto ao modelo de estresse utilizando a separação materna, diversos estudos mostraram controvérsias utilizando a separação mãe-filhote, pois foram utilizados modelos, com tempos variados (4-24 horas, e em idades diferentes). (2, 8-10)

A separação materna neonatal pode resultar no desenvolvimento de depressão e/ou comportamentos de ansiedade, mais tardiamente, em que alterações em neurotransmissão serotoninérgica em longo prazo podem ter um papel importante. O modelo de separação neonatal é aceito como modelo de estresse precoce e comprovadamente tem efeitos sobre o eixo HPA (Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, sigla dos termos em inglês, *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal*). (3)

Um estudo investigou (Aisa e cols. 2009) os efeitos do estresse neonatal na SM sobre a expressão de marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo, relacionado aos processos cognitivos. O aprendizado espacial (no labirinto aquático

de Morris) aumentou significativamente a expressão do nível total da molécula de adesão neuronal (NCAM), bem como suas três principais isoformas (NCAM-120, -140, -180) no grupo controle e no grupo SM. Curiosamente, estes aumentos na expressão NCAM após o teste de Morris foram menores nos animais do grupo SM quando comparados com ratos controle. A SM induziu uma diminuição significativa nos níveis totais de NCAM e, especificamente, na expressão da isoforma NCAM-140. No hipocampo dos ratos SM, houve uma diminuição significativa nas densidades de mRNA para BDNF e sinaptofisina. A proliferação celular, medida como células BrdU positivas, também foi diminuída no giro denteado dos ratos do grupo SM. No total, estes resultados sugerem que a SM pode alterar o desenvolvimento normal do cérebro, fornecendo um mecanismo potencial pelos quais os primeiros estressores ambientais podem influenciar a vulnerabilidade e vir a favorecer deficiências cognitivas mais tarde na vida. (4)

Choy e cols. 2008 assim como Pham e cols. 1997 demonstraram que animais manipulados apresentam menores níveis de corticoesterona induzida por situações novas. A manipulação pós-natal implica na redução da resposta do eixo HPA frente às situações estressantes, mudanças nas taxas de neurogênese, decréscimo em fatores neurotróficos, apoptose e enzimas responsáveis pela transdução de sinais importantes para aprendizagem e cognição, todos esses de forma duradoura, podendo persistir ao longo do desenvolvimento. Os fatores neurotróficos são essenciais para o desenvolvimento do SNC e por isso acredita-se que estejam envolvidos nos mecanismos de alterações neurais da manipulação neonatal. (11, 12)

Nosso grupo tem realizado pesquisas utilizando o modelo animal da SM e de Mania por meio de tratamento com anfetamina (AMPH), que induz a hiperlocomoção, e severos danos a memória. Comprovamos em nossos experimentos que ao associarmos os dois eventos, ou seja, SM e AMPH os déficits cognitivos são intensificados. A SM funcionaria, de acordo com nossos achados, como um precipitador ou fator desencadeante para o déficit cognitivo. (9)

1.1.2 Estudos Clínicos

A situação de crianças que viviam em instituições de acolhimento na Romênia ofereceu um cenário em que as consequências da privação social severa pudessem ser examinadas. Estas crianças experimentaram uma forma de cuidado

sob a forma de aprisionamento, em que suas necessidades médicas e nutricionais foram atendidas, mas as suas necessidades sociais e psicológicas não. (13)

Em um estudo dois grupos foram formados: o controle, o institucionalizado, e o grupo intervenção, em que foi proporcionado um ambiente potencialmente enriquecedor e estimulante. As crianças do grupo intervenção mostraram um crescimento significativamente acelerado, físico e mental, e de desenvolvimento motor, em comparação ao grupo controle. Contudo, após retornarem todos às mesmas condições controle, o grupo de intervenção perdeu a vantagem obtida com a experiência de enriquecimento anterior. (13, 14)

Lupien e colaboradores (2000) realizaram um amplo estudo psiconeuro-endocrinológico com 217 crianças e 139 mães, analisando os níveis de cortisol salivar e da função cognitiva nas crianças e os fatores envolvidos. Aquelas com baixo nível socioeconômico apresentaram níveis de cortisol salivar significativamente mais elevados, e esse efeito socioeconômico ficou evidente a partir dos seis anos de idade. Da mesma forma, o nível de cortisol das crianças foi correlacionado de forma positiva com as mães de sintomatologia depressiva. (15)

1.2 A interação do meio na geração dos transtornos neuropsiquiátricos

A associação entre eventos da vida e o desenvolvimento funcional posterior tem sido cada vez mais estudado, há na literatura diversos estudos (Korosi e cols. 2012, Toth e cols. 2008, Francis e cols. 2002, Van Winkel e cols. 2013) que investigam os fatores envolvidos com a causalidade e correlação gene - ambiente, em que os genes que influenciam a vulnerabilidade também aumentam o risco de exposição a acontecimentos estressantes da vida. O efeito de genes que influenciam a exposição ambiental pode ser mediado por meio da personalidade e, portanto, também a associação entre eventos de vida e de personalidade. (1, 2, 3, 5)

Middeldorp e colaboradores (2008) estudaram informações sobre os eventos estressantes da vida, depressão ansiosa, neuroticismo e extroversão. Com base em seus resultados foi sugerido que a causalidade recíproca explica a relação entre eventos estressantes da vida e depressão ansiosa e, entre os eventos e neuroticismo. Os genes que influenciam a depressão ansiosa, neuroticismo e extroversão não coincidem com os genes que aumentam o risco de exposição a

eventos da vida. (16)

Atualmente se busca estabelecer modelos integrativos que representem a interação da genética e a exposição precoce a eventos perturbadores como predisponentes da depressão, sugere-se que as interações entre genes e fatores ambientais são preditores dos transtornos neuropsiquiátricos. (17)

1.3 Estresse e inflamação

Estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que o aumento das citocinas pró-inflamatórias resultante de infecções, acidente vascular cerebral e de estresse psicológico, cursam com o aparecimento de sintomas, tais como a depressão.

Exposição ao estresse crônico é relacionada ao desenvolvimento de sintomas de depressão e a alterações imunológicas. A Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) desempenha um papel fundamental na mediação dos comportamentos depressivos em resposta à ativação imunológica. O Estresse Crônico Moderado Imprevisível (CUMS, sigla dos termos em inglês, *Chronic Unpredictable Mild Stress*) ativa o eixo HPA e induz a ativação imunitária, que pode estimular a atividade da IDO, induzindo a redução do nível centrais de 5-HT resultando em sintomas depressivos. (18, 19)

O uso de modelos animais, tais como o CUMS contribuiu para a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da depressão, tais como diminuição da neurogênese e alterações do eixo HPA. Neste modelo se explora a associação do comportamento depressivo em ratos com as alterações em citocinas pró-inflamatórias periféricas, IL-1 β , TNF- α e IL-6, bem como a neuroinflamação em áreas do cérebro envolvidas na fisiopatologia da depressão. Estas áreas incluem córtex cerebral, núcleo acumbens, núcleo da estria terminal, putâmen caudado, amígdala e hipocampo. (19)

Alterações nas citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , podem indicar uma via fisiopatológica do estresse agudo e crônico para o desenvolvimento de sintomas depressivos. Alterações nos níveis de IL-4 e IL-10 podem ligar o estresse agudo e crônico a distúrbios auto-imunes, como alergias ou câncer. As mudanças relatadas em Interferon gama (IFN- γ) fornecem uma explicação para a maior susceptibilidade à infecção observada em períodos de vida associados com níveis elevados de

estresse. (20)

Exposição precoce a estresse está relacionada à elevação persistente da IL-6, hiperalgesia, e a suscetibilidade à dor muscular crônica, que é revelado pela exposição ao estresse em adultos. Isso provavelmente depende de uma interação entre catecolaminas adrenais e citocinas pró-inflamatórias que atuam a nível nociceptor muscular. (21)

1.4 Influência do estresse na memória e na aprendizagem

O estresse crônico está associado a um maior risco de aterosclerose, hipertensão arterial, atrofia de neurônios hipocampais, imunossupressão e câncer. O estresse também tem sido associado à manifestação de diversos transtornos psicológicos. Elevadas concentrações de cortisol plasmático são observadas em indivíduos que sofrem de ansiedade, depressão e transtornos alimentares. Pacientes com esquizofrenia frequentemente desenvolvem os primeiros sintomas durante períodos de estresse em suas vidas. As maiores taxas de recaída também ocorrem durante momentos de estresse. (11, 22)

Pesquisas relatam que em indivíduos saudáveis, tanto o estresse crônico quanto elevações de glicocorticóides circulantes induzidas experimentalmente levam a prejuízos cognitivos reversíveis na memória declarativa. A partir desses estudos concluiu-se que os efeitos do estresse nos sistemas da memória mediada pelo hipocampo e as alterações estruturais no hipocampo podem ser desencadeadas pelos glicocorticóides. (23)

Em um processo que poderia ser compreendido como parte da complexidade fisiológica do desenvolvimento, os altos níveis de cortisol ao longo do envelhecimento predizem atrofia hipocampal e déficit de memória. A exposição cumulativa a níveis elevados de glicocorticóides durante toda a vida interrompe a função eletrofisiológica, levando à atrofia e finalmente a morte dos neurônios do hipocampo. O que provoca déficit cognitivo na aprendizagem e na memória hipocampo-dependente. (17)

Como observado, o hipocampo representa papel fundamental tanto na origem quanto na integração de processos patológicos envolvendo as funções executivas e também os transtornos do humor, constituindo uma área extensivamente pesquisada

pelas ciências do comportamento, entre outras. (24-26)

Recentes estudos de imagem em seres humanos mostraram que o hipocampo sofre redução do volume devido ao estresse relacionado com distúrbios neuropsiquiátricos, como depressão recorrente. O estresse é um fator que suprime potencialmente a proliferação de células granulares em adultos, e que além da redução da neurogênese, demonstrou promover a retração dos dendritos apicais dos neurônios piramidais da área CA3. (27, 28)

Com base em resultados obtidos em animais, a perda do volume do hipocampo observada clinicamente pode ser parcialmente explicada pela retração dendrítica e proliferação celular reduzida. Além disso, no tratamento com antidepressivo, existe aumento da proliferação de células granulares no giro denteado de hipocampo de ratos. Esses e outros achados levam à hipótese de que os antidepressivos podem reverter o dano neuronal, opor-se a perda da plasticidade neural induzida pelo estresse, por meio do bloqueio ou reversão da retração de neurônios do hipocampo e pelo aumento da sobrevivência e da função destas células. (26, 28)

Existem evidências de que a desregulação a longo-prazo do eixo HPA, associado à exposição a eventos estressantes precoces podem aumentar a vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta. Aparentemente há uma relação estreita entre glicocorticóides e vulnerabilidade neuronal hipocampal, principalmente por contribuir para a perda neuronal idade-associada e também por potencializar lesões hipocampais. (29)

1.5 Sistema imune e neuroinflamação

Os estudos neuroquímicos e de neuroimagem combinados com a identificação de genes de vulnerabilidade e a pesquisa sobre a interação entre o cérebro e o meio ambiente são ferramentas valiosas no entendimento da neurobiologia dos transtornos neuropsiquiátricos.

O papel do sistema imunológico nos transtornos neuropsiquiátricos, como depressão, esquizofrenia, transtornos de ansiedade, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno do pânico, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo e demências, também tem sido alvo de investigação. (30)

As citocinas podem ser secretadas por várias células, em resposta a uma lesão ou infecção. A sua ação ocorre geralmente através de uma "cascata", em que uma citocina liberada induz a liberação de outras citocinas, por exemplo, IL-1 estimula a liberação de IL-2, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF). São divididas de acordo com a estrutura e classificadas como pró-inflamatórias, que incluem IL-1, IL-6 e TNF- α , e anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e IL-13, e as Hematopoéticas que podem ser exemplificadas pelas IL-3, IL-5, eritropoietina e o fator estimulante dos granulócitos (FEG). (17)

A interleucina-10 (IL-10) é central na regulação negativa do sistema imune, mas a sua utilização em doenças inflamatórias não é bem conhecida (Steidler e cols. 2009, Correia e cols. 2013, Lotrich e cols. 2012, Krügel e cols. 2013 e Kaster e cols. 2012). Sendo inicialmente caracterizada como um fator de inibição da síntese de citocinas (CSIF). A IL-10 inibe a produção de citocinas tais como a interleucina-2 (IL-2), TNF - α , interferon (IFN)- γ e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) pelas células e inibindo parcialmente as atividades iniciadas por IFN- γ , IL-2, TNF- α e interleucina-4 (IL-4). Os mecanismos pelos quais a IL-10 inibe a produção de citocinas foi inicialmente sugerido, como uma ação de bloqueio sobre a capacidade de apresentação do antígeno de macrófagos e células dendríticas (DC). A IL-10 desempenha um papel importante não só no bloqueio da produção de citocinas, mas também na modulação da secreção de quimiocinas e expressão do receptor e na expressão de várias moléculas co-estimuladoras, IL-10 também diminui a expressão da integrina, a molécula de adesão intercelular 1 e diminui a geração de radicais livres. (31-35)

O sistema imunológico interage continuamente com o ambiente e o SNC. Estudos têm demonstrado que a produção de citocinas, durante o processo inflamatório, pode levar o cérebro a desenvolver alterações neuroquímicas, neuroendócrinas, neuroimunes, assim como mudanças comportamentais. (30,36)

Muitos indivíduos deprimidos têm níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, que por sua vez interagem com vários domínios fisiopatológicos da depressão, incluindo a função neuroendócrina, o metabolismo de neurotransmissores e a plasticidade sináptica. (37)

Pacientes com depressão maior possuem elevação dos biomarcadores da inflamação, no sangue periférico e líquido cefalorraquidiano (LCR). Os sinais das citocinas alcançam o cérebro por três caminhos. Através de passagem pela barreira sangue-cérebro, ou por transporte ativo através das moléculas de transporte saturável, ou a ligação aos receptores em fibras nervosas viscerais aferentes, que retornam ao cérebro através do núcleo do trato solitário. (38-40)

Existe também no interior do cérebro uma *network* de citocinas, que inclui elementos da glia, tais como astrócitos e microglia, que produzem citocinas e quimiocinas, e vários tipos de células, incluindo neurônios, os quais expressam receptores de citocinas. (38-40)

Os principais efeitos negativos do aumento das citocinas inflamatórias na função dos neurotransmissores estão associados à depressão e ansiedade, por meio de alterações nos neurotransmissores como a serotonina, norepinefrina, dopamina e glutamato. As citocinas podem influenciar o metabolismo de neurotransmissores nas vias de sinalização dos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese, recaptação e liberação de neurotransmissores. (39)

As citocinas inflamatórias influenciam a síntese dos neurotransmissores de monoamina por meio das vias de sinalização que podem ativar a enzima, indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) ou da síntese de neurotransmissores de monoamina pela quebra de tetrahydrobiopterina (BH4). Também da ativação das vias de sinalização ativada por mitógenos tais como a p38 proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), e o aumento da expressão da função das bombas de recaptação de transportadores para a serotonina, norepinefrina, dopamina, TNF e IL-1 que aumentam a expressão e a atividade do transportador de serotonina (SERT) e dos efeitos sobre a liberação. Por exemplo, a administração de IFN- α para pacientes com hepatite C aumenta a recaptação da serotonina e diminui a liberação de dopa radiomarcado, o primeiro precursor da dopamina, enquanto a administração terapêutica de IFN- α leva à depressão em uma proporção significativa de pacientes. (37, 39, 41-44)

Níveis elevados de IL - 6 são considerados um biomarcador consistente de depressão enquanto os níveis de IL - 10 influenciam no comportamento depressivo por meio da capacidade para contrabalançar a expressão de citocinas pró-

inflamatórias. Os estudos em animais sugerem que a IL - 10 modifica o comportamento depressivo. Por causa da relação entre a supressão de IL - 10 e comportamento depressivo e porque ocorre aumento na expressão de IL - 10 em muitas terapias antidepressivas bem sucedidas. (45, 46)

A morte celular é um processo ativo de apoptose, que ocorre naturalmente com características distintas e bioquímicas. Investigações mostraram claramente que o equilíbrio entre a sobrevivência das células e a morte celular é regulado por sinais diferentes. Hoje se sabe que várias citocinas podem realmente resgatar os neurônios contra a morte. Muitos autores têm sugerido que as citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas em lesão e morte celular e também que as citocinas anti-inflamatórias estão envolvidas na proteção e sobrevivência celular. É importante ressaltar que ambas as citocinas anti-e pró-inflamatórias podem mediar fenômenos regressivos e progressivos, e que a regulação do balanço das citocinas desempenha um papel crucial na homeostase. (47)

As doenças neurodegenerativas como Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, esquizofrenia e, mais recentemente o autismo, todas também exibem ativação neuroglial e marcadores inflamatórios. (41, 48)

Os estudos sobre a associação entre transtorno bipolar e parâmetros imunológicos, cada vez mais sugerem a associação do Transtorno do Humor com o aumento dos níveis de autoanticorpos, bem como o aumento da ativação imunológica com a produção de citocinas pró-inflamatórias e redução dos parâmetros de anti-inflamatórios. (49-52)

De modo geral, os episódios de humor têm sido bem caracterizados como estados pró-inflamatórios. Sugere-se um aumento nos níveis de TNF- α e IL-6 durante os episódios de mania e depressão. A IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória, encontra-se elevada somente no estágio precoce das doenças. (53-58)

A inter-relação entre as manifestações dos mecanismos inflamatórios entre as patologias do corpo e das doenças mentais (como sintomas de depressão) levou à hipótese de que as citocinas inflamatórias e fatores pró-inflamatórios devem estar envolvidos na patofisiologia dos transtornos neuropsiquiátricos. Apoiando esta

hipótese, encontra-se a elevada prevalência de co-morbidade psiquiátrica, incluindo depressão, em pacientes que sofrem com doenças crônicas associadas com a inflamação, como artrite reumatóide, câncer, doenças infecciosas, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares. (59-62)

A ativação de citocinas pró-inflamatórias está associada com o humor deprimido, sentimentos de fadiga e alterações na função cognitiva. Ocorrendo uma inter-relação entre o desempenho cognitivo em adultos saudáveis moderadamente deprimidos e pessoas mais velhas com o aumento dos marcadores celulares da inflamação; como a interleucina-6 (IL - 6) e a proteína C-reativa (PCR). (17, 63-65)

Em pacientes deprimidos, os níveis de TNF- α , IL-6 e PCR são maiores. O aumento dos marcadores inflamatórios em pacientes deprimidos tem sido associado com a não resposta ao tratamento com medicamentos antidepressivos convencionais. O estresse precoce, também está associado a não resposta ao tratamento em pacientes que não respondem ao tratamento farmacológico. (59, 66)

A administração da citocina IFN- α é responsável pelo desenvolvimento de duas síndromes comportamentais, sendo uma síndrome neurovegetativa e uma síndrome do humor cognitiva com fenomenologia distinta e com capacidade de resposta aos antidepressivos diferentes. A síndrome do humor com sintomas cognitivos é sensível ao tratamento com antidepressivos, já os sintomas neurovegetativos (fadiga, em particular) não respondem antidepressivos. (59, 66)

Estudos clínicos em pacientes com Depressão Maior (DM) e Doença Bipolar (DB) tem demonstrado um aumento significativo nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL solúvel -6R, IL-2, solúvel de IL-2R, IL-1ra, e IFN- α . A ativação do sistema imunitário tem sido observada em pacientes com DM, o que resulta num aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias. (67-72)

Há fortes evidências de que existe uma ligação entre depressão, transtornos de ansiedade e inflamação. Sendo mais aparente em determinados pacientes, incluindo aqueles que são resistentes ao tratamento como as vítimas de maus tratos na infância, e aqueles que são obesos. (39, 73, 74)

Estudos que encontraram aumento dos marcadores da inflamação após a administração de antidepressivos referem que estes ocorrem em associação com o uso de antidepressivos e aumento no índice de massa corporal (IMC). Tem sido demonstrado que o IMC se correlaciona com marcadores periféricos aumentados de inflamação, em parte relacionado com a capacidade do tecido adiposo em produzir IL-6 e outras citocinas. (75)

Os portadores de transtornos mentais graves, como esquizofrenia ou DB possuem piora da saúde física e redução da expectativa de vida em comparação com a população em geral. Estas condições estão relacionadas à inflamação, especialmente doença cardiovascular, obesidade e resistência à insulina. A inflamação regula o equilíbrio global de componentes pró e anti-inflamatórios o que pode estar relacionado à elevação de IL-6 na esquizofrenia, este fenômeno também pode refletir um mecanismo compensatório derivado de episódios anteriores em DB. Enquanto os níveis de IL-10 parecem diminuir com a progressão da doença, a balança pró-inflamatória geral em BD piora nas fases posteriores da doença e a resposta anti-inflamatória diminui. (30, 74)

Na esquizofrenia, os estudos enfatizam a importância das alterações no sistema imunológico no papel das interleucinas e sua ação nos processos inflamatórios e anti-inflamatórios, assim como as Infecções no período pré-natal, a função mitocondrial e o estresse oxidativo na fisiopatologia da esquizofrenia. (76-83)

Há evidências convincentes de estudos individuais e familiares de que o Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) tem caráter genético. No entanto, pesquisas recentes sugerem que as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α estão envolvidas na fisiopatologia do TOC. (30, 84)

O Transtorno do Pânico cursa com aumento dos níveis séricos de receptores interleucina-2 solúvel (IL-2R) e aumento das células *natural killer* (NK) assim como enriquecimento dos linfócitos T virgens (CD45RA) e aumento da expressão de CD62L, bem como o aumento do cortisol plasmático. O aumento dos níveis de cortisol pode levar a diminuição da produção de IL-2, em linfócitos de memória e a seguir a sensibilização. (85)

No Transtorno do Estresse Pós Traumático (TEPT) a produção espontânea de interleucina (IL)-1 β , IL-6 e do TNF - α isolados é significativamente aumentada o que também pode ser correlacionado com a gravidade dos sintomas. (86)

1.6 BDNF

O BDNF é a neurotrofina mais abundante e amplamente distribuída no SNC. O papel do BDNF tem sido intensamente investigado em diversas situações clínicas. Estando associado com a patogênese de vários distúrbios psiquiátricos, tais como depressão, distúrbio bipolar, doença de Alzheimer e esquizofrenia.(87)

Na vida adulta se acredita que o papel das neurotrofinas como o BDNF, destina-se, principalmente, à plasticidade neuronal, aprendizagem e a memória. (88)

O BDNF determina o número final de neurônios, para protegê-los de apoptose, facilitando a plasticidade neuronal e regulando as células progenitoras neurais. Supõe-se que a estimulação repetida aumenta a expressão neuronal, secreção e atividade deste fator sobre a transmissão e conectividade sináptica. (89)

Uma diminuição nos níveis circulantes de neurotrofina é prejudicial ao cérebro. O mecanismo exato dessa redução do BDNF sérico não está completamente claro no momento. Ele não parece ser exclusivamente, devido a um polimorfismo do gene BDNF. Mais do que isso, parece que a sua transcrição é modulada epigeneticamente, sendo influenciada pelo estado de metilação dos promotores do gene BDNF e pela ligação de diferentes fatores de transcrição nucleares. (53)

Alteração nos níveis de BDNF tem sido alvo de vários estudos que relacionam a neurogênese prejudicada e o indução de atrofia hipocampal à depressão. Os estudos têm mostrado mudanças estruturais e perda de volume do hipocampo nos pacientes com depressão, tanto precoce como de início tardio, com uma relação significativa entre a atrofia do hipocampo, e as deficiências cognitivas em pessoas com depressão de início tardio. (12, 28)

A exposição a estresse crônico induz diminuição nos níveis de BDNF e também de outras neurotrofinas, conseqüentemente redução na neurogênese, na formação dendrítica e aumento da vulnerabilidade celular. No entanto, o tratamento

com antidepressivo, parece proporcionar o aumento dos fatores neurotróficos, restabelecendo níveis normais de BDNF necessários a proliferação e sobrevivência celular. (90)

De Lima e cols. (2011) investigaram os efeitos da exposição a um evento adverso no início da vida, a SM, combinado à administração de anfetamina (AMPH) na idade adulta, na memória de reconhecimento e o BDNF no cérebro e soro de ratos. Os níveis de BDNF foram diminuídos no hipocampo dos ratos do grupo da SM. (9)

Marais e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos da SM em ratos jovens submetidos ao estresse crônico na idade adulta. Verificando que os ratos submetidos à SM, quando jovens e ao estresse crônico, quando adultos, mostram diferenças comportamentais, em níveis de neurotrofinas e em níveis hormonais. O exercício de correr, em ratos durante 6 semanas, foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e aumentou os níveis de BDNF em ratos submetidos aos protocolos de SM e estresse crônico. O mecanismo pelo qual o comportamento depressivo foi melhorado pode ter sido mediado pelos níveis aumentados de BDNF após o exercício. (91)

1.7 Tratamentos Farmacológicos

Os fármacos antidepressivos atuam de maneiras diferentes na atividade dos neurônios, por exemplo por meio do aumento dos níveis de monoaminas e da modulação de canais iônicos. Da mesma maneira, para os fármacos anticonvulsivantes os canais de sódio são grandes alvos moleculares, o que resulta num efeito desejável para os estabilizadores do humor (Lamotrigina, Topiramato, Fenitoína, Carbamazepina, Ácido Valpróico).

Ao ser comparado o efeito antidepressivo dos estabilizadores do humor (Paroxetina, Imipramina e Desipramina), com um dos anticonvulsivantes (Lamotrigina, Fenitoína e Topiramato) sobre o estresse provocado por meio do teste do nado forçado (FST, sigla do termo em inglês, *Forced Swim Test*) em cobaias, houve evidências de que os mecanismos de ação dos anticonvulsivantes e antidepressivos são semelhantes. Ambos reduziram de maneira semelhante a imobilidade no FST, sugerindo que o parâmetro adotado foi sensível a ambos os

fármacos. Este estudo concluiu que o desenvolvimento de novas drogas agindo sobre os canais de sódio pode ser de interesse para o desenvolvimento de antidepressivos bem como para estratégias adjuvantes para os antidepressivos clássicos. (92)

O sucesso clínico com fármacos antiepilépticos (DAE) depende essencialmente de sua eficácia e tolerabilidade, e de um entendimento básico de características farmacocinéticas da DAE, particularmente aqueles que afetem o potencial para interações de droga. O sucesso do tratamento pode ser complicado por características farmacocinéticas, como uma meia-vida curta, cinética não linear, e metabólitos ativos. Características farmacocinéticas que tornam um fármaco de fácil utilização podem contribuir para adesão do paciente. Em geral, os DAEs mais recentes, como o Topiramato (Top) são mais simples de usar que os DAEs tradicionais porque têm características farmacocinéticas mais favoráveis e poucas interações entre fármacos. (92, 93)

O perfil farmacocinético de Top é caracterizado por absorção rápida e quase completa, não afetada por alimentos; cinética linear, tornando-se possível prever mudanças na concentração de plasma com alterações da dose ou regimes de dosagem, sem auto-indução do metabolismo; sem metabólitos ativos; baixa ligação às proteínas plasmáticas, o que limita o potencial de interação; eliminação predominantemente renal; e longo tempo de semi-vida. (93)

O Top é estruturalmente relacionado com outros fármacos DAEs. Top é usado como monoterapia ou como complementação para o outro DAEs. Testes *in vitro* sugerem que o Top afeta a atividade neuronal e produz seu efeito por vários mecanismos, incluindo a modificação dos potenciais de ação dependentes de cálcio e sódio, o aumento da atividade gabaérgica, e inibição da condutância mediada por cainato em receptores de glutamato do tipo KA . O Top também tem um efeito inibitório em algumas isoenzimas da anidrase carbônica. (94)

Estudos eletrofisiológicos com canais mediados por cainato demonstraram atividade do Top em culturas de neurônios do hipocampo de ratos. Estudos têm revelado que o Top inibe canais dependentes de sódio, mecanismo de ação compartilhado com outros anticonvulsivantes, tais como fenitoína, carbamazepina, lamotrigina. (95)

O Top aumenta o influxo de cloreto via receptores GABAérgicos em neurônios. Estudos demonstraram que o Top aumenta a frequência da ativação de receptores GABA-A em culturas de neurônios cerebelares e corticais; e que o Top não age por meio dos sítios de ligação GABA ou benzodiazepínicos no GABA-A, devendo, portanto, exercer o seu efeito nas correntes GABA-A mediada por interação com outros sítios do receptor GABA-A, mas o mecanismo de execução ainda não está claro. (96)

O Top não tem nenhum efeito em receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA, mas inibe a atividade do KA no receptor AMPA/Kainato de forma concentração-dependente. O bloqueio de potenciais KA-evocados reduz a excitabilidade neuronal e pode contribuir para a ação anticonvulsivante. (97, 98)

O Top inibe fracamente os tipos II e IV de isoenzimas da anidrase carbônica. O influxo intracelular de íons bicarbonato tem ação despolarizante quando os receptores GABA-A são estimulados. Este efeito poderia ser diminuído pelos inibidores da anidrase carbônica. (99)

Com o conhecimento das propriedades farmacológicas de Top e seus mecanismos de ação, se cogita que ele possa ser neuroprotetor. Ao utilizar testes imunofluorescentes verificou-se maior sobrevivência neuronal em culturas expostas a ação excitotóxica glutamatérgica em que o Top foi utilizado. É bem estabelecido que o Top tem um efeito modulatório negativo na corrente de cálcio KA- induzida e que a hiperestimulação dos receptores AMPA/KA induz a morte celular, foi postulado que Top se liga a sítios de fosforilação das proteínas que modula. (97)

Nosso grupo tem estudado as DAEs como por exemplo, o Ácido Valproico ou Val (Pinheiro e cols. 2012). Este, conforme um estudo utilizando os modelos animais SM e Mania, no teste comportamental realizado 2 horas após os tratamentos farmacológicos reverteu-o efeito no número de cruzamentos e explorações verticais induzidos por D-AMPH, e, associado a estresse neonatal, sugerindo seu papel como modulador do humor. Mas ao associarmos estresse neonatal e D-AMPH ao tratamento com o Val não foi observada reversão dos efeitos nos testes. Reforçando a importância do período de vida neonatal como fator relevante na fisiopatologia de doenças mentais na vida adulta. Portanto, consideramos necessário, estudos nesta área buscando os mecanismos envolvidos nos transtornos mentais e na ação de

fármacos utilizados. (100)

É visando buscar compreender os mecanismos envolvidos neste trinômio: “estresse neonatal-desenvolvimento de transtorno neuropsiquiátrico na vida adulta-fármacos com potencial neuroprotetor” que persistimos em nossa busca de fármacos que possam atuar sobre os danos induzidos pela SM.

Em um estudo experimental em ratos foi demonstrado que doses baixas de Top melhoram, enquanto altas doses perturbam a consolidação da memória de reconhecimento de objeto. (101)

Em outro estudo, *in vitro*, foi investigado o efeito do Top o influxo de cálcio por receptores AMPA e Cainato (KA), em diferentes sistemas de cultura de neurônios do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. Em todos os tipos de culturas de neurônios estudados, AMPA e KA provocaram um influxo de cálcio em um subconjunto da população neuronal. O Top, em concentrações de 30 e 100 microM (micromolar), inibiu o influxo de cálcio em até 60%, de modo que esta modulação do influxo de cálcio evocado por AMPA e KA pode contribuir para ambas as propriedades neuroprotetoras e anticonvulsivantes do Top. (102, 103)

Além disso, há cada vez mais evidências sobre o uso efetivo do Top em diferentes patologias neuropsiquiátricas. Estudos demonstraram evidências sobre eficácia do Top no tratamento da dependência de álcool, sendo que dois estudos mostram tendências para a superioridade do Top sobre o Naltrexone oral na dependência do álcool, ainda que inferior ao Dissulfiram e com efeitos colaterais que podem limitar a sua utilização generalizada. (93)

O Top apresentou propriedades neuroprotetoras em modelos animais de lesão cerebral, reduzindo o dano neuronal em modelos animais de isquemia e hipóxica neonatal, de convulsões febris, de isquemia/reperfusão cerebral, de traumatismo crânio-encefálico, crises convulsivas induzidas, e de insultos ocasionados por estados de temperatura elevada. (104-109)

Estudos pré-clínicos sugerem que o Top confere proteção contra a isquemia neurológica. Uma formulação intravenosa de Top foi desenvolvida para a administração, em condições como hipóxia-isquemia, quando a absorção enteral pode ser inviável. A farmacocinética no plasma, penetração no líquido

cefalorraquidiano (LCR) e a farmacodinâmica do Top intravenosa foram avaliados nesse modelo animal de hipóxia-isquemia. Os animais toleraram bem o Top intravenoso, sem mudanças significativas nos parâmetros fisiológicos e neurológicos. O *clearance* lento da droga permite concentrações para a manutenção do potencial neuroprotetor após uma única dose da droga por 24 horas. Uma alta penetração da droga no LCR é uma característica farmacológica ideal de qualquer agente potencial neuroprotetor. (110)

Adicionalmente, o Top demonstrou atenuar os déficits de memória associados à cocaína, hemorragia intracerebral, e estado epiléptico induzido por pilocarpina. (111-113)

Alguns estudos clínicos e pré-clínicos recentes também tem sugerido a ideia de que o Top possa ser utilizado com sucesso no tratamento do transtorno de estresse pós-traumático, levantando a necessidade de investigação mais aprofundada dos mecanismos associados às ações desse fármaco. (114-116)

2 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

2.1 Relação entre exposição ao estresse no período neonatal e a manifestação de alterações neurocomportamentais 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 SM no período neonatal em roedores pode induzir aumento na ansiedade e nos níveis de hormônios do estresse; mudanças nas taxas de neurogênese e indução de apoptose; decréscimo em níveis de fatores neurotróficos e alterações de enzimas responsáveis pela transdução de sinais importantes para o aprendizado e a cognição. (117, 118)

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

Nesta tese de Doutorado foi testado o Top, pois este fármaco vem sendo usado com sucesso em patologias neuropsiquiátricas, apresentando poucas interações medicamentosas. E, entre os fármacos estabilizadores do humor é o que menos induz aumento de peso nos pacientes. Em virtude do efeito modulador dos níveis de ansiedade e do apetite, sendo o último um dos fatores de fracasso do tratamento farmacológico com o uso do lítio e do Val que estão envolvidos com outras patologias como obesidade mórbida, síndrome metabólica e este efeito adverso e uma série de eventos clínicos que acompanham estas patologias consideradas um problema de saúde pública. (25, 119-121)

O objetivo desta tese de doutorado foi avaliar o efeito do Top, comparando-o com o Val e desta forma buscando entender os mecanismos envolvidos com o uso destes fármacos em ratos submetidos ao método da SM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do Top e do Val as alterações neurocomportamentais cognitivas e nos níveis de citocinas e BDNF induzidas pela SM.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da exposição ao estresse no período neonatal (utilizando o modelo da SM) sobre parâmetros comportamentais (através da medida da atividade motora/exploratória e da tarefa de memória de reconhecimento do objeto novo) na fase adulta.

Avaliar os efeitos do tratamento com Top e do Val sobre as possíveis alterações comportamentais induzidas pela exposição ao estresse no período neonatal.

Avaliar os efeitos ocasionados pela SM com e sem o tratamento com Top e Val sobre os níveis TNF- α no hipocampo e no córtex pré-frontal.

Avaliar os efeitos ocasionados pela SM com e sem o tratamento com Top e Val sobre os níveis de Interleucina 10 no hipocampo e no córtex pré-frontal.

Avaliar os efeitos ocasionados pela SM com e sem o tratamento com Top e Val sobre os níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Ratas Wistar prenhas foram obtidas da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEEPS-RS). Cada rata foi acomodada individualmente em uma caixa de moradia. Cada ninhada foi padronizada 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 21 dias de vida e os machos foram colocados em caixas de moradia ventiladas individualmente em grupos de 3 a 5 ratos por caixa.

Em todos os experimentos, foram utilizados somente os animais machos. Os mesmos animais submetidos aos experimentos comportamentais foram utilizados posteriormente para as análises dos níveis de citocinas e BDNF.

Os protocolos desta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA) da PUCRS registro 11/00224.

4.2 Exposição ao estresse no período neonatal (método da privação materna)

Os filhotes foram divididos em dois grupos experimentais:

1) manipulados (grupo controle ou grupo não-separado): que foram separados de suas mães diariamente por 15 minutos, apenas para serem pesados.

2) grupo Separação Materna (SM): que foram separados de suas mães diariamente por um período de 180 min. do 1° ao 14° dia de vida pós-natal das ninhadas.

Durante o período de separação, as caixas de moradia das ninhadas foram colocadas sobre uma superfície aquecida (30-33°C) em uma sala com as mesmas condições de temperatura e luminosidade que a sala onde os outros animais da colônia foram mantidos. (9, 100)

4.3. Tratamento com Top e Val na idade adulta

Com base na revisão da literatura, o design deste estudo foi proposto da

seguinte maneira: cada um dos dois grupos de ratos descritos acima foram subsequentemente divididos em quatro grupos na fase adulta:

1) um grupo recebeu 10mg/Kg por via oral de Topiramato uma vez ao dia por 14 dias,

2) o outro grupo recebeu 100mg/kg por via oral de Topiramato no mesmo período,

3) outro grupo recebeu 200mg/kg por via oral de Valproato no mesmo período,

4) e o outro grupo recebeu a mesma quantidade correspondente em mililitros através da administração por via oral de solução salina (grupo controle).

4.4 Tarefas comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados 24 horas após o término dos tratamentos farmacológicos.

4.4.1 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.

A sessão teve duração de 5 minutos, durante os quais o animal pode explorar a caixa livremente. Foram registrados: a latência de saída do primeiro quadrante, o número de cruzamentos, o número de respostas de orientação. (9, 100)

4.4.2 Tarefa de Reconhecimento do Objeto

Os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo 24 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 serralha sobre o seu assoalho.

No primeiro dia de execução da tarefa, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos foram colocados no campo aberto e o animal pode explorá-los

durante 5 minutos. 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.

As sessões de teste tiveram duração de 5 minutos cada uma. Um índice de preferência, 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.(9, 100, 101, 122-124)

Os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas encefálicas (hipocampo e córtex pré-frontal) foram rapidamente dissecadas e armazenadas à 80°C negativo até sua utilização. As análises bioquímicas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Psiquiatria Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, considerando a colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Flávio Kapczinski.

4.5 Análise Bioquímica dos níveis de Citocinas

As concentrações de citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando a matriz BD™ citométrico Illumina (CBA) Conjuntos Flex IL - 10 e TNF - α para ratos (BD Biosciences, San Diego, CA). O processamento das amostras e análise de dados foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos através de citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA) e os resultados foram gerados usando o BD Análise CBA Software FCAP Matriz™ (BD Biosciences, San Diego, CA).

4.6 Análise Bioquímica dos níveis de BDNF

Os níveis de BDNF nas áreas de interesse foram medidos através de kits anti-BDNF do tipo *sandwich*-ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), de acordo com as instruções do fabricante (Milipore,USA).

As regiões cerebrais foram homogeneizadas em solução salina tamponada – (PBS) contendo 1 mmol/l de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1 mmol/l de ácido etileno glicol tetraacético (EGTA).

As placas para microtitulação (96 poços com fundo plano) foram revestidas por 24 h com as amostras diluídas na proporção de 1:2 no diluente da amostra. As placas foram lavadas quatro vezes com o diluente da amostra e um anticorpo monoclonal de coelho anti-BDNF (diluído na proporção de 1:1000 no diluente da amostra) foi adicionado em cada poço e incubado por 3 horas em temperatura ambiente.

Após a lavagem, um anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase horseradish (diluído na proporção de 1:1000) foi adicionado em cada poço e incubado em temperatura ambiente por 1 h. Após a adição da enzima estreptavidina, substrato e solução de parada, a quantidade de BDNF foi determinada através da absorbância em 450 nm.

A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica e a concentração de BDNF (em cada uma das análises separadamente). A quantidade total de proteínas foi medida segundo o método de Lowry, utilizando albumina de soro bovino como padrão. (9)

4.7 Análise Estatística

Os dados dos índices de reconhecimento de objeto foram expressos como mediana (intervalo interquartil). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas usando a análise de variância de Kruskal - Wallis não paramétrica seguida pelos testes U de Mann - Whitney, quando necessário. O tempo total gasto explorando os objetos, o familiar e o novo nas sessões de treino e nos testes de retenção, e os dados do experimento que avaliam o comportamento em campo aberto foram expressos como média \pm SE e foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA), seguido de testes *post hoc* de Tukey. Os dados bioquímicos foram expressos como média \pm SE, foram analisados pela ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* HSD de Tukey. Valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. (9, 125-127)

5 RESULTADOS

5.1 Comportamento em Campo aberto

Para controle de possíveis efeitos da SM neonatal ou administração crônica de Top ou Val em funções sensório-motoras gerais foi analisado o comportamento de campo aberto em ratos adultos (Fig. 1). A ANOVA (de uma via) não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos na latência para iniciar a locomoção ($F_{(7, 67)} = 1,198$, $p = 0,318$, Fig. 1A) ou no número de cruzamentos ($F_{(7, 67)} = 1,431$, $p = 0,210$, Fig. 1B). A comparação estatística dos números de respostas de orientação revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{(7, 67)} = 3,679$, $p = 0,002$). No entanto, comparações *post hoc* não revelaram nenhuma diferença significativa entre o grupo controle (NS-Sal) em comparação com todos os outros grupos. Além disso, as comparações do grupo S-Sal com todos os outros grupos também não mostraram diferenças significativas (Fig. 1C). Estes resultados sugerem que a separação materna e o tratamento crônico na idade adulta com Top ou Val não afetaram a locomoção ou a exploratória.

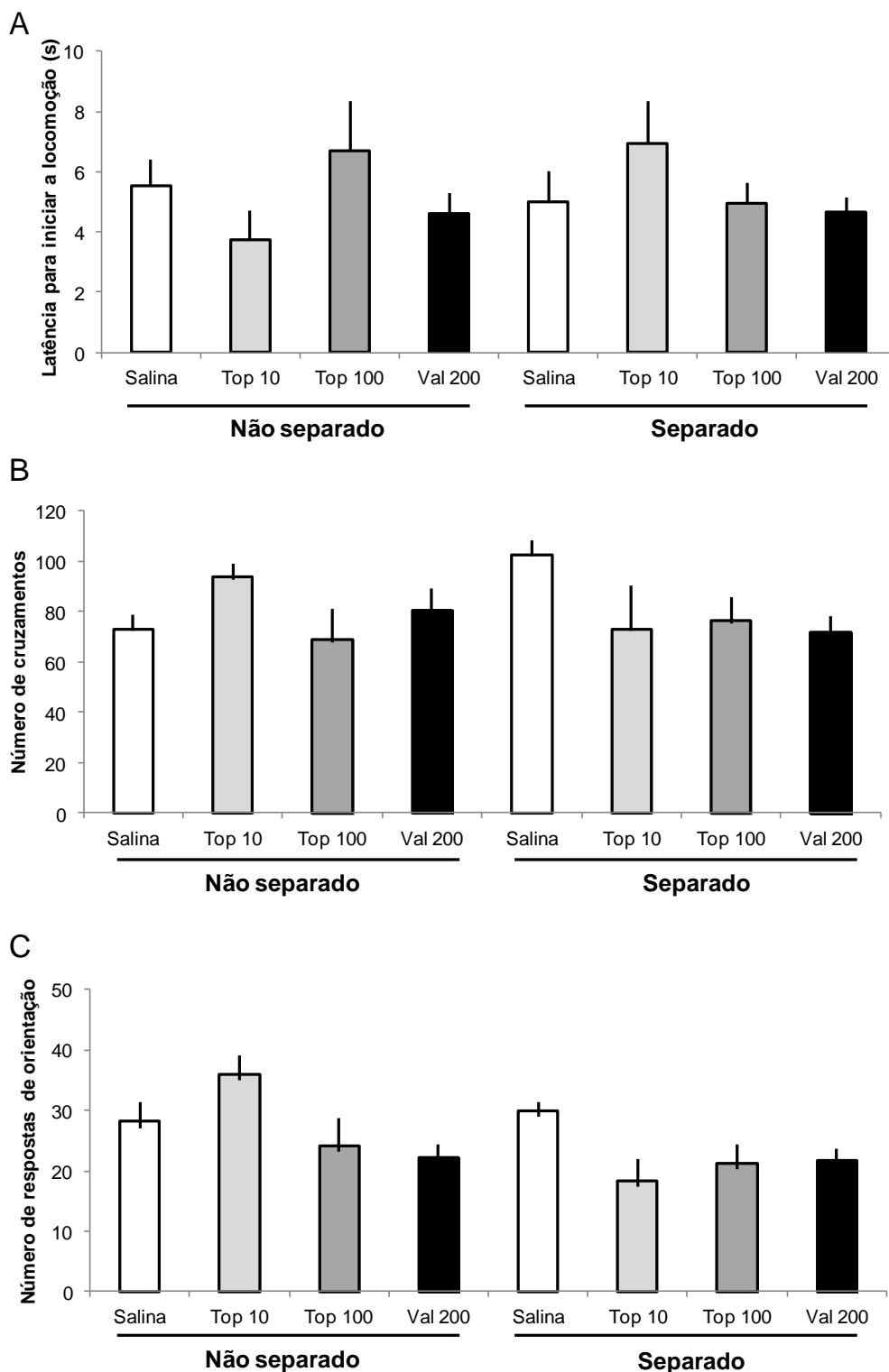


Figura 1. Efeitos da separação materna ou dos tratamentos com Topiramato (Top) ou valproato (Val) sobre o comportamento do campo aberto. (A) latência para iniciar a locomoção, (B) número de cruzamentos e (C) número de respostas de orientação, foram avaliados em uma caixa de campo aberto após tratamentos com Top ou Val crônicos, e esta exploração foi usada como uma sessão de habituação para a tarefa de reconhecimento do objeto. Os dados são expressos como média \pm SE. Nenhuma diferença entre os grupos foi observada.

5.2 Memória de reconhecimento do objeto

Os efeitos da administração crônica de Top ou Val na memória de reconhecimento em ratos expostos à separação materna são mostrados na Fig. 2. A análise de variância de Kruskal-Wallis revelou uma diferença significativa entre os grupos nos testes de retenção de curto prazo ($df = 7$, $H = 22,952$, $p = 0,002$) e de longo prazo ($df = 7$, $H = 18,391$, $p = 0,010$), mas não na sessão de treino ($df = 7$, $H = 7,329$, $p = 0,395$).

Subsequente análise usando os testes de Mann-Whitney revelou que os animais que foram separados de suas mães e tratados com solução salina na idade adulta (Grupo S-Sal), obtiveram índices de reconhecimento mais baixos na sessão de retenção LTM quando comparados com o grupo controle correspondente (NS-Sal, $p < 0,001$), indicando que a SM prejudica a memória de reconhecimento de longo prazo. A administração crônica do Val melhorou a memória no grupo S, já que o índice de reconhecimento a longo prazo do Grupo S-Val mostrou-se sem diferenças significativas em comparação com o grupo controle (NS-Sal, $p = 0,351$; Teste Mann-Whitney, Fig. 2).

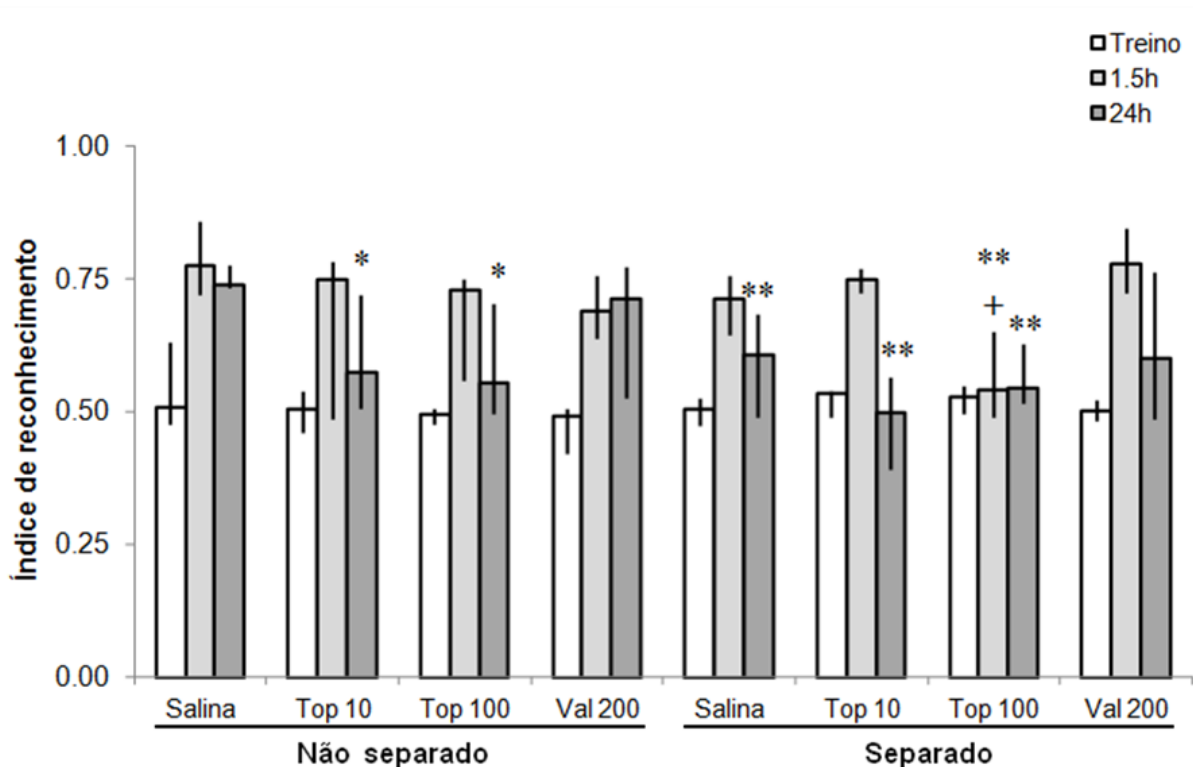


Figura 2. Efeitos do Topiramato (Top) ou Valproato (Val) na memória de reconhecimento após exposição a separação materna (S). Os grupos dos animais separados (S) ou não separados (NS) no período neonatal receberam Top ou Val por 14 dias consecutivos, quando adultos. Vinte e quatro horas após a última administração por via oral, eles foram treinados na tarefa de reconhecimento de objeto. Os testes de Memória de curto prazo (STM) de longo prazo (LTM) foram realizados 1,5 e 24 h após o treinamento, respectivamente. A proporção do tempo total de exploração que o animal passou investigando o objeto novo foi o "índice de reconhecimento", expresso pela relação $TN / (TF + TN)$, TF = tempo gasto explorando o objeto familiar e TN = tempo gasto explorando o novo objeto. Dados expressados em mediana \pm intervalos interquartis, N = 7-11 por grupo (ver tabela 1). Diferenças entre o grupo NS-salina (controle) e todos os outros grupos são indicadas como: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$; entre S-salina e outros grupos como: + $p < 0,05$.

A comparação estatística dos grupos NS que receberam Top na idade adulta com o grupo controle (NS-Sal) revelou que o topiramato prejudicou a memória de reconhecimento de longo prazo. Nesse sentido, os índices de reconhecimento de grupos NS-Top10 e NS-Top100 foram significativamente menores do que o grupo controle ($p = 0,021$ e $p = 0,014$, respectivamente). Além disso, análises estatísticas dos índices de reconhecimento de grupos S que receberam Top mostraram que este tratamento foi incapaz de amenizar os déficits de memória induzidos pela SM. Índices de reconhecimento dos grupos S-Top10 e S-Top100 no teste de retenção de

longo prazo foram significativamente menores do que o grupo controle (NS-Sal) ($p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente). Notavelmente, ratos que foram separados de suas mães e receberam top crônico com a dose mais alta, também mostraram perda de memória a curto prazo, quando comparado ao grupo controle (NS-Sal, $p = 0,002$) e ao grupo S-Sal ($p = 0,015$).

Comparações estatísticas do tempo total explorando objetos durante as sessões de treinamento, e nos testes de memória de curto prazo ou a longo prazo mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1

GRUPO	N	Treinamento	Teste STM	Teste LTM
NS-solução salina	8	38,9 ± 6,3	33,6 ± 7,4	38,4 ± 5,0
NS-Top 10	9	57,3 ± 7,8	39,6 ± 5,2	31,9 ± 4,9
NS-Top 100	7	51,5 ± 8,8	43,8 ± 10,0	33,9 ± 6,6
NS-Val 200	8	40,7 ± 5,6	38,1 ± 6,3	32,1 ± 4,0
S-solução salina	7	59,4 ± 7,8	48,3 ± 5,7	46,0 ± 7,6
S-Top 10	8	50,9 ± 3,5	52,8 ± 8,7	38,9 ± 5,0
S-Top 100	10	62,4 ± 6,6	54,6 ± 7,0	41,6 ± 5,7
S-Val 200	11	56,6 ± 2,8	36,8 ± 4,5	34,5 ± 5,4

Tabela 1 – Tempo total (em segundos), explorando os dois objetos no treino ou nos testes de memória de curta ou longa duração da tarefa de reconhecimento do objeto em ratos submetidos à separação materna neonatal (SM) e a administração crônica de Topiramato (Top) ou de Valproato (Val).

5.3 Citocinas

A Figura 3 mostra os resultados das dosagens de IL-10 no hipocampo (3A) e no córtex pré-frontal (3B) de ratos submetidos à SM neonatal e submetidos ao tratamento crônico com Top ou Val quando adultos. A comparação estatística dos níveis de IL-10 no hipocampo, mas não no córtex, indicou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{(7, 42)} = 2,66$, $p = 0,026$). Posteriores comparações *post hoc* indicaram que a SM induziu um aumento significativo nos níveis de IL-10, quando o grupo S-Sal foi comparado ao grupo controle (NS-Sal) ($p = 0,031$). O Top na dose máxima e o tratamento com Val em ratos expostos a SM induziu diferenças significativas quando comparado ao grupo S-Sal, sugerindo que estes tratamentos foram capazes de reverter aumentos nos níveis de IL-10 induzidos pela SM (ambos $p < 0,05$) no hipocampo.

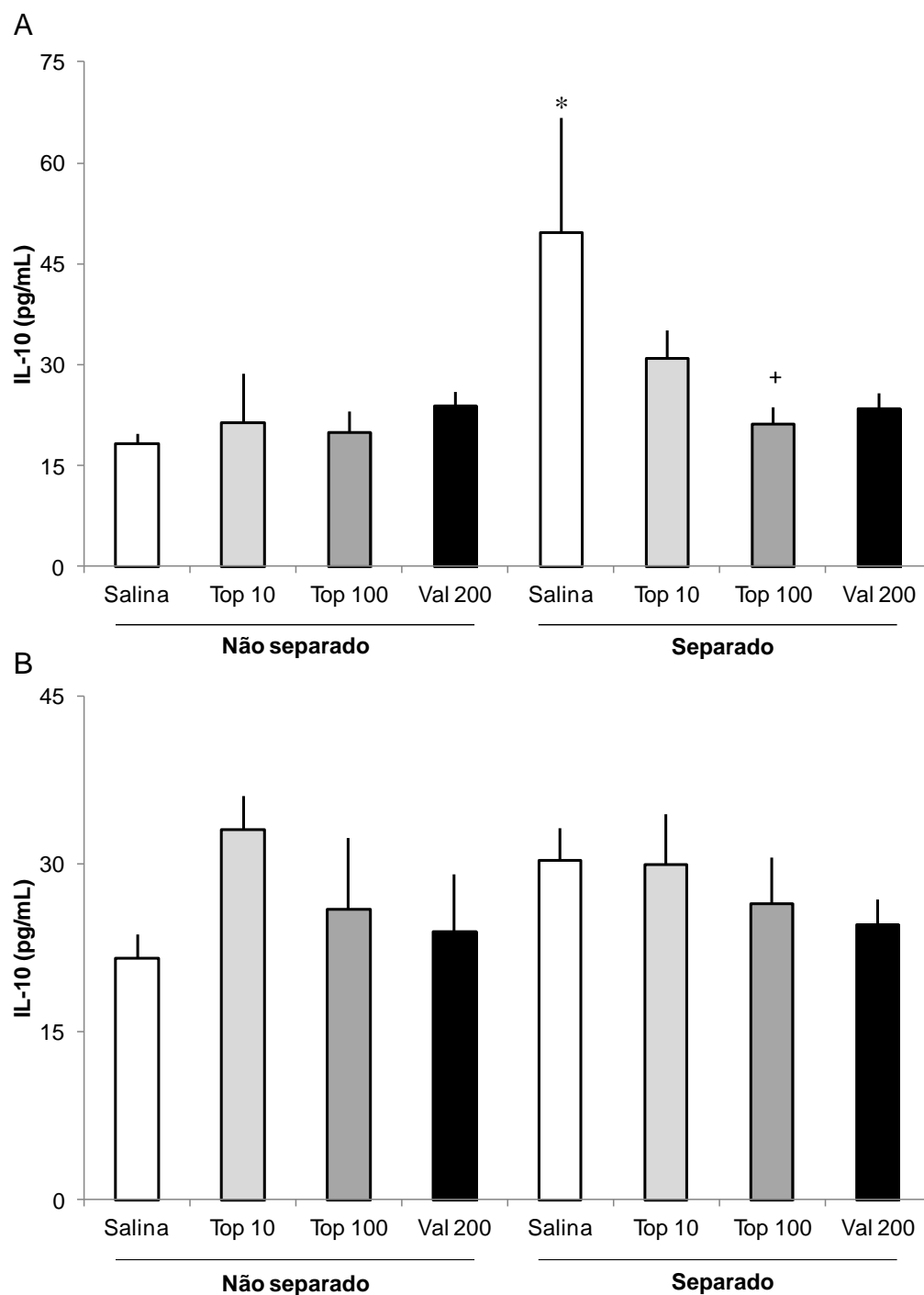


Figura 3. Efeitos da SM e do tratamento com Topiramato (Top) ou Valproato (Val) em níveis de IL-10, em: hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B). Os dados são expressos como média \pm SE picograma de IL-10/mL, N = 3-9 por grupo. Os ratos foram sacrificados para medição de IL-10, 24 horas após a conclusão dos experimentos comportamentais. Diferenças entre NS-Sal versus outros grupos são indicadas como: * P < 0,05; diferenças entre o grupo de S-Sal versus outros grupos são indicadas como: +P < 0.05.

Os resultados mostrando os níveis de TNF- α são apresentados na Figura 4. A comparação estatística dos níveis de TNF- α , revelou diferenças significativas entre os grupos tanto no hipocampo ($F_{(7, 52)} = 2,276$, $p = 0,046$, Fig. 4A) quanto no córtex pré-frontal ($F_{(7, 58)} = 2,91$, $p = 0,012$, Fig. 4B). Comparações *post hoc* indicaram que o grupo submetido à SM que recebeu solução salina (S-Sal) apresentou um aumento significativo nos níveis de TNF- α no hipocampo quando comparados ao grupo controle (NS-Sal, $p = 0,029$). Da mesma forma, os níveis de TNF- α dos animais do Grupo S-Sal também foram aumentados no córtex, quando comparado ao grupo NS-Sal ($p = 0,012$). Comparações *post hoc* também revelaram uma diferença significativa entre S-Sal e o grupo privado que recebeu Top na dose mais elevada (S-Top 100, $p = 0,017$).

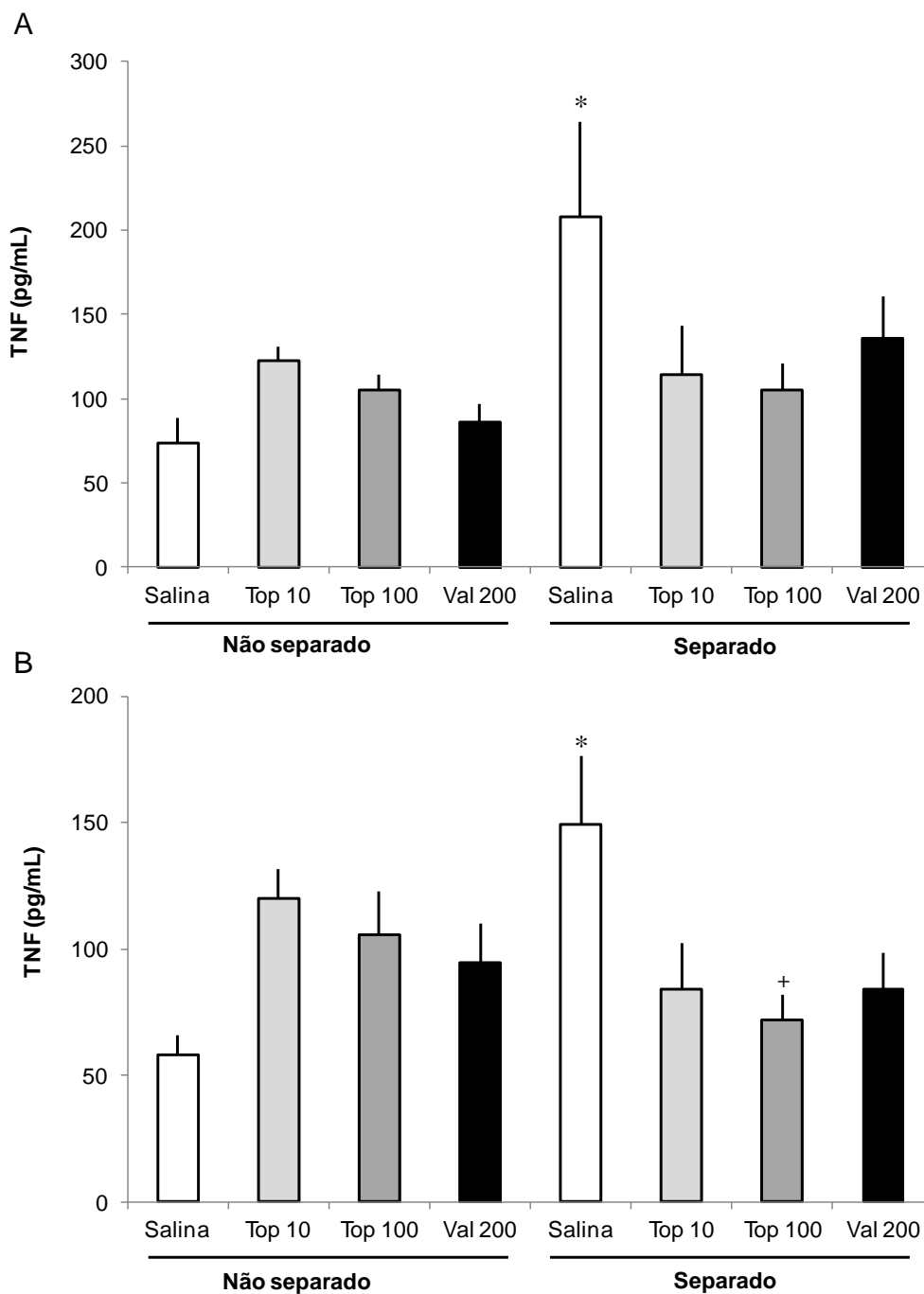


Figura 4. Efeitos da SM e dos tratamentos com Topiramato (Top) ou Valproato (Val) em níveis de TNF- α no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B). Dados são expressos como média \pm SE picograma de TNF- α /mL, N = 5 – 11 por grupo. Ratos foram sacrificados para medição de TNF 24 horas após a conclusão dos experimentos comportamentais. Diferenças entre NS-Sal versus outros grupos são indicadas como: * P < 0,05; diferenças entre o grupo S-Sal versus outros grupos são indicadas como: +P < 0.05.

5.4 BDNF

A Figura 5 apresenta níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos submetidos à SM e que receberam tratamentos crônicos de Topiramato (Top) ou Valproato (Val) na idade adulta. A comparação estatística dos níveis BDNF no hipocampo revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{(7, 45)} = 3,517$, $p = 0,005$, Fig. 5A). Comparações *post hoc* mostraram que SM induziu uma redução significativa nos níveis de BDNF quando o Grupo S-Sal foi comparado ao grupo controle (NS-Sal, $p < 0,05$). Não há diferenças estatisticamente significativas na comparação de BDNF no córtex pré-frontal (Fig. 5B).

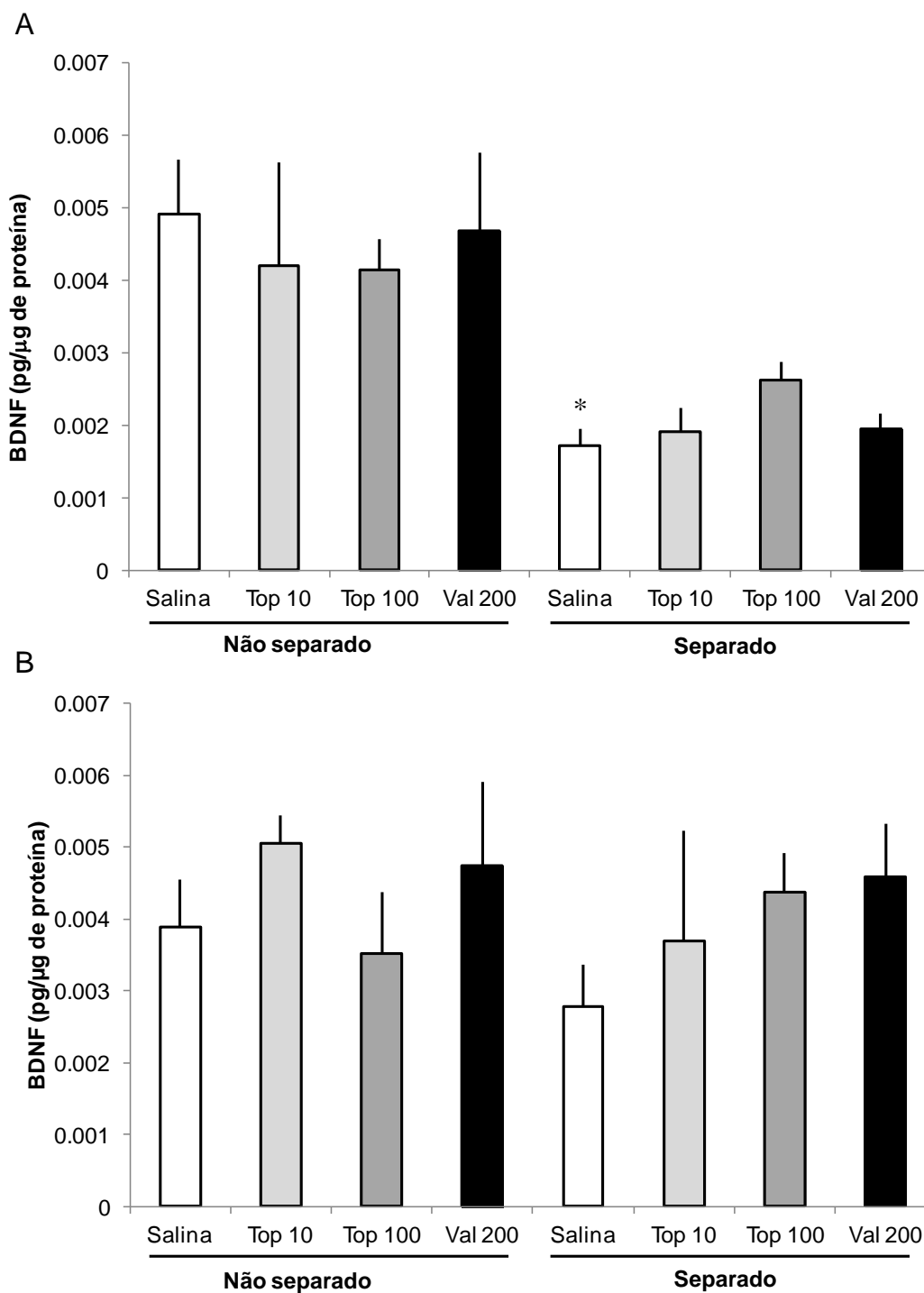


Figura 5. Efeitos da SM e dos tratamentos com Topiramato (Top) e Valproato (Val) nos níveis de BDNF no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B). Os dados são expressos como média \pm SE picograma de BDNF / μ g de proteína, N = 3 – 7 animais por grupo. Os ratos foram sacrificados para medição de BDNF 24 horas após a conclusão dos experimentos comportamentais. Diferenças entre NS-Salina contra outros grupos são indicadas como: * P < 0.05.

6 DISCUSSÃO

Nosso grupo tem estudado os efeitos ocasionados pela SM em ratos Wistar na idade adulta (Pinheiro e cols. 2012). Avaliando os danos ocasionados na memória de longa e curta duração através do teste de reconhecimento do objeto, assim como as alterações correlacionadas ao comportamento ansioso e agitação psicomotora pelas respostas de orientação e número de cruzamentos. Também estudamos análises bioquímicas em busca de respostas, referentes aos mecanismos envolvidos na gênese das alterações ocorridas após a SM e nos possíveis tratamentos farmacológicos que sejam capazes de nos elucidar tais questões. Outros grupos de pesquisadores dividem conosco estes questionamentos que infelizmente, ainda não foram totalmente respondidos, mas já foi possível estabelecer algumas conclusões: (100)

O estresse da SM no início da vida tem um efeito de longo prazo sobre a morfologia das regiões cognitivas do cérebro, provavelmente devido à perda de neurônios durante o desenvolvimento pós-natal. (128)

A SM é um modelo animal de estresse do neurodesenvolvimento associada a ocorrência de uma variedade de alterações comportamentais e fisiológicas. O estresse precoce da SM produz deficiências comportamentais ao longo de modificações dependentes da região em vários índices neuroquímicos e neurobiológicos da função dopaminérgica e serotoninérgica em regiões cerebrais que desempenham papéis críticos na fisiopatologia dos distúrbios do sistema nervoso central. (129)

O estresse tem sido descrito como um fator de risco para o desenvolvimento das doenças neuropsiquiátricas. Diminuição do número de células no hipocampo foi observada em ratos submetidos a SM, como uma consequência da diminuição da proliferação celular e do aumento da morte apoptótica e da diminuição nos níveis de BDNF. Esses efeitos podem estar relacionados a uma hiperatividade do eixo HPA, que se reflete em aumentos significativos nos níveis de corticosterona e diminuição na expressão do receptor glicocorticóide. (130)

A separação materna ativa o eixo HPA, levando a aumentos persistentes na corticosterona plasmática e no ACTH, bem como aumentos na capacidade de

resposta do eixo HPA a estressores e eleva os níveis de mRNA para CRF no núcleo paraventricular do hipotálamo. (131-133)

O sistema de glicocorticóide é conhecido por ser um regulador da resposta inflamatória, o que afeta os níveis das citocinas. O desequilíbrio persistente em mediadores inflamatórios pode contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos em seres humanos submetidos a estresse no início da vida. (134)

A exposição precoce a estresse ocasionado pela SM está associada a risco aumentado de desenvolvimento de transtornos afetivos em longo prazo. Desencadeia alterações na sinalização neuroimune que desempenha um papel importante nos transtornos afetivos, tais como alterações associadas nas células da glia e na expressão de citocinas nas principais regiões do cérebro o hipocampo e o córtex pré-frontal que estão associadas com o comportamento emocional. (135)

Deste modo que, o aumento dos marcadores inflamatórios periféricos, tais como a IL - 6 e TNF- α têm sido relacionados à depressão. (39)

Dados recentes sugerem que as citocinas podem influenciar a síntese, a liberação e a recaptção de neurotransmissores relevantes em condições neuropsiquiátricas, em particular, a serotonina, a noradrenalina, a dopamina e o glutamato, implicando assim o desequilíbrio inflamatório na etiologia da depressão e dos transtornos de ansiedade. (39)

A redução dos níveis de BDNF do hipocampo prejudica a LTP (potenciação de longa duração, sigla do termo em inglês, *long-term potentiation*), uma forma celular de plasticidade sináptica relacionada com a aprendizagem e a memória, causando déficits na formação e consolidação da memória dependente do hipocampo em ratos, assim como o estresse imprevisível crônico reduz os níveis de BDNF do hipocampo em ratos adultos. (136-138)

Estudos anteriores, usando modelos animais têm demonstrado que o estresse psicossocial aumenta os níveis de IL-6 e IL-1 em córtex pré-frontal e em hipocampo. (38, 139, 140)

Tem sido relatado que a administração sistêmica de TNF - α reduz a

expressão de BDNF na amígdala e no córtex insular, sugerindo que as citocinas podem influenciar a expressão de fatores de crescimento no cérebro. (141)

Nosso trabalho vem ao encontro dos relatos encontrados nas outras pesquisas e ao mesmo tempo confirma nossos resultados anteriores, pois demonstramos que a SM, que é comumente usada como modelo de estresse neonatal ocasiona prejuízo na memória de reconhecimento em ratos adultos. (9, 100, 142)

Em nosso estudo demonstramos pela primeira vez que a SM, durante o período neonatal aumenta os níveis da citocina pró-inflamatória, o TNF - α tanto no hipocampo como no córtex pré-frontal, e também eleva a citocina anti-inflamatória IL-10 no hipocampo.

A SM induz uma redução duradoura dos níveis de BDNF no hipocampo, o que é consistente com estudos anteriores. (9, 11, 130)

Foi mostrado recentemente que o Val melhora a memória em modelos animais de hipóxia pré-natal em camundongos transgênicos e no traumatismo crânio encefálico em seres humanos, também demonstrou-se que o Val facilita o processo de aprendizagem *off-line* de extinção do medo condicionado e habituação durante o sono. (143-145) Em nosso estudo anterior (2012), utilizamos o modelo animal de Mania/ Anfetamina (AMPH) em associação com o modelo da SM, no intuito de recriar em laboratório uma situação semelhante à sobrecarga ocasionada pelo somatório de eventos que podem ocorrer naturalmente na vida em humanos. Na fase adulta foi realizado o tratamento com Val na dosagem de 200mg/Kg/ip duas vezes ao dia por 7 dias. O Val no teste comportamental realizado 2h após os tratamentos farmacológicos conseguiu reverter os efeitos da AMPH o que nos reafirmou o seu efeito como modulador do humor. Avaliamos a STM e a LTM 8 dias após o término do tratamento farmacológico. O Val reverteu apenas o efeito da AMPH e não conseguiu reverter os efeitos quando associamos aos efeitos deletérios da AMPH e da SM. (100)

No presente estudo não repetimos a sobreposição de fatores estressantes (SM/Anfetamina) e os animais receberam o tratamento com Val na dosagem de 200mg/kg/dia em dosagem única diária por via oral por 14 dias e os testes

comportamentais foram realizados 24 horas após o final do tratamento farmacológico. Recapitulando, nós utilizamos o mesmo fármaco que foi estudado anteriormente pelo grupo, porém por um período mais longo, e utilizando um modelo diferente e agora o Val foi capaz de atenuar os déficits de memória induzidos pela SM, no entanto, a redução dos níveis de BDNF induzidos pela SM não foram revertidos pelo Val.

Nós tínhamos a hipótese de que o Top poderia ter efeitos benéficos sobre os déficits cognitivos induzidos pela SM devido às suas propriedades neuroprotetoras. Em um estudo anterior demonstramos (2007) que uma única administração de baixa dose de Top foi capaz de melhorar a memória de reconhecimento de objetos, enquanto doses elevadas não. (101)

Curiosamente, Frisch e colaboradores (2007) mostraram que uma única dose de 20 mg/kg de Top, mas não 100 mg/kg, quando administrada durante o estado epiléptico induzido por Pilocarpina, melhorou a memória espacial, em ratos. (111)

Enquanto em nosso estudo prévio (2007), utilizamos doses inferiores (0.01, 0.1, 1.0, 10.0, ou 100.0 mg/kg/ip) em uma única administração, as doses de 10,0 e 100,0 mg/kg, imediatamente após o treino, induziram um déficit na memória de curto prazo (STM) na tarefa de reconhecimento do objeto novo quando testados 1,5 horas após o treinamento em ratos. No teste da memória à longo prazo (LTM) dado para os mesmos ratos 24 horas após a formação, o Top 0,1 mg/kg melhorou a LTM, ao passo que 10,0 e 100,0 mg/kg não prejudicaram a retenção da memória. No segundo experimento, a administração de Top 0,01 e 0,10 mg/kg 1 hora antes do teste de retenção LTM não melhorou a evocação da memória, ao passo que 10,0 e 100,0 mg/kg produziu déficits de evocação. (101)

Embora os estudos que mostram os efeitos do Top em ratos saudáveis ou em modelos animais de deficiências cognitivas sejam controversos, a maioria deles refere que o Top ou não tem efeito ou prejudica a memória.

Apesar dos seus efeitos neuroprotetores, o fato é de que o mecanismo de ação do Top envolve o antagonismo de receptores de glutamato e o bloqueio do canal de Na⁺ o que pode estar associado, pelo menos em parte, aos seus efeitos deletérios sobre a memória.

O Top também foi capaz de prejudicar a consolidação da memória emocional. Recentemente, um estudo relatou que uma única dose alta de Top (120 mg/kg) prejudica, enquanto um tratamento crônico com 60 mg/kg não afetou, a memória espacial em ratos saudáveis. (146, 147)

Embora um estudo *in vitro* tenha mostrado que o Top não teve nenhum efeito sobre IL-6 em sangue periférico em pacientes com enxaqueca, outro estudo recente mostrou que a produção de TNF- α foi significativamente diminuída pelo Top e pelo Val. (148,149)

Se formos analisar os dados obtidos com base na literatura produzida pelas pesquisas com fármacos como o Top e o Val, chegamos à conclusão que ainda existe muito a ser feito no intuito de trazer a luz aos mecanismos envolvidos e suas interações medicamentosas, pois conforme vimos as informações variam de trabalhos e grupos e as causas são multifatoriais.

Considerando os resultados deste trabalho acreditamos que o tratamento com o Top não só é ineficaz em reverter a perda da memória induzida pela separação materna, mas também induz déficits da memória em ratos não separados.

Os tratamentos com Top (na dose mais elevada) e Val foram capazes de reverter os aumentos induzidos pela separação materna nos níveis de IL-10 no hipocampo, enquanto que o Top na dose mais elevada, também diminuiu os níveis de TNF- α no córtex.

Esses resultados sugerem que as alterações nas citocinas podem não estar relacionadas diretamente à deficiência cognitiva induzida pela separação materna, uma vez que, apesar de reverter alterações das citocinas, o tratamento com Top não foi capaz de melhorar os déficits de memória induzidas pela SM.

Assim, mais estudos são necessários para investigar o potencial neuroprotetor do Val e do Top e seus efeitos sobre outros parâmetros comportamentais, relacionados aos efeitos induzidos por estresse neonatal na vida adulta, o que pode contribuir para uma melhora da compreensão do seu potencial terapêutico.

7 CONCLUSÕES

A SM durante o período neonatal causa prejuízo de memória em ratos adultos.

Top:

O tratamento na idade adulta com Top ocasionou prejuízo à memória quando utilizado independente da SM. Assim como, também não conseguiu reverter os danos ocasionados pela SM.

Val:

O tratamento farmacológico com Val na vida adulta reverteu os déficits de LTM induzidos pela SM.

Interleucina-10

A SM induziu um aumento significativo nos níveis de IL-10 no hipocampo. O tratamento com Top na dose máxima e com Val foi capaz de reverter os aumentos nos níveis de IL-10 induzidos pela SM no hipocampo.

TNF- α

A SM aumentou os níveis de TNF- α no hipocampo e no córtex. A dose mais elevada de Top reverteu o aumento dos níveis de TNF- α induzido pela SM no córtex.

BDNF

A SM induziu uma redução significativa nos níveis de BDNF no hipocampo, a qual não foi revertida pelos tratamentos utilizados.

8 BIBLIOGRAFIA

1. KOROSI A, NANINCK EF, OOMEN CA, SCHOUTEN M, KRUGERS H, FITZSIMONS C, LUCASSEN PJ. Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res.* 2012; 227(2): 400-9.
2. 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.
3. FRANCIS, DD, DIORIO J, PLOTSKY PM, Meaney MJ. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. *J. Neurosci.* 2002; 22: 7840-3.
4. AISA B, ELIZALDE N, TORDERA R, LASHERAS B, DEL RÍO J, RAMÍREZ M J. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus.* 2009; 19(12): 1222-31.
5. VAN WINKEL R, VAN NIEROP M, MYIN-GERMEIS I, VAN OS J. I. Childhood trauma as a cause of psychosis: linking genes, psychology, and biology. *Can J Psychiatry.* 2013; 58: 44-5.
6. CHAPMAN DP, WHITFIELD CL, FELITTI VJ, DUBE SR, EDWARDS VJ, ANDA RF. Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord.* 2004; 82: 217–25.
7. PIETREK C, ELBERT T, WEIERSTALL R, MÜLLER O, ROCKSTROH B.. Childhood adversities in relation to psychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2013; 206: 103-10.
8. MCPHERSON RJ, GLEASON C, MASCHER-DENEM M, CHAM M, KELLERT B, JUUL SE. A new model of neonatal stress which produces lasting neurobehavioral effects in adult rats. *Neonatology.* 2007; 92: 33-41.
9. DE LIMA MNM, PRESTI-TORRES J, VEDANA G, ALCALDE LA, STERTZ L, FRIES GR, ROESLER R, ANDERSEN ML, QUEVEDO J, KAPCZINSKI F, SCHRÖDER N. Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res.* 2011; 224(1): 100-6.
10. BILBO SD, NEWSUM 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.
11. CHOY KHC, VISSER Y, NICHOLS NR, VAN DEN BUUSE M. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus.* 2008; 18(7): 655-67.
12. 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(1): 113-20.

13. KALER SR, FREEMAN B. Analysis of environmental deprivation: cognitive and social development in Romanian orphans. *J Child Psychol Psychiatry*. 1994; 35(4): 769-81.
14. CARLSON M, EARLS F. Psychological and Neuroendocrinological Sequelae of Early Social Deprivation in Institutionalized Children in Romania. *Ann N Y Acad Sci*. 1997; 807: 419-28.
15. LUPIEN SJ, KING S, MEANEY MJ, MCEWEN BS. Child's stress hormone levels correlate with mother's socioeconomic status and depressive state. *Biol Psychiatry*. 2000; 48(10): 976-80.
16. MIDDELDORP CM, CATH DC, BEEM AL, WILLEMSSEN G, BOOMSMA DI. Life events, anxious depression and personality: a prospective and genetic study. *Psychol Med*. 2008; 38: 1557-65.
17. MENDONZA BERMUDEZ C. Clinical Applications of Peripheral Markers of Response in Antidepressant Treatment: Neurotrophins and Cytokines. *Rev Colomb Psiquiat*. 2012; 41(1): 165-184.
18. LIU W, SHENG H, XU Y, LIU Y, LU J, NI X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines andIDO activation. *Behav Brain Res*. 2013; 242: 110-6.
19. FAROOQ RK, ISINGRINI E, TANTI A, LE GUISE AM, ARLICOT N, MINIER F, LEMAN S, CHALON S, BELZUN C, CAMUS V. Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res*. 2012; 231(1): 130-7.
20. HIMMERICH H, FISCHER J, BAUER K, KIRKBY KC, SACH U, KRÜGEL U. Stress-induced cytokine changes in rats. *Eur Cytokine Netw*. 2013; 24(2): 97-103.
21. ALVAREZ P, GREEN PJ, LEVINE JD. Stress in the adult rat exacerbates muscle pain induced by early-life stress. *Biol Psychiatry*. 2013; 74(9): 688-95.
22. CAMPBELL T, LIN S, DEVRIES C, LAMBERT K. Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors. *Physiol Behav*. 2003; 78(3): 495-504.
23. OHL F, MICHAELIS T, VOLLMANN-HONS DORF GK, KIRSCHBAUM C, FUCHS E. Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25(4): 357-63.
24. LUPIEN SJ, MCEWEN B. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997; 24(1): 1-27.
25. DALLMAN MF, PECORARO N, AKANA SF, LA FLEUR SE, GOMEZ F, HOUSHYAR H, BELL ME, BATHNAGAR S, LAUGERO KD, MANALO S. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2003; 100(20): 11696-701.
26. SHIMIZU E, HACHIMOTO K, OKAMURA N, KOIKE K, KOMATSU N,

KUMAKIRI C, NAKAZATO M, WATANABE H, SCHINODA N, OKADA S, IVO M. Alterations of serum levels of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry*. 2003; 54(1): 70-4.

27. CZÉH B, MICHAELIS T, WATANABE T, FRAHM J, DE BIURRUM G, VAN KANPEM M, BARTOLOMUCCI A, FUCHS E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(22):12796-801.

28. HASHIMOTO K, SHIMIZU E, IYO M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004; 45: 104-14.

29. AISA B, GIL-BEA FJ, MARCOS B, TORDERA R, LASHERAS B, DEL RIO J, RAMIRES MJ. Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(10): 1495-505.

30. CAPPI C, MUNIZ RK, SAMPAIO AS, CORDEIRO Q, BRENTANI H, PALÁCIOS AS, MARQUES AH, VALLADA H, MIGUEL EC, GUILHERME L, HOUNIE AG. Association study between functional polymorphisms in the TNF-alpha gene and obsessive-compulsive disorder. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012; 70(2): 87.

31. STEIDLER L, ROTTIERS P, COULIE, B. Actobiotics as a Novel Method for Cytokine Delivery The Interleukin-10 Case. *Cytokine Therapies. Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1182: 135-145.

32. CORREIA S, COHEN R, GONGVATANA A, S ROSS, OLCHOWSKI j, K DEVELIN, TASHIMA K, B NAVIA, DELAMONTE S. Relationship of plasma cytokines and clinical biomarkers to memory performance in HIV. *J Neuroimmunol*. 2013; 265 (1-2): 117-23.

33. LOTRICH F. Inflammatory cytokines, growth factors, and depression. *Curr Pharm Des*. 2012; 18 (36): 5920-35.

34. KRÜGEL U, FISCHER J, RADICHE S, SAKE U, RIMMERICH H. Antidepressant effects of TNF- α blockade in an animal model of depression. *J Psychiatr Res*. 2013; 47(5): 611 -6.

35. KASTER MP, GADOTTI VM, CALIXTO JB, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharm*. 2012; 62 (1): 419-26.

36. LAFER B, VALLADA-FILHO HP. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. *Rev Bras Psiquiatr*. 1999; 21(1).

37. LOTRICH FE, EL-GABALAWY H, GUENTHER LC, WAREJ CF. The Role of Inflammation in the Pathophysiology of Depression: Different Treatments and Their Effects. *J Rheumatol*. 2011; 88: 48-54.

38. PACE TWW, MILLER AH. Cytokines and Glucocorticoid Receptor Signaling Relevance to Major Depression. *Glucocorticoids and Mood: You have full text*

access to this content. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1179: 86-105.

39. MILLER AH, HAROON E, RAISON CL, FELGER JC. Cytokine Targets in the Brain: Impact on Neurotransmitters and Neurocircuits. *Depress Anxiety.* 2013; 30: 297–306.

40. MAKHIJA K, KARUNAKARAN S. The role of inflammatory cytokines on the aetiopathogenesis of depression. *Australian and New Zealand J Psychiatry.* 2013; 47 (9): 828-39.

41. LINDQVIST D, KAUFMAN E, BRUNDIN L, HALL S, SUROVA Y, HANSSON O. Non-Motor Symptoms in Patients with Parkinson's Disease – Correlations with Inflammatory Cytokines in Serum. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47387.

42. HSU JW, LIRNG JF, WANG SJ, LIN CL, YANG KC, LIAO MH, CHOU Y H. Association of thalamic serotonin transporters and interleukin-10 in bipolar disorder: a SPECT study. *Bipolar Disorders.* 2013; doi: 10.1111/bdi.12164. [Epub ahead of print]

43. LINDQVIST D, SALA S, SUROVA Y, NIELSEN HM, JANELIDZE S, BRUNDIN L, HANSSON O. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease -associations with depression, fatigue, and cognitive impairment. *Brain, Behav Immun.* 2013; 33: 183-9.

44. MASI G, BROVEDANI P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs.* 2011; 25 (11): 913-31.

45. PAN Y, LIN W, WANG W, X QI, WANG D, M TANG. The effects of central pro-and anti-inflammatory immune challenges on depressive-like behavior induced by chronic forced swim stress in rats. *Behav Brain Res.* 2013; 247: 232-40.

46. VOORHEES JL, TARR AJ, WOHLEB ES, GODBOUT JB, MO X, SHERIDAN JF, EUBANK TD, MARSH CB. Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10. *PLoS One.* 2013; 8(3): e58488.

47. ARAUJO EG, SILVA GM, SANTOS AA. Neuronal Cell Survival The Role of Interleukins. *Neuroimmunomodulation. Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1153: 57–64.

48. YOUNG AMH, CAMPBELL EC, LYNCH S, DUNN MH, POWIS SJ, SUCKLING J. Regional Susceptibility to TNF- α Induction of Murine Brain Inflammation via Classical IKK/NF- κ B Signalling. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39049.

49. BARBOSA, IG, HUGUET RB, NEVES FS, BAUER ME, TEIXEIRA AL. Immunology of bipolar disorder. *J Bras Psiquiatr.* 2009; 58 (1): 52-9.

50. ALTAMURA AC, BUOLI M, POZZOLI S. Role of immunological factors in the pathophysiology and diagnosis of bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2014; 68(1): 21-36.

51. MODABBERNIA A, TASLIMIA S, BRIETZKEC E, ASHRAFIE M. Cytokine alterations in bipolar disorder: a meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry.* 2013; 74 (1): 15- 25.

52. MCNAMARA RK, LOTRICH FE. Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target?. *Expert Rev Neurother.* 2012; 12 (9): 1143-61.
53. MAGALHÃES PVS, FRIES GR, KAPCZINSKI F. Marcadores periféricos e a fisiopatologia do transtorno bipolar. *Rev Psiquiatr Clín.* 2012; 39(2): 60-67.
54. HASHMI AM, BUTT Z, UMAIR M. Is depression na inflammatory condition? A review of available evidence. *J Pak Med Assoc.* 2013; 63 (7): 899-906.
55. MUNKHOLM K, BRAUNER JV, KESSING LV, VINBERG M. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res.* 2013; 47(9): 1119-33.
56. DOGANAVSARGIL-BAYSAL O, CINEMRE B, AKSOY UM, AKBAS H, METIN O, FETTAHOGLU C, GOKMEN Z, DAVRAN F. Levels of TNF- α , soluble TNF (sTNFR1, sTNFR2), and cognition in bipolar disorder. *Hum psychopharmacol.* 2013 ; 28 (2) :160-7.
57. MUNKHOLM K, VINBERG M, KESSING LV. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord.* 2013; 144 (1-2): 16-27.
58. BARBOSA IG, ROCHA NP, HUGUET RB, FERREIRA RA, SALGADO JV, CARVALHO LA, PARIANTE CM, TEIXEIRA AL. Executive dysfunction in euthymic bipolar disorder patients and its association with plasma biomarkers. *J Affect Disord.* 2012; 137 (1-3): 151-5.
59. CAPURON L, MILLER AH. Immune system to brain signaling: Neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther.* 2011; 130(2): 226-238.
60. KESLERA S, JANELSINS M, KOOVAKKATTUA D, PALESHA O, MUSTIAN K, MORROW G, DHABHARA FS. Reduced hippocampal volume and verbal memory performance associated with interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in chemotherapy-treated breast cancer survivors. *Brain Behav Immun.* 2013; 30(S): 109-16.
61. ARNOLD SE, XIE SX, LEUNG YY, WANG LS, KLING MA, HAN X, KIM EJ, WOLK DA, BENNETT DA, CHEN-PLOTINK A, GROSSMAN M, HU W, LEE VM, MACKIN RS, TROJANOWSKI JQ, WILSON RS, SHAW LM. Plasma biomarkers of depressive symptoms in older adults. *Transl Psychiatry.* 2012; 3(2): e65
62. OREST H. The Uses of Biomarkers in Drug Development. *Biomarkers in Brain Disease. Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1180: 1–10.
63. ELDERKIN-THOMPSON V, IRWIN MR, HELLEMMAN G, KUMAR A. Interleukin-6 and memory functions of encoding and recall in healthy and depressed elderly adults. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2012; 20(9): 753-63.
64. BAUNE BT, SMITH E, REPPERMUND S, AIR T, SAMARAS K, LUX O, BRODATY H, SACHDEV P, TROLLOR JN. Inflammatory biomarkers predict depressive, but not anxiety symptoms during aging: the prospective Sydney Memory

and Aging Study. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37(9): 1521-30.

65. GARCÍA-LOZANO JR, CAPILLA-SEVILLA C, GARCÍA-LÓPEZ O, MORENO-GALLEGO, I. Correlação entre as citocinas e sintomas ansiosos-depressivos em pacientes com fibromialgia. *Reumatol Clín*. 2008; 4(4): 136-139.

66. LICHTBLAU N, SCHIMDT FM, SCHUMANN R, KIRKBY KC, HYMMERICH H. Cytokines as biomarkers in depressive disorder: current standing and prospects. *Inter Rev Psychiatry*. 2013; 25(5): 595-603.

67. KHAIROVA RA, MACHADO-VIEIRA, R, DUE J, MANJI HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009; 12(4): 561-78.

68. MILLS NT, SCOTT JG., WRAYNR, COHEN -WOODS S, BAUNE BT. Research review: The role of cytokines in depression in adolescents: a systematic review. *J Child Psychol Psychiatry*. 2013; 54(8): 816-35.

69. MANOSSO LM, NEIS VB, MORETTI M, DAUFENBACH JF, FREITAS AE, COLLA AR, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of α – tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF α . *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46: 48-57.

70. SUKOFF RIZZO SJ, NEAL SJ, HUGHES ZA, BEYNA M, ROSENZWEIG-LIPSON S, MOSS SJ, BRANDON NJ. Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a Key contributor of depressive-like phenotypes. *Transl Psychiatry*. 2012; 4(2): e199.

71. BEUMER W, GIBNEY SM, DREXHAGE RC, PONT-LEZICA L, DOORDUIN J, KLEIN HC, STEINER J, CONNOR TJ, HARKIN A, VERSNEL MA, DREXHAGE HA. The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *J Leukoc Biol*. 2012; 92(5): 959-75.

72. HOCAOGLU, C; KURAL, B; ALIYAZICIOGLU, R; DEGER, O; CENGIZ, S. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α and its relationship with parameters in patients with major depression. *Metab Brain Dis*. 2012; 27(4): 425-30.

73. FELGER JC, LOTRICH FE. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*. 2013; 29(246): 199-229.

74. KUNZ M, CERESER KM, GOI PD, FRIES GR, TEIXEIRA AL, FERNANDES BS, BELMONTE-DE-ABREU PS, KAUER-SANT'ANNA M, KAPCZINSKI F, GAMA CS. Serum levels of IL-6, IL-10 e TNF- α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro-and anti-inflammatory balance. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011; 33(3): 268-274.

75. MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 65: 732-741.

76. ZAKHARYAN R, BOYAJYA A. Inflammatory cytokine network in schizophrenia. *World J Biol psychiatry*. 2013; doi:10.3109/15622975.2013.830774.

77. DUNJIC-KOSTIC B, JASOVIC-GASIC M, IVKOVIC M, RADONIIC NV, PANTOVIC M, DAMJANOVIC A, POZNANOVIC ST, JOVANOVIC A, NIKOLIT T, PETRONIJEVIC ND. Serum levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in exacerbation and remission phase of schizophrenia. *Psychiatr Danub*. 2013; 25 (1): 55-61.
78. KUBISTOVA A, HORACEK J, NOVAK T. Increased interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in first episode schizophrenia patients versus healthy controls. *Psychiatr Danub*. 2012; 24(1): S153 -6.
79. AGUIAR CCT, ALVES CD, RODRIGUES FAR, BARROS FWA, DE SOUSA FCF, VASCONCELOS SMM, MACEDO DS. Esquizofrenia: uma doença inflamatória? *J Bras Psiquiatr*. 2010; 59(1), 52-57.
80. KIRKPATRICK B, MILLER BJ. Inflammation and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2013; 39(6): 1174-9.
81. NA, KS, JUNG HY, KIM, YK. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Progress Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014; 48: 277-86.
82. MARTÍNEZ-CENGOTITABENGOA M, MAC-DOWELL KS, LESA JC, MICÓ JÁ, FERNANDEZ M, ECHEVARRÍA E, SANJUAN A, ELORZA J, GONZÁLEZ – PINTO A. Cognitive impairment is related to oxidative stress and chemokine levels in first psychotic episodes. *Schizophr Res*. 2012; 137(1-3): 66-72.
83. DIMITROV DH, LEE S, YANTIS J, VALDEZ C, et al. Differential correlations between inflammatory cytokines and psychopathology in veterans with schizophrenia: Potential role for IL-17 pathway. *Schizophr Res*. 2013; 151(1-3): 29-35.
84. CINZA SM, BLOCH MH. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive-compulsive disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2012; 14(3): 220-8.
85. MANFRO GG, NETTO CA, POLLACK M, MEZZOMO KM, PREFFER F, KRADIN R. Stress regulates the lymphocyte homing receptor CD2I (L-selectin). *Arq Neuropsiquiatr*. 2003; 61(1): 20-4.
86. GOLA H, ENGLER H, SOMMERSHOF A, ADENAUER H, KOLASSA S, SCHEDLOWSKI M, GROETTRUP M, ELBERT T, KOLASSA IT. Posttraumatic stress disorder is associated with an enhanced spontaneous production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells. *BMC Psychiatry*. 2013; 13: 40. doi: 10.1186/1471-244X-13-40.
87. LANG UE, JOCKERS-SCHERÛBL MC, HELLWEG R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J Neural Transm*. 2004; 111: 387-411.
88. MARTINOWICH K, LU B. Interaction between BDNF and Serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharm*. 2008; 33: 73-83.
89. HUANG EJ, REICHARDT LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 677-736.

90. SAMPAIO-PERITO ME, FORTUNATO JJ. Biological Markers of Depression: A Review on the Expression of Neurotrophic Factors. *Rev Neurocienc.* 2012; 20(4): 597-603.
91. MARAIS L, STEIN DJ, DANIELS WM. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab Brain Dis.* 2009; 24(4): 587-97.
92. BOURIN M, CHENU F HASCOET M. The Role of Sodium Channels in the Mechanism of Action of Antidepressants and Mood Stabilizers. *Curr Drug Targets.* 2009; 10(11): 1052-60.
93. GARNETT WR. Clinical pharmacology of topiramate: a review. *Epilepsia.* 2000; 41 S61-5.
94. DODGSON SJ, SHANK RP, MARYANOFF BE. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. 2000; *Epilepsia* 41(Suppl. 1): S35–S39.
95. WHITE HS. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of the established and newer antiepileptic drugs. 1999; *Epilepsia* 40(Suppl. 5): S2–S10.
96. WHITE HS, BROWN SD, WOODHEAD JH, SKEEN GA, WOLF HH. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. *Epilepsy Res.* 1997; 28: 167–179.
97. GIBBS JWIII, SOMBATI S, DELORENZO RJ, COULTER DA. Cellular actions of topiramate: Blockade of kainate evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia.* 2000; 41(Suppl. 1): S10–S16.
98. ÄNGEHAGEN M, SHANK R, HANSSON E, RÖNNBÄCK L, BEN-MENACHEM E. Topiramate affects the ability of protein kinase to phosphorylate glutamate receptors activated by kainate. *Epilepsia.* 2001; 42(Suppl. 7): S10.
99. HERRERO AI, DEL OLMO N, GONZALES-ESCALADA JR, SOLIS JM. Two new actions of topiramate: Inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology* 2002; 42: 210–220.
100. PINHEIRO RM, DE LIMA MNM, PRESTI-TORRES J, ALCALDE L A, FRIES GR, ROESLER R, ANDERSEN ML, QUEVEDO J, KAPCZINSKI F, GARCIA VA, HALLMENSCHLAGER LH, SCHRÖDER N. Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by D-amphetamine: amelioration by valproic acid. *J Neural Transm.* 2012; 119(6): 627-37.
101. DE LIMA MNM, PRESTI-TORRES J, DORNELLES A, BROMBERG, E, SCHRÖDER, N. Differential effects of low and high doses of topiramate on consolidation and retrieval of novel object recognition memory in rats. *Epilepsy Behav.* 2007; 10(1): 32-7.
102. ANGEHAGEN M, BEN-MENACHEM E, RÖNNBÄCK L, HANSSON E.

Topiramate protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res.* 2003; 54(1):63-71.

103. ANGEHAGEN M, RÖNNBÄCH L, HANSSON E, BEN-MENACHEM E. Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures. *Journal of Neurochem.* 2005; 94(4): 1124-30.

104. CHEN X, BAO G, HUA Y, LI Y, WANG Z, ZHANG X. The effects of topiramate on caspase-3 expression in hippo campus of basolateral amygdala (BLA) electrical kindled epilepsy rat. *J Mol Neurosci.* 2009; 38: 201-6.

105. KOUZOUNIAS K, KIMISKIDIS VK, SIOZOS T, VIOLARIS K, KOSTOMITSOPOULOS N, KARAYANNAKOS PE, SOTIRAKOGLU K, NANNASSIS K. Topiramate promotes neurological recovery in a new model of traumatic brain injury in rats. *J Neuroscience.* 2011; 183: 171-7.

106. MAO X, JI C, SUN C, CAO D, MA P, JI Z, CAO F, MIN D, LI S, CAI J, CAO Y. Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis. *Neurochem Int.* 2012; 60: 39-46.

107. NOH MR, KIM SK, PARQUE SK, CHOI HC, LIM JK, KIM IH, EUN BL. Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* 2006; 201: 470-8.

108. SFAELLO I, BAUD O, AZIMANOGLU A, GLESSENS P. Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. *Neurobiol Dis* 2005; 20: 837-48.

109. SOBANIEC-LOTOWSKA ME, LOTOWSKA JM. The neuroprotective effect of topiramate on the ultrastructure of pyramidal neurons of the hippocampal CA1 and CA3 sectors in an experimental model of febrile seizures in rats. *Folia Neuropathol.* 2011; 49: 230-6.

110. GALINKIN JL, KURTH CD, SCHI H, PRIESTLEY MA, LOEPK AW, ADANSON PC. The plasma pharmacokinetics and cerebral spinal fluid penetration of intravenous topiramate in newborn pigs. *Biopharm Drug Dispos.* 2004; 25(6): 265-71.

111. FRISCH C, KUDIN AP, ELGER CE, KUNZ W, HELMSTAEDTER C. Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Res.* 2007; 73: 173-80.

112. MCDANIEL WF, SAWITSKY AS, VICK KE. Topiramate attenuates a transient learning deficit after lesions inducing intracerebral hemorrhage. *Psychol Rep* 2007; 100: 164-6.

113. MURIACH M, LÓPEZ-PEDRAJAS R, BARCIA JM, SANCHEZ-VILLAREJO MV, AMANSA I, ROMERO F. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem.* 2010; 114: 675-84.

114. MELLO MF, YEH MS, BARBOSA NETO J, BRAGA LL, FIKS JP, MENDES DD, MORIYAMA TS, VALENTE NL, COSTA MC, MATTOS P, BRESSAN RA, ANDREOLI SB, MARI JJ. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess the efficacy of topiramate in the treatment of post-traumatic stress disorder. *BMC Psychiatry*. 2009; 9: 28.
115. ALDERMAN CP, MCCARTHY LC, CONDON JT, MARWOOD AC, FULLER JR. Topiramate in combat-related posttraumatic stress disorder. *Ann Pharmacother*. 2009; 43(4): 635-41.
116. KHAN S, LIBERZON I. Topiramate attenuates exaggerated acoustic startle in an animal model of PTSD. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 172(2): 225-9.
117. POST RM, LEVERICH GS, XING G, WEISS RB. Developmental vulnerabilities to the onset and course of bipolar disorder. *Devel Psychopathol*. 2001; 13(3): 581-98.
118. BREMMER JD, VERMETTEN E. Stress and development: behavioral and biological consequences. *Devel Psychopathol*. 2001; 13(3): 473-89.
119. TATUM WO, FRENCH JA, FAUGHT E, MORRIS GL, 3RD, LIPORACE J, KANNER A, GOFF SL, WINTERS L, FIX A. Postmarketing experience with topiramate and cognition. *Epilepsia*. 2001; 42: 1134-40
120. FREY BN, VALVASSORI SS, RÉUS GZ, MARTINS MR, PETRONILHO FC, BARDINI K, DAL-PIZZOL F, KAPCZINSKI F, QUEVEDO J. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci*. 2006; 31(5): 326-32.
121. 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*. 2006; 8(3): 275-80.
122. SCHRÖDER N; O'DELL SJ, MARSHALL JF. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse*. 2003; 49(2): 89-96.
123. DE LIMA MNM, ROESLER R, LUFT T, SCHRÖDER N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett*. 2006; 405(1-2): 142-6.
124. DE LIMA MNM, 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*. 2005; 40(6): 506-11.
125. DE LIMA MNM, PRESTI-TORRES J, CALDANA F, GRAZZIOTIN MM, SCALCO FS, GUIMARÃES MR, BROMBERG E, FRANKE SI, HENRIQUES JA, SCHRÖDER N. Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007; 570: 111-4.
126. DE LIMA MNM, DIAS CP, PRESTI-TORRES J; DORNELLES A, GARCIA VA, SCALCO FS, GUIMARÃES NR, PETRY RC, BROMBERG E, CONSTANTINO L,

BUDNI P, DAL-PIZZOL F, SCHRÖDER N. Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging*. 2008a; 29: 1052-9.

127. DE LIMA MN, PRESTI-TORRES J GARCIA VA, GUIMARÃES MR, SCALCO FS, ROESLER R, SCHRÖDER N. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharm*. 2008; 55(5): 788-92.

128. AKSIĆ M, RADONJIĆ NV, ALEKSIC D, JEVTIC G, MARKOVIC B, PETRONIJEVIĆ N, RADONJIĆ V, FILIPOVIĆ B. Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013; 73(3): 394-403.

129. RENTESI G, ANTONIOU K, MARCELOS M, SYRROU M, PAPADOUPOULOU-DAIFOTI Z, KONSTANDI M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav Brain Res*. 2013; 244: 29-37.

130. MARTISOVA E, AISA B, GUEREÑU G, RAMÍREZ MJ. Effects of early maternal separation on biobehavioral and neuropathological markers of Alzheimer's disease in adult male rats. *Curr Alzheimer Res* 2013; 10: 420-32.

131. AISA B, TORDERA R, LASHERAS B, DEL RÍO J, RAMIREZ MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32: 256-66.

132. DANIELS WM, FAIRBAIRN LR, VAN TILBURG G, MCEVOY CR, ZIGMOND NJ, RUSSEL VA, STEIN DJ. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 1(7) glucocorticoid receptor promoter region. *Metab Brain Dis*. 2009; 24: 615-27.

133. RENTESI G, ANTONIOU K, MARSELOS M, FOTOPOULOS A, ALBOYCHARALI J, KONSTANDI M. Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett*. 2010; 480(1): 7-11.

134. Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009; 34(1): 4-20.

135. BURKE NN, LIORENTE R, MARCO EM, TONG K, FINN DP, VIVEROS MP, ROCHE M. Maternal deprivation is associated with sex-dependent alterations in nociceptive behavior and neuroinflammatory mediators in the rat following peripheral nerve injury. *J Pain*. 2013; 14(10):1173-84.

136. KWON DH, KIM BS, CHANG H, KIM YI, JO SA, LEEM YH. Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434(2): 245-51.

137. LU B, NAGAPPAN G, GUAN X, NATHAN PJ, WREN P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2013; 14(6): 401-16.

138. QIU, H.M.; et al. Antidepressive effect of sodium valproate involving suppression of corticotropin-releasing factor expression and elevation of BDNF expression in rats exposed to chronic unpredicted stress. *Neuroreport*. 2013 Oct 14. [Epub ahead of print]

139. AUDET MC, MANGANO EN, ANISMAN H. Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 156.

140. AUDET MC, JACOBSNN-PICK S, WANN BP, ANISMAN H. Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 1197–1205.

141. CHURCHILL L, TAISHI P, WANG M, BRANDT J, CEARLEY C, REHMAN A, et al. Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. *Brain Res* 2006; 1120: 64-73.

142. GARCIA, V.A.; et al. Modafinil ameliorates cognitive deficits induced by maternal separation and sleep deprivation. *Behav Brain Res*. 2013; 253: 274-9.

143. CASTRO AA, GHISONI K, LATINI A, QUEVEDO J, TASCA CI, PREDIGER RD. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2012; 229: 208-15.

144. KURIYAMA, K.; HONMA, M.; YOSHIIKE, T.; KIM, Y. Valproic acid but not D-cycloserine facilitates sleep-dependent offline learning of extinction and habituation of conditioned fear in humans. *Neuropharm*. 2013; 64: 424-31.

145. WANG, Z, ZHANG XJ, LI T, TANG Y, LE W. Valproic Acid Reduces Neuritic Plaque Formation and Improves Learning Deficits in APPSwe /PS1A246E Transgenic Mice via Preventing the Prenatal Hypoxia-Induced Down-Regulation of Nephilysin. *CNS Neurosci Ther*. 2013. doi: 10.1111/cns.12186. [Epub ahead off print]

146. PIETRZAK B, KONOPKA A, WOJCIESZAK J. Effect of topiramate on hippocampus-dependent spatial memory in rats. *Pharmacol Report*. 2013; 65(5): 1152-62.

147.SCHMIDT DO PRADO-LIMA PA, PERRENOUD MF, KRISTENSEN CH, CAMMARAROTA M, IZQUIERDO I. Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *J Psychiatry Neurosci*. 2011; 36(4): 250-5.

148.KOÇER A, MEMISOQUILLARI R, DOMAC FM, ILHAN A, KOCER E. et al. IL-6 levels in migraine patients receiving topiramate. *Pain Pract*. 2009; 9(5): 375-9.

149.HIMMERICH, H.; et al. Impact Of Mood Stabilizers And Antiepileptic Drugs On Cytokine Production In-Vitro. *J Psychiatr Res*. 2013; 47(11): 1751-9.

9 ANEXO

9.1 Carta submissão de artigo ao periódico *Journal of Neural Transmission*

A manuscript number has been assigned to Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate

em.jont.0.3a8522.6f2e58b9@editorialmanager.com em nome de JNT Editorial Office
[jntspringer@web.de]

Dear Dr Schröder,

Your submission entitled "Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate" has been assigned the following manuscript number: JONT-D-14-00113.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://jont.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Christian Riederer
Managing Editor (Editorial Office)
Journal of Neural Transmission

9.2 Artigo submetido ao periódico *Journal of Neural Transmission*

Original paper

Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate

Rose Mary Carvalho Pinheiro • Maria Noêmia Martins de Lima • Bernardo Chaves Dávila Portal • Stefano Boemler Busato • Lucio Falavigna • Rafael Dal Ponte Ferreira • André Contri Paz • Bianca Wollenhaupt de Aguiar • Flávio Kapczinski • Nadja Schröder

Rose Mary Carvalho Pinheiro • Bernardo Chaves Dávila Portal • Stefano Boemler Busato • Lucio Falavigna • Rafael Dal Ponte Ferreira

Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

Maria Noêmia Martins de Lima • Nadja Schröder

Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

André Contri Paz

Bipolar Disorders Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Bianca Wollenhaupt de Aguiar • Flávio Kapczinski

Bipolar Disorders Program and Laboratory of Molecular Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

*National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre,
RS, Brazil*

Corresponding author

Nadja Schröder

Faculty of Biosciences

Pontifical Catholic University

Av. Ipiranga, 6681 Predio 12D

90619-900, Porto Alegre - RS

Brazil

Tel.: +55 - 51 3353 4743 Fax: +55 51 33203612

E-mail address: nadja.schroder@pucrs.br

ABSTRACT

Exposure to stressful events early in life may have permanent deleterious consequences on nervous system function and increase the susceptibility to psychiatric conditions later in life. Maternal deprivation, commonly used as a source of neonatal stress, impairs memory in adult rats and reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. Inflammatory cytokines, such as interleukins (IL) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have been shown to be increased in the peripheral blood of patients with psychiatric disorders. The aim of the present study was to investigate the effects of maternal separation on the levels of IL-10 and TNF- α , and BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of adult rats. We also evaluated the potential ameliorating properties of topiramate and valproic acid on memory deficits and cytokine and BDNF changes associated with maternal deprivation. The results indicated that, in addition to inducing memory deficits, maternal deprivation increased the levels of IL-10 in the hippocampus, and TNF- α in the hippocampus and in the cortex, and decreased hippocampal levels of BDNF, in adult life. Neither valproic acid nor topiramate were able to ameliorate memory deficits or the reduction in BDNF induced by maternal separation. The highest dose of topiramate was able to reduce IL-10 in the hippocampus and TNF- α in the prefrontal cortex, while valproate only reduced IL-10 levels in the hippocampus. These findings may have implications for a better understanding of the mechanisms associated with alterations observed in adult life induced by early stressful events, and for the proposal of novel therapeutic strategies.

Keywords: post-natal stress, object recognition, cytokines, topiramate, valproic acid, BDNF.

Introduction

Early life exposure to environmental adverse events may increase the risk of development of neuropsychiatric conditions, including affective disorders and psychosis (Chapman et al. 2004; van Winkel et al. 2013; Pietrek et al. 2013). In rodents, maternal deprivation has been consistently used as a model of exposure to stressful events early in life. Maternal deprivation has been shown to cause long-term effects on brain function, including cellular, neurochemical, and behavioral alterations. For instance, even a short period of maternal deprivation decreases the number of neurons and the volume of hippocampus and neocortex in rats (Aksić et al. 2013). Neurotransmitter systems, including the glutamatergic (Roceri et al. 2002; O'Connor et al. 2013) dopaminergic and serotonergic systems have been shown to be affected by maternal deprivation (Rentesi et al. 2013). We and others have shown that maternal deprivation induces persistent memory impairments (Aisa et al. 2009; Benetti et al. 2012; Pinheiro et al. 2012; Garcia et al. 2013) which are associated to a reduction in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels (De Lima et al. 2011; Choy et al. 2008; Martisova et al. 2013).

Both preclinical and clinical data give support to the concept that inflammation may play a role in neuropsychiatric diseases including neurodegenerative disorders, mood and anxiety disorders as well as schizophrenia (for a review see Miller et al. 2013). Inflammatory markers, such as interleukins (IL) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have been shown to be increased in the peripheral blood of patients with bipolar disorder (Hsu et al. 2013), schizophrenia (Dimitrov et al. 2013), and depressive disorder (Audet and Anisman 2013). Remarkably, depressive patients with a history of childhood maltreatment are more likely to show increased inflammation (Danese et al. 2008). Moreover, long-term effects of early life stress induced by maternal separation were shown to be prevented by non-steroidal anti-inflammatory treatment in rats (Brenhouse et al. 2011). Thus, the aim of the present study

was to investigate the effects of maternal separation on inflammatory cytokines, IL-10 and TNF- α , and BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of adult rats.

Topiramate is an antiepileptic drug that is also approved for migraine prophylaxis (Sommer and Fenn 2010; Ferrari et al. 2011). Its mechanisms of action have been related to the blockade of neuronal Na⁺ channels, GABA_A receptor activation, and antagonism of glutamate AMPA/kainate receptors (Deckers et al. 2000). It was shown to present neuroprotective properties in experimental brain injury, reducing neuronal damage in animal models of neonatal hypoxic ischemia (Noh et al. 2006), febrile seizures (Sobaniec-Lotowska and Lotowska 2011), cerebral ischemia/reperfusion (Mao et al. 2012), traumatic brain injury (Kouzonias et al. 2011), kindling-induced seizures (Chen et al. 2009), and excitotoxic insult (Sfaello et al. 2005). In addition, topiramate attenuates memory deficits associated to cocaine toxicity (Muriach et al. 2010), intracerebral hemorrhage (McDaniel et al. 2007), and pilocarpine-induced status epilepticus (Frisch et al. 2007). In the present study, we evaluated the potential ameliorating properties of topiramate on memory deficits induced by maternal deprivation, and its effects on BDNF and cytokine changes, and compared it to valproic acid, which was previously shown to ameliorate memory deficits in animal models.

Materials and methods

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 their 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 3 weeks the pups

were weaned and the males were selected and raised in groups of 3-5 rats. The animals were supplied with standardized pellet food and tap water *ad libitum*. All behavioral experiments took place between 9:00 and 16:00. 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 (CEUA 11/00224). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Maternal Deprivation

Maternal deprivation was performed based on previous reports (Levine 1967; De Lima et al. 2011; Pinheiro et al. 2012; Garcia et al. 2013). Rat pups were exposed to one of the following maternal rearing conditions from post-natal day 1-14 inclusive: (1) non-deprived (ND), animals were exposed to a daily 15 min period in which the dam was removed and the litter was weighed or (2) deprived (D), animals were exposed to a daily 180 min period in which the dam was removed and the litter was weighed. During the separation period, 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. After the separation period, pups were returned to the nest and rolled in home cage bedding material, and the dam was returned. In rats, the mother is routinely off the litter for periods of 20-25 min (Jans and Woodside 1990). Thus, only the group exposed to a 180 min period of separation (deprived), but not the group exposed to a 15 min period of separation (non-deprived), results in a deprivation of maternal care.

Treatments

When the animals reached the age of 3 months, both groups (ND and D) were divided in 4 other groups of treatments that received daily oral administration of: (1) saline, (2) topiramate 10 mg/kg dissolved in saline solution, (3) topiramate 100 mg/kg dissolved in saline solution, (4) valproic acid 200 mg/kg dissolved in saline solution (Sanofi-Aventis, SP, Brazil), for 14 consecutive days. All treatment groups received the same number of injections (1.0 ml/kg solution volume) once a day. The range of doses of topiramate was selected based on previous studies (Noh et al. 2006; Mikati et al. 2011) and valproic acid dose used was chosen on the basis of previous studies from our laboratories (Frey et al. 2006, Walz et al. 2008; Pinheiro et al. 2012). Drugs were prepared freshly before each experiment.

Open-field Behavior

Open-field behavior was measured as previously described (De Lima et al. 2008a; 2011). 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. Latency to start locomotion, number of line crossings and rearings were measured during the experimental sessions by an investigator unaware of treatment group of the animals.

Object Recognition Task

The object recognition task was performed as previously described (De Lima et al. 2008a, b; 2011). Recognition memory was assessed 24 h after open-field behavior evaluations in the same apparatus except that the arena floor was covered with sawdust [from bedding material] 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: a copy of 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: a copy of 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. Object exploration was measured using two stopwatches to record the time spent exploring the objects during the experimental sessions by an investigator unaware of treatment group of the animals. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose. Sitting on the object was not considered as exploration. A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $T_N/(T_F+T_N)$ [T_F = time spent exploring the familiar object; T_N = time spent exploring the novel object].

After completion of behavioral procedures animals were killed by decapitation and the brain regions (prefrontal cortex and hippocampus) from rats randomly selected from each

experimental group were quickly dissected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for posterior analyses. Prefrontal cortex and hippocampus were homogenized in phosphate buffer solution with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), centrifuged and the supernatant was aliquoted and used in the experiments.

Cytokines assay

The concentration of cytokines was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Flex Sets for rats IL-10, and TNF- α (BD Biosciences, San Diego, CA). Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's instructions. Data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA) and results were generated using the BD CBA Analysis Software FCAP Array™ (BD Biosciences, San Diego, CA).

BDNF measurement

BDNF levels in brain tissue were measured by sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Milipore, USA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with the samples diluted 1:3 in sample diluent and standard curve ranging from 7.8 to 500 pg/ml of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer followed by the addition of biotinylated mouse anti-human BDNF monoclonal antibody (diluted 1:1000 in sample diluent), which was incubated for 3h at room temperature. After washing, a second incubation with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate solution (diluted 1:1000) for 1h at room temperature was carried out. After addition of substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set at 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density and BDNF concentration. Total protein was measured by Bradford's method

using bovine serum albumin as standard (De Lima et al. 2011).

Statistical Analysis

Data for recognition indexes are expressed as median (interquartile ranges). Comparisons among experimental groups were performed using a non-parametric Kruskal–Wallis analysis of variance followed by Mann–Whitney U tests, two-tailed when necessary (De Lima et al. 2007; 2008). Total time spent exploring the familiar and novel objects in training and retention test trials and the data from the experiment evaluating open field behavior are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's HSD *post hoc* tests. Biochemical data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by one way ANOVA, followed by Tukey's HSD *post hoc* tests (De Lima et al. 2011). *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Open-field behavior

In order to control for possible effects of neonatal maternal deprivation or chronic administration of topiramate or valproic acid on general sensorimotor functions, we analyzed open field behavior in adult rats (Fig 1). One-way ANOVA showed no statistically significant differences among the groups in the latency to start locomotion ($F_{(7, 67)} = 1.198, p = 0.318$, Fig 1a) or in the number of crossings ($F_{(7, 67)} = 1.431, p = 0.210$, Fig 1b). Statistical comparison of the numbers of rearings has revealed a significant difference among the groups ($F_{(7, 67)} = 3.679, p = 0.002$). However, *post hoc* comparisons revealed no significant differences between the control group (ND-Saline) compared to all other groups. Additionally,

comparisons of D-Saline group with all other groups have also not shown any significant differences. These results suggest that maternal deprivation and chronic adult topiramate or valproic acid do not affect locomotion, exploration, or anxiety.

Object recognition memory

The effects of chronic administration of topiramate or valproic acid on rats neonatally exposed to maternal deprivation on recognition memory are shown in Fig. 2. Kruskal-Wallis' analysis of variance revealed a significant difference among the groups in the short-term ($df=7$, $H=22.95$, $p=0.002$) and in the long-term retention tests ($df=7$, $H=18.39$, $p=0.010$), but not in training session ($df=7$, $H=7.32$, $p=0.395$).

Subsequent analysis using Mann-Whitney tests revealed that animals that were separated from their mothers and treated with saline in the adulthood (D-Sal group), showed lower recognition indexes in LTM retention session when compared with the corresponding control group (ND-Sal, $p < 0.001$), indicating that maternal deprivation impairs long-term recognition memory. Chronic administration of valproic acid was not able to ameliorate memory in the D group, as the long-term recognition index of D-Val group showed no significant differences in comparison to the separated group that received saline (D-Sal, $p=0.497$; Mann-Whitney test, Fig. 2).

Statistical comparison of ND groups that received topiramate in the adulthood with the control group (ND-Saline) revealed that topiramate impaired long-term recognition memory. Accordingly, recognition indexes of groups ND-Top10 and ND-Top100 were significantly lower than that of the control group ($p=0.021$ and $p=0.015$, respectively). In addition, statistical analyses of recognition indexes of D groups that received topiramate showed that this effect was also observed in maternally deprived rats. Recognition indexes of D-Top10 and

D-Top100 groups in the long-term retention test were significantly lower than the control group (ND-Sal) ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively), and did not differ from the deprived group that received saline (D-Sal, $p = 0.203$ and $p = 0.922$, respectively). Remarkably, rats that were deprived from their mothers and received chronic topiramate treatment at the highest dose, have also shown short-term memory impairment, when compared to the control group (ND-Sal, $p = 0.002$) and to the D-Sal group ($p = 0.015$).

Statistical comparisons of total time exploring objects during the training ($F_{(7, 67)} = 1.900$, $p = 0.085$), short-term ($F_{(7, 67)} = 1.344$, $p = 0.246$) or long-term retention ($F_{(7, 67)} = 0.752$, $p = 0.629$) sessions showed no significant differences among the groups (Table 1).

Cytokines

Figure 3 shows the results for IL-10 measurements in the hippocampus (3a) and in the prefrontal cortex (3b) of rats submitted to neonatal maternal deprivation and adult chronic treatment with topiramate or valproic acid. Statistical comparison of IL-10 levels in the hippocampus, but not in the cortex, has indicated a significant difference among the groups ($F_{(7, 42)} = 2.66$, $p = 0.026$). Further *post hoc* comparisons indicated that maternal deprivation induced a significant increase in IL-10 levels when the group D-Sal was compared to the control group (ND-Sal) ($p = 0.031$). Topiramate at the highest dose and valproic acid treatments in rats exposed to maternal deprivation induced significant differences when compared to the D-Sal group, suggesting that these treatments were able to reverse maternal deprivation-induced increases in IL-10 levels (both p 's < 0.05) in the hippocampus.

Results showing TNF- α levels are presented in Figure 4. Statistical comparison of TNF- α levels has revealed significant differences among the groups both in the hippocampus ($F_{(7, 52)} = 2.276, p = 0.046$, Fig. 4a) and in the prefrontal cortex ($F_{(7, 58)} = 2.91, p = 0.012$, Fig. 4b). *Post hoc* comparisons have indicated that the group submitted to maternal deprivation that received saline (D-Sal) presented a significant increase in TNF- α levels in the hippocampus when compared to the control group (ND-Sal, $p = 0.029$). Likewise, TNF- α levels of animals from the D-Sal group were also increased in the cortex when compared to the ND-Sal group ($p = 0.012$). *Post hoc* comparisons have also revealed a significant difference in TNF- α levels in the prefrontal cortex between D-Sal and the deprived group that received topiramate at the highest dose (D-Top 100, $p = 0.017$). While it seems to be a trend for increased TNF- α levels in the prefrontal cortex of control rats treated with Topiramate (ND-Top10 and ND-Top 100), no statistically significant differences were observed when these groups were compared to ND-Sal.

BDNF

Figure 5 presents BDNF levels in the hippocampus and in the prefrontal cortex of rats submitted to neonatal maternal deprivation and to adult chronic topiramate or valproic acid treatments. Statistical comparison of BDNF levels in the hippocampus has revealed a significant difference among the groups ($F_{(7, 45)} = 3.517, p = 0.005$, Fig. 5a). *Post hoc* comparisons have shown that maternal deprivation induced a significant decrease in BDNF levels when D-Sal group was compared to the control group (ND-Sal, $p < 0.05$). No statistically significant differences were observed in the comparison of BDNF in the prefrontal cortex (Fig. 5b).

Discussion

Exposure to stressful events early in life may have permanent deleterious consequences on nervous system function and increase the susceptibility to psychiatric conditions later in life. Consistently with our previous findings (de Lima et al. 2011; Pinheiro et al. 2012; Garcia et al. 2013), here we show that maternal deprivation, which is commonly used as a source of neonatal stress, impairs recognition memory in adult rats. Memory deficits reported here cannot be attributed to general alterations in exploratory or sensory motor behavior, since no differences were found among the groups in the open-field test or in the time spent exploring objects during training or testing sessions in the object recognition task. The present results indicated that the 14-day regimen of valproic acid was not able to ameliorate memory deficits induced by maternal deprivation. Valproic acid, recently shown to display histone deacetylase inhibitor properties, improves memory in animal models of prenatal hypoxia in APP/PS1 transgenic mice (Wang et al. 2014) and traumatic brain injury (Dash et al. 2010); and prevents olfactory discrimination and short-term memory impairments in rats infused with an intranasal administration of MPTP (Castro et al. 2012). Differences in doses and regimen of treatment used may account, at least in part, for the lack of effect of valproate in the present study.

We had hypothesized that topiramate, possibly due to its neuroprotective properties, could have beneficial effects on cognitive deficits induced by maternal deprivation. However, treatment with topiramate not only was ineffective in reversing memory impairments induced by maternal deprivation, but has also induced memory deficits in non deprived rats. Topiramate was also shown to impair emotional memory consolidation (Schmidt do Prado-Lima et al. 2011). Recently, a study reported that a single high dose of topiramate (120 mg/kg) impaired, while a chronic treatment with 60 mg/kg did not affect, spatial memory in healthy rats (Pietrzak et al. 2013). We have previously shown that a single

administration of low doses of topiramate improves object recognition memory, while high doses do not (Martins de Lima et al. 2007). Interestingly, Frisch and coworkers (2007) have shown that a single dose of 20 mg/kg topiramate, but not 100 mg/kg, when administered during pilocarpine-induced status epilepticus, has improved spatial memory in rats. Although results showing the effects of topiramate in healthy rats or in animal models of cognitive impairments are controversial, most of them show that topiramate either has no effect or impairs memory. In spite of its neuroprotective effects, the fact that the mechanism of action of topiramate involves the antagonism of glutamate receptors and Na⁺ channel blockade may underlie, at least in part, its memory-impairing effects. In humans, studies reported that topiramate treatment worsened cognitive domains of cognitive speed and verbal fluency, as well as short-term memory (Gomer et al. 2007) and led to deterioration in language comprehension, and verbal working memory (Fritz et al. 2005) in patients with focal epilepsy. Recently, it was also demonstrated that topiramate impairs working memory in healthy volunteers after a single administration (Marino et al. 2012).

Here we show for the first time that maternal deprivation during the neonatal period increases levels of the pro-inflammatory cytokine, TNF- α both in the hippocampus and pre-frontal cortex as well as of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the hippocampus. Previous studies using animal models have shown that psychosocial stress, such as social defeat, increase plasma IL-6 and IL-1 β and also increase these cytokines in the prefrontal cortex and hippocampus (Audet et al. 2010; 2011; Sukoff Rizzo et al. 2012). It is well documented that maternal deprivation activates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, leading to persistent increases in plasma corticosterone and ACTH (Daniels et al. 2009; Rentesi et al. 2010), as well as increases in HPA axis responsiveness to stressors and elevated CRF mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (Aisa et al. 2007). The glucocorticoid system is known to be a regulator of the inflammatory response, thereby

affecting cytokine levels (Anisman 2008). The persistent imbalance in inflammatory mediators may contribute to the well documented increased risk of development of psychiatric disorders in humans subjected to early life stressors. Accordingly, increased peripheral inflammatory markers, such as IL-6 and TNF- α have been related to major depression (Miller et al. 2013; Lotrich et al. 2013). Emerging data suggest that cytokines may influence the synthesis, reuptake, and release of neurotransmitters relevant to neuropsychiatric conditions, in particular, serotonin, noradrenalin, dopamine and glutamate systems (Miller et al. 2013), thereby implicating inflammatory imbalance in the development of depression and anxiety disorders. It has been reported that systemic administration of TNF- α reduces BDNF expression in the amygdala and in the insular cortex (Churchill et al. 2006), suggesting that cytokines may influence the expression of growth factors in the brain.

A recent study has shown that the treatment with the anti-inflammatory cytokine IL-10 prevented alterations in NR2A NMDA receptor subunit induced by maternal deprivation in rats (Wieck et al. 2013). Thus, the increases in IL-10, reported in the present study, may be possibly related to a compensatory effect.

Maternal deprivation induces a long-lasting decrease in BDNF levels in the hippocampus, which is consistent with previous studies (Choy et al. 2008; De Lima et al. 2011; Martisova et al. 2013). A reduction of hippocampal BDNF levels was shown to impair long-term potentiation, a cellular form of synaptic plasticity related to learning and memory, and to cause deficits in the formation and consolidation of hippocampus-dependent memory in rats (for a review see Lu et al. 2013). Restraint (Kwon et al. 2013) as well as chronic unpredicted stress (Qiu et al. 2014) reduce hippocampal levels of BDNF in adult rats. Valproic acid was shown to significantly relieve depression-like behaviors and to increase expression of BDNF (Qiu et al. 2013). Here, however, the reduction in BDNF levels in the hippocampus induced by maternal deprivation was not reversed by valproic acid or

topiramate. To our knowledge, no previous studies have evaluated the effects of topiramate treatment on BDNF levels in adult rats.

In the present study we show that topiramate (at the highest dose) and valproic acid treatments were able to reverse maternal deprivation-induced increases in IL-10 levels in the hippocampus, while topiramate at the highest dose only decreased TNF- α levels in the cortex, but not in the hippocampus. These results suggest that the alterations in cytokines may not be directly related to maternal deprivation-induced cognitive impairment, since, in spite of reversing cytokine alterations at some degree, topiramate treatment was not able to ameliorate memory deficits induced by maternal deprivation. Although a study has shown that topiramate had no effect on peripheral blood IL-6 levels in migraine patients (Koçer et al. 2009), a recent *in vitro* study has shown that TNF- α production was significantly decreased by topiramate and valproic acid (Himmerich et al. 2013). Thus, more studies are required to investigate the anti-inflammatory potential of topiramate and valproic acid and their effects on behavioral outcomes other than memory function, related to neonatal stress-induced effects in adult life, which can contribute for a better understanding of its therapeutic potential.

Conclusions

In summary, here we show that, in addition to inducing persistent memory deficits, maternal deprivation increases the levels of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, and of the pro-inflammatory cytokine, TNF- α , and decreases the levels of BDNF in the adulthood. Neither valproic acid nor topiramate were able to ameliorate memory deficits or the reduction in BDNF levels in the hippocampus induced by maternal separation. Surprisingly, the highest dose of topiramate was able to reduce the levels of IL-10 in the hippocampus and TNF- α in the prefrontal cortex, while valproic acid only reduced IL-10

levels in the hippocampus of maternally deprived rats. These findings may have implications for a better understanding of the mechanisms associated with persistent alterations observed in adult life induced by early stressful events, and for the proposal of novel therapeutic strategies.

Acknowledgements

F.K. and N.S. are Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Research fellows. Funding for this study was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Procad 061/2007, grant AUX-PE 657/2008).

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32: 256-266.
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ (2009) Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 19: 1222-1231.
- Aksić M, Radonjić NV, Aleksić D, Jevtić G, Marković B, Petronijević N, Radonjić V, Filipović B (2013) Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73: 394-403.
- Anisman H (2009) Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34: 4-20.
- Audet MC, Mangano EN, Anisman H (2010) Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. *Front Behav Neurosci* 4: 156.
- Audet MC, Jacobson-Pick S, Wann BP, Anisman H (2011) Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Behav Immun* 25: 1197–1205.
- Audet MC, Anisman H (2013) Interplay between pro-inflammatory cytokines and growth factors in depressive illnesses. *Front Cell Neurosci* 7: 68.
- Benetti F, da Silveira CK, da Silva WC, Cammarota M, Izquierdo I (2012) Histamine reverses

a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem* 97: 54-58.

Brenhouse HC, Andersen SL (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory treatment prevents delayed effects of early life stress in rats. *Biol Psychiatry* 70: 434-440.

Castro AA, Ghisoni K, Latini A, Quevedo J, Tasca CI, Prediger RD (2012) Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 229: 208-215.

Chapman DP, Whitfield CL, Felitti VJ, Dube SR, Edwards VJ, Anda RF (2004) Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. *J Affect Disord* 82: 217–225.

Chen X, Bao G, Hua Y, Li Y, Wang Z, Zhang X (2009) The effects of topiramate on caspase-3 expression in hippocampus of basolateral amygdala (BLA) electrical kindled epilepsy rat. *J Mol Neurosci* 38: 201-206.

Choy KHC, Visser Y, Nichols NR, Van den Buuse M (2008) Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Hippocampus* 18: 655–667.

Churchill L, Taishi P, Wang M, Brandt J, Cearley C, Rehman A, Krueger JM (2006) Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. *Brain Res* 1120: 64-73.

Danese A, Moffitt TE, Pariante CM, Ambler A, Poulton R, Caspi A (2008) Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. *Arch Gen Psychiatry* 65: 409-415.

- Daniels WM, Fairbairn LR, van Tilburg G, McEvoy CR, Zigmond MJ, Russell VA, Stein DJ (2009) Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 1(7) glucocorticoid receptor promoter region. *Metab Brain Dis* 24: 615-627.
- Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J, Moore AN (2010) Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *PLoS One* 5(6):e11383.
- Deckers CLP, Czuczwar SJ, Hekster YA, Keyser A, Kubova H, Meinardi H, Patsalos PN, Renier WO, Van Rijn CM (2000) Selection of Antiepileptic Drug Polytherapy Based on Mechanisms of Action: The Evidence Reviewed. *Epilepsia* 41: 1364 -1374.
- De Lima MN, Presti-Torres J, Caldana F, Grazziotin MM, Scalco FS, Guimarães MR, Bromberg E, Franke SI, Henriques JA, Schröder N (2007) Desferoxamine reverses neonatal iron-induced recognition memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 570: 111-114.
- De Lima MN, Dias PC, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, Guimarães MR, Petry RC, Bromberg E, Constantino L, Budni P, Dal-Pizzol F, Schröder N (2008a) Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging* 29: 1052-1059.
- De Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R, Schröder N (2008b) Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 55: 788-792.
- De Lima MN, Presti-Torres J, Vedana G, Alcalde LA, Stertz L, Fries GR, Roesler R, Andersen

ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2011) Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 224: 100-106.

Dimitrov DH, Lee S, Yantis J, Valdez C, Paredes RM, Braida N, Velligan D, Walss-Bass C (2013) Differential correlations between inflammatory cytokines and psychopathology in veterans with schizophrenia: Potential role for IL-17 pathway. *Schizophr Res* 151: 29-35.

Ferrari A, Tiraferri I, Neri L, Sternieri E (2011) Clinical pharmacology of topiramate in migraine prevention. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7: 1169-1181.

Frey BN, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J (2006) Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 31: 326–332.

Frisch C, Kudin AP, Elger CE, Kunz WS, Helmstaedter C (2007) Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Res* 73: 173-180.

Fritz N, Glogau S, Hoffmann J, Rademacher M, Elger CE, Helmstaedter C (2005) Efficacy and cognitive side effects of tiagabine and topiramate in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav* 6: 373-381.

Garcia VA, Hirotsu C, Matos G, Alvarenga T, Pires GN, Kapczinski F, Schröder N, Tufik S, Andersen ML (2013) Modafinil ameliorates cognitive deficits induced by maternal separation and sleep deprivation. *Behav Brain Res* 253: 274-279.

Gomer B, Wagner K, Frings L, Saar J, Carius A, Härle M, Steinhoff BJ, Schulze-Bonhage A

(2007) The influence of antiepileptic drugs on cognition: a comparison of levetiracetam with topiramate. *Epilepsy Behav* 10: 486-494.

Himmerich H, Bartsch S, Hamer H, Mergl R, Schönherr J, Petersein C, Munzer A, Kirkby KC, Bauer K, Sack U (2013) Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. *J Psychiatr Res* 47: 1751-1759.

Hsu JW, Lirng JF, Wang SJ, Lin CL, Yang KC, Liao MH, Chou YH (2014) Association of thalamic serotonin transporter and interleukin-10 in bipolar I disorder: a SPECT study. *Bipolar Disord* Epub ahead of print, DOI: 10.1111/bdi.12164.

Jans JE, Woodside BC (1990) Nest temperature: effects on maternal behavior, pup development, and interactions with handling. *Dev Psychobiol* 23: 519-534.

Koçer A, Memişoğulları R, Domaç FM, İlhan A, Koçer E, Okuyucu S, Özdemir B, Yüksel H (2009) IL-6 levels in migraine patients receiving topiramate. *Pain Pract* 9: 375-379.

Kouzounias K, Kimiskidis VK, Siozos T, Violaris K, Kostomitsopoulos N, Karayannakos PE, Sotirakoglou K, Nanassis K (2011) Topiramate promotes neurological recovery in a new model of traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 183: 171-177.

Kwon DH, Kim BS, Chang H, Kim YI, Jo SA, Leem YH (2013) Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. *Biochem Biophys Res Commun* 434: 245-251.

Levine S (1967) Maternal and environmental influences on the adrenocortical response to stress in weanling rats. *Science* 156: 258-260.

Lotrich F (2012) Inflammatory cytokines, growth factors, and depression. *Curr Pharm Des* 18: 5920-5935.

- Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P (2013) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14: 401-416.
- Mao X, Ji C, Sun C, Cao D, Ma P, Ji Z, Cao F, Min D, Li S, Cai J, Cao Y (2012) Topiramate attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via activating GABAergic signaling and inhibiting astrogliosis. *Neurochem Int* 60: 39-46.
- Marino SE, Pakhomov SV, Han S, Anderson KL, Ding M, Eberly LE, Loring DW, Hawkins-Taylor C, Rarick JO, Leppik IE, Cibula JE, Birnbaum AK (2012) The effect of topiramate plasma concentration on linguistic behavior, verbal recall and working memory. *Epilepsy Behav* 24: 365-372.
- Martins de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Bromberg E, Schröder N (2007) Differential effects of low and high doses of topiramate on consolidation and retrieval of novel object recognition memory in rats. *Epilepsy Behav* 10: 32-37.
- Martisova E, Aisa B, Guereñu G, Ramírez MJ (2013) Effects of early maternal separation on biobehavioral and neuropathological markers of Alzheimer's disease in adult male rats. *Curr Alzheimer Res* 10: 420-432.
- McDaniel WF, Sawitsky AS, Vick KE (2007) Topiramate attenuates a transient learning deficit after lesions inducing intracerebral hemorrhage. *Psychol Rep* 100: 164-166.
- Mikati MA, Daderian R, Zeinieh M, Leonard AS, Azzam D, Kurdi R (2011) Potential neuroprotective effects of continuous topiramate therapy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 20: 597 – 601.
- Miller AH, Haroon E, Raison CL, Felger JC (2013) Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety* 30: 297-306.

- Muriach M, López-Pedrajas R, Barcia JM, Sanchez-Villarejo MV, Almansa I, Romero FJ (2010) Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J Neurochem* 114: 675-684.
- Noh MR, Kim SK, Sun W, Park SK, Choi HC, Lim JH, Kim IH, Kim HJ, Kim H, Eun BL (2006) Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 201: 470-478.
- O' Connor RM, Pusceddu MM, Dinan TG, Cryan JF (2013) Impact of early-life stress, on group III mGlu receptor levels in the rat hippocampus: effects of ketamine, electroconvulsive shock therapy and fluoxetine treatment. *Neuropharmacology* 66: 236-241.
- Pietrek C, Elbert T, Weierstall R, Müller O, Rockstroh B (2013) Childhood adversities in relation to psychiatric disorders. *Psychiatry Res* 206: 103-110.
- Pietrzak B, Konopka A, Wojcieszak J (2013) Effect of topiramate on hippocampus-dependent spatial memory in rats. *Pharmacol Rep* 65: 1152-1162.
- Pinheiro RM, de Lima MN, Fries GR, Garcia VA, Presti-Torres J, Hallmenschlager LH, Alcalde LA, Roesler R, Andersen ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2012) Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by d-amphetamine: amelioration by valproic acid. *J Neural Transm* 119: 627-637.
- Qiu HM, Yang JX, Liu D, Fei HZ, Hu XY, Zhou QX. (2014) Antidepressive effect of sodium valproate involving suppression of corticotropin-releasing factor expression and elevation of BDNF expression in rats exposed to chronic unpredicted stress. *Neuroreport* 25: 205-210.

- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M (2010) Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett* 480: 7-11.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Syrrou M, Papadopoulou-Daifoti Z, Konstandi M (2013) Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav Brain Res* 244: 29-37.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7: 609–616.
- Schmidt do Prado-Lima PA, Perrenoud MF, Kristensen CH, Cammarota M, Izquierdo I. (2011) Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *J Psychiatry Neurosci* 36: 250 – 255.
- Sfaello I, Baud O, Arzimanoglou A, Gressens P (2005) Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain. *Neurobiol Dis* 20: 837-848.
- Sobaniec-Lotowska ME, Lotowska JM (2011) The neuroprotective effect of topiramate on the ultrastructure of pyramidal neurons of the hippocampal CA1 and CA3 sectors in an experimental model of febrile seizures in rats. *Folia Neuropathol* 49: 230-236.
- Sommer BR, Fenn HH (2010) Review of topiramate for the treatment of epilepsy in elderly patients. *Clin Interv Aging* 5: 89-99.
- Sukoff Rizzo SJ, Neal SJ, Hughes ZA, Beyna M, Rosenzweig-Lipson S, Moss SJ, Brandon NJ (2012) Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. *Transl Psychiatry* 2: e199.

- van Winkel R, van Nierop M, Myin-Germeys I, van Os J (2013) Childhood trauma as a cause of psychosis: linking genes, psychology, and biology. *Can J Psychiatry* 58: 44-51.
- Walz JC, Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Cacilhas AA, Valvassori SS, Quevedo J, Kapczinski F (2008) Effects of lithium and valproate on serum and hippocampal neurotrophin-3 levels in an animal model of mania. *J Psychiatric Res* 42:416–421.
- Wang Z, Zhang XJ, Li T, Li J, Tang Y, Le W (2014) Valproic acid reduces neuritic plaque formation and improves learning deficits in APPSwe /PS1A246E transgenic mice via preventing the prenatal hypoxia-induced down-regulation of neprilysin. *CNS Neurosci Ther* 20: 209-217.
- Wieck A, Andersen SL, Brenhouse HC (2013) Evidence for a neuroinflammatory mechanism in delayed effects of early life adversity in rats: relationship to cortical NMDA receptor expression. *Brain Behav Immun* 28: 218-226.

Figure captions

Fig. 1 Effects of maternal deprivation (D) and topiramate (Top) or valproic acid (Val) treatment on open-field behavior. (a) Latency to start locomotion, (b) number of crossings and (c) rearings were evaluated in an open-field apparatus after chronic Top or Val treatments, and this exploration was used as a habituation session for the object recognition task. Data are expressed as mean \pm SEM. No significant differences among the groups were observed.

Fig. 2 Effects of Topiramate (Top) or Valproic acid (Val) on recognition memory after exposure to maternal deprivation (D). Groups of animals submitted (Deprived, D) or not (non-deprived, ND) to maternal deprivation in the neonatal period received Top or Val for 14 consecutive days, when adults. Twenty-four hours after the last injection, they were trained in the object recognition task. Short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) retention tests were performed 1.5 and 24 h after training, respectively. 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 \pm interquartile ranges, $n = 7-11$ per group (see Table 1). Differences between ND-Saline (control) group and all other groups are indicated as: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$; between D-Saline group from other groups as: + $p < 0.05$.

Fig. 3 Effects of maternal deprivation (D) and topiramate (Top) or valproic acid (Val) treatment on IL-10 levels in: hippocampus (a) and prefrontal cortex (b). Data are expressed as

mean \pm SEM picogram of IL-10/mL, $n = 3-9$ per group. Rats were euthanized for IL-10 measurement 24 hours after the completion of the behavioral experiments. Differences between ND-Sal versus other groups are indicated as: * $p < 0.05$; differences between D-Sal group versus other groups are indicated as: + $p < 0.05$.

Fig. 4 Effects of maternal deprivation (D) and topiramate (Top) or valproic acid (Val) treatment on TNF- α levels in hippocampus (a) and prefrontal cortex (b). Data are expressed as mean \pm SEM picogram of TNF- α /mL, $n = 5-11$ per group. Rats were euthanized for TNF measurement 24 hours after the completion of the behavioral experiments. Differences between ND-Sal versus other groups are indicated as: * $p < 0.05$; differences between D-Sal group versus other groups are indicated as: + $p < 0.05$.

Fig. 5 Effects of maternal deprivation (D) and topiramate (Top) or valproic acid (Val) treatment on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in hippocampus (a) and prefrontal cortex (b). Data are expressed as mean \pm SEM picogram of BDNF/ μ g of protein, $N = 3-7$ animals per group. Rats were euthanized for BDNF measurement 24 hours after the completion of the behavioral experiments. Differences between ND-Sal versus other groups are indicated as: * $P < 0.05$.

Table 1 – Mean \pm SEM total time (in seconds) exploring both objects in the training or short-term (STM), or long-term (LTM) testing trials of object recognition task in rats submitted to neonatal maternal deprivation (D) or not (ND) and to chronic saline, topiramate (Top), or valproic acid (Val) administration. No significant differences among the groups were observed.

GROUP	<i>n</i>	Training Mean (s) \pm S.E.	STM test trial Mean (s) \pm S.E.	LTM test trial Mean (s) \pm S.E.
ND-Saline	8	38.9 \pm 6.3	33.6 \pm 7.4	38.4 \pm 5.0
ND-Top 10	9	57.3 \pm 7.8	39.6 \pm 5.2	31.9 \pm 4.9
ND-Top 100	7	51.5 \pm 8.8	43.8 \pm 10.0	33.9 \pm 6.6
ND-Val 200	8	40.7 \pm 5.6	38.1 \pm 6.3	32.1 \pm 4.0
D-Saline	7	59.4 \pm 7.8	48.3 \pm 5.7	46.0 \pm 7.6
D-Top 10	8	50.9 \pm 3.5	52.8 \pm 8.7	38.9 \pm 5.0
D-Top 100	10	62.4 \pm 6.6	54.6 \pm 7.0	41.6 \pm 5.7
D-Val 200	11	56.6 \pm 2.8	36.8 \pm 4.5	34.5 \pm 5.4

