UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Efeitos do levetiracetam sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pela exposição ao estresse na adolescência

Aluna: Andreza Manzato Cavichioli
Orientador: Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ANDREZA MANZATO CAVICHIOLI

Efeitos do levetiracetam sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pela exposição ao estresse na adolescência

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Villela Gomes

Ribeirão Preto

2022

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESSE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Cavichioli, Andreza Manzato

Efeitos do levetiracetam sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pela exposição ao estresse na adolescência / Andreza Manzato Cavichioli; orientador; Felipe Villela Gomes - Ribeirão Preto, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2022

1. Estresse 2. Levetiracetam 3. Esquizofrenia 4. Eletrofisiologia 5. Sistema dopaminérgico 6. Hipocampo ventral.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CAVICHIOLI, Andreza Manzato

Título: Efeitos do levetiracetam sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pela exposição ao estresse na adolescência

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia. Orientador: Prof. Dr. Felipe Villela Gomes.

Aprovado em: _____/_____ /_____

Banca examinadora:

Prof (a) Dr (a)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a) Dr (a)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Adegair de Araújo Cavichioli e Aparecida da Silva Manzato Cavichioli, por serem meus maiores incentivadores e sempre me lembrarem que as palavras “eu não consigo” não fazem parte do meu vocabulário.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus, porque sem Ele eu não seria capaz de realizar esse trabalho, agradeço por todas as vezes que suas mãos me sustentaram e por todas as vezes que o seu amor me constrangeu e fez de mim alguém melhor. Obrigada meu Pai, por ter guiado cada passo meu em todo esse processo.

Agradeço aos meus pais Aparecida da Silva Manzato Cavichioli e Adegair de Araújo Cavichioli; obrigada por me apoiarem em todo esse processo e proporcionarem todas as condições para que pudesse sonhar e realizar qualquer coisa que eu quisesse na vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim, e por “embarcarem” em todos os meus sonhos comigo.

Agradeço a minha amiga Larissa Cristina Bastos de Oliveira, pois tenho certeza que sem a sua amizade todo esse processo seria muito mais difícil. Obrigada porque mesmo a km de distância você se fez presente em todos os meus dias, as suas mensagens/ligações sempre foram um motivo de alegria nos dias que eu mais precisava; mas eu te agradeço principalmente por ser o meu lembrete diário da bondade de Deus.

Agradeço a minha amiga Aline Esposito, por tornar os dias em Ribeirão Preto muito mais divertidos. Eu tenho certeza que dividir os meus dias com você fizeram com que todo esse processo fosse leve. Obrigada por ser a minha família aqui, sei que dividimos em vários momentos muito mais que a casa, e para mim essa foi a melhor parte de todo esse processo.

Agradeço ao meu orientador Felipe Villela Gomes, obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório e ter me dado essa oportunidade. Agradeço por toda a paciência e por toda ajuda, sem dúvidas eu aprendi muitas coisas em todo esse

processo e várias delas foi você que me ensinou dia a dia. Não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto que você contribuiu com minha formação, obrigada por tudo. Eu te admiro como pesquisador, professor e principalmente como pessoa.

Agradeço aos meus amigos de laboratório: Débora Fabris, Thamyris Silva, Adriana Souza e Débora Uber. Obrigada por me receberem com tanto carinho, por sempre estarem mais do que dispostas a me ensinar e por me ajudarem em tudo que eu precisei. Sem dúvidas ninguém faz nada sozinho, e todo esse trabalho só foi possível pela colaboração de cada uma de vocês, muito obrigada.

Agradeço ao professor Francisco Silveira Guimarães, pelas oportunidades e ensinamentos, e por ter aberto as portas do seu laboratório para realização desse trabalho.

Agradeço aos membros da banca professor Fabricio Araújo Moreira e professor Fernando Eduardo Padovan Neto, pelo tempo disposto na correção desse trabalho e por todas as contribuições que ajudarão a aprimora-lo ainda mais.

Agradeço a todos os funcionários e técnicos do Departamento de Farmacologia da FMRP por toda ajuda para realização de procedimentos experimentais e cuidado dos animais.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo o apoio financeiro sem o qual não seria possível a realização desse trabalho (n°2020/04241-6).

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por todo apoio financeiro; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) pelo apoio.

Aprendi o segredo de viver contente em toda e qualquer situação, tendo muito ou tendo pouco; tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:12-13

RESUMO

CAVICHIOL, A.M Efeitos do levetiracetam sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pela exposição ao estresse na adolescência. 2022. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 2022.

Introdução: dentre os transtornos psiquiátricos, a esquizofrenia é considerada o mais incapacitante. Sabe-se que fatores de risco socioambientais, como o estresse, têm um papel importante no desenvolvimento da doença. Estudos indicam que a exposição ao estresse durante períodos críticos de desenvolvimento, como a adolescência, resulta em um estado hiperdopaminérgico indicado por um aumento da atividade do sistema dopaminérgico na área tegmental ventral (ATV) similar ao que é observado em pacientes com esquizofrenia e em modelos animais para o estudo desse transtorno. Assim como em modelos animais e como é sugerido ocorrer em pacientes com esquizofrenia, o estado hiperdopaminérgico induzido pelo estresse na adolescência foi associado a uma disfunção no balanço exicitatório-inibitorio (E/I) no hipocampo ventral (HV), com perda funcional de interneurônios GABAérgicos que expressam a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina (PV) e consequente aumento na atividade de neurônios glutamatérgicos piramidais. Assim, fármacos que atuam através da modulação do balanço E/I podem ser estratégias farmacológicas interessantes no tratamento de disfunções associadas a alterações nesse balanço. O levetiracetam, um anticonvulsivante, apresenta mecanismos de ação capazes de modular o balanço E/I, como a modulação da proteína sináptica SV2A, regulando a liberação de neurotransmissores como o GABA e o glutamato, e de canais para potássio Kv3.1 que são importantes para a atividade dos interneurônios PV. Assim, hipotetizamos que o tratamento agudo com levetiracetam em animais adultos é capaz

de atenuar os déficits no balanço E/I e, consequentemente, prejuízos comportamentais e eletrofisiológicos induzidos pelo estresse na adolescência. **Objetivo:** avaliar se o tratamento com levetiracetam na idade adulta é capaz de atenuar as alterações comportamentais e a hiperatividade dos neurônios piramidais no HV e de neurônios dopaminérgicos na ATV induzidas pelo estresse na adolescência**. Métodos**: ratos da linhagem Sprague-Dawley foram submetidos a um protocolo de estresse entre os dias pós-natal (DPN) 31 e 40, período correspondente a adolescência nos animais. Quando atingiram a idade adulta (DPN 65), os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: bloco 1 de experimentos - labirinto em cruz elevado (LCE), reconhecimento de objeto (RO) e reposta locomotora à anfetamina (RLA); bloco 2 de experimentos - claro-escuro (CE) e interação social (IS). Uma semana depois dos testes do bloco 2, os animais foram submetidos aos registros eletrofisiológicos *in vivo* de neurônios dopaminérgicos da ATV. Em um terceiro bloco de experimentos foi realizado o registro eletrofisiológico *in vivo* de neurônios piramidais e interneurônios no HV. Os animais receberam 10 mg/kg (i.p) de levetiracetam ou salina 30 minutos antes de cada teste comportamental e dos registros eletrofisiológicos. **Resultados:** o estresse durante adolescência diminuiu a exploração dos animais no LCE, causou um efeito tipo-ansiedade no teste de CE, diminuiu o tempo de interação no teste de IS e também resultou em prejuízos cognitivos no teste de RO. O tratamento com levetiracetam foi capaz de atenuar/reverter esses comportamentos, com exceção das alterações no LCE. O estresse durante a adolescência não alterou a RLA, mas, de maneira inesperada, observamos um aumento da RLA em animais estressados tratados com levetiracetam. Os registros eletrofisiológicos indicaram que o estresse durante a adolescência aumentou a frequência de disparo dos neurônios piramidais no HV, bem

como o número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV. O tratamento com levetiracetam foi capaz de reverter a hiperatividade tanto dos neurônios piramidais como dos neurônios dopaminérgicos. Adicionalmente, houve uma diminuição, não estatisticamente significativa, na frequência de disparo de interneurônios no HV de animais submetidos ao estresse na adolescência tratados com salina quando comparados com o grupo naïve. Mas, a frequência de disparo de interneurônios no HV de animais submetidos ao estresse na adolescência tratados com levetiracetam foi significativamente maior comparada a dos animais estressados que receberam salina. **Conclusão:** Esses achados sugerem que o levetiracetam atenua alterações comportamentais e eletrofisiológicas relacionadas à esquizofrenia no animal adulto que foram induzidas pela exposição ao estresse durante a adolescência.

Palavras-chave: Estresse, levetiracetam, esquizofrenia, eletrofisiologia, sistema dopaminérgico, hipocampo ventral.

ABSTRACT

CAVICHIOL, A.M Effects of levetiracetam on behavioral e electrophysiological changes resembling schizophrenia induced by adolescent stress. 2022. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, 2022.

Introduction: among all psychiatric disorders, schizophrenia is considered the most disabling. It is known that socioenvironmental risk factors, such as stress, play a critical role in schizophrenia development. Studies indicate that the exposure to stress during critical periods of development, such as adolescence, results in a hyperdopaminergic state indicated by an increased activity of the dopaminergic system in the ventral tegmental area (VTA) similar to what is seen in schizophrenia patients and animal models for the study of this disorder. As in animal models and suggested to occur in patients with schizophrenia, the adolescent stress-induced hyperdopaminergic state was associated with a dysfunction in the excitatory-inhibitory (E/I) balance in the ventral hippocampus (VH), with functional loss of parvalbumin (PV)-containing interneurons GABAergic e increase in the activity of pyramidal glutamatergic neurons. Thus, drugs that act through the modulation of the E/I balance have emerged as interesting pharmacological tools for the treatment of disorders associated with E/I balance impairments. Levetiracetam, an anticonvulsant, seems to be capable of modulating the E/I balance through the modulation of the synaptic protein SV2A, regulating the release of neurotransmitters such as GABA and glutamate, and Kv3.1 potassium channels that are crucial for the activity of PV interneurons. Thus, we hypothesize that the acute treatment with levetiracetam in adult animals attenuates deficits in the E/I balance e, consequently, behavioral e electrophysiological changes induced by stress in adolescence. **Aims:** To assess whether treatment with levetiracetam in adulthood attenuates behavioral changes e hyperactivity of pyramidal

neurons in VH e dopaminergic neurons in VTA induced by adolescent stress. **Methods**: Male Sprague-Dawley rats were submitted to a stress protocol between postnatal days (PND) 31 e 40, a period corresponding to adolescence. When they reached adulthood (PND 65), the animals were submitted to the following behavioral tests: experimental block 1 of experiments - elevated plus-maze (EPM), object recognition (NOR) and locomotor response to amphetamine (LRA); block 2 of experiments - light-dark test (LD) and social interaction (SI). One week later, the animals were submitted to *in vivo* electrophysiological recordings of VTA dopaminergic neurons. In a third block of experiments, the in vivo electrophysiological recording of pyramidal neurons e interneurons in the VH was performed. The animals received 10 mg/kg (i.p) of levetiracetam or saline 30 minutes before each behavioral test e electrophysiological recordings. **Results:** Stress during adolescence decreases exploration of animals in the EPM, caused an anxiety-like effect in the LD test, decreased interaction time in the SI test and also resulted in cognitive impairments in the NOR test. Acute treatment with levetiracetam attenuated/reversed all these behavioral deficits, except for the changes in the EPM. Stress during adolescence did not change LRA, but, unexpectedly, we observed an increased locomotor response to amphetamine in stressed animals treated with levetiracetam. Electrophysiological recordings indicated that stress during adolescence led to an increase in the firing rate of pyramidal neurons in the VH, as well as an increase in the number of spontaneously active dopaminergic neurons in the VTA. Levetiracetam treatment reversed the hyperactivity of both pyramidal and dopaminergic neurons. Furthermore, treatment with levetiracetam also increased the firing rate of GABAergic interneurons in the VH of stressed animals compared to saline-treated stressed animals. **Conclusion**: These findings suggest that levetiracetam attenuates behavioral and electrophysiological

changes related to schizophrenia in the adult animal that were induced by exposure to stress during adolescence.

Keywords: Stress, levetiracetam, schizophrenia, electrophysiology, dopaminergic System, ventral hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de regulação da atividade do eixo HPA.....21

Figura 2. Mecanismos pelos quais o estresse pode levar a danos nos interneurônios PV.....28

Figura 3. Regulação do sistema dopaminérgico na ATV.....31

Figura 4. Disfunção de interneurônios PV no hipocampo ventral (HV) associada aos diferentes sintomas da esquizofrenia.....33

Figura 5. Desenho experimental.....41

Figura 6. Protocolo experimental de estresse durante a adolescência.....42

Figura 7. Protocolo experimental do teste de labirinto em cruz elevado.....43

Figura 8. Protocolo experimental do teste de reconhecimento de objeto.....44

Figura 9. Protocolo experimental do teste de resposta locomotora a anfetamina.....45

Figura 10. Protocolo experimental do teste claro-escuro.....46

Figura 11. Protocolo experimental do teste interação social.....47

Figura 12. Protocolo experimental de registros eletrofisiológicos da ATV e características eletrofisiológicas de neurônios dopaminérgicos.....49

Figura 13. Protocolo experimental de registros eletrofisiológicos do HV e características eletrofisiológicas de neurônios piramidais e interneurônios.....50

Figura 14. Efeito do estresse na adolescência (FS+RS) e da administração aguda de levetiracetam (10 mg/kg) no LCE.....53

Figura 15. Efeito do estresse na adolescência (FS+RS) e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de RO.....55

Figura 16. Efeito do estresse e do tratamento com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de RLA.....57

Figura 17. Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de claro-escuro.....58

Figura 18. Efeito do estresse e do tratamento com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de IS.....60

Figura 19: Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) na eletrofisiologia de neurônios dopaminérgicos na ATV.....61

Figura 20. Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) na eletrofisiologia de neurônios piramidais no HV.....63

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO.....19

1.1 Neurobiologia do estresse e transtornos psiquiátricos.....19

1.2 Estresse na adolescência como um fator de ricos para o desenvolvimento da esquizofrenia.....24

1.3 Sistema dopaminérgico e neurobiologia da esquizofrenia.....

1.4 Hiperatividade do HV na esquizofrenia: desregulação do balanço E/I.....29

1.5 Modulação do balanço E/I pelo levetiracetam.....32

2. OBJETIVOS.....38

2.1 Objetivos Gerais.....38

2.2 Objetivos Específicos.....39

3. METODOLOGIA.....40

3.1 Animais.....40

3.2 Desenho experimental.....40

3.3 Protocolo de exposição ao estresse.....41

3.4 Grupos experimentais e tratamento.....42

3.5 Labirinto em cruz elevado (LCE).....42

3.6 Reconhecimento de objeto (RO).....43

3.7 Resposta locomotora à anfetamina (RLA).....45

3.8 Teste claro-escuro (CE).....46

3.9 Interação social (IS).....46

3.10 Eletrofisiologia *in vivo* de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV).....47

3.11 Eletrofisiologia *in vivo* de neurônios glutamatérgicos piramidais do HV.49

3.12 Análise Estatística.....50

4. RESULTADOS.....53

4.1 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no LCE em animais adultos.....53

4.2 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no RO em animais adultos.....54

4.3 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no teste de RLA em animais adultos.....56

4.4 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no teste CE em animais adultos.....58

4.5 Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam no teste de IS em animais adultos.....59

4.6 Registros de eletrofisiologia *in vivo* de neurônios dopaminérgicos na ATV.....60

4.7 Registros de eletrofisiologia *in vivo* de neurônios piramidais no HV.....62

5. DISCUSSÃO.....64

6. CONCLUSSÃO.....74

7. REFERÊNCIAS.....75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurobiologia do estresse e transtornos psiquiátricos

Os transtornos psiquiátricos representam o maior desafio médico do século XXI, sendo considerados a principal causa de incapacidade relacionada a doenças crônicas não fatais (Whiteford, Degenhardt et al. 2013). Ainda assim, a etiologia da maioria desses transtornos permanece indeterminada, uma vez que são condições complexas e multifatoriais (Cruz-Pereira, Rea et al. 2020). Estudos indicam que a exposição a fatores socioambientais adversos, como o estresse, aumentam o risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como: ansiedade, transtorno depressivo maior e esquizofrenia (Linszen, Brouwer et al. 2016, Otte, Gold et al. 2016, Ray, Gulati et al. 2017).

Embora as respostas desencadeadas pelo estresse no organismo sejam comumente associadas a prejuízos para homeostasia do corpo, estudos mostram que essas respostas são importantes para que o organismo possa se adaptar e responder de maneira adequada frente a situações de estresse (Joels 2018). O problema começa a partir do momento que essa reposta passa ser excessiva e prolongada, persistindo por um longo período de tempo, o que pode resultar em efeitos deletérios para todo corpo e, consequentemente, contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, bem como outras patologias (Brzozowski, Mazur-Bialy et al. 2016, Howes, McCutcheon et al. 2017, Ray, Gulati et al. 2017, Cruz-Pereira, Rea et al. 2020).

A resposta do organismo frente ao estresse consiste em um primeiro momento na ativação do sistema nervoso autônomo, resultando na liberação de adrenalina e noradrenalina (Wong, Tai et al. 2012). Na sequência, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é ativado e o núcleo paraventricular do hipotálamo libera o hormônio

liberador de corticotrofina (CRF) e a arginina-vasopressina, o que resulta na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior na circulação sistêmica (Herman, McKlveen et al. 2016). No córtex da adrenal o ACTH ativa mecanismos de síntese e liberação do glicocorticoide cortisol (predominante em humanos) ou corticosterona (na maioria dos roedores) (Joels 2018), que são considerados como “hormônios do estresse”.

A responsividade do eixo HPA ao estresse é em parte determinada pela capacidade dos glicocorticoides de regular a liberação de ACTH e CRF pela ligação a dois receptores: o receptor de glicocorticoides (GR) e o receptor de mineralocorticoides (MR), através de mecanismos de *feedback negativo* que são acionados em vários níveis do sistema, isto é, da glândula adrenal ao hipotálamo e outras regiões do cérebro, como o hipocampo, córtex pré-frontal (CPF) e amígdala, que são estruturas ricas em receptores GR e MR (Figura 1), visando a diminuição da atividade do eixo HPA (Lupien, McEwen et al. 2009).

A ativação de receptores MR e GR desencadeiam, principalmente, respostas celulares associadas a regulação da transcrição gênica (Brzozowski, Mazur-Bialy et al. 2016). Assim, alterações transcricionais podem resultar em prejuízos na síntese de moléculas importantes para células, como: enzimas, neurotransmissores e receptores. Dessa forma, os glicocorticoides podem ter efeitos duradouros sobre estruturas do cérebro (Lupien, Juster et al. 2018) e, consequentemente, sobre suas atividades.

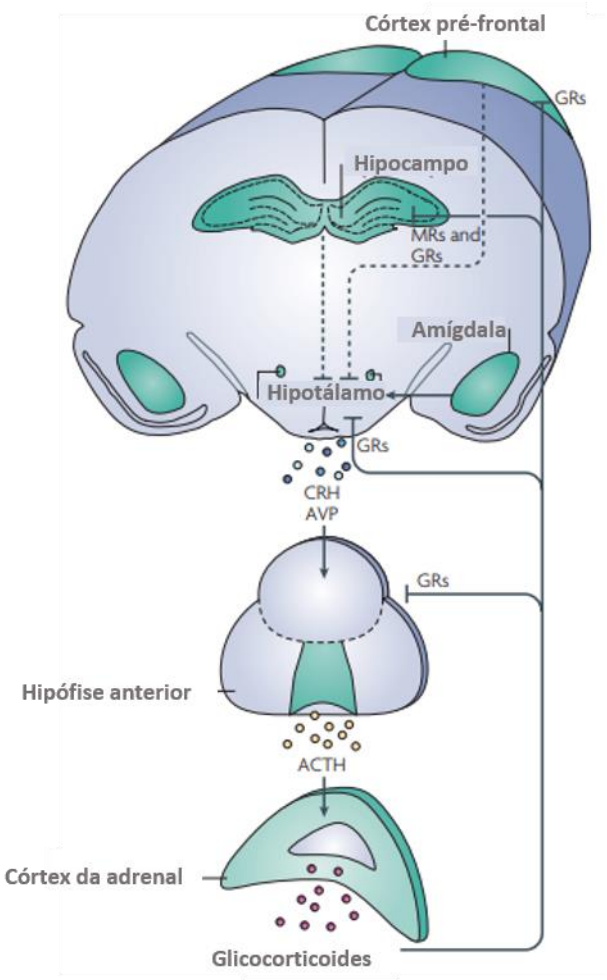

Figura 1. Mecanismos de regulação da atividade do eixo HPA. A ativação do eixo HPA resulta na liberação de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) pelo hipotálamo, que por sua vez induz a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pela hipófise anterior, resultado na estimulação da produção de glicocorticoides no córtex da adrenal. Os glicocorticoides regulam a atividade do eixo HPA através de mecanismos de *feedback negativos*, atuando em seus receptores: GR (receptor de glicocorticoides) e MR (receptor de mineralocorticoides) em várias estruturas como: hipófise anterior, hipotálamo, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal. **Imagem adaptada de: Lupien; McEwen et al. 2009.**

Diferentes hipóteses tentam explicar o efeito de períodos prolongados de estresse no cérebro, como a hipótese da neurotoxicidade e a hipótese da vulnerabilidade (Lupien, Juster et al. 2018). A hipótese da neurotoxicidade postula que a exposição a altas concentrações de glicocorticoides promove um efeito deletério no eixo HPA, prejudicando os mecanismos de *feedback negativo* mantendo assim o eixo HPA hiperativo, o que por sua vez pode aumentar o estresse oxidativo resultando em danos neuronais (Sapolsky, Krey et al. 1986) Já a hipótese da vulnerabilidade postula

que a fase da vida (pré-natal, pós-natal, adolescência e vida adulta) em que se é exposto ao estresse é importante para modular o tipo de reposta fisiológica e comportamental que será desenvolvida, sendo que quanto mais cedo se é exposto (pré-natal até adolescência), os prejuízos observados seriam mais severos uma vez que estruturas importantes do sistema nervoso central ainda estão em formação (Gilbertson, Shenton et al. 2002, Gunnar e Donzella 2002). Sendo assim essas duas hipóteses (neurotoxicidade e vulnerabilidade) se complementam, indicando que existem períodos mais críticos do desenvolvimento e que esses podem ser afetados de maneiras mais severas pelos processos de neurotoxicidade.

A adolescência é considerada um período de maior vulnerabilidade caracterizado por diversas alterações dinâmicas em processos fisiológicos e sociais dos indivíduos (Sisk e Foster 2004). Essas alterações, tanto no âmbito fisiológico como social, apresentam potencial para interferir em características neurobiológicas envolvidas na maturação cerebral, tornando a adolescência um período de maior suscetibilidade a fatores socioambientais adversos, como o estresse (Niehaus, Chaplin et al. 2019). Estudos indicam que o estresse durante a adolescência resulta em alterações deletérias na função do eixo HPA, levando a uma ativação prolongada em resposta a estressores em comparação com a idade adulta (Lupien, McEwen et al. 2009), o que, por sua vez, pode resultar em danos em estruturas importantes.

Além disso, ratos adolescentes apresentam aumento tardio dos níveis de glicocorticoides e liberação prolongada de glicocorticoides em resposta a vários tipos de estressores quando comparados com ratos adultos, devido à maturação incompleta dos sistemas de *feedback negativo* (Vazquez e Akil 1993). Adicionalmente, em contraste com ratos adultos, que mostram uma habituação da resposta ao estresse com a exposição repetida ao mesmo estressor, ratos adolescentes têm uma

liberação potencializada de ACTH e de glicocorticoides após exposição repetida ao estresse, sugerindo uma dificuldade para se adaptar ao estressor (Girotti, Pace et al. 2006). Estudos em humanos também sugerem que a adolescência está associada ao aumento da atividade basal induzida por estresse no eixo HPA (Gunnar, Wewerka et al. 2009).

Há indícios de que o cérebro humano adolescente pode ser especialmente sensível aos efeitos de níveis elevados de glicocorticoides e, por extensão, ao estresse (Lupien, McEwen et al. 2009). Estudos mostram que os níveis de mRNA de GR no CPF e hipocampo são elevados na adolescência em comparação com a vida adulta (Perlman, Webster et al. 2007). Esses dados sugerem que os processos cognitivos e emocionais que são regulados por essas áreas cerebrais podem ser sensíveis à regulação mediada por GR de uma maneira dependente da idade (Paus, Keshavan et al. 2008).

Estudos mostram que períodos de exposição a estressores frequentemente precedem a manifestação de transtornos psiquiátricos (Lupien, McEwen et al. 2009); e que apesar do estresse ser um fator de risco comum para o desenvolvimento de diferentes transtornos psiquiátricos, o período da vida em que se é exposto aos eventos estressores bem como o tipo de estressor influência as alterações observadas (Lupien, Juster et al. 2018). Levando isso em consideração, estudos sugerem que o estresse durante a adolescência parece ser particularmente importante para o desenvolvimento da esquizofrenia (Gomes e Grace 2018, Gomes, Zhu et al. 2019).

1.2 Estresse na adolescência como um fator de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia

A esquizofrenia é considerada um dos transtornos psiquiátricos mais incapacitantes (Maric, Jovicic et al. 2016, McCutcheon, Reis Marques et al. 2020), sendo caracterizada por sintomas positivos, negativos e cognitivos (McCutcheon, Reis Marques et al. 2020). Os sintomas positivos ou psicóticos incluem as alucinações, ideias delirantes e fragmentação do pensamento. Os sintomas negativos incluem, por exemplo, o embotamento afetivo, anedonia e isolamento social. Por fim, os sintomas cognitivos estão relacionados a déficits nos principais domínios cognitivos, como: memória de trabalho, atenção, aprendizagem verbal e memória de resolução de problemas (Kahn, Sommer et al. 2015).

No mínimo 26 milhões de pessoas vivem com esquizofrenia em todo mundo (Fleischhacker, Arango et al. 2014) e de forma importante, a esquizofrenia está associada a uma redução na expectativa de vida média de cerca de 15 anos em relação a população geral e risco de 5-10 % de morte por suicídio (Hjorthoj, Sturup et al. 2017). Os impactos econômicos, tanto diretos como indiretos, também precisam ser levados em consideração. Por exemplo, nos EUA estima-se que os custos anuais com a doença cheguem a 150 bilhões de dólares (McCutcheon, Reis Marques et al. 2020).

Em geral a esquizofrenia se manifesta no final da adolescência/início da vida adulta, e já se sabe que antes da doença se manifestar geralmente ocorre uma fase prodrômica que é caracterizada por sintomas psicóticos, negativos e cognitivos atenuados (Bosnjak Kuharic, Kekin et al. 2019). O primeiro episódio psicótico ocorre quando os sintomas atingem o limiar para um diagnóstico clínico que costuma ser o primeiro contado com os serviços de saúde especializados (Bosnjak Kuharic, Kekin et

al. 2019, McCutcheon, Reis Marques et al. 2020). A etiologia da esquizofrenia até o presente momento permanece indeterminada, mas acredita-se que surja de uma combinação de predisposição genética e exposição a fatores socioambientais adversos, como o estresse, em períodos críticos de vulnerabilidade, como a adolescência (Gomes, Zhu et al. 2019, Niehaus, Chaplin et al. 2019).

Indivíduos com psicoses relatam experiências de abuso na infância e/ou adolescência mais frequentes e mais graves do que pessoas sem condições psiquiátricas (Mauritz, Goossens et al. 2013). Além disso, crianças e adolescentes com risco aumentado para a esquizofrenia no qual entre 20-40% irão de fato desenvolver a doença (Fusar-Poli, Bonoldi et al. 2012) apresentam uma maior reatividade ao estresse (Pruessner, Iyer et al. 2011). Adicionalmente, um estudo multicêntrico do *North American Prodrome Longitudinal* Study (NAPLS), que avaliou uma amostra significativa de adolescentes com risco aumentado para esquizofrenia, demostrou que as concentrações de cortisol estavam aumentadas na saliva entre aqueles que fizeram a transição para o transtorno psicótico (Walker, Trotman et al. 2013).

Em estudos pré-clínicos, um dos modelos animais mais bem caracterizados para o estudo da esquizofrenia, o modelo da exposição pré-natal ao antimitótico acetato de metilazoximetanol (modelo MAM), parece estar associado a uma maior responsividade ao estresse durante período correspondente a adolescência (Zimmerman, Bellaire et al. 2013). O modelo MAM é baseado em alterações no neurodessenvolvimento que faz com que a prole, na idade adulta, apresente várias características de indivíduos com esquizofrenia, como comportamento tipo-ansioso, prejuízos cognitivos, perda de interneurônios que expressam a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina (PV), aumento da atividade do hipocampo ventral (HV) e do

sistema dopaminérgico na área tegmental ventral (ATV) (Modinos, Allen et al. 2015). A emergência desse fenótipo tipo-esquizofrenia no animal MAM adulto foi prevenida por estratégias com potencial para aliviar o estresse durante a adolescência, como o tratamento com o ansiolítico diazepam e o ambiente enriquecido (Du e Grace 2013, Zhu e Grace 2021).

Recentemente nosso grupo observou que a exposição de ratos normais a um protocolo de estresse envolvendo a combinação de choque nas patas e estresse de restrição durante a adolescência, entre os dias pós-natais 31 e 40, resultou, na idade adulta, em alterações similares as observadas no modelo MAM e em pacientes com esquizofrenia, como: prejuízo cognitivo, comportamento tipo-ansioso, perda de interneurônios PV no HV, aumento da atividade de neurônios piramidais no HV e um estado hiperdopaminérgico na ATV (Gomes e Grace 2017, Gomes, Zhu et al. 2020). Quando esses animais foram expostos ao mesmo protocolo de estresse na vida adulta, não houve a emergência do fenótipo tipo-esquizofrenia (Gomes, Zhu et al. 2020). Em conjunto, esses achados sugerem que o estresse na adolescência é capaz de induzir alterações de longo-prazo, podendo ser um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, na idade adulta.

Os mecanismos pelos quais os estressores produzem essas alterações fisiológicas, neuroanatomicas e comportamentais não são completamente conhecidos, mas estudos apontam que estruturas que são consideradas importantes na regulação da resposta ao estresse como: córtex pré-frontal medial (CPFm), amígdala e hipocampo são consideradas disfuncionais na esquizofrenia (Czeh, Simon et al. 2005, Goto e Grace 2006, McEwen, Nasca et al. 2016). Por exemplo, um CPFm disfuncional tem sido implicado na fisiopatologia da esquizofrenia e já pode estar presente até mesmo na fase prodrômica da doença (Phillips e Seidman 2008, Van der

Velde, Opmeer et al. 2015). Assim déficits na função do CPFm que é considerado o integrador primário de resposta ao estresse, podem estar presentes em indivíduos com risco aumentado para esquizofrenia (Abé, Petrovic et al. 2021), o que poderia limitar a capacidade dessa estrutura de integrar as repostas ao estresse e consequentemente levar a disfunção de outras estruturas implicadas na fisiopatologia da doença (Gomes, Zhu et al. 2019, Grace e Gomes 2019) .

Um estudo mostrou que lesões no CPFm, principalmente em sua porção pré-límbica, aumentou a vulnerabilidade ao estresse em ratos adolescentes (Gomes e Grace 2017), e sabe-se que essa porção do CPFm desempenha um papel regulador sobre as respostas desencadeadas pelo estresse, modulando a responsividade da amígdala basolateral ao estresse (Rosenkranz e Grace 2002, Rosenkranz, Moore et al. 2003). Sendo assim, sugere-se que uma falha no córtex pré-frontal medial pré-límbico em regular o impacto do estresse em indivíduos com risco aumentado para esquizofrenia possa contribuir para o desenvolvimento da doença (Gomes e Grace 2017); uma vez que foi demostrado que a ativação da amígdala, que ocorre durante o estresse, causa uma perda de interneurônios PV no hipocampo (Berretta, Lange et al. 2004).

Propõe-se que essa perda, por sua vez, leve à hiperatividade hipocampal e, consequentemente, a hiperatividade do sistema dopaminérgico na ATV. Essas alterações são similares às observadas na esquizofrenia (Lodge, Behrens et al. 2009). Portanto, sugere-se que uma falha na regulação da reposta ao estresse em estruturas como o CPFm, poderia, por sua vez, resultar em prejuízo na regulação de estruturas como a amígdala, desencadeando os demais eventos observados na fisiopatologia da doença (Figura 2).

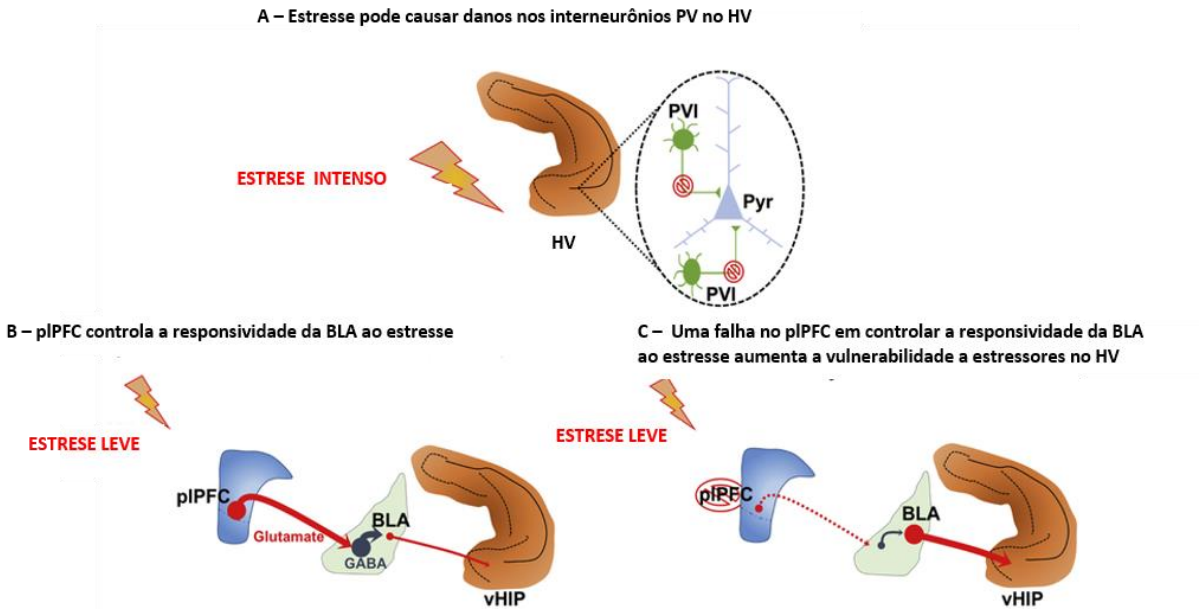

Figura 2. Mecanismos pelos quais o estresse pode levar a danos nos interneurônios PV. **A**: estresse intenso pode levar a danos nos interneurônios PV no HV; **B**; mecanismo pelo qual o plPFC controla a responsividade da BLA ao estresse; **C**; lesões no plPFC limitam a capacidade de controlar a responsividade da BLA, assim estressores moderados podem resultar em danos aos interneurônios PV; **HV** = hipocampo ventral; **PVI** = interneurônios que expressam parvalbumina; **Pry** = neurônios piramidais; **plPFC** = porção pré-límbica do CPFm; **BLA** = amígdala basolateral. **Imagem adaptada de: Gomes, Zhu, Grace, 2019**

Os danos causados aos interneurônios PV são particularmente importantes na neurobiologia da esquizofrenia, uma vez que estudos *post-mortem* indicam que esses interneurônios estão diminuídos em indivíduos com a doença (Zhang e Reynolds 2002, Konradi, Yang et al. 2011). E, a diminuição na população de interneurônios PV na esquizofrenia tem sido associada aos sintomas positivos, negativos e cognitivos (Grace e Gomes 2019).

Os mecanismos pelos quais o estresse pode causar danos aos interneurônios PV têm sido associados ao período da vida em que os indivíduos são expostos aos eventos estressores, uma vez que os interneurônios PV só estarão completamente maduros na idade adulta (Caballero, Flores-Barrera et al. 2020). Assim, em períodos anteriores a sua completa maturação (período de plasticidade), como na adolescência, os interneurônios PV estariam mais suscetíveis ao dano (Gomes, Zhu et al. 2019). Quando esse período de plasticidade não se encera de maneira

adequada, uma atividade aumentada de projeções glutamatérgicas que fazem sinapse com os interneurônios PV pode levar a um acúmulo de cálcio nesse interneurônios, aumento do estresse oxidativo e da demanda metabólica; eventos que podem resultar em morte celular (Do, Cabungcal et al. 2009, Stanika, Pivovarova et al. 2009, Volman, Behrens et al. 2011).

Essa vulnerabilidade se mantém até o fechamento do período crítico de plasticidade pela formação das redes perineuronais (PNNs, do inglês *perineuronal nets*), que são agregados de matriz extracelular, que envolvem os interneurônios PV e estabiliza as projeções glutamatérgicas que fazem sinapse com esses interneurônios para encerrar a fase plástica, mas também atua como um “escudo” protegendo os interneurônios PV de danos metabólicos e oxidativos (Do, Cabungcal et al. 2009, Grace e Gomes 2019). Essas evidências indicam que a exposição a estressores durante um período de vulnerabilidade, no qual os interneurônios PV não estão completamente maduros e protegidos pelas PNNs, pode ser suficiente para o desenvolvimento de alterações tipo-esquizofrenia.

1.3 Sistema dopaminérgico e neurobiologia da esquizofrenia

Uma atividade aumentada do sistema dopaminérgico no estriado é o achado patológico mais consistente em indivíduos com esquizofrenia (Kapur e Remington 2001, McCutcheon, Abi-Dargham et al. 2019). O sistema dopaminérgico apresenta diversas particularidades que o tornam único, como projeções para regiões cerebrais especificas envolvidas no comportamento motor, cognição e emoção (Grace 2016). Os neurônios dopaminérgicos estão localizados principalmente no mesencéfalo, e podem ser divididos em relação a sua localização, projeções e funções (Ikemoto 2007, Grace 2016). No rato, a porção medial do mesencéfalo é denominada área tegmental ventral (ATV), e consiste em: neurônios dopaminérgicos (60-65%), neurônios

GABAérgicos (35%) e uma porção relativamente pequena de neurônios glutamatérgicos (2-3%) (Baik 2020).

Os neurônios DA na parte medial e central da ATV projetam-se para o CPFm, amígdala e o núcleo accumbens *shell*, enquanto os neurônios dopaminérgicos na ATV lateral projetam-se seletivamente para o núcleo accumbens *core* e estriado associativo (Lammel, Hetzel et al. 2008, Tubert-Brohman, Sherman et al. 2013). Os neurônios dopaminérgicos apresentam três estados de atividade: um estado inativo e hiperpolarizado que é mantido por projeções GABAérgicas provenientes do pálido ventral (Floresco, West et al. 2003), um estado tônico que é caracterizado por disparos lentos e irregulares e mantido por uma atividade intrínseca de marca-passo (Grace e Bunney 1983, Grace e Bunney 1984, Sonnenschein, Gomes et al. 2020) e, por fim, um estado fásico que é controlado por projeções glutamatérgicas provenientes do tegmento pedúnculo pontino (Lodge e Grace 2006).

O estado fásico representa o sinal com relevância comportamental, sendo desencadeado por estímulos de recompensa e aversivos (Berridge e Robinson 1998). Para que o estado de atividade fásico dos neurônios dopaminérgicos na ATV ocorra por meio da ativação de projeções glutamatérgicas provenientes do tegmento pedúnculo pontino, estes precisam estar espontaneamente ativos (Sonnenschein, Gomes et al. 2020) ou seja, livre da influência inibitória proveniente do pálido ventral. No rato, em um estado de homeostasia, 50% dos neurônios dopaminérgicos estão disparando espontaneamente e o restante está sobre influência inibitória do pálido ventral (Phillips, Ahn et al. 2004, Grace e Gomes 2019). Sendo assim, embora as projeções glutamatérgicas modulem o estado de atividade fásico, são as projeções GABAérgicas do pálido ventral que controlam o número de neurônios dopaminérgicos que estarão espontaneamente ativos (Sonnenschein, Gomes et al. 2020).

O HV parece ter um papel importante sobre o número de neurônios dopaminérgicos que se encontram espontaneamente ativos, realizando esse controle através da influência sobre a atividade do pálido ventral. Projeções glutamatérgicas do HV para o núcleo accumbens ativam projeções GABAérgicas do núcleo accumbens para o pálido ventral, que por sua vez inibem o pálido ventral (Gomes e Grace, 2020) (Figura 3). Assim aumentos da atividade do HV, uma alteração observada na esquizofrenia e induzida pela exposição ao estresse durante a adolescência em ratos (Gomes, Zhu et al. 2019, Gomes, Zhu et al. 2020) resultariam na inibição de neurônios GABAérgicos do pálido ventral para o ATV e, consequentemente, no aumento do número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos (Grace, Floresco et al. 2007).

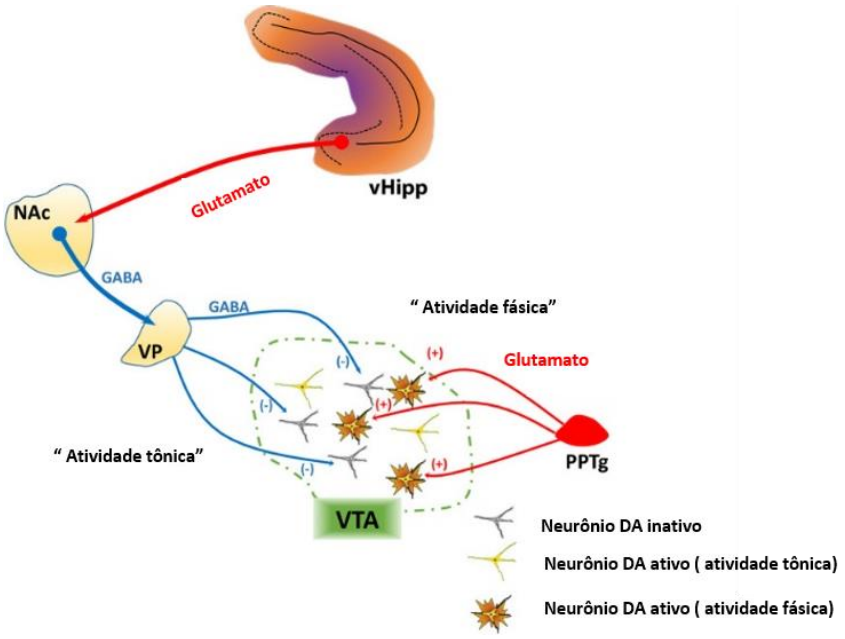

Figura 3. Regulação do sistema dopaminérgico na ATV. A atividade dos neurônios DA é regulada por sistemas aferentes distintos. Um grupo de neurônios dopaminérgicos gera sua própria atividade por meio de uma condutância de marca-passo (atividade tônica); outro grupo de neurônios dopaminérgicos não estão disparando espontaneamente, sendo mantidos em um estado hiperpolarizado por projeções inibitórias provenientes do pálido ventral (VP). O VP, por sua vez, é controlado por uma via que compreende o hipocampo ventral (vHipp) e o núcleo accumbens (NAc). O vHipp envia projeções glutamatérgicas para o NAc que, por meio de projeções GABAérgicas, inibe o VP. A atividade fásica, por sua vez, é impulsionado por projeções glutamatérgicas provenientes do tegmento pedúnculo pontino (PPTg). Este sistema aferente regula os estados de disparo dentro da população de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos, uma vez que apenas os neurônios

que estão disparando espontaneamente podem transitar da atividade tônica para fásica. **Imagem adaptada de: Sonnenschein, Gomes, Grace, 2020.**

1.4 Hiperatividade do HV na esquizofrenia: desregulação do balanço E/I

O HV é uma área que desempenha um papel importante na regulação de repostas do organismo às condições ambientais, de maneira mais especifica, é uma região que determina respostas dependentes de contexto (Maren 1999). Esse mecanismo é extremamente importante para entender principalmente os sintomas positivos da esquizofrenia. Por exemplo, um barulho em um local seguro, não resulta em ativação exacerbada do sistema dopaminérgico comparado ao mesmo barulho em uma área insegura (Grace e Gomes 2019). Em uma área insegura, a atividade do HV resulta em maior atividade dos neurônios dopaminérgicos para orientar na decisão de uma resposta apropriada.

Em indivíduos com esquizofrenia propõem-se que uma atividade aumentada do HV altere a atividade da via HV-núcleo accumbens-pálido ventral, ou seja, independe do contexto, o pálido ventral estará inibido, permitindo assim uma maior população de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos (Grace e Gomes 2019). Assim, alterações na atividade do HV podem resultar nas interpretações inadequadas de eventos que ocorrem na psicose (Kapur 2003). A origem da hiperatividade do HV na esquizofrenia tem sido associada a uma disfunção no balanço exicitatório-inibitorio (E/I) (Grace e Gomes 2019) .

O balanço E/I é determinado principalmente por neurônios piramidais glutamatérgicos e pelos interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina (PV) (Dienel, Enwright et al. 2020). Os interneurônios PV tem como principal característica o disparo em alta frequência (Lewis, Hashimoto et al. 2005) e formam uma rede celular que é capaz de sincronizar o estado excitatório dos neurônios piramidais, exercendo um controle temporal preciso sobre a informação que flui

através desses neurônios (Bartos, Vida et al. 2007). Assim, os interneurônios PV contribuem para a geração de uma atividade rítmica e sincronizada dos circuitos cerebrais, o que é importante para o processamento adequado de informações (Benes e Berretta 2001).

Já é bem documentado que pacientes com esquizofrenia apresentam uma perda funcional dos interneurônios PV no hipocampo (Zhang e Reynolds 2002), o que levaria a perda da homeostasia do balanço E/I, fazendo com que os neurônios piramidais glutamatérgicos disparem em maior frequência (Grace e Gomes 2019). No HV essa alteração resulta em hiperatividade da via HV-núcleo accumbens-pálido ventral, resultando em desregulação do sistema dopaminérgico na ATV (Grace 2016). Tem sido proposto que a hiperatividade do HV não influência apenas a ATV, mas também poderia resultar em alterações funcionais em outras estruturas como a, amígdala basolateral que regula respostas relacionadas a emoção, podendo então contribuir para os sintomas negativos, bem como o CPFm, contribuindo para os déficits cognitivos (Figura 4) (Gomes e Grace 2021) .

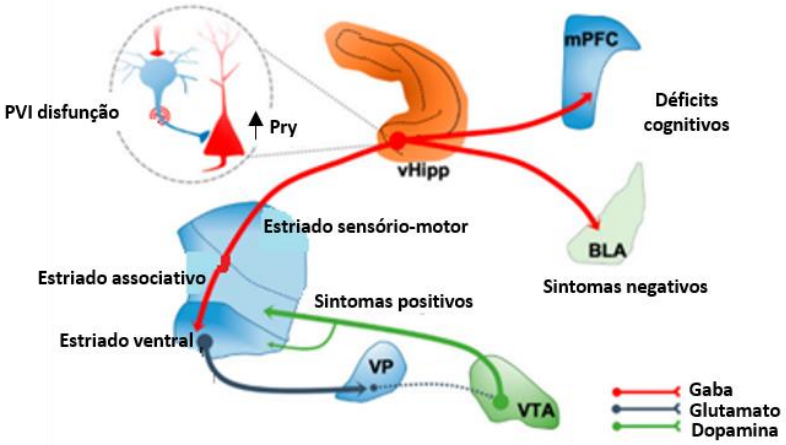

Figura 4. Disfunção de interneurônios PV no hipocampo ventral (HV) associada aos diferentes sintomas da esquizofrenia. Tem sido proposto que a perda funcional de interneurônios PV no HV e, consequentemente, a alteração no balanço E/I resulte em alterações na atividade de outras estruturas cerebrais, contribuindo para os diferentes sintomas da esquizofrenia. **vHipp** = hipocampo ventral; **VP** = pálido ventral; **VTA** = área tegmental ventral**. Imagem adaptada de: Gomes, Grace, 2021.**

Baseando-se nessas evidências e no fato de que os antipsicóticos atualmente disponíveis para o tratamento da esquizofrenia produzem seus efeitos através do antagonismo dos receptores de dopamina D2 (Kapur e Remington 2001), atuando, teoricamente, no que seria uma consequência de alterações em estruturas que regulam o sistema dopaminérgico, pode-se sugerir que um fármaco capaz de restaurar a homeostasia do balanço E/I possa ser eficaz em atenuar os sintomas positivos, negativos e prejuízos cognitivos e com baixa propensão para indução de efeitos adversos associados ao antagonismo dos receptores de dopamina D2.

1.5 Modulação do balanço E/I pelo levetiracetam

A terapia farmacológica atual para o tratamento da esquizofrenia consiste quase que exclusivamente no antagonismo dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 (Kapur e Remington 2001). Como descrito acima, as evidências indicam que a patologia não está diretamente no sistema dopaminérgico, mas sim em estruturas que regulam esse sistema como o HV. Sendo assim, a busca por novas estratégias farmacológicas que atuam, por exemplo, na desregulação do balanço E/I no HV podem ser eficazes no tratamento da esquizofrenia. Dentre essas estratégias, podemos destacar as que consigam atenuar/reverter a perda funcional dos interneurônios PV e/ou diminuir a atividade potencialmente aumentada dos neurônios glutamatérgicos (Gomes e Grace, 2021),

Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos dos levetiracetam, uma droga utilizada na clínica como anticonvulsivante, que apresenta diversos mecanismos de ação que parecem modular o balaço E/I (Katzel, Wolff et al. 2020). Um desses mecanismos consiste na modulação de um canal para potássio dependente de voltagem do tipo Kv3.1. Os canais Kv3.1 são altamente expressos em interneurônios PV e contribuem para que esses possam disparar em altas frequências, sendo

responsáveis pela repolarização rápida após o potencial de ação, facilitando assim o início de um próximo potencial de ação, aumentando por sua vez a frequência de disparo dos interneurônios PV (Boddum, Hougaard et al. 2017).

Alguns compostos experimentais que atuam como moduladores positivos dos canais Kv3.1 mostraram que esses têm capacidade de resgatar o fenótipo de disparo rápido desses interneurônios, após um comprometimento de sua função em modelos animais para o estudo da esquizofrenia baseados no antagonismo de receptores NMDA (Rosato-Siri, Zambello et al. 2015). Evidências indicam que o levetiracetam modula a atividade dos canais Kv3.1, fornecendo mecanismos para regulação do disparo desses neurônios (Huang, Tsai et al. 2009).

Adicionalmente, através da técnica de *patch clamp*, foi observado que o levetiracetam foi capaz de inibir as correntes de cálcio ativadas por alta voltagem em neurônios piramidais do hipocampo e consequentemente reduzir a atividade desses neurônios em até 30% (Niespodziany, Klitgaard et al. 2001, Lukyanetz, Shkryl et al. 2002). Além disso, outros trabalhos mostram que administração aguda de levetiracetam é capaz de facilitar a neurotransmisão inibitória mediada por GABA (Wakita, Kotani et al. 2014). Ambos mecanismos que podem influenciar diretamente o balaço E/I.

Os mecanismos citados acima indicam o potencial do levetiracetam em modular componentes envolvidos na regulação do balaço E/I. Entretanto, a ligação do levetiracetam a glicoproteína da vesícula sináptica SV2A é tida como o principal mecanismo pelo qual essa droga produz os efeitos anticonvulsivantes (Yang e Rothman 2009). As proteínas SV2 existem como três subtipos separados (SV2A, SV2B e SV2C) e são parte integrante das membranas de vesículas secretoras

localizadas em diferentes órgãos secretores de mamíferos, sendo o subtipo SV2A com maior expressão no cérebro (Robinson, Chen et al. 2013).

Ainda não se sabe exatamente qual é a função da SV2A visto que ela não é necessária para exocitose ou endocitose, mas é essencial para manter a neurotransmisão normal dependente do potencial de ação (Nowack, Malarkey et al. 2011). Estudos mostram que animais que não expressam SV2A apresentam alterações na liberação de GABA e glutamato, e que a superexpressão dessa proteína em culturas neuronais do hipocampo reduz a amplitude de correntes excitatórias pós-sinápticas, bem como diminui a probabilidade de liberação de glutamato (Nowack, Malarkey et al. 2011).

Todos os mecanismos citados acima apresentam potencial para modular o balanço E/I de alguma forma ou consequências de sua alteração, fazendo com que o levetiracetam seja uma promissora estratégia farmacológica para o tratamento de transtornos psiquiátricos associados ao desequilíbrio do balanço E/I, como a esquizofrenia. Até o presente momento existe apenas um estudo que utilizou o levetiracetam em um modelo de esquizofrenia e os resultados encontrados foram promissores, uma vez que o tratamento agudo com levetiracetam foi capaz de reverter o aumento da resposta locomotora à anfetamina e atenuar os prejuízos cognitivos (Koh, Shao et al. 2018).

Além disso, ensaios clínicos em humanos visando investigar se o levetiracetam é capaz de atenuar a hiperatividade do hipocampo em indivíduos com esquizofrenia (NCT02647437), bem como avaliar se o levetiracetam é eficaz nas fases iniciais da psicose (NCT03129360) estão em andamento. Sendo assim, a nossa ***hipótese*** é que o tratamento com o levetiracetam na idade adulta é capaz de

atenuar/reverter as alterações comportamentais e eletrofisiológicas tipo-esquizofrenia induzidas pelo estresse na adolescência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a capacidade do levetiracetam em atenuar/reverter alterações comportamentais e eletrofisiológicas induzidas pela a exposição ao estresse na adolescência que são similares as observadas na esquizofrenia.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar se o estresse durante a adolescência induz alterações relacionadas a ansiedade nos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e claro-escuro (CE) e se a administração aguda de levetiracetam é capaz de reverter/atenuar essas alterações.
- Avaliar se o estresse durante a adolescência induz prejuízos cognitivos avaliados no teste de reconhecimento de objetos (RO) e se a administração aguda de levetiracetam é capaz de reverter/atenuar esses prejuízos.
- Avaliar se o estresse durante a adolescência induz alterações relacionadas à ativação do sistema dopaminérgico através do teste de resposta locomotora a anfetamina (RLA) e na atividade de neurônios dopaminérgicos na ATV através de eletrofisiologia *in vivo* e se a administração aguda de levetiracetam é capaz de reverter/atenuar essas alterações.
- Avaliar se o estresse durante a adolescência induz alterações relacionadas aos sintomas negativos da esquizofrenia (isolamento social) através do teste de interação social e se a administração aguda de levetiracetam é capaz de reverter/atenuar os prejuízos observados.
- Avaliar se o estresse durante a adolescência altera a atividade de neurônios piramidais e interneurônios no hipocampo ventral através de eletrofisiologia *in*

vivo e se a administração aguda de levetiracetam é capaz de reverter/atenuar essas alterações.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley. Realizamos cruzamentos para obtenção dos animais para que tivéssemos controle da idade para realização dos experimentos. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) em gaiolas micro isoladas, com água e ração *ad libitum* e sob condições laboratoriais padrões. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela CEUA/FMRP (155/2018).

3.2 Desenho experimental

O trabalho foi realizado em três blocos experimentais. Os animais de todos os blocos de acordo com os grupos experimentais foram submetidos ao protocolo de estresse do dia pós-natal (DPN) 31 ao 40. Quando os animais atingiram a idade adulta no DPN 65, no primeiro bloco experimental, foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), reconhecimento de objeto (RO) e resposta locomotora a anfetamina (RLA); trinta minutos antes de cada teste comportamental os animais de acordo com o grupo experimental receberam salina ou 10 mg/kg de levetiracetam, totalizando um total de 3 injeções de levetiracetam por animal.

No segundo bloco experimental os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: claro-escuro (CE) e interação social (IS), também receberam 30 minutos antes salina ou 10 mg/kg de levetiracetam de acordo com os grupos experimentais. Uma semana após os testes comportamentais os animais foram submetidos aos registros eletrofisiológicos da ATV, onde receberam 30 minutos antes do início do registro eletrofisiológico salina ou levetiracetam de acordo com os grupos experimentais, totalizando 3 injeções de levetiracetam por animal. No terceiro bloco

experimental os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico do HV, onde também receberam salina ou levetiracetam 30 minutos antes de iniciar o registro eletrofisiológico, totalizando 1 injeção de levetiracetam por animal (Figura 5).

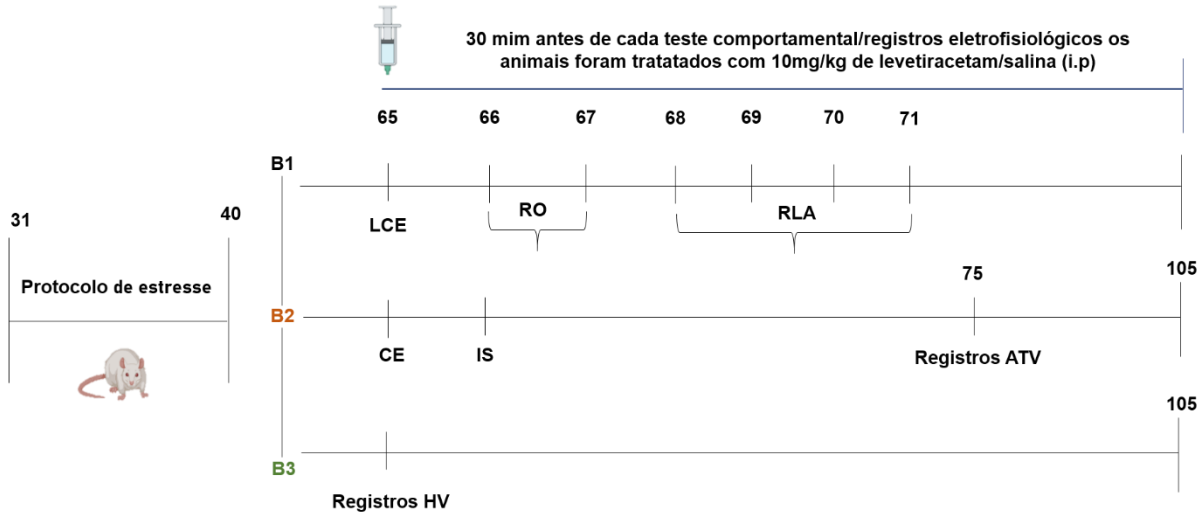

Figura 5. Desenho experimental: protocolo de estresse, testes comportamentais e registros eletrofisiológicos**.** Bloco de experimentos 1 (B1) - foram realizados: LCE = labirinto em cruz elevado; RO = reconhecimento de objeto RLA = reposta locomotora a anfetamina; Bloco de experimentos 2 (B2) - foram realizados: CE = teste claro-escuro; IS = interação social e registros eletrofisiológicos da ATV = área tegmental ventral; Bloco de experimentos 3 (B3) - foi realizado: registros eletrofisiológicos do HV = hipocampo ventral. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com*.

3.3 Protocolo de exposição ao estresse

Os animais foram expostos a uma sessão diária de choque nas patas (FS) durante 10 dias entre os dias pós-natal (DPN) 31 e 40, que corresponde ao período de adolescência em ratos (Schneider 2013). Em cada sessão, 25 choques (1 mA, 2 segundos) foram apresentados de forma randômica a cada 60±20 segundos. Além disso, os animais foram submetidos a três sessões de estresse de restrição (RS) no primeiro, segundo e último dia de exposição aos choques nas patas (Figura 6). Para a restrição, os animais foram colocados em tubo de acrílico com tamanho ajustável a idade. O estresse de restrição foi realizado imediatamente após a sessão de choque nas patas e cada sessão teve duração de 1 hora. Após o término do protocolo de exposição ao estresse os animais ficaram no biotério até atingir a idade adulta

(DPN65), quando teve início os testes comportamentais e registros eletrofisiológicos. Durante o protocolo de estresse, os animais naïve permaneceram no biotério.

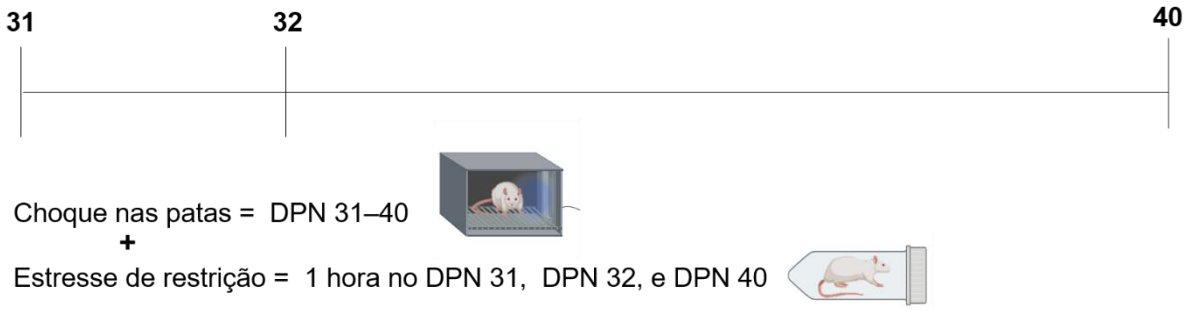

Figura 6. Protocolo experimental de estresse durante a adolescência. Combinação de choque (DPN 31-40) e estresse de restrição (DPN 31, 32 e 40). Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.4 Grupos experimentais e tratamento

Foram avaliados os seguintes grupos experimentais: grupo naïve tratado com salina; grupo naïve tratado com levetiracetam (10 mg/kg; i.p.); grupo estressado (FS+RS) tratado com salina e grupo FS+RS tratado com levetiracetam (10 mg/kg, i.p.). O levetiracetam (Sigma, EUA) foi dissolvido em salina e a dose foi baseada em trabalho prévio (Koh, Shao et al. 2018). Os animais receberam o tratamento 30 minutos antes de cada teste comportamental ou dos registros eletrofisiológicos na idade adulta.

3.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Após atingir a idade adulta os animais foram submetidos ao LCE, um teste utilizado no estudo de comportamentos relacionados a ansiedade (Kraeuter, Guest et al. 2019). O teste consiste em um labirinto elevado a 50 cm do solo, com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados. Trinta minutos antes de iniciar o LCE os animais foram tratados com levetiracetam (10 mg/kg, i.p.) ou salina. No teste, os animais foram colocados no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, e exploraram o aparato livremente por 5 minutos (Figura 7). A % de entradas

e % tempo gasto nos braços abertos (índices relacionados à ansiedade) e o número total de entradas nos braços fechados (índice de atividade locomotora) foram registrados com o auxílio do software Any-maze (Stoelting).

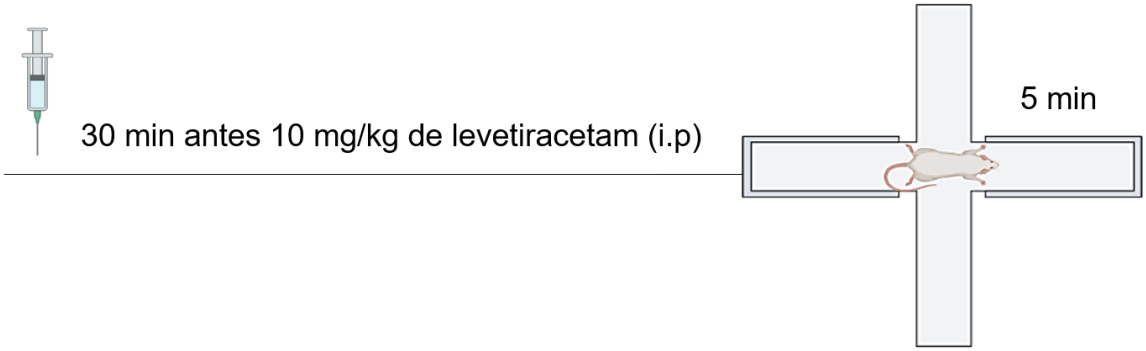

Figura 7. Protocolo experimental do teste de labirinto em cruz elevado. Realizado no bloco de experimentos 1; teste realizado no DPN 65. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.6 Reconhecimento de objeto (RO)

No dia seguinte após a realização do LCE, os animais foram submetidos ao teste de RO. Esse teste é baseado no comportamento natural dos roedores em explorar por mais tempo um objeto novo comparado a um objeto familiar quando expostos a ambos objetos ao mesmo tempo (Ennaceur, Michalikova et al. 2009). Assim, este teste é utilizado para o estudo de funções cognitivas, como memória e aprendizagem, as quais estão diminuídas em modelos animais para esquizofrenia (Kallai, Lenard et al. 2020) e em pacientes com a doença (Lewis, Hashimoto et al. 2005).

Inicialmente, cada animal foi submetido a uma sessão de habituação a arena (60 cm de diâmetro e 65 cm de altura) com duração de 15 minutos, onde foi medido a distância total percorrida e o tempo gasto na zona central (um parâmetro associado a ansiedade) (Kuniishi, Ichisaka et al. 2017). No dia seguinte, os animais foram colocados na mesma arena contendo dois objetos idênticos, onde permaneceram por

um período de 10 minutos (sessão de aquisição). Imediatamente após a sessão de aquisição foi administrado levetiracetam (10 mg/kg; i.p.) ou salina. Após um intervalo de 60 minutos, um dos objetos presentes na sessão de aquisição foi trocado por um objeto novo com tamanho, textura e cor diferentes dos objetos anteriores. Os animais foram novamente colocados na arena contendo este objeto novo e o objeto familiar por um período de 5 minutos, registrando-se o tempo de interação com cada objeto (sessão de retenção).

Todos os objetos tinham aproximadamente 16 cm de altura e peso suficiente para que não fossem deslocados pelos animais durante o experimento. Os parâmetros analisados foram: tempo de exploração dos objetos e o índice de discriminação (ID % = TN – TF/TN + TF x 100), onde TN corresponde ao tempo de exploração do objeto novo e TF ao tempo de exploração do objeto familiar.

Figura 8. Protocolo experimental do teste de reconhecimento de objeto. Realizado no bloco de experimentos 1; habituação; realizada no DPN 66 não houve tratamento nesse dia; Teste RO; realizado no DPN 67, tratamento realizado imediatamente após a sessão de aquisição. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.7 Resposta locomotora à anfetamina (RLA)

No dia seguinte após a realização do RO nós iniciamos a avaliação da RLA. Devido ao tempo total de avaliação e por temos uma única arena, foram necessários 4 dias para que todos os animais fossem testados. A administração sistêmica aguda de anfetamina aumenta a atividade locomotora (Koh, Shao et al. 2018) e sabe-se que

uma responsividade locomotora à anfetamina tem sido observada em modelos animas para esquizofrenia (Zhu e Grace 2021). O teste foi realizado em uma arena circular de acrílico (60 cm de diâmetro e 65 cm de altura).

Os animais foram colocados na arena e a atividade locomotora basal foi medida por 20 minutos. Em seguida, os animais receberam levetiracetam (10 mg/kg; i.p.) ou salina e foram colocados na arena, onde permaneceram por mais 30 minutos. Posteriormente, os animais receberam uma injeção i.p. de anfetamina (1,5 mg/kg) e foram colocados na arena. A atividade locomotora foi avaliada por mais 50 minutos. A distância total percorrida pelo animal foi registrada com o auxílio do software Any-maze.

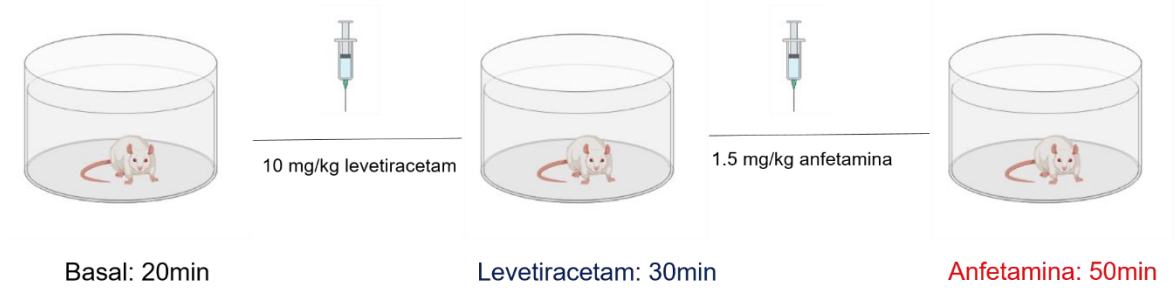

Figura 9. Protocolo experimental do teste de resposta locomotora a anfetamina. Realizado no bloco de experimentos 1; o teste foi realizado com animais com DPN 68-71; foram realizados por dia de 4/5 animais de modo que todos os dias se tinha animais dos quatros grupos experimentais. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.8 Teste claro-escuro (CE)

O teste CE, realizado no segundo bloco de experimentos, consiste em uma caixa de acrílico contendo dois compartimentos, um escuro e um iluminado, interligados por uma abertura divisória. Esse teste é utilizado para avaliar comportamentos relacionados a ansiedade, uma vez que o ambiente iluminado é considerado uma zona aversiva para o animal (Bourin e Hascoet 2003). Trinta minutos antes do teste os animais receberam levetiracetam (10 mg/kg) ou salina. O animal foi colocado no lado iluminado da caixa com a cabeça voltada para divisória e seu comportamento foi analisado por 10 minutos.

Figura 10. Protocolo experimental do teste claro-escuro. Realizado no bloco de experimentos 2; o teste foi realizado no DPN 65. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.9 Interação social (IS)

O teste de IS é utilizado por exemplo, para o estudo dos sintomas negativos (isolamento social) da esquizofrenia (Wilson e Koenig 2014). O teste foi realizado em uma arena circular de acrílico (60 cm de diâmetro e 65 cm de altura), um dia após o teste claro-escuro. Trinta minutos antes do teste os animais foram tratados com levetiracetam (10 mg/kg) ou salina. Cada animal foi colocado na arena por 5 minutos para habituação. Imediatamente após a habituação, outro animal da mesma espécie, sexo e idade foi colocado na arena por 10 minutos. O tempo de interação social foi registrado (definido como o tempo gasto cheirando, seguindo, limpando, escalando um ao outro).

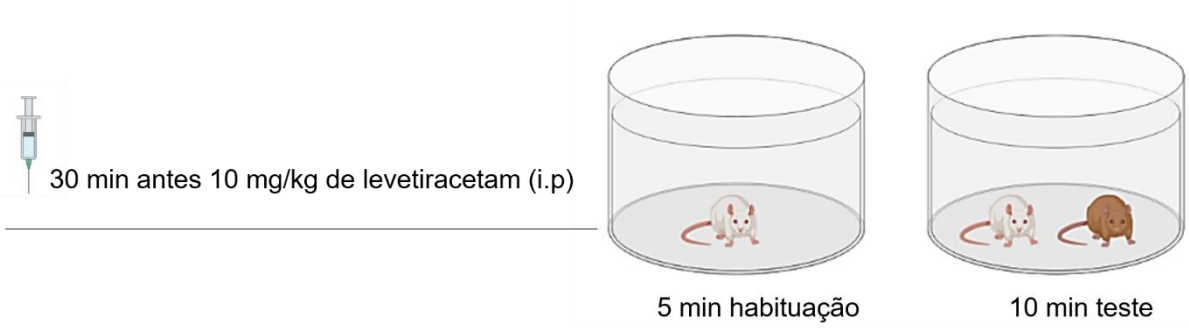

Figura 11. Protocolo experimental do teste interação social. Realizado no bloco de experimentos 2, realizado no DPN 66. Fonte: autor; imagens feitas utilizando o site *biorender.com.*

3.10 Eletrofisiologia *in vivo* de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV)

Os registros eletrofisiológicos foram realizados uma semana após o teste de interação social. Os animais foram anestesiados com uma dose inicial de hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) e suplementados intraperitonealmente para a manutenção da anestesia. Os animais foram colocados em um estereotáxico e a temperatura corporal foi mantida em 37 ºC. Foi realizada a craniotomia, as coordenadas da ATV foram: 5,5 mm posterior ao bregma, 0,6 mm lateral a linha media e 6,5-9 mm ventral à superfície do cérebro.

Os registros extracelulares foram realizados utilizando eletrodos de vidro que foram feitos a uma temperatura de 67,5° C em um *electrode puller* (Narishigue P-22, Japão). Os eletrodos foram preenchidos com uma solução de Chicago Sky Blue a 2% em NaCl 2M e abaixados através de 6 a 9 "*tracks*" verticais em um padrão pré-determinado dentro da ATV de cada rato para permitir a comparação entre os neurônios dopaminérgicos localizados nas sub-regiões medial, central e lateral da ATV. Trinta minutos antes do início do registro, os animais receberam levetiracetam (10 mg/kg) ou salina. Os dados foram adquiridos por meio de pré-amplificador (AC 1800, AM-Systems, EUA) com filtro aberto (*high pass*=10Hz; *low pass*=10kHz) e do sistema de aquisição PowerLab 8/35 com o uso do software LabChart Pro (ADInstruments, Nova Zelândia).

Os neurônios dopaminérgicos foram identificados de acordo com características eletrofisiológicas descritas na literatura, como: a duração do potencial de ação, com a duração do início da fase positiva até o pico da fase negativa maior do que 1,1 milissegundos e duração total do potencial de ação maior do que 2,2 milissegundos. Além disso, normalmente os neurônios dopaminérgicos apresentam

um “nó” na fase ascendente e uma fase negativa proeminente e tem frequência de disparo menor do que 10 Hz (Ungless e Grace 2012).

Três parâmetros foram avaliados: atividade populacional, isto é, o número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos; frequência de disparo e a porcentagem de disparos em “*burst*” (dois potenciais de ação ocorrendo em um intervalo de 80-160 milissegundos). A frequência de disparo e a porcentagem de disparos em “*burst*” foi analisada com o auxílio do software Neuroexplorer 5.1 (Nex Technologies, EUA). Cada neurônio dopaminérgico identificado foi registrado por 1-3 minutos. Ao fim do experimento, o sítio de registro foi marcado por injeção iontoforética (corrente contínua constante de 20 µA, 20 minutos) do corante Chicago Sky Blue para posterior confirmação histológica.

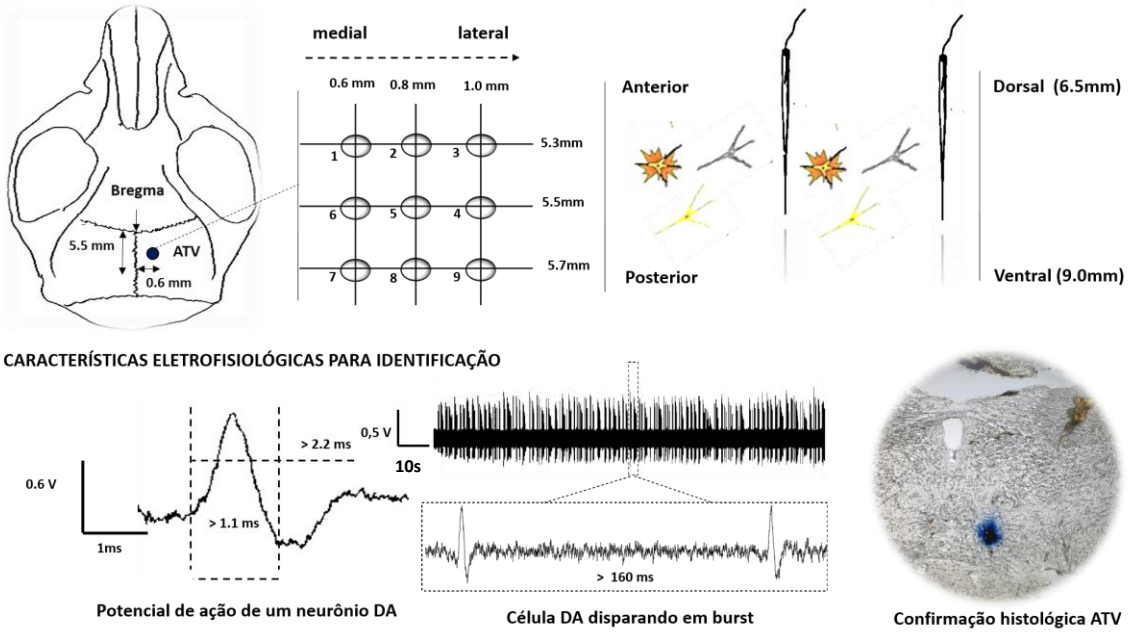

Figura 12. Protocolo experimental de registros eletrofisiológicos da ATV e características eletrofisiológicas de neurônios dopaminérgicos. Realizado no bloco de experimentos 2.; a partir do DPN 69. Fonte: autor, imagens feitas utilizado o site *biorender.com.*

3.11 Eletrofisiologia *in vivo* de neurônios glutamatérgicos piramidais do HV

Em um terceiro bloco de experimentos, os animais foram anestesiados com uma dose inicial de hidrato de cloral (400 mg/kg; i.p.) e foram suplementados intraperitonealmente para manutenção da anestesia. Trinta minutos antes do início do registro os animais receberam 10 mg/kg de levetiracetam ou salina de acordo com cada grupo experimental. Os animais foram colocados em um estereotáxico e a temperatura corporal foi mantida em 37 ºC. Foi realizada a craniotomia, as coordenadas do hipocampo foram 5,8 mm posterior ao bregma e 4,8 mm lateral a linha media e 6.0-8.5 mm da superfície ventral do cérebro. Os registros extracelulares foram realizados utilizando eletrodos de vidro preenchidos com uma solução de Chicago Sky Blue a 2% em NaCl 2M. Foi utilizado o mesmo sistema de aquisição e análise de dados descrito no registro de neurônios dopaminérgicos na ATV.

Os eletrodos foram abaixados por 6 "*tracks*" dentro do HV, e os neurônios piramidais foram identificados por características eletrofisiológicas típicas como: frequência de disparo (média até 2 Hz) e formato do potencial de ação (*half-width* > 0,4 milissegundos). Foi medido a frequência de disparo desses neurônios e o número de neurônios por *track*. Cada neurônio piramidal identificado foi registrado por 1-3 minutos. Além dos neurônios piramidais também foi avaliado os interneurônios encontrados que foram identificados pelo formato do potencial de ação. Ao fim do experimento, o sítio de registro foi marcado por injeção com o corante Chicago Sky Blue que preenche o eletrodo (corrente contínua constante de 20 µA, 20 minutos) para posterior confirmação histológica.

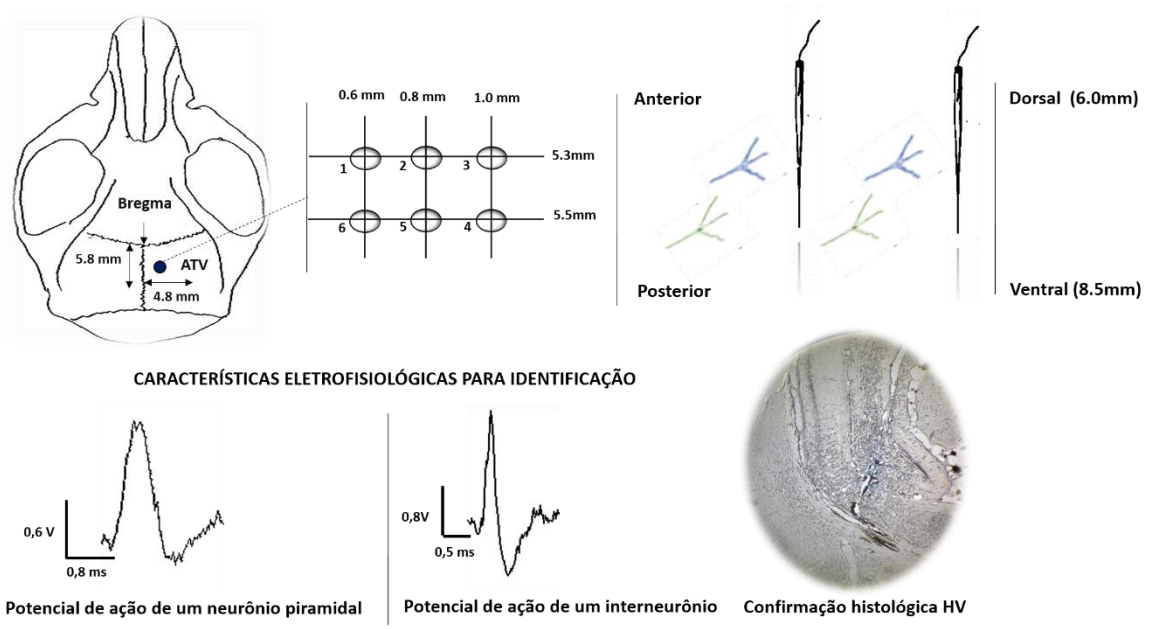

Figura 13. Protocolo experimental de registros eletrofisiológicos do HV e características eletrofisiológicas de neurônios piramidais e interneurônios. Realizado no bloco de experimentos 3. Fonte: autor

3.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± o erro padrão da média (EPM). Os resultados foram submetidos a testes para verificar a homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e se os dados seguiam distribuição normal (teste de Shapiro Wilk) de modo que os que atenderam esses parâmetros foram submetidos a análises paramétricas (ANOVA de 2 ou 3 vias ou teste t de *Student*) e os que não atenderam foram submetidos a análises não-paramétricas (Kruskal-Wallis). Os dados obtidos no teste de LCE para os parâmetros de: % de entradas e % de tempo nos braços abertos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Já o número de entradas nos braços fechados no LCE assim como os dados obtidos no teste de RO (índice de discriminação, distância percorrida e tempo na zona central), CE e IS foram analisados através do teste ANOVA de duas vias (fatores condição: naïve ou FS+RS; tratamento: salina ou levetiracetam), seguido do pós-teste de Tukey.

Para avaliação do tempo de exploração dos objetos foi utilizado o teste t de *Student* durante a sessão de aquisição (objeto na direita ou esquerda da arena) e retenção (objeto novo e familiar) para cada grupo. A RLA foi avaliada pela ANOVA de três vias (fatores condição: naïve ou FS+RS; tratamento: salina ou levetiracetam; tempo como medida repetida). Também foi realizado ANOVA de duas vias com o grupo (naïve ou FS+RS + salina ou levetiracetam) como fator independente e o tempo como medida repetida, seguido do pós-teste de Tukey.

Os resultados dos registros eletrofisiológicos de neurônios dopaminérgicos: células por *track*, frequência de disparo e % de disparos em *burst* foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias (fatores condição: naïve ou FS+RS; tratamento: salina ou levetiracetam), seguido do pós-teste de Tukey. Já os resultados do número de neurônios dopaminérgicos ativos por *track*, frequência de disparo e % de disparos em *burst* nas sub-regiões da ATV foram analisados por meio e ANOVA de três vias (fatores condição: naïve ou FS+RS; tratamento: salina ou levetiracetam; sub-região: medial, central e lateral), seguido do pós-teste de Tukey.

Os resultados dos registros eletrofisiológicos dos neurônios piramidais: células por *track* foi analisado utilizando ANOVA de duas vias (fatores condição: naïve ou FS+RS; tratamento: salina ou levetiracetam), seguido do pós-teste de Tukey. Já os resultados de frequência de disparo foram submetidos a análise não-paramétrica uma vez que não apresentaram homogeneidade das variâncias e distribuição normal; foi realizado teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As mesmas análises foram utilizadas para os dados dos registros de interneurônios. Foi adotado um nível de significância de $p<0,05$

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no LCE em animais adultos

A % de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE não seguiram a distribuição normal. Assim, esses parâmetros foram submetidos a análise não-paramétrica. O teste de Kruskal-Wallis não indicou efeito significativo para a % de entradas (H=0,69, p=0,87) e de tempo nos braços abertos (H=1,21, p=0,74).

O número de entradas nos braços fechados foi submetido a análise paramétrica uma vez que apresentou distribuição normal. A ANOVA de duas vias não indicou efeito do tratamento ($F_{1,36}$=0,19, p=0,66), mas indicou um efeito da condição (estresse) ($F_{1,36}$=47,54, p<0,0001). Não foi observada interação entre esses fatores ($F_{1,36}$=0,56, p=0,46). O pós-teste de Tukey indicou que os animais FS+RS, independente do tratamento, apresentaram uma diminuição no número de entradas nos braços fechados (p<0,05 vs. naïve-salina), indicando uma diminuição da exploração do LCE induzida pela exposição ao estresse. Resultados similares foram observados em estudos investigando o impacto da exposição a estressores sobre o comportamento de ratos no LCE (Padovan e Guimaraes 2000).

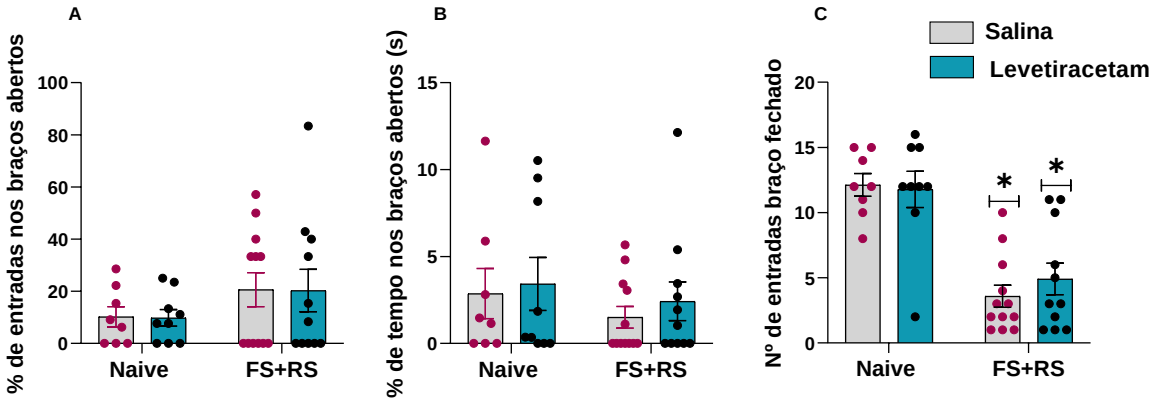

Figura 14. Efeito do estresse na adolescência (FS+RS) e da administração aguda de levetiracetam (10 mg/kg) no LCE (n=8-12/grupo). A – % de entradas nos braços abertos; **B** – % de tempo gasto nos braços abertos (segundos); **C** – Número de entradas nos braços fechados. *p<0,05

vs. naïve-salina. Dados apresentados como a média ± EPM. Kruskal-Wallis (A e B); ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey (C). Um animal do grupo FS+RS levetiracetam caiu do aparato durante o teste e, por isso, foi removido das análises.

4.2 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no RO em animais adultos

Um dia antes de realizar o RO, os animais foram submetidos a um protocolo de habituação a arena, no qual foi avaliado a distância total percorrida e o tempo de exploração da zona central da arena (índice relacionado a ansiedade). Não houve tratamento antes da habituação. Mas, como no dia anterior os animais receberam uma injeção de levetiracetam, foi realizado a ANOVA de duas vias que não evidenciou um efeito significativo do tratamento na distância total ($F_{1,37}$=0,01, p=0,95) e tempo na zona central ($F_{1,37}$=2,24, p=0,14). Contudo foi observado um efeito da condição (estresse) para a distância total ($F_{1,37}$=12,4, p=0,001) e tempo na zona central ($F_{1,37}$=10,4, p=0,002).

O pós-teste de Tukey indicou que o grupo FS+RS tratado com salina apresenta uma diminuição da distância total percorrida (p<0,05 vs. naïve-salina) e que os grupos FS+RS independente do tratamento apresentam diminuição do tempo gasto na zona central (p<0,05 vs. naïve-salina). Ambos os comportamentos analisados na sessão de habituação (diminuição da atividade locomotora e diminuição do tempo gasto na zona central) indicam que o estresse leva a comportamentos relacionados a ansiedade (Kuniishi, Ichisaka et al. 2017).

No dia seguinte, durante a sessão de aquisição do teste de RO não foi observada diferença entre o tempo de exploração entre o objeto posicionado no lado direito e o no lado esquerdo da arena para todos os grupos (naïve-salina: t_{14}=0,44, p=0,66; naïve-levetiracetam: t_{16}=1,37, p=0,19; FS+RS-salina: t_{22}=0,97, p=0,34; FS+RS-levetiracetam: t_{22}=1,48, p=0,15; Figura 15C), indicando uma ausência de

preferência espacial. Na sessão de retenção (discriminação), uma maior exploração do objeto novo foi observada nos grupos naïve-salina (t_{14}=6,23, p<0,0001); naïve-levetiracetam (t_{16}=3,57, p=0,0026) e FS-RS-levetiracetam (t_{22}=3,75, p=0,0011), mas não no grupo FS+RS-salina (t_{22}=0,12, p=0,84; Figura 15D). Esse resultado refletiu no índice de discriminação, onde a ANOVA de duas vias mostrou um efeito do estresse ($F_{1,37}$=9,27, p=0,0043) e do tratamento ($F_{1,37}$=16,56, p=0,0002), mas não houve interação entre os fatores ($F_{1,37}$=2,41, p=0,12). O pós-teste de Tukey indicou uma diminuição no índice de discriminação no grupo FS+RS-salina (p<0,05 vs. naïve-salina) indicando, portanto, um prejuízo cognitivo induzido pelo estresse na adolescência. Esse prejuízo foi revertido pelo tratamento agudo com o levetiracetam (p<0,05 vs. FS+RS-salina, pós-teste de Tukey; Figura 15E).

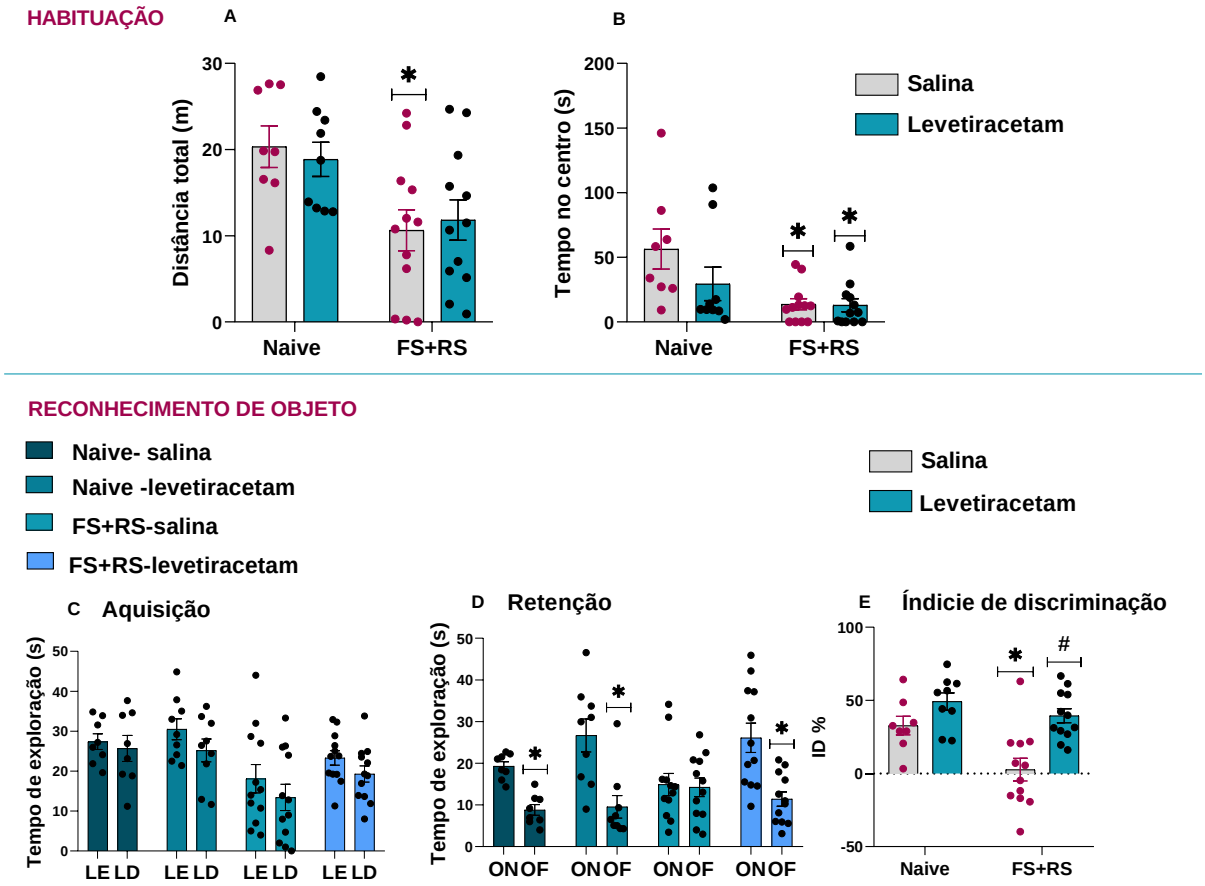

Figura 15. Efeito do estresse na adolescência (FS+RS) e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de RO (n=8-12/grupo). A – distância total e **B** – tempo na zona central durante a habituação; **C** – aquisição; **D** – retenção; **E** índice de discriminação. *p<0,05; ANOVA de duas vias (A,

B, E) seguida de pós teste de Tukey. *p<0,05, teste t de Student entre cada grupo (C, D). *p<0,05 vs. naïve-salina e #p<0,05 vs. FS+RS-salina. LD = lado direito; LE = lado esquerdo; OF = objeto familiar; ON = objeto novo.

4.2 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no teste de RLA em animais adultos

Os resultados da RLA foram apresentados em conjunto (Figura 16A) para evidenciar todas as fases do teste (basal, tratamento com levetiracetam e após anfetamina), mas as análises foram realizadas de maneira separada para cada fase. Para análise da atividade locomotora basal foi realizada ANOVA de três vias de medidas repetidas com condição e tratamento como os principais fatores independentes e o tempo como medida repetida foi realizada; ANOVA de três vias evidenciou apenas um efeito do tempo x condição x tratamento ($F_{3,105}$=3,01, p=0,03). Decidimos então realizar a ANOVA de duas vias com o grupo (naïve ou FS+RS + salina ou levetiracetam) como principal fator independente e o tempo como medida repetida, seguida de pós-teste de Tukey. Houve um efeito do tempo x grupo ($F_{35,105}$=3,43, p<0,0001). O pós-teste de Tukey indicou que houve uma diminuição da atividade locomotora no grupo FS+RS tratado com salina (Figura 16B) no tempo t5 (p<0,05 vs. naïve-salina).

Para fase de tratamento com levetiracetam foram realizadas as mesmas análises. A ANOVA de três vias evidenciou apenas um efeito da condição x tratamento ($F_{1,35}$=5,62, p=0,02); a ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito do grupo ($F_{3,35}$=2,11, p=0,11).

Para fase pós-anfetamina as mesmas análises foram realizadas; ANOVA de três vias indicou em efeito do tempo x tratamento ($F_{9,315}$=3,91, p<0,0001). ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os fatores (tempo e grupo) ($F_{27,315}$=1,16, p=0,02). O pós-teste de Tukey indicou que houve um aumento da atividade

locomotora no grupo FS+RS tratado com levetiracetam nos tempos t90 e t95 ($p<0,05$ vs. naïve-salina).

Também foi realizada a análise da distância total percorrida em cada fase do teste. A ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo da condição ou do tratamento na fase basal (condição: $F_{1,35}=0,61$, $p=0,44$; tratamento: $F_{1,35}=0,61$, $p=0,98$), após o tratamento com levetiracetam (condição: $F_{1,35}=0,14$, $p=0,71$; tratamento: $F_{1,35}=1,80$, $p=0,19$) e após a administração de anfetamina (condição: $F_{1,35}=0,73$, $p=0,40$; tratamento: $F_{1,35}=2,88$, $p=0,098$).

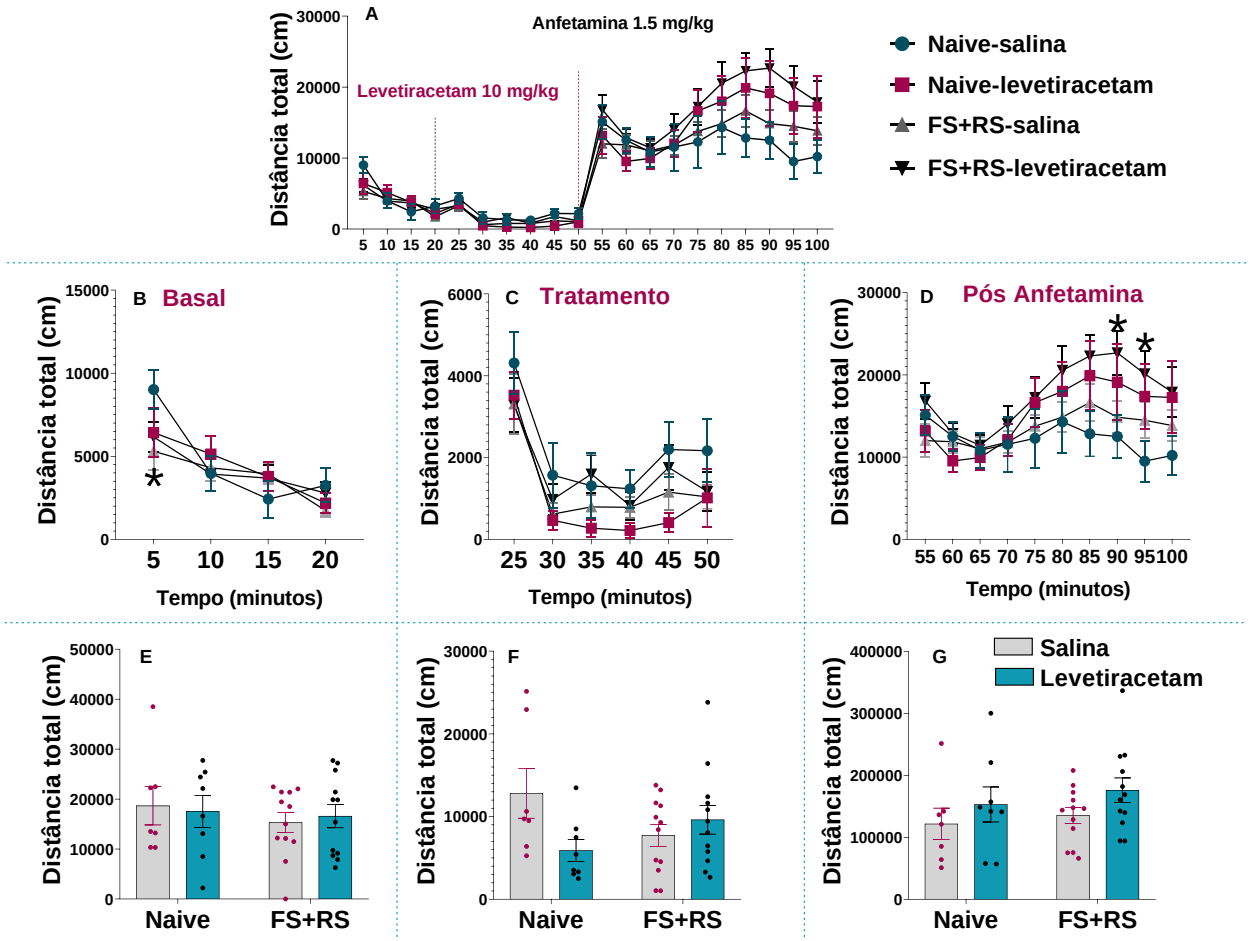

Figura 16. Efeito do estresse e do tratamento com levetiracetam (10 mg/kg) na RLA (n=7-12/grupo). *p<0,05 vs. naïve-salina). Os resultados foram apresentados como a média ± EPM. ANOVA de duas vias ou ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do pós-teste de Tukey. Um animal do grupo naïve-salina e um animal do grupo naïve-levetiracetam foram retirados das análises uma vez que foi usado uma dose de 1,0 mg/kg de anfetamina (para verificar a produção de efeito da droga); que só foi observado com a dose de 1,5 mg/kg.

4.4 Efeito do estresse na adolescência e do tratamento agudo com levetiracetam no teste CE em animais adultos.

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo da condição (estresse) nos três parâmetros analisados: tempo na zona clara ($F_{1,39}$=19,63, p<0,0001); número de entradas na zona clara ($F_{1,39}$=34,13, p<0,0001) e número total de cruzamentos ($F_{1,39}$=34,13, p<0,0001). Não houve efeito do tratamento, mas houve interação entre os fatores no tempo de permanência na zona clara ($F_{1,19}$=6,12, p=0,02). O pós-teste de Tukey indicou que o grupo FS+RS tratado com salina tem uma diminuição no número de entradas na zona clara, tempo na zona clara e número total de cruzamentos (p<0,05 vs. naïve-salina); além disso, também indicou que o levetiracetam atenua a diminuição no tempo de permanência na zona clara induzida pelo estresse na adolescência (p<0,05, FS+RS-levetiracetam vs. FS+RS-salina, pós-teste de Tukey). Os resultados obtidos indicam que o estresse na adolescência resulta em comportamento tipo-ansiogênico no teste CE, o que foi atenuado pelo tratamento com levetiracetam (Figura 17).

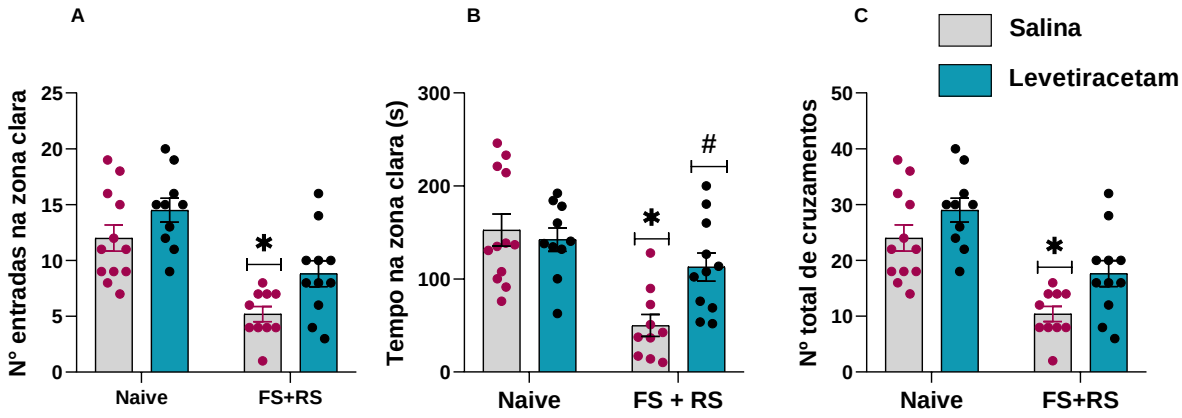

Figura 17. Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de claro-escuro (n=10-12/grupo). **A** – número total de cruzamentos; **B** – número de entradas na zona clara; **C** – tempo na zona clara (s). *p<0,05 vs. naïve-salina e #p<0,05 vs. FS+RS-salina. Os resultados foram apresentados como a média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey.

4.5 Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam no teste de IS em animais adultos.

Os animais foram colocados individualmente na arena por 5 minutos e foi medido a distância total percorrida e o tempo na zona central. Semelhante ao que foi observado no RO, ANOVA de duas vias indicou um efeito do estresse ($F_{1,38}$=72,29, p<0,0001) na distância percorrida, mas sem efeito do tratamento ($F_{1,38}$=1,46, p=0,23) e interação entre os fatores ($F_{1,38}$=0,14, p=0,70). O pós-teste de Tukey indicou que os grupos FS+RS, independente do tratamento, apresentam uma diminuição da atividade locomotora (p<0,05 vs. naïve-salina, Figura 18A).

A ANOVA de duas vias também evidenciou um efeito do estresse para o tempo gasto na zona central ($F_{1,38}$=45,87, p<0,0001), sem efeito do tratamento ($F_{1,38}$=0,57, p=0,45) e interação entre os fatores ($F_{1,38}$=0,09, p=0,76). O pós-teste de Tukey indicou que os grupos FS+RS, independente do tratamento, tem uma diminuição do tempo gasto na zona central (p<0,05 vs. naïve-salina, Figura 18B). Esses resultados são similares aos observados durante a sessão de habituação do teste de RO. Entretanto, para a habituação a arena no teste de interação social os animais foram tratados 30 min antes, diferentemente do RO, na qual os animais não receberam tratamento imediatamente antes da habituação.

Para avaliar a sociabilidade, após a sessão de habituação outro animal foi colocado na arena e foi avaliado o tempo de interação social. A ANOVA de duas vias indicou um efeito do estresse ($F_{1,38}$=5,60, p=0,02), do tratamento ($F_{1,38}$=4,70, p=0,04) e interação entre estresse e tratamento ($F_{1,38}$=33,30, p<0,0001). O pós-teste de Tukey indicou que o grupo FS+RS apresentou uma diminuição no tempo de interação social (p<0,05 vs. naïve-salina), um efeito que foi revertido pelo tratamento com levetiracetam (p<0,05 vs. FS+RS-salina; Figura 18C).

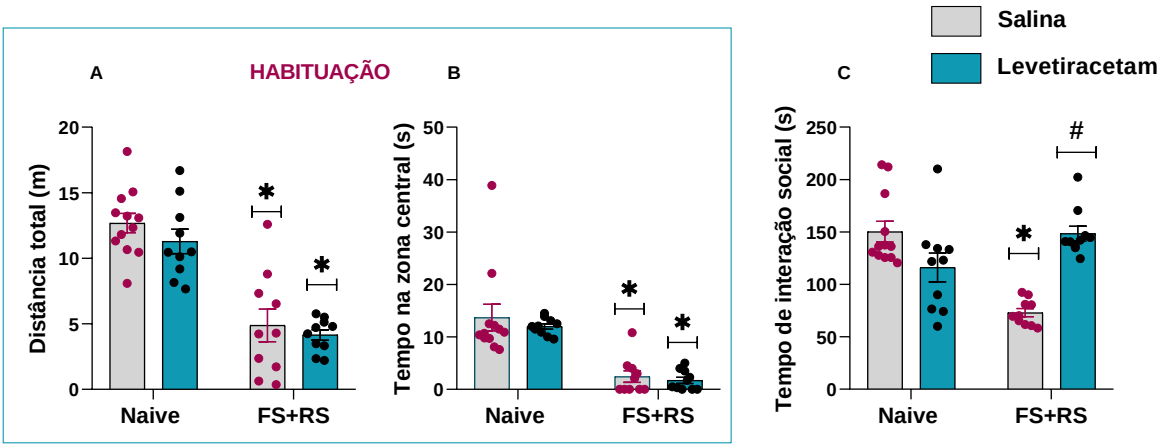

Figura 18. Efeito do estresse e do tratamento com levetiracetam (10 mg/kg) no teste de IS (n=10-12/grupo). A – distância total; **B** – tempo na zona central durante a habituação; **C**. tempo de interação social *p<0,05 vs. naïve-salina e #p<0,05 vs. FS+RS-salina. Os resultados foram apresentados em média ± EPM. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. Um animal do grupo FS+RS tratado com levetiracetam foi retirado da análise devido a quedas de energia no momento da realização do teste.

4.6 Registros de eletrofisiologia *in vivo* de neurônios dopaminérgicos na ATV

Em relação ao número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do estresse ($F_{1,18}$=6,07, p=0,02), do tratamento ($F_{1,18}$=6,85, p=0,02) e uma interação entre os fatores ($F_{1,18}$=6,75, p=0,02). O pós-teste de Tukey indicou que o grupo FS+RS apresentou um aumento no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos (p<0,05 vs. naïve-salina), sugerindo a presença de um estado hiperdopaminérgico. Essa alteração foi revertida pelo tratamento com levetiracetam (p<0,05 vs. FS+RS-salina; Figura 19A). Nenhum efeito significativo foi observado na frequência de disparos e na % de disparos em *burst* (Figura 19A-C).

Uma análise do número de neurônios dopaminérgicos por sub-região da ATV (medial, central e lateral) também foi realizada. A ANOVA de três vias indicou um efeito da condição ($F_{1,16}$=4,64, p=0,046), da região x condição ($F_{2,32}$=3,74, p=0,035) e da condição x tratamento ($F_{1,16}$=7,26, p=0,016), que foi evidenciado pelo aumento no

número de neurônios dopaminérgicos na região lateral no grupo FS+RS tratado com salina (p<0,05 vs. naïve–salina; pós-teste de Tukey; Figura 19D). Nenhum efeito significativo foi observado na frequência de disparos e na % de disparos em *burst* nas diferentes sub-regiões da ATV (Figura 19 E-F).

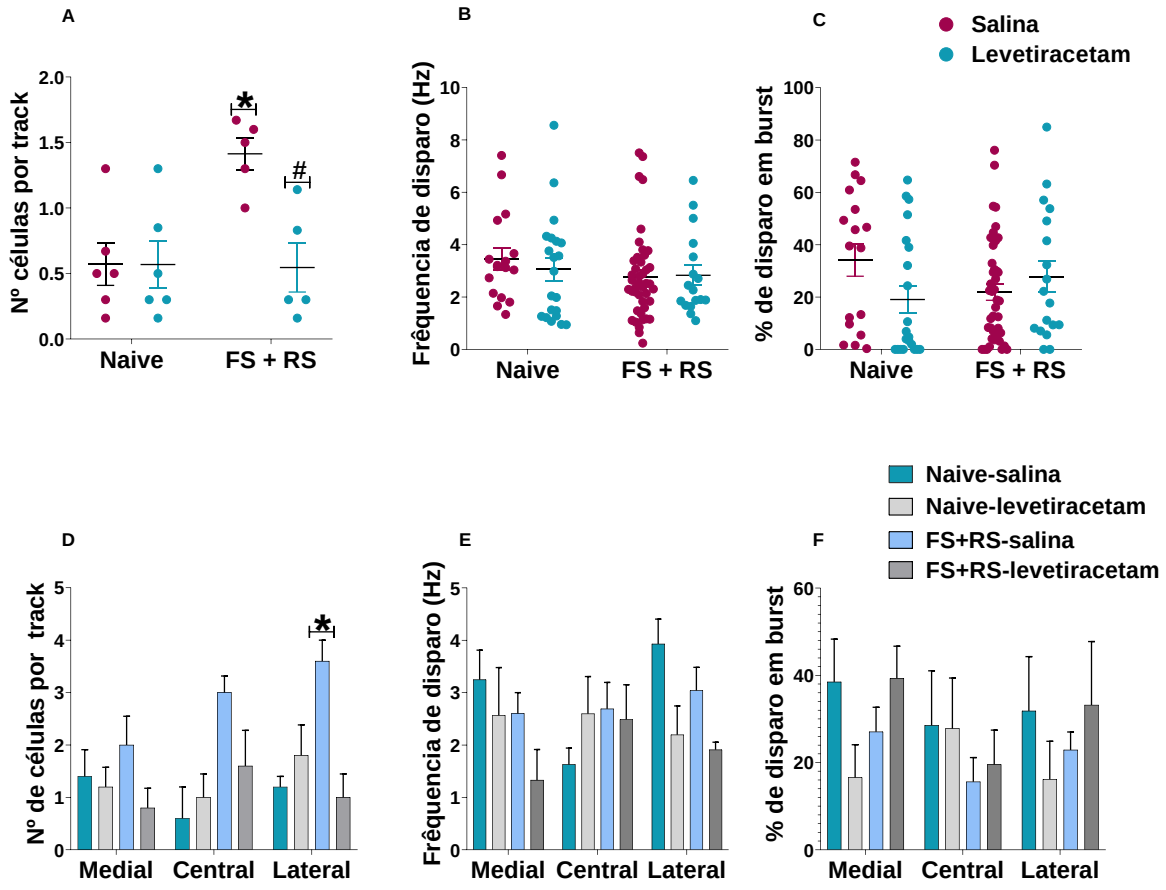

Figura 19: Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) na eletrofisiologia de neurônios dopaminérgicos na ATV (n= 5-6/grupo). **A** – número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativas por *track*; **B** – frequência de disparo; **C** – % de disparos em *burst*; (naïve-salina: 17 células); (naïve-levetiracetam: 21 células); (FS+RS- salina: 43 células); (FS+RS-levetiracetam: 18 células). **D** – número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos por *track* nas diferentes sub-regiões da ATV; **E** – frequência de disparo por sub-região da ATV; **F** – % de disparos em *burst* por sub-região da ATV. *p<0,05 vs. naïve-salina e #p<0,05 vs. FS+RS-salina; ANOVA de duas vias (A, B, C) ou de três vias (D, E, F), seguida pelo pós-teste de Tukey. O menor número de animais por grupo nas análises eletrofisiológicas do que nos testes comportamentais é devido a morte de alguns animais durante a cirurgia e também devido à realização do registro fora da ATV.

4.7 Registros de eletrofisiologia *in vivo* de neurônios piramidais no HV

A ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo para o número de células por *track*, tanto em relação a condição (estresse) ($F_{1,20}$ =1,87, p=0,18) bem como em relação ao tratamento ($F_{1,20}$=0,32, p=0,57). Os dados de frequência de disparo foram submetidos a análise não-paramétrica uma vez que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias. O teste de Kruskal-Wallis indicou um efeito significativo para frequência de disparo (H=10,19, p=0,01), o pós-teste de Dunn indicou que os animais FS+RS tratados com salina apresentaram um aumento na frequência de disparo (p<0,05 vs. naïve-salina), uma alteração revertida pelo tratamento com levetiracetam.

As mesmas análises foram realizadas para os interneurônios encontrados. ANOVA de duas vias não indicou nenhum efeito significativo no número de células por *track* tanto em relação a condição (estresse) ($F_{1,20}$ =2,24, p=0,14) bem como para o tratamento ($F_{1,20}$=0,35, p=0,42). O teste de Kruskal-Wallis indicou um efeito significativo para frequência de disparo (H=9,99, p=0,018). Houve uma diminuição, não estatisticamente significativa, na frequência de disparo de interneurônios no HV de animais submetidos ao estresse na adolescência tratados com salina quando comparado aos animais do grupo naïve-salina. Mas, a frequência de disparo de interneurônios no HV de animais submetidos ao estresse na adolescência tratados com levetiracetam foi significativamente maior comparada a dos animais estressados que receberam salina (p<0,05, FS+RS levetiracetam vs. FS+RS salina; pós-teste de Dunn).

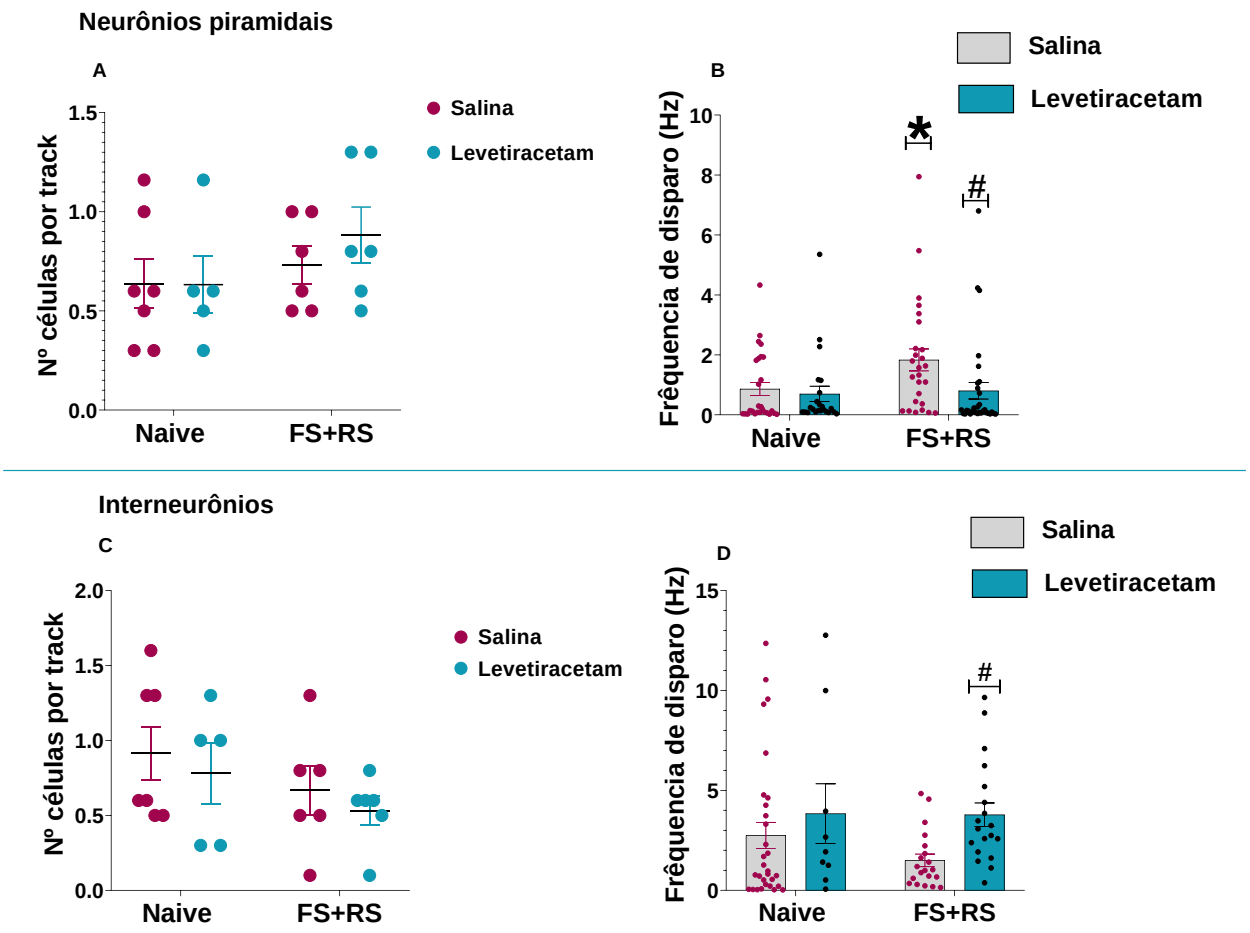

Figura 20. Efeito do estresse e do tratamento agudo com levetiracetam (10 mg/kg) na eletrofisiologia de neurônios piramidais no HV (n=5-7/grupo - naïve-salina: 27 células piramidais e 30 interneurônios; naïve-levetiracetam: 23 células piramidais e 9 interneurônios; FS+RS-salina: 26 células piramidais e 20 interneurônios; FS+RS-levetiracetam: 31 células piramidais e 19 interneurônios). **A** – Número de neurônios piramidais por *track*; **B** – frequência de disparo dos neurônios piramidais; **C** – número de interneurônios por track; **D**- frequência de disparo dos interneurônios; *p<0,05 vs. naïve-salina e #p<0,05 vs. FS+RS-salina. Dados apresentado em média ± EPM. ANOVA de duas vias (A e C); Kruskal-Wallis (B e D).

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados indicam que a exposição ao estresse durante a adolescência induziu alterações similares as observadas na esquizofrenia na idade adulta, como: comportamentos tipo-ansiedade, prejuízos na interação social e na função cognitiva, além de induzir hiperatividade no HV caracterizado pelo aumento da frequência de disparo dos neurônios piramidais e um estado hiperdopaminérgico caracterizado por um aumento no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV.

O tratamento agudo com levetiracetam 30 minutos antes dos testes comportamentais e dos registros eletrofisiológicos foi capaz de atenuar as alterações comportamentais induzidas pelo estresse na adolescência, com exceção das alterações no LCE. O tratamento com levetiracetam também atenuou a hiperatividade do HV e o aumento na população de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV induzidos pelo estresse na adolescência. Contrário ao observado anteriormente por Gomes e Grace (2017), o estresse na adolescência não aumentou a resposta locomotora à anfetamina. Entretanto, nós observamos um aumento da resposta locomotora à anfetamina em animais estressados que foram tratados com levetiracetam.

Apesar dos sintomas que mais comumente caracterizam a esquizofrenia sejam os psicóticos, sabe-se que cerca de 65% dos pacientes são geralmente mais ansiosos e que essa condição produz uma piora do prognóstico (Braga, Reynolds et al. 2013, Temmingh e Stein 2015). O teste de LCE e o teste de CE são utilizados para avaliação de repostas relacionadas a ansiedade (Bourin e Hascoet 2003, Braga, Reynolds et al. 2013). Embora no LCE nós não observamos alterações na exploração dos braços abertos, que é utilizado como parâmetro relacionado a ansiedade, houve uma redução

no número de entradas nos braços fechados, um parâmetro relacionado a atividade locomotora. Assim, a ausência de alteração na exploração dos braços abertos dos animais estressado pode ter sido influenciada por uma diminuição na exploração do animal no LCE. Destaca-se que um maior nível de ansiedade pode ser refletido por uma diminuição na atividade locomotora (Rodgers e Dalvi 1997, Augustsson e Meyerson 2004). Trabalhos anteriores avaliando o impacto de estressores no comportamento de ratos no LCE também observaram um efeito de diminuição da exploração do LCE (Padovan e Guimaraes 2000). Além disso, é interessante ressaltar que os valores observados em ambos os parâmetros de exploração do braço aberto (% de entradas e % de tempo) no grupo “controle” (naïve+salina) foram baixos em relação ao que é comumente observado (20-40 %) em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Padovan e Guimarães 2000, Campos e Guimarães 2008, Andrade e Guimarães 2003). O levetiracetam não foi capaz de atenuar os efeitos do estresse na exploração do LCE.

No teste do CE, nós observamos que o estresse na adolescência induziu comportamento tipo-ansiedade indicado pela diminuição no tempo gasto no compartimento claro, bem como uma diminuição no número de entradas na zona clara. O tratamento com levetiracetam atenuou o comportamento tipo-ansiedade no CE, aumentando o tempo de permanência dos animais estressados na zona clara. Além disso, foi observado uma diminuição no número total de cruzamentos nos animais estressados tratados com salina, reforçando o possível efeito do estresse em diminuir a exploração do aparato como observado no LCE.

Adicionalmente, os animais estressados passaram menos tempo explorando o centro da arena durante a sessão de habituação do teste de RO e no teste de IS, bem como apresentaram uma diminuição da distância total percorrida, ambas alterações

comumente associadas a um comportamento do tipo-ansiogênico (Augustsson e Meyerson 2004, Kuniishi, Ichisaka et al. 2017). Em conjunto, nossos achados em relação a prejuízos relacionados a ansiedade indicam que o estresse na adolescência resulta em comportamentos tipo-ansiogênico, e que o levetiracetam foi capaz de atenuar esses comportamentos. De fato, estudos em humanos sugerem que o levetiracetam é eficaz no tratamento de transtornos de ansiedade (Kinrys, Worthington et al. 2007).

Na esquizofrenia os déficits cognitivos podem estar presentes antes da emergência do primeiro episódio psicótico (Brewer, Wood et al. 2006) e persistem durante todo o curso da doença (Chua e Murray 1996). Esse grupo de sintomas é resistente ao tratamento com os antipsicóticos atualmente disponíveis, o que indica para a necessidade de novas estratégicas farmacológicas que sejam eficazes no alivio desses sintomas. Sabe-se que memória pode ser dividida em duas categorias distintas: formas declarativas e não declarativas. A memória declarativa, ou memória explícita, é caracterizada pela capacidade de recordar histórias pessoais, fatos e eventos e depende das estruturas interconectadas do lobo temporal medial (Opitz 2014).

O reconhecimento é um subtipo de memória declarativa, sendo assim o teste de RO é análogo em alguns aspectos à memória declarativa em humanos, um dos sete domínios cognitivos que são anormais na esquizofrenia (Rajagopal, Massey et al. 2014). Similar ao observado anteriormente pelo nosso grupo (Gomes e Grace 2017), o estresse na adolescência induziu prejuízo cognitivo no teste de RO na idade adulta. Essa alteração foi revertida pelo tratamento com levetiracetam. Esses achados estão em concordância com resultados que indicam que o levetiracetam foi capaz de

reverter prejuízos cognitivos em um modelo animal de esquizofrenia baseado na hipofunção dos receptores NMDA (Koh, Shao et al. 2018).

Outro grupo de sintomas resistente ao tratamento com antipsicóticos é o dos sintomas negativos, o que afeta significativamente qualidade de vida dos pacientes. Os resultados obtidos indicam que além de alterações em comportamento tipo-ansiedade e prejuízos na função cognitiva como já havíamos demonstrado (Gomes e Grace 2017), o estresse na adolescência também resultou em diminuição na interação social na idade adulta. O tratamento com levetiracetam também foi capaz de reverter essa alteração. Esses resultados, podem abrir caminho para novas estratégias farmacológicas no tratamento dos sintomas negativos. Adicionalmente esse é o primeiro trabalho que relata um efeito do levetiracetam em reverter prejuízos na interação social.

A esquizofrenia é caracterizada por um estado hiperdopaminérgico, um achado também observado em modelos animais para o estudo da doença. Em humanos, o estado de atividade aumentado do sistema dopaminérgicos é refletido pela maior captação de fluorodopa estriatal medida por exames de imagem como: tomografia por emissão de pósitrons (Katzel, Wolff et al. 2020). Em animais esse estado pode ser indicado por uma resposta exacerbada a uma baixa dose de anfetamina (Pierce e Kalivas 1997), aumento dos níveis basais de dopamina em regiões do estriado e da atividade de neurônios dopaminérgicos (Grace 2016) . Por exemplo, no modelo animal de esquizofrenia MAM observa-se um aumento da atividade de neurônios dopaminérgicos na ATV e um aumento da resposta locomotora após a administração de uma baixa dose de anfetamina (Du e Grace 2013). Alteração similar foi observada pelo nosso grupo em animais adultos que foram submetidos ao estresse na adolescência (Gomes e Grace 2017).

Em relação a resposta locomotora à anfetamina, no presente estudo, nós não conseguimos reproduzir a resposta locomotora aumentada após o desafio com anfetamina em animas que foram submetidos ao estresse na adolescência. As causas para isso não são claras, mas podem estar relacionadas às diferenças nos protocolos. Por exemplo, a dose de anfetamina utilizada no presente estudo (1,5 mg/kg) foi maior que a do que a utilizada por nós anteriormente (0,5-0,75 mg/kg) e as condições de manutenção dos animais. De forma não esperada, nós observamos uma maior atividade locomotora após a administração de anfetamina em animais submetidos ao estresse na adolescência e tratados com levetiracetam. Relatos de caso na literatura reportam que o levetiracetam pode induzir sintomas psicóticos em alguns pacientes recebendo esse composto para o tratamento de epilepsia (Martins, Carvalho et al. 2020). Os mecanismos para isso ainda não são claros, mas poderia ter a exposição a estressores como fator que contribua para o aparecimento desses sintomas.

Além disso, nossos resultados diferem de estudos anteriores, que indicam que o levetiracetam foi capaz de atenuar a hiperatividade locomotora induzida por anfetamina em um modelo para esquizofrenia baseado na administração repetida de quetamina (Koh, Shao et al. 2018). Em contrapartida, evidencias indicam que o levetiracetam pode ter efeitos opostos sobre a locomoção a depender do tipo de droga que é administrada uma vez que reduz a atividade locomotora após a administração de álcool mas aumenta a locomoção induzida pela cocaína (Robinson, Chen et al. 2013).

Os dados que obtivemos nos registros eletrofisiológicos mostraram que os animais estressados apresentaram um aumento no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV, e que o tratamento agudo com levetiracetam reverteu essa alteração. Acreditamos que a aparente contradição entre

os resultados dos registros eletrofisiológicos (levetiracetam atenuando o número aumentado de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV de animais estressados) e os da RLA (levetiracetam aumentando a RLA em animais estressados) possa estar associada aos pontos citados acima bem como alterações em vias e estruturas *downstream* à ATV, como, por exemplo, alterações na expressão e/ou sensibilidade de receptores dopaminérgicos em estruturas extratais. Entretanto, estudos são necessários para investigar essa e outras possibilidades.

A hipótese de que os resultados que observamos na RLA podem estar associados com alterações em outras estruturas pode ainda ser sustentada se levarmos em consideração que o aumento no número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos foi confinado a região lateral da ATV, que se projeta para o estriado associativo (Ikemoto 2007), área que é considerada hiperativa em indivíduos com esquizofrenia e está associada com os sintomas positivos da doença (Kegeles, Dargham et al. 2010, Sonnenschein, Gomes et al. 2020). Nenhuma alteração foi observada nas regiões medial e central que se projetam para núcleo accumbens *core* e estão relacionadas com estímulos de recompensa como os induzidos pela anfetamina (Lodge e Grace 2008).

Nossos resultados também indicaram que o estresse na adolescência resultou na hiperatividade do HV, alteração que é encontrada em modelos animais para esquizofrenia e em humanos. Estudos de imagem mostram que o hipocampo anterior, que é homólogo ao HV em roedores (Heilbronner, Rodriguez-Romaguera et al. 2016), se encontra hiperativo em indivíduos com esquizofrenia (Liebermam, Girgis et al. 2018, Sonnenschein, Gomes et al. 2020). A maioria dos estudos relata níveis aumentados de glutamato no hipocampo no primeiro episódio e em pacientes crônicos, independentemente do estado de medicação (Poels, Kegeles et al. 2014), e

já se sabe que as alterações no metabolismo hipocampal e no fluxo sanguíneo estão associadas a sintomas psicóticos mais graves (Gur, Mozley et al. 1995). Nossos resultados estão em concordância com trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa que mostram que o estresse durante a adolescência resulta na hiperatividade hipocampal caracterizada pelo aumento da frequência de disparo dos neurônios piramidais Gomes, Zhu et al. 2020, Gomes e Grace 2018). Nosso trabalho mostrou que o levetiracetam é capaz de reverter essa hiperatividade de neurônios piramidais no HV induzida pelo estresse na adolescência.

Também observamos uma diminuição, que não foi estaticamente significativa, na frequência de disparo de interneurônios no HV de animais submetidos ao estresse na adolescência e os animais estressados tratados com levetiracetam apresentaram um aumento significativo na frequência de disparo dos interneurônios no HV em relação ao grupo FS+RS salina. Esses resultados podem indicar que o levetiracetam possa atenuar o possível prejuízo funcional na atividade de interneurônios induzida pelo estresse na adolescência e facilitar a neurotransmisão GABAérgica, como já foi observado em outro estudo (Wakita, Kotani et al. 2014). Isso poderia contribuir para a normalização do balanço E/I, com a normalização da atividade aumenta dos neurônios piramidais induzida pelo estresse. Além disso, já foi demonstrado que estratégias capazes de aliviar o estresse em um modelo animal para o estudo da esquizofrenia, o modelo MAM, levam a um aumento na frequência de disparo de interneurônios GABAérgicos no HV, o que foi associado com uma atenuação do fenótipo tipo-esquizofrenia (Zhu e Grace 2021).

Embora não tenhamos explorado os mecanismos pelos quais o levetiracetam produza seus efeitos, uma quantidade significativa de estudos mostra que essa droga diminui a transmissão excitatória dependente de glutamato e facilita a

neurotransmisão GABAérgica (Katzel, Wolff et al. 2020). Esses efeitos podem ser modulados pela ação do levetiracetam em diferentes alvos farmacológicos como: canais de cálcio dependentes de voltagem; glicoproteína SV2A, facilitação da neurotransmisão GABAérgica e canais Kv3.1 (Lukyanetz, Shkryl et al. 2002, Wakita, Kotani et al. 2014) Yang e Rothman 2009, Huang, Tsai et al. 2009).

Sabe-se que os canais de cálcio dependentes de voltagem são essenciais para manutenção do potencial de ação; estudos eletrofisiológicos *in vitro* mostram que a administração aguda de levetiracetam inibe esses canais em neurônios piramidais do hipocampo, resultado na diminuição da liberação de glutamato e, consequentemente, reduzindo a neurotransmisão excitatória (Lukyanetz, Shkryl et al. 2002), mecanismo que poderia contribuir para normalização da aumentada frequência de disparo dos neurônios piramidais no HV.

Além disso, como discutido acima estudos mostram que o levetiracetam facilita a neurotransmisão GABAérgica, essa ação pode ocorrer através da facilitação da neurotransmisão mediada por receptores $GABA_A$ e através da sua ação em canais de potássio Kv3.1 que são abundantes em interneurônios PV, regulando a atividade *fast-spiking* dos mesmos (Wakita, Kotani et al. 2014, Huang, Tsai et al. 2009, Boddum, Hougaard et al. 2017). Já é bem descrito na literatura a perda funcional de interneurônios PV em indivíduos com esquizofrenia e também nos modelos animais da doença (Zhang e Reynolds 2002, Konradi, Yang et al. 2011). Embora não seja possível afirmar que o levetiracetam esteja realizando seus efeitos por uma facilitação especifica da atividade de PV, os resultados por nós encontrados (normalização da frequência de disparo de neurônios piramidais e aumento da frequência de disparo de interneurônios GABAérgicos no HV em animais estressados tratados com levetiracetam em comparação ao animais estressados tratados com salina), bem

como dados presentes na literatura indicando que o levetiracetam modula a atividade de canais Kv3.1 e de que compostos que possuem atividade sob esses canais resultam no resgate do fenótipo de disparo rápido desses interneurônios (Huang, Tsai et al. 2009, Boddum, Hougaard et al. 2017), podem indicar um efeito do levetiracetam sobre a modulação da atividade desse interneurônios. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para testar essa hipótese.

Outro importante mecanismo de ação do levetiracetam é a modulação da glicoproteína SV2A. Embora não se saiba exatamente a sua função, é proposto que essa glicoproteína participe dos processos de exocitose dependente de cálcio, retenção de neurotransmissores nas vesículas sinápticas e *priming* das vesículas sinápticas, bem como no transporte dos constituintes das vesículas (Loscher, Giliard et al. 2016). Estudos eletrofisiológicos em animais nocautes para SV2A mostram que ocorre uma diminuição na neurotransmisão GABAérgica nesses animais (Crowder, Gunther et al. 1999). O local de ligação do levetiracetam na glicoproteína SV2A ainda não está elucidado, bem como o exato mecanismo de modulação de sua função. Entretanto, acredita-se que os efeitos anticonvulsivantes do levetiracetem envolvam a a modulação da SV2A e a diminuição da neurotransmisão excitatória que está aumentada na epilepsia (Sourbron, Chan et al. 2018) Portando, os efeitos do levetiracetam observados no presente trabalho também podem ser mediados pela modulação da glicoproteína SV2A.

Levando em conta dos dados descritos acima o levetiracetam poderia exercer seus efeitos através da modulação da via HV-núcleo accumbens–pálido ventral–ATV, uma vez que foi capaz de reverter o aumento da frequência de disparo no HV e diminuir o número de neurônios dopaminérgicos espontaneamente ativos na ATV. Adicionalmente, um estudo mostrou que a administração de levetiracetam reduz a

transmissão excitatória no núcleo accumbens (Robinson, Chen et al. 2013), representando mais um ponto de modulação na via proposta.

De uma forma geral, o levetiracetam tem sido apontado como uma possível estratégia farmacológica para normalização de transtornos que apresentam desregulação no balanço E/I (Katzel, Wolff et al. 2020). Nosso trabalho é um dos primeiros a mostrar que o levetiracetam consegue atenuar/reverter alterações comportamentais e eletrofisiológicas similares as observadas na esquizofrenia induzidas pelo estresse na adolescência, possivelmente através da modulação a atividade disfuncional do balanço E/I

6. CONCLUSÃO

1. O modelo de exposição a estressores durante a adolescência induziu alterações comportamentais relacionadas a ansiedade, prejuízos de interação social, prejuízos cognitivos na idade adulta, além de alterações eletrofisiológicas que resultaram na hiperatividade dos neurônios piramidais glutamatérgicos no HV bem como dos neurônios dopaminérgicos na ATV, de certa forma, similares às observadas na esquizofrenia.

2. O tratamento agudo com levetiracetam atenuou/reverteu as alterações comportamentais bem como as alterações eletrofisiológicas induzidas pelo estresse na adolescência. Sendo assim, nossos achados apoiam a continuidade da pesquisa pré-clínica e clinica sobre a utilização do levetiracetam como uma potencial droga a ser utilizada no tratamento da esquizofrenia.

7. REFERÊNCIAS

Abé, C., P. Petrovic, W. Ossler, W. H. Thompson, B. Liberg, J. Song, S. E. Bergen, C. M. Sellgren, P. Fransson, M. Ingvar e M. Leen (2021). “Genetic risk for bipolar disorder e schizophrenia predicts structure and function of the ventromedial prefrontal córtex”. J Psychiatry Neurosci **46** (44-41): 342916-284058.

Andrade, C. S., e F. S. Guimarães (2003). “Anxiolytic-Like effect of group housing on stress-induce behavior in rats”. Depression e anxiety **149** (5)**:** 150-152.

Augustsson, H. e B. J. Meyerson (2004). "Exploration e risk assessment: a comparative study of male house mice (Mus musculus musculus) e two laboratory strains." Physiol Behav **81**(4): 685-698.

Baik, J. H. (2020). "Stress e the dopaminergic reward system." Exp Mol Med **52**(12): 1879-1890.

Bartos, M., I. Vida e P. Jonas (2007). "Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks." Nat Rev Neurosci **8**(1): 45-56.

Benes, F. M. e S. Berretta (2001). "GABAergic interneurons: implications for understeing schizophrenia e bipolar disorder." Neuropsychopharmacology **25**(1): 1-27.

Berretta, S., N. Lange, S. Bhattacharyya, R. Sebro, J. Garces e F. M. Benes (2004). "Long-term effects of amygdala GABA receptor blockade on specific subpopulations of hippocampal interneurons." Hippocampus **14**(7): 876-894.

Berridge, K. C. e T. E. Robinson (1998). "What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?" Brain Res Brain Res Rev **28**(3): 309-369.

Boddum, K., C. Hougaard, J. Xiao-Ying Lin, N. L. von Schoubye, H. S. Jensen, M. Grunnet e T. Jespersen (2017). "Kv3.1/Kv3.2 channel positive modulators enable faster activating kinetics e increase firing frequency in fast-spiking GABAergic interneurons." Neuropharmacology **118**: 102-112.

Bosnjak Kuharic, D., I. Kekin, J. Hew, M. Rojnic Kuzman e L. Puljak (2019). "Interventions for prodromal stage of psychosis." Cochrane Database Syst Rev **2019**(11).

Bourin, M. e M. Hascoet (2003). "The mouse light/dark box test." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 55-65.

Braga, R. J., G. P. Reynolds e S. G. Siris (2013). "Anxiety comorbidity in schizophrenia." Psychiatry Res **210**(1): 1-7.

Brewer, W. J., S. J. Wood, L. J. Phillips, S. M. Francey, C. Pantelis, A. R. Yung, B. Cornblatt e P. D. McGorry (2006). "Generalized e specific cognitive performance in clinical high-risk cohorts: a review highlighting potential vulnerability markers for psychosis." Schizophr Bull **32**(3): 538-555.

Brzozowski, B., A. Mazur-Bialy, R. Pajdo, S. Kwiecien, J. Bilski, M. Zwolinska-Wcislo, T. Mach e T. Brzozowski (2016). "Mechanisms by which Stress Affects the Experimental e Clinical Inflammatory Bowel Disease (IBD): Role of Brain-Gut Axis." Curr Neuropharmacol **14**(8): 892-900.

Caballero, A., E. Flores-Barrera, D. R. Thomases e K. Y. Tseng (2020). "Downregulation of parvalbumin expression in the prefrontal cortex during adolescence causes enduring prefrontal disinhibition in adulthood." Neuropsychopharmacology **45**(9): 1527-1535.

Campos, A. C., F. S. Guimarães (2008). " Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats". Psychopharmacology **199** (7) 223-230.

Chua, S. E. e R. M. Murray (1996). "The neurodevelopmental theory of schizophrenia: evidence concerning structure e neuropsychology." Ann Med **28**(6): 547-555.

Crowder, K. M, J. M. Gunther, T. A. Jones, B. D. Hale, H. Z. Zhang, M. R. Peterson, R. H. Scheller, C. Chavkin e S. M. Bajjalieh (1999)."Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A) ". *PNAS* **26** (3):1568-1573.

Cruz-Pereira, J. S., K. Rea, Y. M. Nolan, O. F. O'Leary, T. G. Dinan e J. F. Cryan (2020). "Depression's Unholy Trinity: Dysregulated Stress, Immunity, e the Microbiome." Annu Rev Psychol **71**: 49-78.

Contreas-Garcia, I. J. G. Gomes-Lira, B. V. Phillips-Farfán, L. A. Pichardo-Macías, M. E. G. Cruz, J.L.C. Pacheco, J. G. M. Torreblaca (2021). "Synaptic Vesicle Protein 2A Expression in Glutamatergic Terminals Is Associated with the Response to Levetiracetam Treatment". Brain Science **11** (4): 531-546.

Czeh, B., M. Simon, M. G. van der Hart, B. Schmelting, M. B. Hesselink e E. Fuchs (2005). "Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist." Neuropsychopharmacology **30**(1): 67-79.

Dienel, S. J., J. F. Enwright, 3rd, G. D. Hoftman e D. A. Lewis (2020). "Markers of glutamate e GABA neurotransmission in the prefrontal cortex of schizophrenia subjects: Disease effects differ across anatomical levels of resolution." Schizophr Res **217**: 86-94.

Do, K. Q., J. H. Cabungcal, A. Frank, P. Steullet e M. Cuenod (2009). "Redox dysregulation, neurodevelopment, e schizophrenia." Curr Opin Neurobiol **19**(2): 220-230.

Du, Y. e A. A. Grace (2013). "Peripubertal diazepam administration prevents the emergence of dopamine system hyperresponsivity in the MAM developmental disruption model of schizophrenia." Neuropsychopharmacology **38**(10): 1881-1888.

Ennaceur, A., S. Michalikova e P. L. Chazot (2009). "Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty e to an object recognition task in an open space e an enclosed space." Behav Brain Res **197**(2): 417-434.

Fleischhacker, W. W., C. Arango, P. Arteel, T. R. Barnes, W. Carpenter, K. Duckworth, S. Galderisi, L. Halpern, M. Knapp, S. R. Marder, M. Moller, N. Sartorius e P. Woodruff (2014). "Schizophrenia--time to commit to policy change." Schizophr Bull **40 Suppl 3**: S165-194.

Floresco, S. B., A. R. West, B. Ash, H. Moore e A. A. Grace (2003). "Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic e phasic dopamine transmission." Nat Neurosci **6**(9): 968-973.

Fusar-Poli, P., I. Bonoldi, A. R. Yung, S. Borgwardt, M. J. Kempton, L. Valmaggia, F. Barale, E. Caverzasi e P. McGuire (2012). "Predicting psychosis: meta-analysis of transition outcomes in individuals at high clinical risk." Arch Gen Psychiatry **69**(3): 220-229.

Gilbertson, M. W., M. E. Shenton, A. Ciszewski, K. Kasai, N. B. Lasko, S. P. Orr e R. K. Pitman (2002). "Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma." Nat Neurosci **5**(11): 1242-1247.

Girotti, M., T. W. Pace, R. I. Gaylord, B. A. Rubin, J. P. Herman e R. L. Spencer (2006). "Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain." Neuroscience **138**(4): 1067-1081.

Gomes, F. V. e A. A. Grace (2017). "Prefrontal Cortex Dysfunction Increases Susceptibility to Schizophrenia-Like Changes Induced by Adolescent Stress Exposure." Schizophr Bull **43**(3): 592-600.

Gomes, F. V. e A. A. Grace (2018). "Cortical dopamine dysregulation in schizophrenia e its link to stress." Brain **141**(7): 1897-1899.

Gomes, F. V. e A. A. Grace (2021). "Beyond Dopamine Receptor Antagonism: New Targets for Schizophrenia Treatment e Prevention." Int J Mol Sci **22**(9).

Gomes, F. V., X. Zhu e A. A. Grace (2019). "Stress during critical periods of development e risk for schizophrenia." Schizophr Res **213**: 107-113.

Gomes, F. V., X. Zhu e A. A. Grace (2020). "The pathophysiological impact of stress on the dopamine system is dependent on the state of the critical period of vulnerability." Mol Psychiatry **25**(12): 3278-3291.

Goto, Y. e A. A. Grace (2006). "Alterations in medial prefrontal cortical activity e plasticity in rats with disruption of cortical development." Biol Psychiatry **60**(11): 1259-1267.

Grace, A. A. (2016). "Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia e depression." Nat Rev Neurosci **17**(8): 524-532.

Grace, A. A. e B. S. Bunney (1983). "Intracellular e extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--1. Identification e characterization." Neuroscience **10**(2): 301-315.

Grace, A. A. e B. S. Bunney (1984). "The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing." J Neurosci **4**(11): 2866-2876.
Grace, A. A., S. B. Floresco, Y. Goto e D. J. Lodge (2007). "Regulation of firing of dopaminergic neurons e control of goal-directed behaviors." Trends Neurosci **30**(5): 220-227.

Grace, A. A. e F. V. Gomes (2019). "The Circuitry of Dopamine System Regulation e its Disruption in Schizophrenia: Insights Into Treatment e Prevention." Schizophr Bull **45**(1): 148-157.

Gunnar, M. R. e B. Donzella (2002). "Social regulation of the cortisol levels in early human development." Psychoneuroendocrinology **27**(1-2): 199-220.

Gunnar, M. R., S. Wewerka, K. Frenn, J. D. Long e C. Griggs (2009). "Developmental changes in hypothalamus-pituitary-adrenal activity over the transition to adolescence: normative changes e associations with puberty." Dev Psychopathol **21**(1): 69-85.

Gur, R. E., P. D. Mozley, S. M. Resnick, L. H. Mozley, D. L. Shtasel, F. Gallacher, S. E. Arnold, J. S. Karp, A. Alavi, M. Reivich e et al. (1995). "Resting cerebral glucose metabolism in first-episode e previously treated patients with schizophrenia relates to clinical features." Arch Gen Psychiatry **52**(8): 657-667.

Heilbronner, S. R., J. Rodriguez-Romaguera, G. J. Quirk, H. J. Groenewegen e S. N. Haber (2016). "Circuit-Based Corticostriatal Homologies Between Rat e Primate." Biol Psychiatry **80**(7): 509-521.

Herman, J. P., J. M. McKlveen, S. Ghosal, B. Kopp, A. Wulsin, R. Makinson, J. Scheimann e B. Myers (2016). "Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response." Compr Physiol **6**(2): 603-621.

Hjorthoj, C., A. E. Sturup, J. J. McGrath e M. Nordentoft (2017). "Years of potential life lost e life expectancy in schizophrenia: a systematic review e meta-analysis." Lancet Psychiatry **4**(4): 295-301.

Howes, O. D., R. McCutcheon, M. J. Owen e R. M. Murray (2017). "The Role of Genes, Stress, e Dopamine in the Development of Schizophrenia." Biol Psychiatry **81**(1): 9-20.

Huang, C. W., J. J. Tsai, C. C. Huang e S. N. Wu (2009). "Experimental e simulation studies on the mechanisms of levetiracetam-mediated inhibition of delayed-rectifier potassium current (KV3.1): contribution to the firing of action potentials." J Physiol Pharmacol **60**(4): 37-47.

Ikemoto, S. (2007). "Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex." Brain Res Rev **56**(1): 27-78.

Joels, M. (2018). "Corticosteroids e the brain." J Endocrinol **238**(3): R121-R130.

Kahn, R. S., I. E. Sommer, R. M. Murray, A. Meyer-Lindenberg, D. R. Wwinberger, T. D. Cannos, M. O'Donovan, C. U. Correll, J. M. Kane, J. Van Os, T. R. Insel (2015). "Schizophrenia". Nat Ver Dis Primers **12** (7): 15-67

Kallai, V., L. Lenard, L. Peczely, R. Galosi, D. Dusa, A. Toth, K. Laszlo, E. Kertes, A. Kovacs, O. Zagoracz, B. Berta, Z. Karadi e T. Ollmann (2020). "Cognitive performance of the MAM-E17 schizophrenia model rats in different age-periods." Behav Brain Res **379**: 112345.

Kapur, S. (2003). "Psychosis as a state of aberrant salience: a framework linking biology, phenomenology, e pharmacology in schizophrenia." Am J Psychiatry **160**(1): 13-23.

Kapur, S. e G. Remington (2001). "Dopamine D(2) receptors e their role in atypical antipsychotic action: still necessary e may even be sufficient." Biol Psychiatry **50**(11): 873-883.

Katzel, D., A. R. Wolff, A. M. Bygrave e D. M. Bannerman (2020). "Hippocampal Hyperactivity as a Druggable Circuit-Level Origin of Aberrant Salience in Schizophrenia." Front Pharmacol **11**: 486811.

Kegeles, L.S., A. A. Dargham, W. G. Frankle, R. Gil, T. B. Cooper, M. Slifstein, D. Hwang, Y. Huang, S. N. Haber, M. Laruelle (2010). "Increased Synaptic Dopamine Function in Associative Regions of the Striatum in Schizophrenia". Arch Gen Psychiatry **67** (3): 231-239.

Kinrys, G., J. J. Worthington, L. Wygant, F. Nery, H. Reese e M. H. Pollack (2007). "Levetiracetam as adjunctive therapy for refractory anxiety disorders." J Clin Psychiatry **68**(7): 1010-1013.

Koh, M. T., Y. Shao, S. Rosenzweig-Lipson e M. Gallagher (2018). "Treatment with levetiracetam improves cognition in a ketamine rat model of schizophrenia." Schizophr Res **193**: 119-125.

Konradi, C., C. K. Yang, E. I. Zimmerman, K. M. Lohmann, P. Gresch, H. Pantazopoulos, S. Berretta e S. Heckers (2011). "Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia." Schizophr Res **131**(1-3): 165-173.

Kraeuter, A. K., P. C. Guest e Z. Sarnyai (2019). "The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents." Methods Mol Biol **1916**: 69-74.

Kuniishi, H., S. Ichisaka, M. Yamamoto, N. Ikubo, S. Matsuda, E. Futora, R. Harada, K. Ishihara e Y. Hata (2017). "Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats." Neurosci Res **123**: 27-35.

Lammel, S., A. Hetzel, O. Hackel, I. Jones, B. Liss e J. Roeper (2008). "Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system." Neuron **57**(5): 760-773.

Lewis, D. A., T. Hashimoto e D. W. Volk (2005). "Cortical inhibitory neurons e schizophrenia." Nat Rev Neurosci **6**(4): 312-324.

Lodge, D. J., M. M. Behrens e A. A. Grace (2009). "A loss of parvalbumin-containing interneurons is associated with diminished oscillatory activity in an animal model of schizophrenia." J Neurosci **29**(8): 2344-2354.

Lieberman, JÁ., R. Girgis, G .Brucato, H.Moore, F. Provenzano, L. Kegeles, D. Javitt, J. Kantrowitz, M. Wall, C. Corcoran , S. Schobel e S. Small (2018). “Hippocampal dysfunction in the pathophysiology of schizophrenia: a selective review and hypothesis for early detection and intervention”. Molecular Psychiatry **23** (4): 1764-1772.

Lodge, D. J. e A. A. Grace (2006). "The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5167-5172.

Lodge, D. J. e A. A. Grace (2008). "Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization." J Neurosci **28**(31): 7876-7882.

Loscher,W., M. Gillard, Z. A. Sands, R. M. Kaminski, H. Klitgaard (2016). “Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Ligands in the Treatment of Epilepsy and Beyond”. CNS Drugs **30** (5): 150-165.

Lukyanetz, E. A., V. M. Shkryl e P. G. Kostyuk (2002). "Selective blockade of N-type calcium channels by levetiracetam." Epilepsia **43**(1): 9-18.

Lupien, S. J., R. P. Juster, C. Raymond e M. F. Marin (2018). "The effects of chronic stress on the human brain: From neurotoxicity, to vulnerability, to opportunity." Front Neuroendocrinol **49**: 91-105.

Lupien, S. J., B. S. McEwen, M. R. Gunnar e C. Heim (2009). "Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour e cognition." Nat Rev Neurosci **10**(6): 434-445.

Mattheisen, M. et al. Genetic variation at the synaptic vesicle gene SV2A is associated with schizophrenia (2012). Schizophr Res **141** (8): 262–265.

Maren, S. (1999). "Neurotoxic or electrolytic lesions of the ventral subiculum produce deficits in the acquisition e expression of Pavlovian fear conditioning in rats." Behav Neurosci **113**(2): 283-290.

Maric, N. P., M. J. Jovicic, M. Mihaljevic e C. Miljevic (2016). "Improving Current Treatments for Schizophrenia." Drug Dev Res **77**(7): 357-367.

Martins, C. P., S. Carvalho, A. P. Correia e M. Pinto da Costa (2020). "Schizophrenia-like psychosis induced by levetiracetam in a patient with epilepsy." Actas Esp Psiquiatr **48**(4): 181-190.

Mauritz, M. W., P. J. Goossens, N. Draijer e T. van Achterberg (2013). "Prevalence of interpersonal trauma exposure e trauma-related disorders in severe mental illness." Eur J Psychotraumatol **4**.

McCutcheon, R. A., A. Abi-Dargham e O. D. Howes (2019). "Schizophrenia, Dopamine e the Striatum: From Biology to Symptoms." Trends Neurosci **42**(3): 205-220.

McCutcheon, R. A., T. Reis Marques e O. D. Howes (2020). "Schizophrenia-An Overview." JAMA Psychiatry **77**(2): 201-210.

McEwen, B. S., C. Nasca e J. D. Gray (2016). "Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, e Prefrontal Cortex." Neuropsychopharmacology **41**(1): 3-23.

Modinos, G., P. Allen, A. A. Grace e P. McGuire (2015). "Translating the MAM model of psychosis to humans." Trends Neurosci **38**(3): 129-138.

Niehaus, C. E., T. M. Chaplin, S. F. Goncalves, R. Semelsberger e J. C. Thompson (2019). "Maternal stress e adolescent brain structure e function." Brain Behav **9**(6): e01311.

Niespodziany, I., H. Klitgaard e D. G. Margineanu (2001). "Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca(2+) current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices." Neurosci Lett **306**(1-2): 5-8.

Nowack, A., E. B. Malarkey, J. Yao, A. Bleckert, J. Hill e S. M. Bajjalieh (2011). "Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A." PLoS One **6**(12): e29560.

Onwordi, E. C, E. F. Halff, T. Whitehurst, A. Mansur, M. Cotel, L. Wells, H. Creeney, D. Bonsal, M. Rogdaki, E. Shatalina, T. R. Marques, E. A. Rabiner, R. N. Gunn, S. Natesan, A. C. Vernon, O. D. Howes (2020). “Synaptic density marker SV2A is reduced in schizophrenia patients and unaffected by antipsychotics in rats”. Nature Comunications **246** (4): 1-11.

Opitz, B. (2014). "Memory function e the hippocampus." Front Neurol Neurosci **34**: 51-59.

Padovan, C. M. e F. S. Guimaraes (2000). "Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze." Braz J Med Biol Res **33**(1): 79-83.

Paus, T., M. Keshavan e J. N. Giedd (2008). "Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence?" Nat Rev Neurosci **9**(12): 947-957.

Perlman, W. R., M. J. Webster, M. M. Herman, J. E. Kleinman e C. S. Weickert (2007). "Age-related differences in glucocorticoid receptor mRNA levels in the human brain." Neurobiol Aging **28**(3): 447-458.

Phillips, A. G., S. Ahn e S. B. Floresco (2004). "Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task." J Neurosci **24**(2): 547-553.

Phillips, L. K. e L. J. Seidman (2008). "Emotion processing in persons at risk for schizophrenia." Schizophr Bull **34**(5): 888-903.

Pierce, R. C. e P. W. Kalivas (1997). "A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants." Brain Res Brain Res Rev **25**(2): 192-216.

Poels, E. M., L. S. Kegeles, J. T. Kantrowitz, D. C. Javitt, J. A. Lieberman, A. Abi-Dargham e R. R. Girgis (2014). "Glutamatergic abnormalities in schizophrenia: a review of proton MRS findings." Schizophr Res **152**(2-3): 325-332.

Pruessner, M., S. N. Iyer, K. Faridi, R. Joober e A. K. Malla (2011). "Stress e protective factors in individuals at ultra-high risk for psychosis, first episode psychosis e healthy controls." Schizophr Res **129**(1): 29-35.

Rajagopal, L., B. W. Massey, M. Huang, Y. Oyamada e H. Y. Meltzer (2014). "The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia." Curr Pharm Des **20**(31): 5104-5114.

Ray, A., K. Gulati e N. Rai (2017). "Stress, Anxiety, e Immunomodulation: A Pharmacological Analysis." Vitam Horm **103**: 1-25.

Robinson, J. E., M. Chen, A. M. Stamatakis, M. C. Krouse, E. C. Howard, S. Faccidomo, C. W. Hodge, E. W. Fish e C. J. Malanga (2013). "Levetiracetam has opposite effects on alcohol- e cocaine-related behaviors in C57BL/6J mice." Neuropsychopharmacology **38**(7): 1322-1333.

Rodgers, R. J. e A. Dalvi (1997). "Anxiety, defence e the elevated plus-maze." Neurosci Biobehav Rev **21**(6): 801-810.

Rosato-Siri, M. D., E. Zambello, C. Mutinelli, N. Garbati, R. Benedetti, L. Aldegheri, F. Graziani, C. Virginio, G. Alvaro e C. H. Large (2015). "A Novel Modulator of Kv3 Potassium Channels Regulates the Firing of Parvalbumin-Positive Cortical Interneurons." J Pharmacol Exp Ther **354**(3): 251-260.
Rosenkranz, J. A. e A. A. Grace (2002). "Cellular mechanisms of infralimbic e prelimbic prefrontal cortical inhibition e dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo." J Neurosci **22**(1): 324-337.

Rosenkranz, J. A., H. Moore e A. A. Grace (2003). "The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity e responses to previously conditioned stimuli." J Neurosci **23**(35): 11054-11064.

Sapolsky, R. M., L. C. Krey e B. S. McEwen (1986). "The neuroendocrinology of stress e aging: the glucocorticoid cascade hypothesis." Endocr Rev **7**(3): 284-301.
Schneider, M. (2013). "Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior." Cell Tissue Res **354**(1): 99-106.

Sisk, C. L. e D. L. Foster (2004). "The neural basis of puberty e adolescence." Nat Neurosci **7**(10): 1040-1047.

Sonnenschein, S. F., F. V. Gomes e A. A. Grace (2020). "Dysregulation of Midbrain Dopamine System e the Pathophysiology of Schizophrenia." Front Psychiatry **11**: 613.

Sourbron, J., H. Chan, E. A. Wammes-van der Heijden, P. Klarenbeek, B. F. M. Wijnen, G. J. de Haan, H. van der Kuy, S. Evers e M. Majoie (2018). "Review on the relevance of therapeutic drug monitoring of levetiracetam." Seizure **62**: 131-135.

Stanika, R. I., N. B. Pivovarova, C. A. Brantner, C. A. Watts, C. A. Winters e S. B. Erews (2009). "Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction e glutamate excitotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(24): 9854-9859.

Temmingh, H. e D. J. Stein (2015). "Anxiety in Patients with Schizophrenia: Epidemiology e Management." CNS Drugs **29**(10): 819-832.

Tubert-Brohman, I., W. Sherman, M. Repasky e T. Beuming (2013). "Improved docking of polypeptides with Glide." J Chem Inf Model **53**(7): 1689-1699.

Ungless, M. A. e A. A. Grace (2012). "Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons." Trends Neurosci **35**(7): 422-430.

Van der Velde, J., E. M. Opmeer, E. J. Liemburg, R. Bruggeman, R. Nieboer, L. Wunderink e A. Aleman (2015). "Lower prefrontal activation during emotion regulation in subjects at ultrahigh risk for psychosis: an fMRI-study." NPJ Schizophr **1**: 15026.

Vazquez, D. M. e H. Akil (1993). "Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion." Pediatr Res **34**(5): 646-653.

Vogt, K., J. Mellor, G. Tong e R. Nicoll (2000). "The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses." Neuron **26**(1): 187-196.

Volman, V., M. M. Behrens e T. J. Sejnowski (2011). "Downregulation of parvalbumin at cortical GABA synapses reduces network gamma oscillatory activity." J Neurosci **31**(49): 18137-18148.
Wakita, M., N. Kotani, K. Kogure e N. Akaike (2014). "Inhibition of excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons by levetiracetam involves Zn(2)(+)-dependent GABA type A receptor-mediated presynaptic modulation." J Pharmacol Exp Ther **348**(2): 246-259.

Walker, E. F., H. D. Trotman, B. D. Pearce, J. Addington, K. S. Cadenhead, B. A. Cornblatt, R. Heinssen, D. H. Mathalon, D. O. Perkins, L. J. Seidman, M. T. Tsuang, T. D. Cannon, T. H. McGlashan e S. W. Woods (2013). "Cortisol levels e risk for

psychosis: initial findings from the North American prodrome longitudinal study." Biol Psychiatry **74**(6): 410-417.

Whiteford, H. A., L. Degenhardt, J. Rehm, A. J. Baxter, A. J. Ferrari, H. E. Erskine, F. J. Charlson, R. E. Norman, A. D. Flaxman, N. Johns, R. Burstein, C. J. Murray e T. Vos (2013). "Global burden of disease attributable to mental e substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet **382**(9904): 1575-1586.

Wilson, C. A. e J. I. Koenig (2014). "Social interaction e social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia." Eur Neuropsychopharmacol **24**(5): 759-773.

Wong, D. L., T. C. Tai, D. C. Wong-Faull, R. Claycomb, E. G. Meloni, K. M. Myers, W. A. Carlezon, Jr. e R. Kvetnansky (2012). "Epinephrine: a short- e long-term regulator of stress e development of illness : a potential new role for epinephrine in stress." Cell Mol Neurobiol **32**(5): 737-748.

Yang, X. F. e S. M. Rothman (2009). "Levetiracetam has a time- e stimulation-dependent effect on synaptic transmission." Seizure **18**(9): 615-619.
Zhang, Z. J. e G. P. Reynolds (2002). "A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia." Schizophr Res **55**(1-2): 1-10.

Zhu, X. e A. A. Grace (2021). "Prepubertal Environmental Enrichment Prevents Dopamine Dysregulation e Hippocampal Hyperactivity in MAM Schizophrenia Model Rats." Biol Psychiatry **89**(3): 298-307.

Zimmerman, E. C., M. Bellaire, S. G. Ewing e A. A. Grace (2013). "Abnormal stress responsivity in a rodent developmental disruption model of schizophrenia." Neuropsychopharmacology **38**(11): 2131-2139.