

GUSTAVO ANTUNES MASTELLA

**RELAÇÃO ENTRE A FUMAÇA DE CIGARRO NO PERÍODO
GESTACIONAL DE RATAS *Wistar* E O
DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA VIDA
ADULTA DA PROLE: MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Alexandra
Zugno

CRICIÚMA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M423r Mastella, Gustavo Antunes.

Relação entre fumaça de cigarro no período gestacional de ratas *wistar* e o desenvolvimento de esquizofrenia na vida adulta da prole : machos e fêmeas / Gustavo Antunes Mastella. - 2017.

71 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Alexandra Zugno.

1. Fumaça de cigarro – Efeitos colaterais. 2. Esquizofrenia. 3. Tabagismo na gestação. 4. Dopamina. 5. Neurotrofina.
I. Título.

CDD 23. ed. 616.865



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

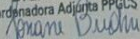
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

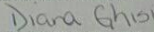
ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 303

Com início às 08h30 (oito e trinta horas) do dia trinta do mês de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Gustavo Antunes Mastella**, sob a orientação da Prof.^a Dra. Alexandra Ioppi Zugno, intitulada **"RELAÇÃO ENTRE A FUMAÇA DE CIGARRO NO PERÍODO GESTACIONAL DE RATAS Wistar E O DESENVOLVIMENTO DE ESQUIZOFRENIA NA VIDA ADULTA DA PROLE: MACHOS E FÊMEAS"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Renan Pedra de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 09h30 (nove e trinta horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Josiane Budni, Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 30 (trinta) de janeiro de 2018 (dois mil e dezoito).

Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta PPGCS


Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS

Diana Ghisi Daniel
Auxiliar Administrativo PPGCS.


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico grave com fisiopatologia pouco conhecida. O tabagismo durante o período pré-natal vem sendo estudado como fator causador de anormalidades obstétricas, levando à alterações cognitivas e comportamentais associadas à esquizofrenia. O objetivo desse trabalho foi avaliar, níveis de dopamina e marcadores neuroquímicos cerebrais em ratos Wistar machos e fêmeas na fase da vida adulta, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante o período pré-natal. O estudo utilizou um total de 40 ratas que foram mantidas com um rato macho cada por 7 dias para acasalamento. Após o segundo dia de contato, as fêmeas foram separadas em dois grandes grupos, MC (mães controle) e ME (mães expostas). As fêmeas do grupo ME foram expostas à fumaça de cigarro 3 vezes ao dia, 4 cigarros por vez, totalizando 12 cigarros ao dia, durante todo o período gestacional (21 dias). Na fase adulta, a prole foi submetida à administração de salina ou cetamina (25 mg/kg), via intraperitoneal, (i.p.) durante 7 dias. Após a realização deste protocolo, os animais foram mortos por decapitação e suas estruturas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) retiradas para a realização das análises neuroquímica: Níveis de BDNF, NGF e GDNF, além dos níveis de dopamina. Pode-se concluir que a exposição à fumaça do cigarro seguido do protocolo de indução a esquizofrenia utilizando a cetamina mostrou alterações nos níveis de dopaminas em córtex de ratos machos dos grupos Cigarro e cigarro+cetamina, e também alterações em ratas fêmeas quando analisado neurotrofinas, para BDNF tivemos alterações no grupo cigarro+cetamina no estriado, NGF tivemos alterações no grupo cigarro no córtex, no estriado e hipocampo tivemos alterações no grupo cigarro+cetamina para níveis de GDNF tivemos alterações noestriado no grupo cigarro+cetamina, e no hipocampo nos grupos cigarro e cigarro+cetamina.

Palavras-chave: Esquizofrenia, Tabagismo Materno, Gestação, Dopamina, neurotrofina.

ABSTRACT

Schizophrenia is a severe neuropsychiatric disorder with little known pathophysiology. Smoking during the prenatal period has been studied as a factor causing obstetric abnormalities, leading to cognitive and behavioral changes associated with schizophrenia. The objective of this study was to evaluate dopamine levels and brain neurochemical markers in male and female Wistar rats during adulthood whose mothers were exposed to cigarette smoke during the prenatal period. The study used a total of 40 rats that were maintained with one male rat each for 7 days for mating. After the second day of contact, the females were separated into two large groups, MC (control mothers) and ME (exposed mothers). The females of the ME group were exposed to cigarette smoke 3 times a day, 4 cigarettes at a time, totaling 12 cigarettes a day, throughout the gestational period (21 days). In adulthood, the offspring were administered saline or ketamine (25 mg / kg) intraperitoneally (i.p.) for 7 days. After this protocol, the animals were killed by decapitation and their cerebral structures (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) were removed for neurochemical analysis: levels of BDNF, NGF and GDNF, in addition to dopamine levels. It can be concluded that the exposure to cigarette smoke followed by the induction protocol to schizophrenia using ketamine showed alterations in dopamine levels in cortex of male rats of the cigarette and cigarette + ketamine groups, as well as alterations in female rats when analyzed neurotrophins, for BDNF we had changes in the cigarette + ketamine group in the striatum, NGF had alterations in the cigarette group in the cortex, in the striatum and hippocampus we had alterations in the cigarette + ketamine group for GDNF levels we had changes in the striatum in the cigarette + ketamine group, and in the hippocampus in the cigarette and cigarette + ketamine groups.

Key words: Schizophrenia, Maternal smoking, Gestation, Dopamine, neurotrophin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância.
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AChE – Acetil-Colinesterase
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)
CEUA - Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais.
ChAT- Colina Acetiltransferase
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
CO – Monóxido de Carbono
EPM - Erro Padrão da Média.
GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia. (do inglês ...)
GPi – Globo pálido interno.
GPe – Globo pálido externo.
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
NFκB - Nuclear-κ B.
NGF - Fator de Crescimento Nervoso. (do inglês ...)
NT-3 - Neurotrofina 3.
NT-4 - Neurotrofina 4.
NTs - Neurotrofinas.
mRNA – RNA mensageiro.
OMS - Organização Mundial de Saúde.
SNC - Sistema Nervoso Central.
SNP - Sistema Nervoso Periférico.
SNr – Substancia Nigra reticulata
TrkB - Receptor Tirosina Quinase. (do inglês...)
UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Imagem receptores dopamina (Zoran Vukadinovic, 2015).
- Figura 2:** Desenho experimental.
- Figura 3:** Representa os níveis de dopamina em soro das ratas fêmeas mães expostas (grupo cigarro) ou não expostas (grupo controle) à fumaça de cigarro durante o período gestacional.
- Figura 4:** Apresenta os resultados referentes aos níveis de dopamina nas estruturas cerebrais, córtex frontal e estriado, da prole adulta de machos cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional.....
- Figura 5:** Apresenta os níveis de dopamina nas estruturas cerebrais, córtex frontal e estriado, da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional.....
- Figura 6:** Apresenta os níveis de BDNF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, da prole adulta de machos cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional.
- Figura 7:** Apresenta níveis de BDNF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional
- Figura 8:** Apresenta os níveis de NGF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, da prole de machos adulta cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional
- Figura 9:** Apresenta os níveis de NGF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, na prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional
- Figura 10:** Apresenta os níveis de GDNF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, da prole de machos adulta cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional
- Figura 11:** Apresenta os níveis de GDNF no córtex frontal, estriado e hipocampo, respectivamente, da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo da exposição à fumaça de cigarro (Zugno et al., 2013).....

Tabela 2: Separação dos animais por grupo de exposição à fumaça de cigarro no período pré-natal e dose para o tratamento com cetamina na fase adulta.

SUMÁRIO

1	
INTRODUÇÃO.....	199
1.1	
Esquizofrenia.....	199
1.2 Tabagismo pré-natal e sua influência no desenvolvimento da esquizofrenia.....	22
1	
1.3 Esquizofrenia e dopamina.....	22
1.4	Esquizofrenia e
Neurotrofinas.....	255
1.4.1	
BDNF.....	266
1.4.2	
NGF.....	277
1.4.3	
GDNF.....	277
2.1	Objetivo
geral.....	299
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais.....	30
3.2 Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.....	30
3.3 Cetamina.....	31
3.4 Análises Neuroquímicas.....	34
3.4.1 Condições Cromatográficas para dosagem de monoaminas – CLAE.....	34
3.4.2 Níveis Cerebrais de BDNF, NGF e GDNF.....	34
3.5 Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Níveis de dopamina.....	36
4.2 Níveis de BDNF.....	39
4.3- Níveis de NGF.....	41
4.4 Níveis de GDNF.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	Er
ro! Indicador não definido.	

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico grave que afeta de 0,5% a 1,0% da população mundial. É uma patologia com efeitos devastadores para os indivíduos acometidos e seus familiares (Ross et al. 2006), sendo considerado um dos transtornos que mais leva à incapacidade crônica (Javitt, 2010). Seus sintomas iniciam-se predominantemente entre o final da adolescência e o início da idade adulta, geralmente marcada por uma alteração abrupta no perfil social e afetivo (APA, 1999; Weiden et al., 2007; Nagai et al., 2011; Marsman et al., 2013), que varia de acordo com a vulnerabilidade do indivíduo podendo, então, evoluir de maneira progressiva para a cronicidade (Graeff e Brandão, 1999). O início tardio da esquizofrenia pode ser entendido pela maturação prolongada dos circuitos cerebrais sugeridos na doença, particularmente no período da adolescência (O'donnell, 2011).

Os sintomas clínicos são caracterizados em três diferentes classes: sintomas positivos que abrangem os episódios de psicose, delírio, alucinações e pensamentos desorganizados; sintomas negativos que correspondem ao isolamento social/emocional, embotamento afetivo e anedonia e déficit cognitivo caracterizado pelo prejuízo na memória de trabalho, desorganização, desorientação e falta de atenção (Bowie e Harvey, 2006; Javitt, 2010). A esquizofrenia, em geral, rompe a maior parte das funções humanas básicas de percepção, emoção e julgamento (Ross et al., 2006; Meyer e Feldon, 2010; Pickard, 2011). Uma hipótese global classifica este transtorno como uma patologia neurodesenvolvimental, onde as alterações relacionadas aos seus sintomas ocorrem durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) no período da gestação (Rapoport et al., 2005).

Pacientes com esquizofrenia possuem percentuais de mortalidade maiores quando comparados à população em geral (Hoang et al., 2011). Sua etiologia e fisiopatologia ainda não são conhecidas por completo (Rapoport et al., 2005; Rapoport et al., 2012). Assim, este transtorno caracteriza-se como uma patologia complexa, com diversos fatores que contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo a presença de genes que aumentam a susceptibilidade, em conjunto com os fatores ambientais e alterações no desenvolvimento cerebral (Baguelin-Pinaud et al., 2010; Gilmore et al., 2010; Ayhan et al., 2011; Nagai et al., 2011).

Dentre estes fatores, encontram-se os estímulos ambientais estressantes, bem como a idade em que indivíduo recebe tais estímulos (Lewis e Lieberman, 2000), além do sofrimento pré-natal e/ou perinatal (Baguelin-Pinaud et al., 2010), compreendendo a exposição materna ao estresse (Lee et al., 2007), infecção e/ou ativação do sistema imunológico (Clarke et al., 2009; Fatemi e Folsom, 2009), deficiências nutricionais (Brown e Susser, 2008; Susser et al., 2008) e complicações obstétricas (Cannon et al., 2002; Haukvik et al., 2009), tendo como resultado uma complexa disfunção nervosa.

Tais agressões ambientais resultam no aparecimento de sintomas característicos do transtorno, como a diminuição da interação social e/ou reconhecimento de objetos e déficit no sistema sensorio-motor em modelos animais (Le Pen et al., 2000; Goto e O'donnell, 2002; Le Pen e Moreau, 2002). Além disso, anormalidades na estrutura cortical, baixo peso ao nascer e alterações nos sistemas de neurotransmissores, como o dopaminérgico e o glutamatérgico, em humanos (Foerster et al., 1991; Weinstock, 2001) foram evidentes após a adolescência, justamente na fase da vida em que os episódios agudos da doença se manifestam.

Neste sentido, o tabagismo materno é uma das agressões ambientais atualmente estudadas, por ser um fator de risco para o surgimento da esquizofrenia relacionado também a distúrbios cognitivos e comportamentais (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Estudos pré-clínicos demonstram que a exposição materna à nicotina induz mudanças no desenvolvimento de marcadores neuroquímicos de dopamina (DA) e causam hiperatividade na prole, acreditando-se ser resultado de mudanças no sistema dopaminérgico nas regiões mesolímbica e nigroestriatal (Azam et al., 2007).

A pesquisa em animais tem se mostrado um promissor instrumento para investigar a base neurobiológica do distúrbio neural e comportamental da esquizofrenia, a fim de avaliar e constituir novas estratégias farmacoterapêuticas (Meyer e Feldon, 2010) e buscar alvos para novos fármacos (Nagai et al., 2011). Os modelos animais farmacológicos de esquizofrenia bem evidenciados na literatura são a administração de antagonistas não competitivos dos receptores glutamatérgicos N-metil d-aspartato (NMDA), como a fenciclidina (PCP) (Hashimoto et al., 2007; Elsworth et al., 2012), o MK-801 (Su et al., 2007; Boulay et al., 2010) e a cetamina (De Oliveira et al., 2009; Canever et al., 2010; Fraga et al., 2011). Estes fármacos obstruem o canal NMDA, impedindo a entrada de cálcio, podendo então, levar a um estado psicótico transitório e reversível, mimetizando os sintomas

característicos da patologia em pessoas saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001).

1.2 TABAGISMO PRÉ-NATAL E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA

Estudos sugerem que alterações no SNC podem ser geradas nos filhos (as) de mulheres que iniciaram uma resposta ao estresse durante a gestação (Brixey et al., 1993; O'donnell, 2011). O tabagismo, um importante fator estressante durante o período gestacional, pode desencadear anormalidades obstétricas e baixo peso ao nascer, desencadeando alterações cognitivas e comportamentais na infância e vida adulta dos filhos (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Tais alterações no neurodesenvolvimento podem modificar a organização da ligação axonal em projeções sinápticas ao afetar a proliferação celular neuronal, migração e apoptose (Van De Berg et al., 2002), as quais são necessárias para o SNC em desenvolvimento. Desse modo, o tabagismo durante a gestação pode ser um fator de risco para o surgimento de transtornos neurodesenvolvimentais, inclusive para a esquizofrenia (Stathopoulou et al., 2013).

A exposição pré-natal ao cigarro vem sendo relacionada com mudanças fisiológicas e de desenvolvimento, aumentando assim, o risco de crianças e adultos desenvolverem doenças neuropsiquiátricas (Witschi et al., 1997; Roy et al., 1998). Apesar do mecanismo neurobiológico responsável por tais alterações ser ainda pouco conhecido, acredita-se que modificações no sistema dopaminérgico central estejam relacionadas (Baguelin-Pinaud et al., 2010).

É sabido que há uma grande quantidade de componentes presentes na fumaça do cigarro, porém, ainda não se conhece quais substâncias, além da nicotina, são capazes de gerar todos ou determinados tipos de efeitos prejudiciais. Pesquisas demonstram que a nicotina e o monóxido de carbono (CO) pré-natal são capazes de gerar efeitos negativos na prole. Dentre eles, o CO, pode levar a diminuição de oxigênio (O₂) transferido para o feto, induzindo hipóxia em tecidos do embrião (Freeman et al., 2014). Estas e outras substâncias presentes na fumaça são consideradas toxinas celulares e o uso de cigarro pode modificar a situação nutricional da mãe e da criança (Benowitz et al., 2000). Do mesmo modo, estudos sugerem que a nicotina age como um fator causador de morte celular em estruturas embrionárias (Roy et al., 1998; Slotkin, 2004). Ademais, pesquisas pré-clínicas indicam que a queima do cigarro

libera gases e partículas que estabelecem mecanismos capazes de danificar as células e os tecidos, levando a hipóxia, à citotoxicidade e à modificação na formação, sobrevivência e diferenciação das células cerebrais (Slotkin et al., 1993; Song et al., 1998).

Baseando-se nas evidências de que a exposição à fumaça de cigarro no período pré-natal está diretamente relacionada com alterações no neurodesenvolvimento e, conseqüentemente, com a fisiopatologia da esquizofrenia, dados da literatura indicam que o ambiente intrauterino inadequado favorece a incidência de transtornos psiquiátricos na prole jovem-adulta e o sinergismo entre a ação glutamatérgica e colinérgica pode estar entre os mecanismos subjacentes aos sintomas do transtorno. Levando em consideração que estes dados ainda não estão completamente explicados, é visível a necessidade de um aprofundamento e complementação dos estudos já realizados em relação aos possíveis mecanismos envolvidos com estas alterações.

1.3 ESQUIZOFRENIA E DOPAMINA

Apesar da fisiopatologia da esquizofrenia não ser ainda totalmente conhecida, a existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais já foram comprovadas (Keshavan et al., 2011). Os sistemas predominantemente sugeridos são o dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e adenosinérgico, tendo como hipótese clássica que a esquizofrenia é o resultado de alterações em um ou mais destes sistemas de neurotransmissores (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005; Lara et al., 2006; Pickard, 2011; Boison et al., 2012). Outros sistemas são sugeridos, como o sistema GABAérgico (Akbarian et al., 1995; Volk et al., 2000; Vinkers et al., 2010) e colinérgico (Brooks et al., 2011; Sarter et al., 2012). No entanto, estas hipóteses ainda não explicam completamente as alterações do transtorno, o que tem levado a realização de mais estudos que possam explicar os prejuízos causados por agressões ambientais, tais como o tabagismo materno (Keshavan et al., 2011)

Desde a sua descoberta em 1957 (Javitt., 2007), o neuromodulador dopamina mostrou ter um papel chave na regulação do afeto, atenção, motivação, recompensa, sono e movimento voluntário. Variações na capacidade de síntese de dopamina têm sido associadas a alterações de algumas destas funções (Siessmeier et al., 2006; Schlagenhauf et al., 2013) e podem ter um papel fisiopatológico em uma série de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo transtorno de déficit de atenção e

hiperatividade (ADHD) (Ernst M et al., 1998), doença de Parkinson (Lotharius J et al., 2002) e esquizofrenia (Howes OD et al., 2009). Especificamente, elevada capacidade de síntese de dopamina é observada em pacientes com esquizofrenia (Hietala J et al., 1995; Howes OD et al., 2012).

A teoria glutamatérgica da esquizofrenia indica os principais déficits que conduzem às disfunções comportamentais (Schwartz et al., 2012). Em particular, os receptores de glutamato do tipo NMDA estão envolvidos, uma vez que fármacos tais como cetamina e a PCP induzem sintomas semelhantes a esquizofrenia em indivíduos saudáveis e exacerbam os sintomas em pacientes com esquizofrenia (Kretschmer., 1999).

Adicionalmente, os sistemas dopaminérgicos também estão implicados neste transtorno. Evidências indicam que alguns fármacos como a anfetamina aumentam a função da dopamina e induzem sintomas semelhantes à esquizofrenia. Além disso, os antipsicóticos utilizados clinicamente têm em comum uma ação antagonista nos receptores dopaminérgicos (Berridge KC et al., 1998, Mehta SH et al., 2008). Desta forma, o deficit na função do glutamato causa uma desregulação da na liberação de dopamina (Howes OD., 2009). Sobretudo, mudanças nas funções da dopamina no núcleo accubens podem ter um papel importante para a expressão dos sintomas positivos da esquizofrenia, enquanto a via mesocortical, que tem o seu fim no córtex frontal, está relacionado aos sintomas negativos e déficits cognitivos do transtorno (Mehta SH et al., 2008).

Sagar et al (2008) sugerem que anormalidades nos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico possam estar conectadas e agirem simultaneamente, levando a danos em diversas funções características da esquizofrenia. Concomitante, estudos demonstram a participação não apenas de um único neurotransmissor e sim de uma interação de diferentes vias que possam estar envolvidas no transtorno (Javitt, 2004., Abi-Dargham e Laruelle, 2005)

A diferença dos efeitos hormonais e/ou de gênero entre os receptores NMDA e ações mediadas pelo receptor NMDA no cérebro é considerável e continua a crescer diante de novos estudos. Incluindo os efeitos dos estrógenos e andrógenos na densidade de células piramidais (Gould et al. 1990; Hajszan et al. 2008); sobre números de receptores NMDA; afinidade e/ou composição das subunidades (Smith e McMahon 2006; Taherianfard et al. 2012; Vedder et al. 2013) e em medidas de toxicidade dependente de NMDA e plasticidade sináptica (de Olmos et al. 2008; Smith et al. 2010). Segundo Locklear et al.

(2016) a diferença entre gêneros na mediação homeostática de dopamina tem origem na ativação mediada pela área tegumentar ventral (ATV). Entretanto, o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda é desconhecido, podendo estar relacionado às diferenças de ações hormonais em homens e mulheres (Aubele e Kritzer, 2012).

Na esquizofrenia, a hiperatividade dopaminérgica no estriado (Howes, et al., 2009) atenua os produtos inibitórios GABAérgicos para o núcleo médio dorsal (NMD) (Obeso, et al., 2007). Este núcleo, por sua vez, está relacionado com a esquizofrenia devido a sua ligação com o córtex pré-frontal (Fuster, 2008). Portanto, déficits na comunicação córtico-tálamo-cortical na esquizofrenia podem ter múltiplas causas contribuintes, abrangendo genética, trauma na infância e uso de substâncias durante todo o decorrer da vida do indivíduo. (Zoran Vukadinovic, 2015).

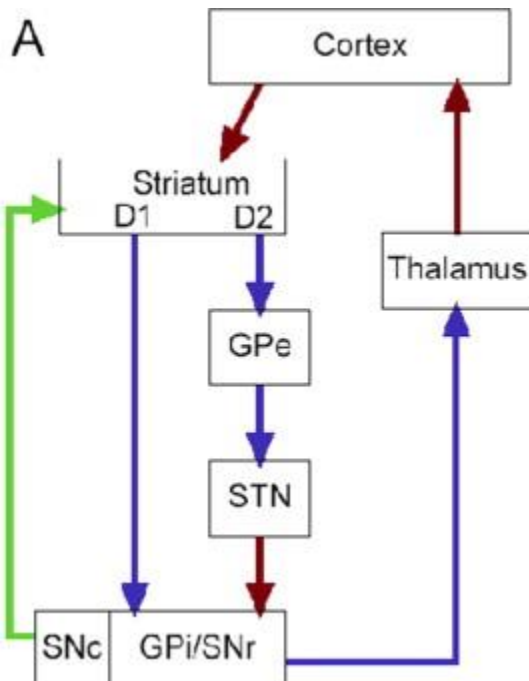


Figura 1: O córtex fornece insumos glutamatérgicos excitatórios ao estriado, que também recebe inervação dopaminérgica da substância negra compacta (SNc). Os receptores de Dopamina D1 e D2 no corpo estriado modulam a atividade das projeções GABAérgicas estriatórias inibitórias para o globo palido interno (GPe) e a substância negra reticulada (SNr) (via direta), bem como para o

globo palido externo (GPe) (Indireta). O GPe proporciona inervação inibitória GABAérgica ao núcleo subtalâmico (STN), que por sua vez fornece entradas glutamatérgicas excitatórias ao GPI e SNr. GPI e SNr enviam entradas inibitórias de GABAérgica para o tálamo.

1.4 ESQUIZOFRENIA E NEUROTROFINAS

Evidência substancial indica que o desenvolvimento neuronal anormal participa da fisiopatologia da esquizofrenia (Marengo e Weinberger, 2000). No entanto, o passo de desenvolvimento afetado neste transtorno psicótico continua uma dúvida.

Para se tornarem funcionais, os neurônios formam primeiro dendritos e axônios imaturos, chamados neuritos (Arimura e Kaibuchi, 2007; Dehmelt e Halpain, 2004; Dotti et al., 1988). Este processo essencial no desenvolvimento neurológico é regulado por centenas, senão milhares, de genes e moléculas, muitas das quais foram associadas à esquizofrenia (Bellon, 2007). Curiosamente, a formação anormal de neuritos em roedores produz, entre outras anormalidades cerebrais, ventrículos aumentados e diminuição do volume cerebral (Badea et al., 2007; Matricon et al., 2010). Tais anomalias estruturais são, de fato, os achados mais consistentes na esquizofrenia (Gur et al., 1994; Van Horn e McManus, 1992; Woods et al., 2005; Wright et al., 2000). Assim, análises *pós-mortem* de pacientes com esquizofrenia apoiam esta hipótese (Howes, et al., 2009; Howes et al., 2015)

Dentre as várias moléculas que participam deste processo de formação, as neurotrofinas (NTs) estão entre as mais estudadas. Segundo Bellon et al. (2011), essa família de fatores de crescimento pode ser o centro para os déficits encontrados em pacientes com esquizofrenia. As NTs e seus receptores correspondem a uma família de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção adequados de redes neuronais e estão envolvidas em uma variedade de funções, incluindo a sobrevivência celular, a diferenciação, o crescimento axonal e dendrítico, bem como a plasticidade sináptica, arborização e formação de sinapses (Chao, 2003; Park e Poo, 2013).

A produção de NTs inicia-se por moléculas precursoras denominadas pró-NTs, as quais são quebradas e transformadas em proteínas não covalentes diméricas (Chao, 2003) que se ligarão aos receptores da família Trk (Dechant et al., 1994). Assim, a via de sinalização prossegue com a ativação do processo de dimerização, fosforilação das frações de tirosina e ativação de sítios da quinase. Tais ações iniciam um processo

de seleção proteica específica, culminando na modificação da expressão gênica e síntese de proteínas (Poo, 2001).

É sabido que fatores estressores durante a gestação, como a presença de infecções, o uso de cigarro e o abuso de álcool podem aumentar o risco de parto prematuro, além de comprometer o neurodesenvolvimento do feto e predispor o aparecimento de doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos na prole (Dammann et al., 2002). O tabagismo materno durante a gravidez tem sido associado a comportamentos anormais e desenvolvimento cognitivo prejudicado na prole e, estes efeitos adversos no desenvolvimento neurológico, podem persistir durante o período da adolescência e se prolongar até a idade adulta (Weitzman et al., 1992; Barros et al., 2011; Cornelius et al., 2011; Liu et al., 2011; Cornelius et al., 2012; Elmasry et al., 2014). A probabilidade de desenvolver transtornos psiquiátricos aumenta em crianças cujas mães fumam cigarros durante a gravidez, sugerindo que existe um possível período crítico de sensibilidade ao desenvolvimento da exposição ao fumo de cigarro durante o período pré-natal e pós-natal inicial. Com base nisso, as NTs têm seu papel cada vez mais estudado em pesquisas relacionadas a estes transtornos. Ademais, já está bem descrito a interação entre fatores genéticos e ambientais na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e, por conseguinte, as NTs também se encontram envolvidas, seja com sua síntese e/ou sua liberação alterada (Shintani, 1999).

1.4.1 BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) auxilia na sobrevivência e na manutenção dos neurônios sensorio-motores e também de alguns neurônios colinérgicos e dopaminérgicos. No cérebro, o BDNF tem não somente um importante, como único papel na plasticidade sináptica e sua síntese é afetada pela atividade neuronal (Allen et al., 2013). Em particular, o BDNF mostrou ser essencial tanto para a integridade como para a plasticidade das conexões neuronais no SNC e é a mais estudada de todas as NTs (Bekinschtein et al., 2014; Callaghan e Kelly, 2012; Park and Poo, 2013).

Pesquisas de expressão de genes de NTs indicaram padrões de expressão diminuídos no cérebro humano. A expressão de BDNF alterada é descrita nos casos *pós-mortem* de pacientes esquizofrênicos (Issa et al., 2010; Ray et al., 2014; Weickert et al., 2003). Ambos os níveis de expressão da proteína BDNF e neurotrofina 3 (NT-3) foram aumentados nas áreas corticais e diminuíram no hipocampo (Durany et

al., 2001). Outro fator que aponta a importância dos fatores neurotróficos como BDNF e o NGF e suas vias de sinalização é a sua alteração em regiões cerebrais comprometidas por doenças neurodegenerativas e psiquiátricas como córtex, hipocampo e a glândula pituitária (Goedert et al., 1986; Hefti e Weiner, 1986; Maisonnier et al., 1991; Mariga et al., 2015).

1.4.2 NGF

O NGF é um fator importante para a sobrevivência, crescimento e manutenção de tipos específicos de neurônios tanto no SNC como no sistema nervoso periférico (SNP) (Allen et al., 2013). Foi primeiramente investigada há mais de 60 anos em estudos realizados por Levi-Montalcini e Hamburger em 1951. Este fator é sintetizado como um precursor, pró-NGF, o qual é clivado para produzir a sua forma ativa, fazendo parte da família de Cysteine Knot. Foi o primeiro a ser descoberto em 1998 por Yuen et al.

Sabe-se que o NGF é produzido no córtex e no hipocampo, os quais são alvos de projeções neuronais do *Cholinergic basal forebrain* alguns neurônios hipocámpais e estriatais (Allen et al., 2013). Estudo realizado por Chen et al. (1997) sugere a importância do NGF para a maturação entre a interação colinérgica- hipocampo, sendo esta relação uma das principais para o surgimento de alguns sintomas observados em pacientes com esquizofrenia, tais como o déficit de memória e cognitivo.

1.4.3 GDNF

A NT derivada da célula glial (GDNF) foi originalmente isolada a partir do sobrenadante de uma linhagem celular de glioma de rato e descobriu-se que tinha efeitos pronunciados sobre a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (Lin et al., 1993). Ela tem uma especificidade relativamente alta para os neurônios dopaminérgicos e, portanto, tem potencial significativo para o tratamento da Doença de Parkinson, que é predominantemente caracterizada por depleção progressiva das populações de células dopaminérgicas do mesencéfalo e também relacionando com alguns sintomas observados na esquizofrenia. Posteriormente, descobriu-se que o GDNF tem efeitos tróficos e protetores sobre neurônios noradrenérgicos no cérebro, bem como neurônios motores periféricos, aumentando o seu potencial terapêutico

na doença de *Huntington* e na esclerose lateral amiotrófica (Zurn et al., 1994, 1996; Arenas et al., 1995).

As análises da distribuição tecidual do mRNA de GDNF mostram que este é expresso no estriado e no músculo esquelético, os campos alvo para neurônios liberados da substância nigra dopaminérgica e neurônios motores, respectivamente, sugerindo que o GDNF atue como um fator neurotrófico derivado do alvo para esses neurônios (Allen et al., 2013).

O GDNF é um potente promotor da sobrevivência neuronal no SNC e SNP, e tem demonstrado ter efeitos em várias populações celulares, incluindo os gânglios sensoriais e autonômicos, células de *Purkinje* do cerebelo, neurônios do hipocampo, além de noradrenérgicos, serotoninérgicos e neurônios colinérgicos.

A sinalização das NTs através de seus receptores inicia várias vias de sinalização, as quais podem ser modificadas por uma série de critérios com resultados dependentes de células. A diversidade de seus efeitos pode ser observada pelo fato de que tanto o NGF como o BDNF são importantes na mediação da dor na periferia, bem como na comunicação colinérgico-hipocampal e na formação da memória no cérebro (Cheng e Stephen, 2013).

Diante disso, as NTs têm seu papel cada vez mais estudado em pesquisas relacionadas aos transtornos psiquiátricos. Portanto, investigar os níveis de neurotransmissores como a dopamina e de fatores neurotróficos nas estruturas cerebrais da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase gestacional apresenta extrema relevância, uma vez que ainda há carência de estudos. Ademais, levando-se em consideração que agressões ambientais no período pré-natal têm demonstrado afetar o neurodesenvolvimento da prole e que os mecanismos pelos quais estas alterações acontecem ainda permanecem obscuros, a presente pesquisa é justificada por auxiliar no avanço para uma melhor compreensão quanto aos fatores relacionados à fisiopatologia da esquizofrenia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os níveis de dopamina e de fatores neurotróficos em estruturas cerebrais de ratos *Wistar*, machos e fêmeas na fase adulta, submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante o período pré-natal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de dopamina em soro de ratas mães, as quais foram expostas a fumaça do cigarro durante a fase gestacional.
- Avaliar os níveis de dopamina em córtex frontal, hipocampo e estriado, da prole adulta machos e fêmeas submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase gestacional.
- Avaliar os níveis de BDNF, NGF e GDNF em córtex frontal, hipocampo e estriado, da prole adulta machos e fêmeas submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase gestacional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este estudo é considerado do tipo experimental, utilizando um modelo animal. Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 026/2016-1 (Anexo A). Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

Os procedimentos utilizados para realização deste protocolo foram realizados nas dependências do Laboratório Neurociências (Neurolab), pertencente à instituição de ensino UNESC. Todos os equipamentos, reagentes e drogas necessárias para o cumprimento deste estudo estiveram disponíveis ao proponente, não havendo critérios aparentes para suspensão ou encerramento da pesquisa.

Utilizaram-se ratos *Wistar*, machos e ratas fêmeas adultos, com aproximadamente 60 dias de vida, pesando em média 250g a 300g. Os animais foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponíveis e temperatura entre 22[±] 1° C.

3.2 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

O estudo utilizou um total de 40 ratas *Wistar* jovens virgens que serão mantidas cada uma com um rato *Wistar* macho para acasalamento durante sete dias. A partir do segundo dia de contato com o macho, as ratas foram separadas aleatoriamente em dois grupos, o grupo de mães controle (MC) (n=10), no qual os animais não receberam a fumaça de cigarro, e o grupo de mães expostas (ME), ou seja, que receberam a fumaça de cigarro (n=15).

As fêmeas permaneceram separadas desta forma até o último dia de gestação (21 dias). Durante todo este período as ratas do grupo cigarro foram expostas à inalação passiva da fumaça de cigarro 3 vezes ao dia (8h, 11h e 14h). Sendo que um número de 4 cigarros foi utilizado em cada exposição, totalizando 12 cigarros/dia. O cigarro escolhido neste protocolo foi o da marca comercial Marlboro® vermelho. Esta escolha

foi feita pelas características do produto, alcatrão (10mg), nicotina (0,8mg) e monóxido de carbono (10mg). Cada cigarro prosseguirá com um tempo de inalação de 6 minutos, com 1 minuto de intervalo entre cada queima (quando a exaustão era acionada). Totalizando 72 minutos de exposição à fumaça de cigarro por dia (Tabela 1).

O procedimento foi realizado utilizando-se uma câmara de acrílico com dimensões de 30X40X25 cm, localizada no interior de uma capela de exaustão. No compartimento foram colocadas 5 ratas por vez, para inalação da fumaça de cigarro. A fumaça será levada à câmara, por uma seringa de 60 ml, adaptada a uma entrada na mesma. O protocolo de exposição acima descrito bem como a escolha do tipo de cigarro foi feita com base em estudo anteriormente publicado pelo nosso grupo (Zugno et al., 2013).

Horários de exposição por dia	Qtde de cigarros por exposição	Tempo de exposição por cigarro (min)	Intervalo de exaustão entre cada cigarro (min)
08:00hs	4	6	1
11:00hs	4	6	1
14:00hs	4	6	1
TOTAL	12	72	3

Tabela 1: Protocolo da exposição à fumaça de cigarro (Fraga et al., 2013).
Fonte: do autor, 2017.

Após o período de gestação, os ratos filhotes machos e fêmeas foram mantidos junto à mãe para a amamentação por 21 dias. Em seguida, os filhotes foram submetidos ao desmame para serem utilizados na vida adulta.

3.3 CETAMINA

Após o desmame, a prole adulta permaneceu com alimentação e água disponíveis até completarem 60 dias de vida. Ao chegarem à fase adulta, esses animais foram divididos em 4 diferentes grupos (Tabela 2) para seguir o protocolo de indução do modelo animal de esquizofrenia.

GRUPOS
Filhote Controle + Salina i.p. (FC-sal)
Filhote Controle + Cetamina 25 mg/Kg i.p. (FC-cet)
Filhote Exposto + Salina i.p. (FE-Sal)
Filhote Exposto + Cetamina 25 mg/Kg i.p. (FE-cet)

Tabela 2: Separação dos animais por grupo de exposição à fumaça de cigarro no período pré-natal e dose para o tratamento com cetamina na fase adulta. Fonte: do autor, 2017.

A partir dessa divisão, o protocolo de injeções iniciou-se e os animais receberam salina ou cetamina (25 mg/kg), via intraperitoneal (i.p.), durante um período de sete dias (tratamento crônico) (Figura 1). A dose de cetamina foi preparada em solução salina no volume de 1ml/100g, conforme previamente descrito (Becker e Grecksch, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya et al., 2006; Canever et al., 2010). Estudos anteriores, inclusive do nosso laboratório, descreveram que diferentes doses subanestésicas de cetamina, em modelos animais, levam a sintomas análogos aos da esquizofrenia (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009), tais como hiperlocomoção, déficit na interação social e comprometimento cognitivo (Hunt et al., 2006; Canever et al., 2010; Gama et al., 2012; Zugno et al., 2016).

Trinta minutos após a última injeção de salina ou cetamina, os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais dissecadas em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, para posteriores análises bioquímicas.

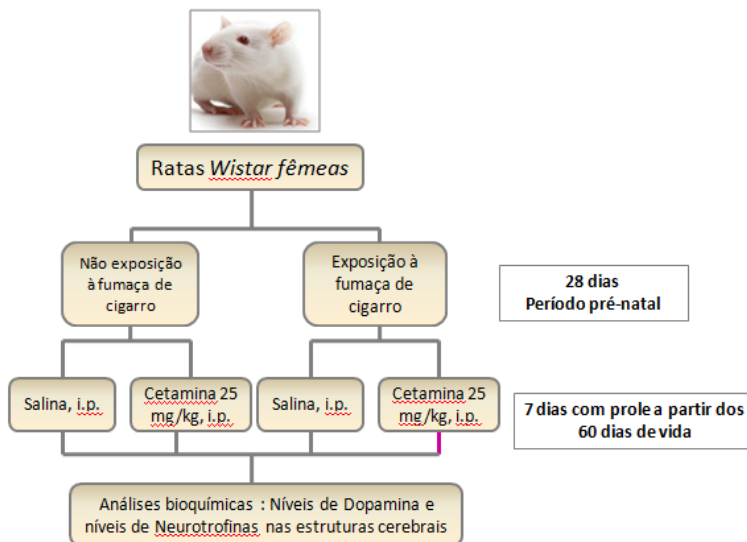


Figura 2: Desenho experimental – Foi utilizado um número de 25 ratas Wistar que estavam no período gestacional. Estas foram divididas em dois grupos distintos: Mães Controle (MC) que não foram expostas à fumaça de cigarro durante o período pré-natal, e Mães Expostas à fumaça de cigarro (ME). Os filhotes machos e fêmeas provenientes de MC e ME foram subdivididos em 4 diferentes grupos e receberão tratamento crônico (sete dias) com salina ou cetamina (25 mg/kg) via i.p. de acordo com seu respectivo grupo. Essa subdivisão será realizada aos 60 dias de vida da prole (fase adulta). Após a última injeção, os animais serão mortos por decapitação e as estruturas cerebrais dissecadas para as análises bioquímicas. Fonte: do autor, 2017.

Os animais utilizados neste experimento foram descartados, acondicionados em saco branco leitoso e conduzidos para o freezer (conservação) na Universidade. Posteriormente, serão coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos serão tratados fisicamente e em seguida encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Procedimentos realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.4 ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

3.4.1 Condições Cromatográficas para dosagem de monoaminas-CLAE

O método cromatográfico proposto por De Benedetto, et al (2014) com adaptações. A separação cromatográfica foi realizada com Coluna de fase reversa, Ascentis® C18 (250 mm x 2.1 mm 5 µm; Supelco®, USA), e sistema cromatográfico composto por uma bomba de distribuição da fase móvel LC-20AT acoplada a um autosampler SIL-20A_{HT}, e um detector de fluorescência RF-20A; Shimadzu (Kyoto, Japan), o software para aquisição de dados em cromatografia foi LCSolution. As amostras tiveram volume de injeção de 20 µL, com temperatura de análise de 35 °C. A taxa de bombeamento da fase móvel foi de 0,3 mL/min. A detecção por fluorescência, monitorados nos comprimentos de onda de excitação em 279 nm e de emissão 320 nm. O perfil da fase móvel foi isocrático: tampão acetato (pH 3,5, ácido acético 12 mM, 0,26 mM EDTA) e metanol (86:14, v/v). Os picos foram identificados e quantificados por comparação do seu tempo de retenção na solução da amostra com a da solução padrão, por meio de curva de calibração.

3.4.2 Níveis Cerebrais de BDNF, NGF e GDNF

Os níveis de BDNF, NGF e GDNF foram avaliados no córtex frontal, hipocampo, estriado, BO e medidos por ensaio imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Inc. – USA). Resumidamente, as estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão fosfato (PBS) com 1 mM de flúor fenilmetilsulfonil (PMSF) e etileno glicol 1mM bis (2aminoetil éter)-N, N, N'N' ácido tetra acético (EGTA). Placas de microtitulação (96 poços de fundo plano) foram revestidas por 24h com o anticorpo de captura. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com o reagente de lavagem (wash buffer) e, após, adicionado o reagente diluente por 1h. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e, em seguida, foram adicionadas as amostras e o padrão para realização da curva por 2h. As placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção (anti-BDNF e anti-NGF e anti-GDNF) por 2h em temperatura ambiente. Após a lavagem, adicionou-se a estreptavidina por 20 minutos, evitando-se o contato com a luz. Novamente, as placas foram lavadas e foi adicionada

a solução de substrato por mais 20 minutos, sendo que as placas foram guardadas no escuro. Após 20 minutos adicionou-se a solução de parada e finalmente foi realizada a leitura das placas em 450nm. A proteína total foi medida pelo método de Lowry (1951) usando soro albumina bovina como padrão.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos níveis de dopamina e padrões epigenéticos serão realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, acompanhada pelo post hoc *Tukey* quando F for significativo. Os dados serão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M).

Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos estatisticamente. Dois programas serão utilizados para a realização das análises estatísticas: *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) e o *software* Estatística 7.0.

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE DOPAMINA

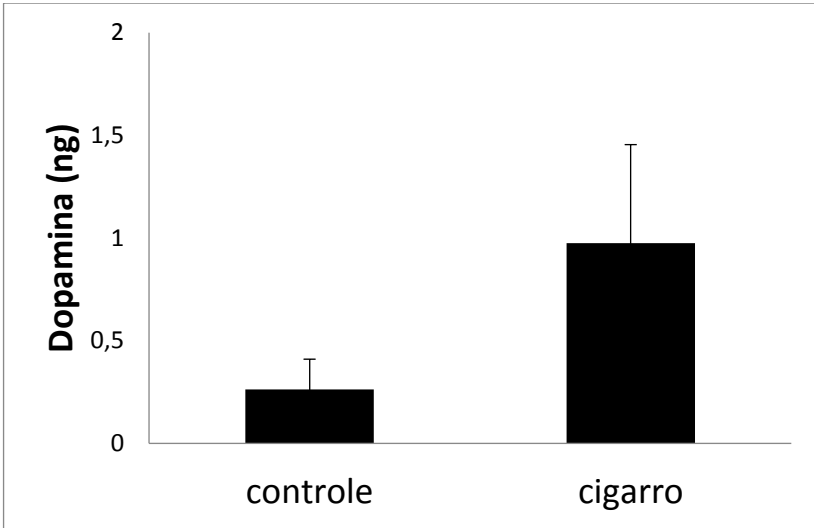


Figura 3: A figura 3 representa os níveis de dopamina sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro em ratas fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=3$.

A figura 3 representa os níveis de dopamina em soro das ratas fêmeas mães expostas (grupo cigarro) ou não expostas (grupo controle) à fumaça de cigarro durante o período gestacional. O teste *T de Student* demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos controle e cigarro. [$t(1,2)=1,42$ $p= 0,27$]

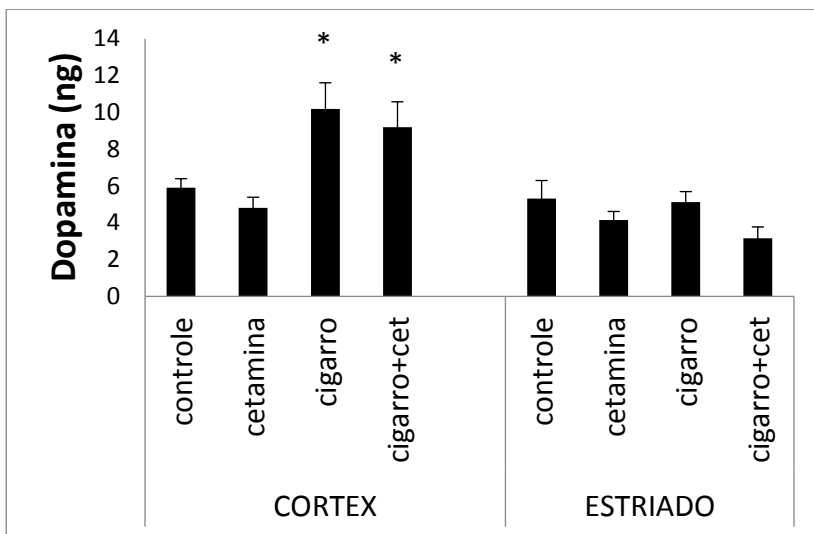


Figura 4: A figura 4 representa os níveis de dopamina sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratos machos. Os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). Fonte: do autor, 2017.

A figura 4 apresenta os resultados referentes aos níveis de dopamina nas estruturas cerebrais, córtex frontal e estriado, da prole adulta de machos cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. A prole adulta, machos e fêmeas, foi agrupada conforme os seguintes tratamentos: Grupo controle (salina); Grupo cetamina; Grupo cigarro e Grupo cigarro+cetamina. ANOVA de uma via demonstrou que houve diferença significativa entre os grupos cigarro e cigarro+cetamina [$F(3,19) = 6,86$ $p=0,003$] quando comparados ao grupo controle no córtex frontal e não revelou diferença na estrutura do estriado [$F(3,17) = 2,431$ $p=0,101$]. De fato, a Figura 4 indica que os animais machos adultos, tratados ou não com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase pré-natal apresentaram um aumento nos níveis de dopamina em relação ao grupo controle no córtex frontal. Contudo, no estriado, ANOVA de uma via não revelou nenhuma diferença estatística entre os grupos analisados.

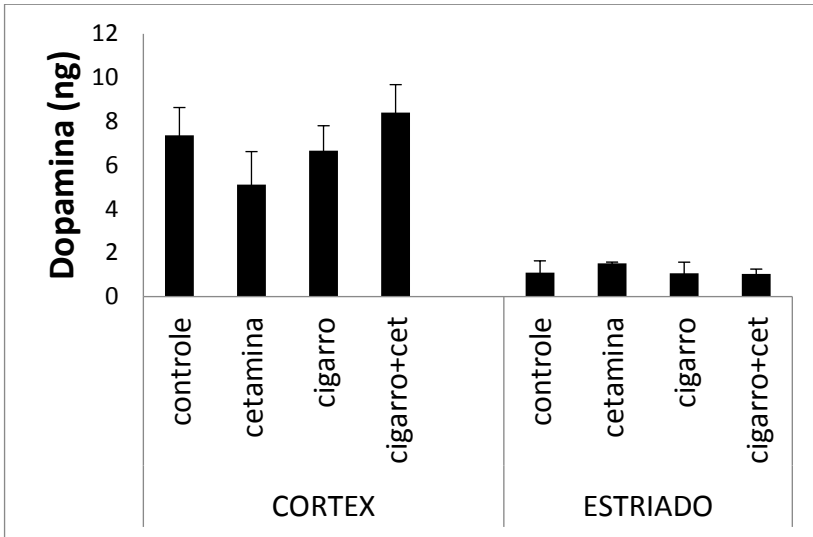


Figura 5: A figura 5 representa os níveis de dopamina sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratas fêmeas. Os valores foram expressos como média ± EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). Fonte: do autor, 2017.

A figura 5 retrata os níveis de dopamina nas estruturas cerebrais, córtex [F(3,14) = 1,033 $p = 0,408$], frontal e estriado [F(3,15) = 0,333 $p = 0,802$], da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina para os níveis de dopamina em ambas as regiões cerebrais avaliadas.

Em geral, os achados acima apontam que à exposição materna à fumaça de cigarro durante a gestação foi capaz de aumentar os níveis de dopamina apenas no córtex frontal da prole de ratos machos. Entretanto, no estriado, à exposição à fumaça de cigarro na fase pré-natal, bem como o tratamento com cetamina na prole adulta associado ou não à fumaça de cigarro, não foi capaz de alterar os níveis de dopamina na prole de machos e fêmeas adultos.

4.2 NÍVEIS DE BDNF

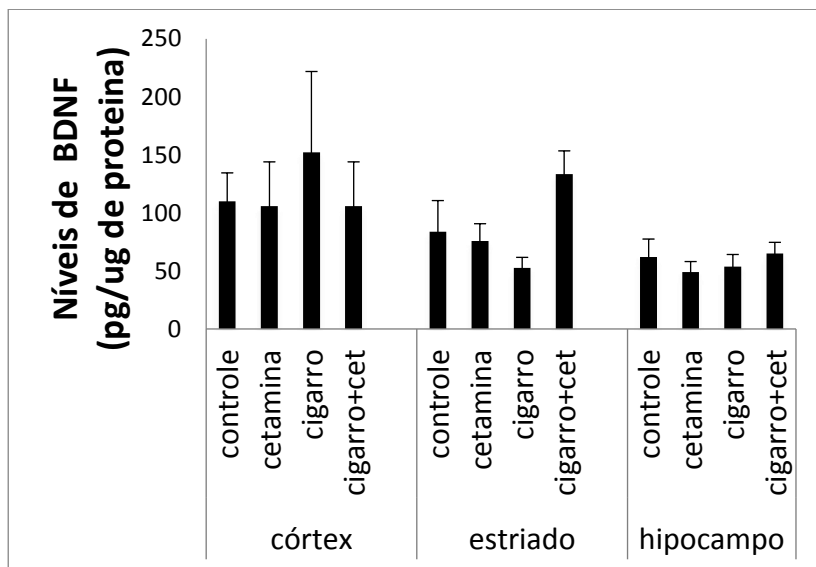


Figura 6: A figura 6 representa os níveis de neurotrofinas BDNF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratos machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal. Fonte: do autor, 2017.

A figura 6 representa os níveis de BDNF no córtex frontal [$F(3,18) = 0,242$ $p = 0,866$], estriado [$F(3,16) = 3,246$ $p=0,05$] e hipocampo [$F(3,18)=0,390$ $p=0,761$], respectivamente, da prole adulta de machos cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. ANOVA de uma via não revelou diferença estatística entre os grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina para os níveis de BDNF dos animais machos nas estruturas cerebrais avaliadas.

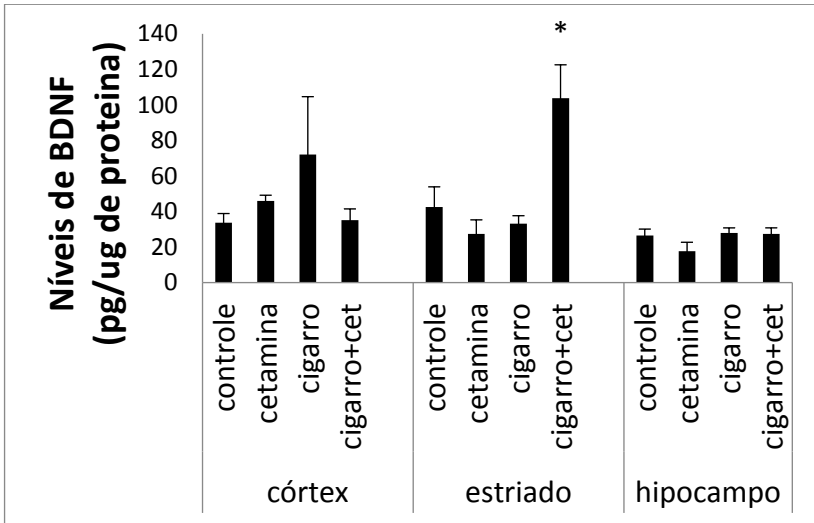


Figura 7: A figura 7 representa os níveis de neurotrofinas BDNF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratas fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes expostos + salina (FE-sal). FC-sal (filhotes controle tratados com salina), FC-cet (filhotes controle tratados com cetamina), FE-sal (filhotes expostos tratados com salina), FE-cet (filhotes expostos tratados com cetamina). Fonte: do autor, 2017.

Na Figura 7 são apresentados os níveis de BDNF no córtex frontal [$F(3,18) = 1,273$ $p=0,313$], estriado [$F(3,19) = 9,103$ $p=0,001$] e hipocampo [$F(3,18) = 1,554$ $p= 0,235$], respectivamente, da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. No estriado, foi observado um aumento significativo nos níveis de BDNF da prole adulta de fêmeas tratadas com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro (grupo cigarro+cetamina). Este achado foi comprovado por ANOVA de uma via, o qual demonstrou diferença estatística nos níveis desta NT para o grupo acima quando comparado ao grupo controle, sugerindo um possível efeito da exposição materna à fumaça de cigarro na fase pré-natal com a administração de cetamina na vida adulta da prole de fêmeas, apenas no estriado. Para as demais estruturas cerebrais analisadas, ANOVA de uma via revelou que não houve diferença

estatística entre os grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina na prole de ratas fêmeas.

4.3 NÍVEIS DE NGF

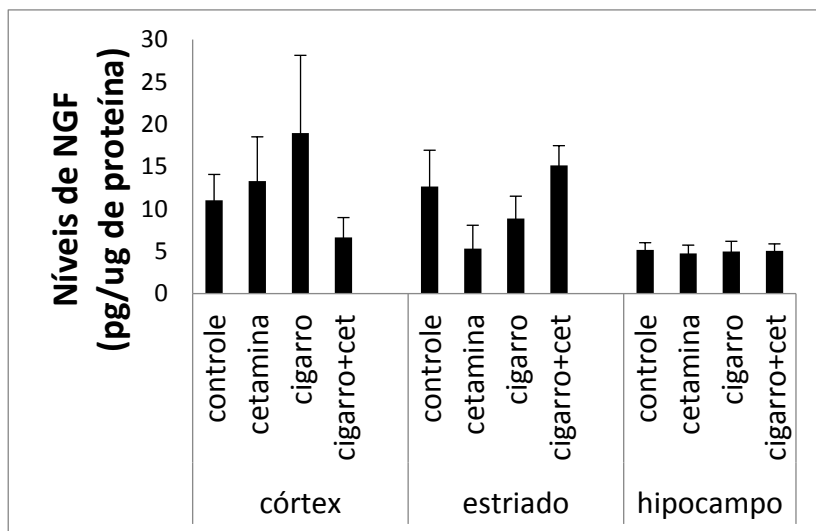


Figura 8: A figura 8 representa os níveis de neurotrofinas NGF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratos machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes expostos + salina (FE-sal). FC-sal (filhotes controle tratados com salina), FC-cet (filhotes controle tratados com cetamina), FE-sal (filhotes expostos tratados com salina), FE-cet (filhotes expostos tratados com cetamina). Fonte: do autor, 2017.

A figura 8 representa os níveis de NGF no córtex frontal [$F(3,16) = 0,832$ $p=0,496$], estriado [$F(3,17) = 1,901$ $p=0,168$] e hipocampo [$F(3,17) = 0,080$ $p=0,993$], respectivamente, da prole de machos adulta cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. ANOVA de uma via não apontou diferença significativa nos níveis de NGF para os ratos machos dos grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina nas três estruturas cerebrais avaliadas.

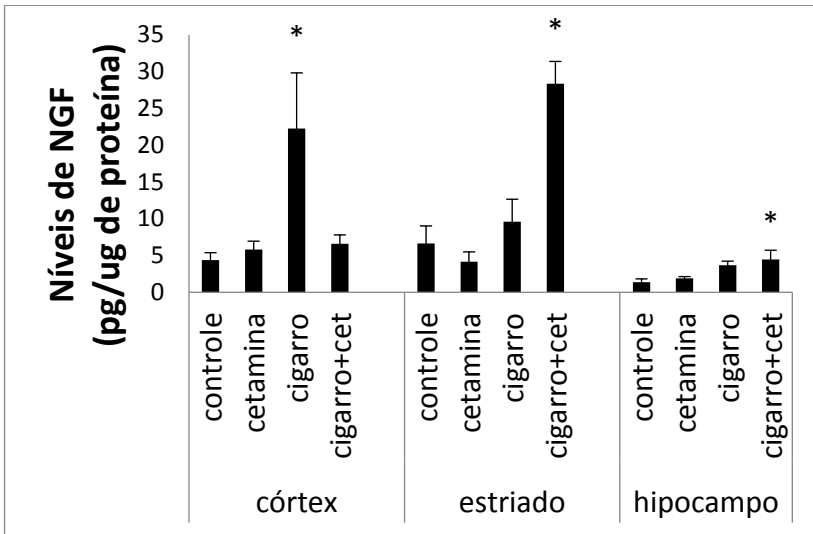


Figura 9: A figura 9 representa os níveis de neurotrofinas NGF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratas fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n=6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes expostos + salina (FE-sal). FC-sal (filhotes controle tratados com salina), FC-cet (filhotes controle tratados com cetamina), FE-sal (filhotes expostos tratados com salina), FE-cet (filhotes expostos tratados com cetamina). Fonte: do autor, 2017.

A figura 9 retrata os níveis de NGF no córtex frontal [$F(3,15) = 4,227$ $p = 0,023$], estriado [$F(3,20) = 18,71$ $p = 0,001$] e hipocampo [$F(3,17) = 3,891$ $p = 0,028$], respectivamente, na prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. No córtex frontal, ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos cigarro e controle. Isto indica que à exposição à fumaça de cigarro nas ratas mães durante a gestação foi capaz de aumentar os níveis de NGF na prole de fêmeas adultas, sugerindo um possível efeito da exposição materna à fumaça de cigarro na vida tardia destes animais. A prole adulta de fêmeas tratadas com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase pré-natal apresentaram um aumento significativo nos níveis de NGF no estriado e hipocampo. Tais

resultados foram comprovados por ANOVA de uma via, o qual demonstrou diferença estatística entre os grupos cigarro+cetamina em relação ao grupo controle, no estriado e hipocampo respectivamente.

4.4 NÍVEIS DE GDNF

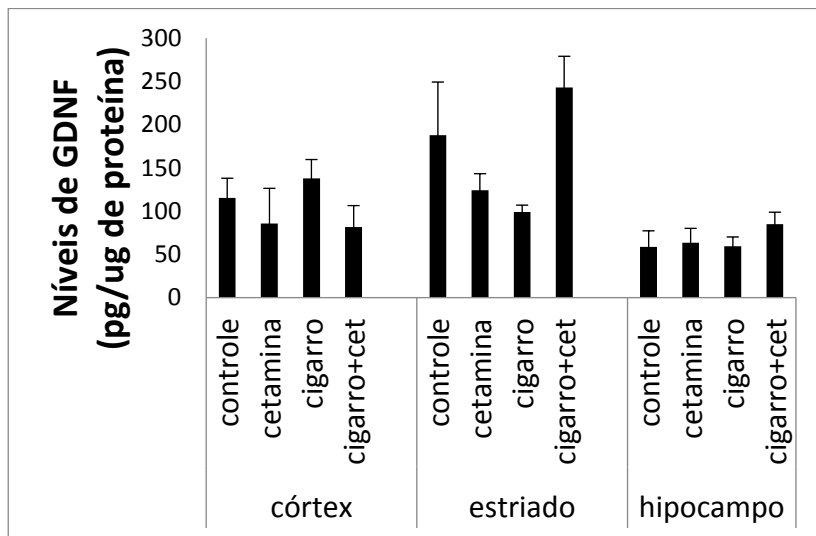


Figura 10: A figura 10 representa os níveis de neurotrofinas GDNF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratos machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes expostos + salina (FE-sal). FC-sal (filhotes controle tratados com salina), FC-cet (filhotes controle tratados com cetamina), FE-sal (filhotes expostos tratados com salina), FE-cet (filhotes expostos tratados com cetamina). Fonte: do autor, 2017.

A figura 10 representa os níveis de GDNF no córtex frontal [$F(3,12) = 0,869$ $p = 0,484$], estriado [$F(3,13) = 3,198$ $p = 0,059$] e hipocampo [$F(3,15) = 0,721$ $p = 0,555$], respectivamente, da prole de machos adulta cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. ANOVA de uma via não revelou qualquer diferença estatística nos níveis de GDNF para os animais dos grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina nas estruturas cerebrais avaliadas acima.

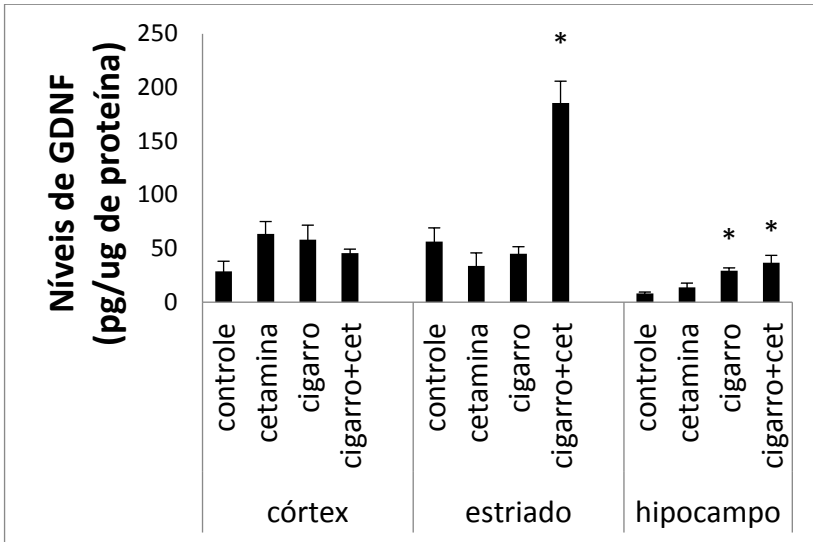


Figura 11: A figura 11 representa os níveis de neurotrofinas GDNF sobre o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) em ratas fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$, $n = 6$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes expostos + salina (FE-sal). FC-sal (filhotes controle tratados com salina), FC-cet (filhotes controle tratados com cetamina), FE-sal (filhotes expostos tratados com salina), FE-cet (filhotes expostos tratados com cetamina). Fonte: do autor, 2017.

Na Figura 11 são apresentados os níveis de GDNF no córtex frontal [$F(3,15) = 2,555$ $p = 0,094$], estriado [$F(3,13) = 21,91$ $p = 0,001$] e hipocampo [$F(3,17) = 10,681$ $p = 0,001$], respectivamente, da prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas ou não à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. No estriado e hipocampo, observou-se um aumento significativo nos níveis de GDNF nas ratas fêmeas adultas tratadas com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a gestação (grupo cigarro+cetamina). Este resultado foi comprovado por ANOVA de uma via, o qual revelou diferença estatística entre os grupos cigarro+cetamina e controle, no estriado e hipocampo respectivamente. No hipocampo, ANOVA de uma via também revelou que a prole adulta de fêmeas cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro (grupo cigarro) apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

Tais achados parecem sugerir que tanto a exposição materna à fumaça de cigarro isolada como associada à administração de cetamina na vida adulta das ratas fêmeas foi capaz de aumentar os níveis de GDNF em estruturas cerebrais, indicando um possível efeito de ambos fatores, isolados ou combinados, sobre os níveis desta NT na vida adulta das ratas fêmeas. Por fim, ANOVA de uma via não apontou nenhuma diferença significativa nos níveis de GDNF na prole de ratas fêmeas dos grupos controle, cetamina, cigarro e cigarro+cetamina no córtex frontal.

5 DISCUSSÃO

A esquizofrenia é considerada um transtorno debilitante que resulta da combinação de fatores hereditários e ambientais (Van Os et al., 2010). Com ênfase, este transtorno tem sido vinculado aos fatores estressantes ocorridos durante a vida intrauterina e o período pós-natal precoce (Weinberger, 1995; Cannon et al., 2002). Com a evolução do cérebro humano em relação a sua sensibilidade ao meio, o indivíduo possui uma flexibilidade comportamental mediante às alterações ambientais frequentes. Assim, o fator genético vem sendo associado às síndromes psicóticas intercedido por esta sensibilidade, uma vez que alguns eventos estressores, tais como o uso materno de substâncias tóxicas durante a gestação como o (cigarro), bem como a exclusão social na infância podem ter efeitos no neurodesenvolvimento e/ou desenvolvimento neuronal ao longo da vida e influenciar na fisiopatologia da esquizofrenia na vida jovem-adulta (Van Os et al., 2010).

Sabendo da associação entre fatores ambientais durante o período pré-natal e a susceptibilidade para o desenvolvimento da esquizofrenia, o presente estudo investigou os níveis de dopamina e fatores neurotróficos nas estruturas cerebrais de ratos *Wistar*, machos e fêmeas na fase adulta, submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante o período pré-natal.

Está bem descrito que a fumaça do cigarro contém compostos bioativos capazes de causar alterações no desenvolvimento cerebral e induzir mudanças neuroquímicas irreversíveis (Naeye, 1992; Slotkin, 1999). Alguns destes compostos são psicoativos (Rose, 2006), como é o caso da nicotina, a qual tem a capacidade de cruzar a barreira placentária e desencadear irregularidades no crescimento e no comportamento da prole (Vaglenova et al., 2008). O uso da nicotina durante a gestação tem um impacto negativo sobre a saúde materna e da prole. Em modelos animais, o uso da nicotina aumentou a resistência vascular e reduziu o fluxo de sangue intrauterino (Benowitz, 1991., Xiao et al., 2007). A utilização da nicotina como alternativa ao cigarro durante a gestação foi investigada por Pauly e colaboradores (2008). Os autores verificaram que a utilização da nicotina causou alterações em mediadores neuroquímicos como a dopamina, glutamato e também GABAérgicos e induziu um comportamento patológico na prole como déficit em memória espacial e tempo de reação.

Todavia, não se pode considerar apenas a nicotina como o único fator agravante da utilização do cigarro durante a gestação, haja vista que mais de 2500 outras substâncias diretamente tóxicas são encontradas em cigarros comuns, tais como amônia, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, cianeto de hidrogênio, cloreto de vinil e óxido de nitrogênio, dentre outras (Tuthill et al., 1999). Assim, tanto a mãe como a prole estão expostas a múltiplas potenciais toxinas quando o cigarro é utilizado durante a fase gestacional. Apesar disso, estudo realizado por Quinn e colegas (2017) demonstrou recentemente que a associação do uso de cigarro materno, isto é, durante todo o período pré e pós-natal não apresentou relação com o desenvolvimento de doenças mentais severas. No entanto, os autores acima enfatizam que o ambiente familiar é um importante fator de risco para o desenvolvimento de transtornos mentais na prole.

É sabido que o SNC se desenvolve rapidamente durante a vida pós-natal fetal e precoce. Dada a natureza dinâmica e vulnerável dos processos de desenvolvimento, este período de morfogênese provavelmente será sensível a agressões ambientais (Slotkin et al., 2002; Balsevich et al., 2014). Pouco se sabe sobre como a exposição prévia e precoce ao tabagismo pré e pós-natal influencia no desenvolvimento do cérebro. Todavia, estudos emergentes têm reforçado que os neurotransmissores estão alterados nos animais que foram expostos ao cigarro e também a adesivos de nicotina como uma alternativa ao cigarro (Slotkin et al., 2002; Slotkin et al., 2006; Parameshwaran et al., 2012).

Nesta perspectiva, o presente estudo observou que os ratos machos adultos tratados ou não com cetamina (modelo animal de esquizofrenia), cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase pré-natal apresentaram um aumento nos níveis de dopamina no córtex frontal. Este achado é consistente aos estudos realizados por (Slotkin et al. 2002; 2006) e (Parameshwaran et al. 2012), uma vez que não apenas os animais expostos diretamente ao cigarro apresentam alterações nos neurotransmissores, mas conforme verificado no presente estudo, a exposição materna à fumaça de cigarro durante a gestação, assim como a exposição das mães à fumaça de cigarro na fase pré-natal associada à administração de cetamina na vida adulta destes animais foi capaz de alterar os níveis de dopamina na prole adulta de machos, demonstrando um efeito persistente do cigarro na vida tardia destes animais.

Está bem descrito que a cetamina, um antagonista do receptor NMDA, é usada para fins anestésicos, terapêuticos e, ainda, como uma droga de abuso (Morgan et al., 2012). Evidências recentes sugerem que a

cetamina pode não apenas afetar os sistemas de glutamato, mas também atuar sobre os receptores nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Niester et al., 2014), o que justifica ao menos em parte, o aumento dos níveis de dopamina nos animais deste estudo (grupo cigarro e grupo cigarro+cetamina), cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a gestação. Ademais, já foi demonstrado por Moylan et al. (2013) e Zugno et al. (2017) que o uso materno de cigarro durante a fase gestacional, bem como no período pós-natal (Wu et al., 2016) pode contribuir para a fisiopatologia de possíveis transtornos psiquiátricos e doenças mentais na vida adulta da prole.

Adicionalmente, o mesmo grupo revelou que o cigarro durante o período pré-natal pode afetar o comportamento e as estruturas colinérgicas cerebrais durante a idade adulta da prole (Zugno et al., 2017). De fato, esta pesquisa de Zugno et al., 2017 demonstrou que a exposição materna à fumaça de cigarro durante a fase gestacional associada à administração de cetamina na prole adulta foi capaz de induzir sintomas positivos (hiperlocomoção), negativos (aumentou o tempo de latência para o primeiro contato entre os animais no teste de interação social) e déficits cognitivos, evidenciados através do teste de esQUIVA inibitória (déficit na memória de trabalho, de curto e longo prazo) e do teste de inibição por pré-pulso do reflexo de sobressalto (IPP – déficit no filtro sensorio-motor). Adicionalmente, Zugno e colaboradores (2017) observaram alterações bioquímicas induzidas pela exposição materna à fumaça de cigarro na fase pré-natal no cérebro da prole adulta submetida ao modelo de esQUIZOFRENIA. Verificaram um aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex, hipocampo e estriado, bem como um aumento na atividade da colina acetiltransferase (ChAT) no córtex e estriado.

De fato, os resultados de Zugno et al. (2017) sugerem que a fase de desenvolvimento pré-natal sofre influências provenientes de agressões ambientais, como o tabagismo no período gestacional. Fatores de risco ambiental podem desencadear alterações na atividade enzimática, essencial para o desenvolvimento normal do SNC do feto, bem como gerar alterações comportamentais na fase adulta, possivelmente devido a modificações neuroquímicas presentes no transtorno. Porém, estas alterações neuroquímicas e comportamentais não são ainda completamente entendidas, justificando novos estudos e a análise de outros marcadores que possam contribuir com o aprofundamento de resultados já existentes.

Seguindo esse mesmo modelo, o estudo atual avaliou os níveis de BDNF, NGF e GDNF nas estruturas cerebrais, córtex frontal,

hipocampo e estriado, da prole adulta submetida ao modelo animal de esquizofrenia, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase gestacional. Os fatores neurotróficos são importantes moléculas sinalizadoras durante os estágios de neurodesenvolvimento, sendo algumas de suas funções a proliferação, diferenciação e migração cerebral. Além disso, as NTs influenciam à saúde neuronal e a manutenção sináptica, não só na fase neurodesenvolvimental, mas durante a vida adulta (Rybakowski et al., 2008). Os resultados da presente pesquisa para os níveis de BDNF, NGF e GDNF nas estruturas cerebrais, córtex frontal, estriado e hipocampo da prole adulta de machos cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro na fase gestacional não apontou qualquer achado significativo. Entretanto, para a prole de fêmeas tratadas com cetamina na vida adulta, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a gestação (grupo cigarro+cetamina), foi observado um aumento significativo nos níveis das três NTs (BDNF, NGF e GDNF) avaliadas, particularmente no estriado e hipocampo destes animais.

Os achados acima para as ratas fêmeas adultas podem sugerir uma tentativa de compensação de algum dano causado previamente nestes animais, uma vez que alterações nos níveis de NTs podem produzir efeitos duradouros sobre os processos neurotróficos (número de neurônios e sinapses) que influenciam a maturação neuronal e a plasticidade na vida tardia (Vicario-Abejón et al., 2002). Além disso, fatores estressores durante a gestação, como o tabagismo, podem causar modificações nos níveis de NTs e predispor o aparecimento de transtornos psiquiátricos na prole adulta (Dammann et al., 2002; Shintani, 1999).

Wu e colaboradores (2016) verificaram que mesmo após a exposição à fumaça do cigarro durante o período pós-natal, a expressão gênica de NGF e a expressão da sua proteína foram aumentadas em tecidos pulmonares e líquido alveolar, respectivamente. Ainda corroborando com estes resultados, um estudo realizado por Xiao e colegas (2015) procurou encontrar o período em que o cérebro está mais suscetível a alterações que podem ser causadas pela fumaça do cigarro, apesar da utilização de diferentes protocolos para a exposição à fumaça do cigarro, os resultados encontrados por Xiao corroboram com os do presente estudo na prole adulta de machos mostrando alterações não significativas nos níveis de BDNF em córtex frontal e hipocampo.

Urrego e colegas (2009) relacionaram o uso crônico da nicotina com os níveis de NGF e, após a realização dos protocolos, tanto a expressão de NGF quanto a expressão de seu receptor aumentaram em tecidos

pulmonares. Apesar da maioria dos estudos realizados com nicotina avaliarem os níveis de NGF nas vias aéreas, pelo fato do tabagismo estar relacionado ao aparecimento da asma, a pesquisa de Urrego e colegas (2009) vem ao encontro dos achados do presente estudo, uma vez que os níveis de NGF também aumentaram no córtex frontal e hipocampo da prole adulta de fêmeas tratadas com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro na fase pré-natal (grupo cigarro+cetamina).

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que o GDNF promove o desenvolvimento de neurônios e desempenha um papel importante na patogênese de distúrbios do humor (Barbosa et al., 2011; Tunca et al., 2014; Tunca et al., 2015). Portanto, quanto aos níveis de GDNF avaliados neste estudo foi observado um aumento deste marcador no estriado e hipocampo de ratas fêmeas adultas do grupo cigarro+cetamina, bem como nas ratas fêmeas do grupo cigarro, porém apenas no hipocampo.

De modo geral, os resultados encontrados no presente estudo para a prole adulta de machos e fêmeas diferiram, tanto nos níveis de dopamina, como nas NTs. Foi observado que os animais machos adultos, tratados ou não com cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro durante a fase pré-natal apresentaram um aumento nos níveis de dopamina no córtex frontal, enquanto a prole de ratas fêmeas não apresentou alterações neste marcador bioquímico. Todavia, para as NTs, verificou-se um aumento significativo nos níveis de BDNF, NGF e GDNF, em especial, nas ratas fêmeas dos grupos cigarro e cigarro+cetamina, principalmente no estriado e hipocampo destes animais.

Neste sentido, Weinstock (2007) e Schwendener et al. (2009) reforçam que os gêneros podem diferir quanto à sensibilidade das áreas cerebrais em desenvolvimento e aos hormônios do estresse, manifestando diferentes respostas mediante à exposição de uma mesma situação estressora.

Em geral, Weinstock (2007) confirma que a presença de um agente estressor na fase gestacional é capaz de comprometer o desenvolvimento do sistema límbico e do eixo HPA fetal, resultando em comportamento ansiogênico e depressivo, além de déficits de aprendizagem e atenção na vida tardia da prole. No entanto, ressalta que tais características variam conforme o gênero (sexo), intensidade e momento em que a mãe sofre o estresse (fase pré ou pós-natal).

Sabe-se que o estresse materno aumenta os níveis de corticosterona no cérebro-fetal, diminui a testosterona no feto e a atividade da aromatase

cerebral em homens e, ainda, altera a atividade das catecolaminas no cérebro das fêmeas. Assim, os déficits de aprendizagem, as reduções na neurogênese hipocampal, na potenciação de longa duração (LTP) e na densidade das espinhas dendríticas no córtex pré-frontal são mais facilmente observados em homens com ansiedade pré-natal, enquanto a ansiedade, a depressão e o aumento da resposta do eixo HPA para o estresse são mais prevalentes em mulheres. Estes achados parecem sugerir que os machos são mais vulneráveis ao estresse pré-natal, o que implica em déficits cognitivos na vida tardia, enquanto as fêmeas são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos afetivos quando expostas ao estresse pós-natal ou ao estresse no decorrer da vida (Weinstock, 2007).

Deste modo, os achados acima podem, ao menos parcialmente, explicar a divergência dos resultados entre machos e fêmeas no presente estudo. O aumento dos níveis de dopamina na prole de machos pode estar relacionado ao fato de que este gênero tende a ser mais vulnerável ao estresse pré-natal, o que justifica essa pior resposta dos níveis de dopamina nestes animais. Todavia, o aumento dos níveis de fatores neurotróficos (BDNF, NGF, GDNF) nas ratas fêmeas adultas, pode ser explicado como uma ação neuroprotetora, visto que as fêmeas são mais propensas ao estresse pós-natal ou ao estresse no decorrer da vida e, portanto, responderam melhor ao estresse materno gerado durante a fase gestacional.

Em adição, estudos têm demonstrado que pacientes do sexo feminino com esquizofrenia tendem a ter um curso mais benigno e melhores resultados do que os homens. Uma explicação proposta é a influência diferencial dos hormônios sexuais masculinos e femininos, incluindo estrogênio, progesterona, testosterona e desidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (DHEAS). Esse benefício pode ser mediado por seus efeitos em neurotransmissores e neuroproteção. Além dos níveis alterados de estrogênio e DHEA / DHEAS em pacientes do sexo feminino, os dados são discrepantes nas diferenças hormonais entre pacientes e controles (Silva e Ravidran, 2015).

No entanto, estudos têm verificado uma correlação, principalmente negativa entre os níveis de estrogênio e a gravidade dos sintomas da esquizofrenia em ambos os gêneros e, uma correlação positiva entre os níveis de estrogênio e a neurocognição, principalmente em mulheres (Canuso et al., 2002). De modo geral, os dados sobre o impacto dos hormônios sexuais no curso clínico ou como tratamento para a esquizofrenia são limitados, entretanto, o estrogênio tem uma maior

evidência de influência positiva e benefício clínico (Di Michele et al., 2005; Gallagher et al., 2007; Yildirim et al., 2011).

Han et al. (2012) comparou pacientes esquizofrênicos homens e mulheres com controles positivos e observou que os homens apresentaram um maior déficit cognitivo quando comparado às mulheres, porém apenas neste parâmetro. Outros fatores que têm sido levados em consideração para explicar esta possível diferença entre machos e fêmeas são fatores genéticos (Han et al., 2012). Chase et al. (2015) verificaram que pacientes homens expressaram níveis mais altos de $G9\alpha$, SETDB1 mRNA e H3K9me2, os quais são fatores genéticos relacionados ao maior surgimento de sintomas da esquizofrenia juntamente com a pré-disposição do desenvolvimento de transtornos. Tudo isso leva à compreensão de que os machos têm maior apresentação dos sintomas e, ainda, uma pior qualidade de vida (Chase et al., 2015).

Diante de tudo, considerando que diferentes trabalhos enfatizam o possível envolvimento e alteração da dopamina, bem como das neutrofinas na esquizofrenia, as diferenças observadas no presente estudo entre a prole de animais machos e fêmeas adulta para estes marcadores podem estar relacionadas às respostas distintas de gênero ao tabagismo pré-natal, uma vez que machos e fêmeas podem manifestar diferentes respostas mediante à exposição de uma mesma situação estressora.

6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou os níveis de dopamina nas mães e prole adulta e também níveis neuroquímicos de neurotrofinas da prole adulta de ratas Wistar submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina, cujas mães foram expostas à fumaça de cigarro no período pré-natal. Pode-se concluir que a exposição à fumaça do cigarro seguido do protocolo de indução a esquizofrenia utilizando a cetamina mostrou alterações nos níveis de dopaminas em córtex de ratos machos dos grupos Cigarro e cigarro+cetamina, e também alterações em ratas fêmeas quando analisado neurotrofinas, para BDNF tivemos alterações no grupo cigarro+cetamina no estriado, NGF tivemos alterações no grupo cigarro no córtex, no estriado e hipocampo tivemos alterações no grupo cigarro+cetamina para níveis de GDNF tivemos alterações no estriado no grupo cigarro+cetamina, e no hipocampo nos grupos cigarro e cigarro+cetamina.

Diante disso e de estudos citados acima, enfatiza-se a necessidade de novos estudos que possam ajudar a compreender a natureza destes resultados, outros parâmetros podem ser avaliados como padrões epigenéticos principalmente pela diferença entre os sexos que foram visualizadas neste trabalho, uma exploração da cascata de liberação da dopamina como expressão de seu receptor, dopamina pré e pós sináptica, todos estes devem ser investigados para um melhor entendimento da participação do cigarro durante o período gestacional e da cetamina no aparecimento da esquizofrenia.

REFERENCIAS

- Abi-Dargham A1, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry*. 2005; 20(1):15-27.
- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE, Jr., Jones EG. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*. 1995; 52(4):258-66.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Pael NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology and Therapeutics*. 2013; 138(2):155-75.
- Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibáñez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*. 1995; 15(6):1465-73.
- Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(3):194-205.
- Aubele T, Kritzer MF. Androgen influence on prefrontal dopamine systems in adult male rats: localization of cognate intracellular receptors in medial prefrontal projections to the ventral tegmental area and effects of gonadectomy and hormone replacement on glutamate-stimulated extracellular dopamine level. *Cereb Cortex*. 2012; 22(8):1799-812.
- Ayhan Y, Abazyan B, Nomura J, Kim R, Ladenheim B, Krasnova IN, Sawa A, Margolis RL, Cadet JL, Mori S, Vogel MW, Ross CA, Pletnikov MV. Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2011; 16(3):293-306.
- Azam L, Chen Y, Leslie FM. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*. 2007; 144(4):1347-60.
- Badea A, Ali-Sharief AA, Johnson GA. Análise morfológica do cérebro do mouse C57BL / 6J. *Neuroimagem*. 2007; 37(3): 683-93.

Baguelin-Pinaud A, Robert S, Ménard JF, Thibaut F. Prenatal exposure to tobacco and risk for schizophrenia: a retrospective epidemiological study. *Compr Psychiatry*. 2010 51(2):106-9.

Balsevich G, Poon A, Goldowitz D, Wilking JA. The effects of pre- and post-natal nicotine exposure and genetic background on the striatum and behavioral phenotypes in the mouse. *Behav Brain Res*. 2014; 266:7-18.

Barros MC, Mitsuhiro SS, Chalem E, Laranjeira RR, Guinsburg R. Prenatal tobacco exposure is related to neurobehavioral modifications in infants of adolescent mothers. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66:1597-1603.

Becker A, Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004; 28(8):1267-77.

Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF e processamento de memória. *Neurofarmacologia*. 2014; 76:677-83.

Bellon A, Krebs MO, Jay MT. Factoring neurotrophins into a neurite-based pathophysiological model of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*. 2011; 94(1):77-90.

Bellon A. New genes associated with schizophrenia in neurite formation: a review of cell culture experiments. *Mol Psychiatry*. 2007; 12(7):620-9.

Benowitz DaD, Robert L Goldenberg, John R Hughes, Patricia Dolan-Mullen PLO, Cheryl Oncken, C Tracy Orleans, Theodore a Slotkin HPW, Jr, Sumner Yaffe. The use of pharmacotherapies for smoking cessation during pregnancy. *Tobacco Control*. 2000; 9:91-4.

Benowitz NL. Nicotine replacement therapy during pregnancy. *JAMA*. 1991; 266:3174

Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev*. 1998; 28:309-369.

Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK. Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1527-43.

Boulay D, Bergis O, Avenet P, Griebel G. The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(2):416-27.

Bowie CR, Harvey PD. Schizophrenia from a neuropsychiatric perspective. *Mt Sinai J Med*. 2006; 73(7):993-8.

Brixey SN, Gallagher BJ, 3rd, Mcfalls JA, Jr., Parmelee LF. Gestational and neonatal factors in the etiology of schizophrenia. *J Clin Psychol*. 1993; 49(3):447-56.

Brooks JM, Sarter M, Bruno JP. Transient inactivation of the neonatal ventral hippocampus permanently disrupts the mesolimbic regulation of prefrontal cholinergic transmission: implications for schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2011; 36(12):2477-87.

Brown AS, Susser ES. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2008; 34(6):1054-63.

Callaghan CK, Kelly ÁM. Sinalização BDNF diferencial no giro dentado e no córtex peririnal durante a consolidação da memória de reconhecimento no rato. *Hipocampo*. 2012; 22(11):2127-35.

Canever L, Oliveira L, D'altoe De Luca R, Correa PT, De BFD, Matos MP, Scaini G, Quevedo J, Streck EL, Zugno AI. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(6):421-7.

Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry*. 2002; 159(7):1080-92.

Clarke MC, Tanskanen A, Huttunen M, Whittaker JC, Cannon M. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2009; 166(9):1025-30.

Cornelius MD, De Genna NM, Leech SL, Willford JA, Goldschmidt L, Day NL. Effects of prenatal cigarette smoke exposure on neurobehavioral outcomes in 10-year-old children of adolescent mothers. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33:137-144.

Cornelius MD, Goldschmidt L, Day NL. Prenatal cigarette smoking: Long-term effects on young adult behavior problems and smoking behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 34:554-559.

Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage and cognitive limitation in children born preterm. *Mental Retardation and Developmental Disabilities.* 2002; 8:46–50.

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, De Nuccio F, La Pesa V. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2014; 98:266-70.

De Oliveira L, Spiazzi CM, Bortolin T, Canever L, Petronilho F, Mina FG, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Zugno AI. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 33(6):1003-8.

de Olmos S, Bueno A, Bender C, Lorenzo A, de Olmos J. Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat. *Brain Struct Funct.* 2008; 213(1-2):229-38.

Dehmelt L, Halpain S. Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol.* 2004; 58(1):18-33.

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1988; 8(4):1454-68.

Durany N, Michel T, Zöchling R, Boissl KW, Cruz-Sánchez FF, Riederer P, Thome J. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr Res.* 2001; 52(1-2):79-86.

Elmasry H, Goodwin RD, Terry MB, Tehranifar P. Early life exposure to cigarette smoke and depressive symptoms among women in midlife. *Nicotine Tob Res.* 2014; 16(10):1298-306.

Elsworth JD, Groman SM, Jentsch JD, Valles R, Shahid M, Wong E, Marston H, Roth RH. Asenapine effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology.* 2012; 62(3):1442-52.

Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Jons PH, Cohen RM. DOPA decarboxylase activity in attention deficit hyperactivity disorder adults. A [fluorine-18]fluorodopa positron emission tomographic study. *J Neurosci.* 1998; 18:5901-5907.

Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull.* 2009; 35(3):528-48.

Foerster A, Lewis SW, Owen MJ, Murray RM. Low birth weight and a family history of schizophrenia predict poor premorbid functioning in psychosis. *Schizophr Res.* 1991; 5(1):13-20.

Fraga DB, Deroza PF, Ghedim FV, Steckert AV, De Luca RD, Silverio A, Cipriano AL, Leffa DD, Borges GD, Quevedo J, Pinho RA, Andrade VM, Dal-Pizzol F, Zugno AI. Prenatal exposure to cigarette smoke causes persistent changes in the oxidative balance and in DNA structural integrity in rats submitted to the animal model of schizophrenia. *Journal of psychiatric research.* 2011; 45(11):1497-503.

Freeman TP, Stone JM, Orgaz B, Noronha LA, Minchin SL, Curran HV1. Tobacco smoking in schizophrenia: investigating the role of incentive salience. *Psychol Med.* 2014; (10):2189-97.

Gilmore JH, Schmitt JE, Knickmeyer RC, Smith JK, Lin W, Styner M, Gerig G, Neale MC. Genetic and environmental contributions to neonatal brain structure: A twin study. *Hum Brain Mapp.* 2010; 31(8):1174-82.

Goedert M, Fine A, Hunt SP, Ullrich A. Nerve growth factor mRNA in peripheral and central rat tissues and in the human central nervous system: lesion effects in the rat brain and levels in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1986; 387(1):85-92.

Goto Y, O'donnell P. Delayed mesolimbic system alteration in a developmental animal model of schizophrenia. *J Neurosci.* 2002; 22(20):9070-7.

Gould E, Woolley CS, Frankfur M, McEwen BS. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 1990; 10:1286–1291.

Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais.* 5.ed. São Paulo: Lemos, 1999, p.96

Gur, R.E. et al. Neuropsychological functioning in siblings discordant for schizophrenia and healthy volunteers. *Arch. Gen. Psychiat.* 1994, 51, 651–660.

Hajszan T1, MacLusky NJ, Leranth C. Role of androgens and the androgen receptor in remodeling of spine synapses in limbic brain areas. *Horm Behav.* 2008; 53(5):638-46.

Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 2005; 10(1):40-68.

Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32(3):514-21.

Haukvik UK, Lawyer G, Bjerkan PS, Hartberg CB, Jonsson EG, Mcneil T, Agartz I. Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *Journal of psychiatric research.* 2009; 43(16):1287-93.

Hietala J, Syvälahti E, Vuorio K, Rääköläinen V, Bergman J, Haaparanta Ml. Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. *Lancet* 1995; 346:1130.

Hoang U, Stewart R, Goldacre MJ. Mortality after hospital discharge for people with schizophrenia or bipolar disorder: retrospective study of linked English hospital episode statistics, 1999-2006. *Bmj.* 2011; 13(343).

Howes O, McCutcheon R2, Stone J2. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J Psychopharmacol*. 2015; 29(2):97-115.

Howes OD, Kambeitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment: meta-analysis of imaging studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 69:776–786.

Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull*. 2009; 35:549–562.

Howes OD, Montgomery AJ, Asselin MC, Murray RM, Valli I, Tabraham P, Bramon-Bosch E, Valmaggia L, Johns L, Broome M, McGuire PK, Grasby PM. Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. *Arc Gen Psychiatry*. 2009; 66(1):13-20.

Hunt MJ, Raynaud B, Garcia R. Ketamine dose-dependently induces high-frequency oscillations in the nucleus accumbens in freely moving rats. *Biol Psychiatry*. 2006; 60(11):1206-14.

Imre G, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ. Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull*. 2006; 69(3):338-45.

Issa L, Wilson C, Terry AV Jr, Pillai Uma. Uma relação inversa entre os níveis de cortisol e BDNF na esquizofrenia: dados de estudos pós-morte e animal em humanos. *Neurobiol Dis*. 2010; 39(3):327-33.

Javitt DC, Shelley AM, Silipo G, Lieberman JA. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57(12):1131-7.

Javitt DC. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(11):984-97,979.

Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 2010; 47(1):4-16.

Javitt, D.C. Glutamate and Schizophrenia: Phencyclidine, N-Methyl-d-Aspartate Receptors, and Dopamine–Glutamate Interactions. *Int rev neurobiol.* 2007; 78:69-108.

Keshavan MS, Nasrallah HA, Tandon R. Schizophrenia, "Just the Facts" 6. Moving ahead with the schizophrenia concept: from the elephant to the mouse. *Schizophr Res.* 2011; 127(1-3):3-13.

Kretschmer BD. Modulation of the mesolimbic dopamine system by glutamate: role of NMDA receptors. *J Neurochem.* 1999; 73(2):839-48.
Lara DR, Dall'igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30(4):617-29.

Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Martin JR, Jenck F, Moreau JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol.* 2000; 11(3-4):257-68.

Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology.* 2002; 27(1):1-11.

Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res.* 2007; 1156:152-6

Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool.* 1951; 116(2):321-61.

Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000; 28(2):325-34.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993; 260(5111):1130-2.

Locklear MN, Cohen AB, Jone A, Kritzer MF. Sex Differences Distinguish Intracortical Glutamate Receptor-Mediated Regulation of

Extracellular Dopamine Levels in the Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Cereb Cortex*. 2016; 26(2):599-610.

Lotharius J, Brundin P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3:932-942.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-7.

Maisonpierre PC, Le Beau MM, Espinosa R 3rd, Ip NY, Belluscio L, de la Monte SM, Squinto S, Furth ME, Yancopoulos GD. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics*. 1991; 10(3):558-68.

Marengo S1, Weinberger DR. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol*. 2000; 12(3):501-27.

Mariga A, Zavadil J, Ginsberg SD, Chao MV. Withdrawal of BDNF from hippocampal cultures leads to changes in genes involved in synaptic function. *Dev Neurobiol*. 2015; 75(2):173-92.

Marsman A, Van Den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE. Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of (1)H-MRS studies. *Schizophr Bull*. 2013; 39(1):120-9.

Matricon J, Bellon A, Frieling H, Kebir O, Le Pen G, Beuvon F, Daumas-Duport C, Jay TM, Krebs MO. Neuropathological and Reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia. *PLoS One*. 2010; 5(4):e10291.

Mechri A, Saoud M, Khiari G, D'amato T, Dalery J, Gaha L. [Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine]. *Encephale*. 2001; 27(1):53-9.

Mehta SH, Morgan JC, Sethi KD. Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology, and clinical scales of assessment. *CNS Spectr*. 2008; 13:6-11.

Meyer U, Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 2010; 90(3):285-326.

Miyamoto S, Lamantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv.* 2003; 3(1):27-39.

Moylan S, Jacka FN, Pasco JA, Berk M. How cigarette smoking may increase the risk of anxiety symptoms and anxiety disorders: a critical review of biological pathways. *Brain Behav.* 2013; 3(3):302-26.

Moylan S, Jacka FN, Pasco JA, Berk M, Zugno AI, Oliveira MB, Mastella GA, Heylmann AS, Canever L, Pacheco FD, Damazio LS, Citadin SA, de Lucca LA, Simões LR, Malgarin F, Budni J, Barichello T, Schuck PF, Quevedo J. Increased risk of developing schizophrenia in animals exposed to cigarette smoke during the gestational period. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017; 75:199-206.

Naeye RL. Cognitive and behavioral abnormalities in children whose mothers smoked cigarettes during pregnancy. *J Dev Behav Pediatr.* 1992; 13(6):425-8.

Nagai T, Ibi D, Yamada K. Animal model for schizophrenia that reflects gene-environment interactions. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34(9):1364-8.

Obeso JA1, Merello M, Rodríguez-Oroz MC, Marin C, Guridi J, Alvarez L. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol.* 2007; 84:185-218.

O'donnell P. Adolescent onset of cortical disinhibition in schizophrenia: insights from animal models. *Schizophr Bull.* 2011; 37(3):484-92.

Parameshwaran K, Buabeid MA, Karuppagounder SS, Uthayathas S, Thiruchelvam K, Shonesy B, Dityatev A, Escobar MC, Dhanasekaran M, Suppiramaniam V. Developmental nicotine exposure induced alterations in behavior and glutamate. *Brain Behav.* 2013; 3(3):302-26.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14(1):7-23.

Pauly JR, Slotkin TA. Maternal tobacco smoking, nicotine replacement and neurobehavioural development. *Acta Paediatr.* 2008; 97:1331.

Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med*. 2011; 28(13).

Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(1):24-32.

Quinn PD, Rickert ME, Weibull CE. Association between Maternal Smoking During Pregnancy and Severe Mental Illness in Offspring. *JAMA Psychiatry*. 2017; 74:589.

Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(5):434-49.

Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N. Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol Psychiatry*. 2012; 17(12):1228-38.

Rose JE. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology*. 2006; 184(3-4):274-85.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 2006; 52(1):139-53.

Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, Slotkin TA. Nicotine evokes cell death in embryonic rat brain during neurulation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 287(3):1136-44.

Rybakowski JK. BDNF gene: functional Val66Met polymorphism in mood disorders and schizophrenia. *Pharmacogenomics*. 2008; 9(11):1589–1593.

Sagar S, Kaur M, Dawe A, Seshadri SV, Christoffels A, Schaefer U, Radovanovic A, Bajic VB. DDESC: Dragon database for exploration of sodium channels in human. *BMC Genomics*. 2008; 9:622.

Sarter M, Lustig C, Taylor SF. Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology*. 2012; 62(3):1544-53.

Schlagenhauf F, Rapp MA, Huys QJM, Beck A, Wüstenberg T, Deserno L. Ventral striatal prediction error signaling is associated with dopamine

synthesis capacity and fluid intelligence. *Hum Brain Mapp.* 2013; 34:1490–1499.

Schwartz, T. L., Sachdeva, S., & Stahl, S. M. Glutamate Neurocircuitry: Theoretical Underpinnings in Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* 2012; 3:195.

Schwendener S, Meyer U, Feldon J. Deficient maternal care resulting from immunological stress during pregnancy is associated with a sex-dependent enhancement of conditioned fear in the offspring. *J. Neurodev. Disord.* 2009; 1:15–32.

Shintani Y. Growth hormone-releasing hormone (GHRH). *Nihon Rinsho.* 1999; 57:8-11.

Siessmeier T, Kienast T, Wrase J, Larsen JL, Braus DF, Smolka MN. Net influx of plasma 6-[18 F]fluoro-1-DOPA (FDOPA) to the ventral striatum correlates with prefrontal processing of affective stimuli. *Eur J Neurosci.* 2006; 24:305–313.

Slotkin TA, Lappi SE, Seidler FJ. Impact of fetal nicotine exposure on development of rat brain regions: critical sensitive periods or effects of withdrawal? *Brain Res Bull.* 1993; 31(3-4):319-28.

Slotkin TA, Pinkerton KE, Auman JT, Qiao D, Seidler FJ. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke upregulates nicotinic cholinergic receptors in monkey brain. *Brain Res Dev.* 2002; 133:175-179.

Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 198(2):132-51.

Slotkin TA. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(1):71-80.

Smith CC, McMahon LL. Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci.* 2006; 26(33):8517-22.

Smith T, Weston C, Lieberman J. Schizophrenia (maintenance treatment). *Am Fam Physician.* 2010; 82(4):338-9.

Song X, Violin JD, Seidler FJ, Slotkin TA. Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro: macromolecule synthesis in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 151(1):182-91.

Stathopoulou A, Beratis IN, Beratis S. Prenatal tobacco smoke exposure, risk of schizophrenia, and severity of positive/negative symptoms. *Schizophr Res*. 2013; 148(1-3):105-10.

Su YA, Si TM, Zhou DF, Guo CM, Wang XD, Yang Y, Shu L, Liang JH. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT 2A/2C receptors. *Eur J Pharmacol*. 2007; 564(1-3):123-30.

Susser E, St Clair D, He L. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*. 2008:024.

Taherianfard M, Sharifi M, Tadjali M, Kohkiloezadeh M. Modulation of NR1 subunit of N-methyl-D-aspartate receptor by ovariectomy and passive avoidance learning. *Iran J Neurol*. 2012; 11(4):140-5.

Tomiya M, Fukushima T, Kawai J, Aoyama C, Mitsuhashi S, Santa T, Imai K, Toyo'oka T. Alterations of plasma and cerebrospinal fluid glutamate levels in rats treated with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, ketamine. *Biomed Chromatogr*. 2006; 20(6-7):628-33.

Tunca Z, Kivircik Akdede B, Özerdem A, Alkın T, Polat S, Ceylan D, Bayın M, Cengizçetin Kocuk N, Şimşek S, Resmi H, Akan P. Diverse glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) support between mania and schizophrenia: a comparative study in four major psychiatric disorders. *Eur. Psychiatry*. 2015; 30(2):198–204.

Tuthill DP, Stewart JH, Coles EC, Andrews J, Cartlidge PH. Maternal cigarette smoking and pregnancy outcome. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1999; 13(3):245-53.

Urrego F, Scuri M, Auais A, Mohtasham L, Piedimonte G. Combined effects of chronic nicotine and acute virus exposure on neurotrophin expression in rat lung. *Pediatr Pulmonol*. 2009; 44:1075–1084.

Vaglenova J, Parameshwaran K, Suppiramaniam V, Breese CR, Pandiella N, Birru S. Long-lasting teratogenic effects of nicotine on cognition: gender specificity and role of AMPA receptor function. *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 90(3):527-36.

Van De Berg WD, Schmitz C, Steinbusch HW, Blanco CE. Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: a combined TUNEL and stereological study. *Exp Neurol.* 2002; 174(1):29-36.

Van Horn JD, McManus IC . Aumento ventricular na esquizofrenia. Uma meta-análise de estudos do ventrículo: relação cerebral (VBR). *Br J Psychiatry.* 1992; 160:687-97.

Van Os J, Kenis G, Rutten BP. The environment and schizophrenia. *Nature.* 2010; 468(7321):203-12.

Vedder LC, Smith CC, Flannigan AE, McMahan LL. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus.* 2013; 23(1):108-15.

Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3, 965–974.

Vinkers CH, Mirza NR, Olivier B, Kahn RS. The inhibitory GABA system as a therapeutic target for cognitive symptoms in schizophrenia: investigational agents in the pipeline. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010; 19(10):1217-33.

Volk DW, Austin MC, Pierrri JN, Sampson AR, Lewis DA. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 2000; 57(3):237-45.

Vukadinovic Z. Elevated striatal dopamine attenuates nigrothalamic inputs and impairs trans-thalamic cortico-cortical communication in schizophrenia: A hypothesis. *Medical Hypotheses.* 2015; 84(1):47-52

Weickert CS 1, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal

cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2003; 8(6):592-610.

Weiden PJ, Buckley PF, Grody M. Understanding and treating "first-episode" schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am*. 2007; 30(3):481-510.

Weinberger DR. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet*. 1995; 346(8974):552-7.

Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol*. 2001; 65(5):427-51.

Weinstock M. Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem Res*. 2007; 32:1730-40.

Weitzman M, Gortmaker S, Sobol A. Maternal smoking and behavior problems of children. *Pediatrics*. 1992; 90:342-349.

Witschi H, Joad JP, Pinkerton KE. The toxicology of environmental tobacco smoke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997; 37:29-52.

Woods P1, Reed V, Collins M. The Behavioural Status Index: testing a social risk assessment model in a high security forensic setting. *J Forensic Nurs*. 2005; 1(1):9-19.

Xiao D, Huang X, Yang S, Zhang L. Direct effects of nicotine on contractility of the uterine artery in pregnancy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 322:180.

Zurn AD, Baetge EE, Hammang JP, Tan SA, Aebischer P. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), a new neurotrophic factor for motoneurons. *Neuroreport*. 1994; 6(1):113-8.

Zurn AD, Winkel L, Menoud A, Djabali K, Aebischer P. Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. *J Neurosci Res*. 1996; 44(2):133-41.

Zugno AI, Juliao RF, Budni J, Volpato AM, Fraga DB, Pacheco FD, Derroza PF, Luca RD, De Oliveira MB, Heylmann AS, Quevedo J. Rivastigmine reverses cognitive deficit and acetylcholinesterase activity

induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2013; 28(3):501-8.

Zugno AI, Matos MP, Canever L, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, De Oliveira MB, Pacheco FD, Valvassori SS, Volpato AM, Budni J, Quevedo J. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr.* 2014; 26(1):43-50.

Zugno AI, Chipindo H, Canever L, Budni J, Alves De Castro A, Bittencourt De Oliveira M, Heylmann AS, Gomes Wessler P, Da Rosa Silveira F, Damazio LS, Mastella GA, Kist LW, Bogo MR, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 fatty acids prevent the ketamine-induced increase in acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia. *Life Sci.* 2015; 121:65-9.

Zugno AI, Chipindo HL, Volpato AM, Budni J, Steckert AV, De Oliveira MB, Heylmann AS, Da Rosa Silveira F, Mastella GA, Maravai SG, Wessler PG, Binatti AR, Panizzutti B, Schuck PF, Quevedo J, Gama CS. Omega-3 prevents behavior response and brain oxidative damage in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience.* 2014; 259:223-31.

ANEXOS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**A relação entre a fumaça de cigarro no período gestacional e o desenvolvimento de esquizofrenia na prole de ratos Wistar**”, **Protocolo nº 026/2016-1** sob a responsabilidade de **Alexandra Ioppi Zugno**, equipe: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio, Isadora Fachim, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Vigência do Projeto	10/04/2016 a 15/12/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº. De animais	313
Peso/Idade	250g a 300g / 60 dias
Sexo	Masculino e Feminino
Origem	Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Protocol number: 026/2016-1


Principal Investigator: Alexandra Ioppi Zugno

Researchers: Josiane Budni, Patrícia Fernanda Schuck, Samira Valvassori, Vanessa Moraes de Andrade, Lara Canever, Felipe Damázio Pacheco, Alexandra Stephanie Almeida Heylmann, Gustavo Mastella, Louyse Sulzbach Damázio, Isadora Fachim.

Project title: “**The relationship between the cigarette smoke in pregnancy period and schizophrenia in the offspring of adult rats development stage**”.

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 22 de março de 2016.


JAIRO JOSÉ ZOCCHE
Coordenador da CEUA