

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA BITTENCOURT DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE
ESQUIZOFRENIA EM RATOS WISTAR EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

CRICIÚMA

2015

MARIANA BITTENCOURT DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DE
ESQUIZOFRENIA EM ANIMAIS EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Ioppi Zugno

CRICIÚMA

2015

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi escrita seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

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.

Aos meus pais, Edgar e Arlete, meus tesouros e exemplos de vida. Sou imensamente grata por todo o apoio, carinho, amor e dedicação no qual sempre tiveram por mim e meus irmãos. Tudo devo a vocês! Amo-os infinitamente!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por sempre me acompanhar, proteger, me dar força e coragem para vencer as dificuldades deste bem precioso, chamado vida. E por me apresentar com a realização deste sonho.

Agradeço imensamente meus pais, Edgar de Oliveira e Arlete Bittencourt de Oliveira, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me darem força para continuar lutando por meus ideais. Sem a presença, amor e confiança de vocês, nada disso seria possível. Tenho orgulho de chama-los de pais, e de fazer parte dessa família maravilhosa! Amo vocês!

Agradeço a meus amados irmãos, Cristiano Bittencourt de Oliveira e Maicon Bittencourt de Oliveira, assim como minhas cunhadas Simone Daniel de Oliveira e Gislaine de Assunção Teixeira, pela amizade, risadas e bagunça nos dias em que a família está reunida. Por sempre me apoiarem e demonstrarem confiança de que esse sonho se tornaria realidade. Rafaela Daniel de Oliveira e Lucas Teixeira de Oliveira, amores da minha vida, obrigada a vocês pelo carinho, amor de sobrinho e por fazerem parte da vida da tia Mari! Coração cheio de orgulho por ter todos vocês!

Agradeço ao meu namorado Luciano Linenburg, pelo companheirismo, amizade, apoio e paciência, em todos os momentos! Obrigada por fazer parte da minha vida, sou imensamente feliz por ter uma pessoa tão incrível ao meu lado! Te amo!

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, pela amizade de todos esses anos e ajuda para que este trabalho fosse concretizado. Obrigada Alexandra Heylmann, Amanda Steckert, Bruna Pescador, Daiane Fraga, Francielle Mina, Josiane Budni e Lara Canever pela amizade de vocês, paciência, apoio, palavras de conforto, momentos de descontração e imensa ajuda sempre, em especial neste período de finalização do mestrado! Cada uma de vocês tem um lugar especial no meu coração!

Agradeço, em especial, minha professora, orientadora e amiga Alexandra Ioppi Zugno, por todos os ensinamentos, apoio e confiança desde a iniciação científica. Sua ajuda e incentivo foram demasiado importantes para a realização deste trabalho. És uma pessoa especial, no qual tenho um imenso carinho! Obrigada por tudo!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico grave, cuja fisiopatologia é pouco conhecida. O tabagismo pré-natal vem sendo estudado como fator causador de anormalidades obstétricas, induzindo alterações comportamentais e neuroquímicas associadas à esquizofrenia. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade locomotora, interação social, memória através do teste de esquiva inibitória, função sensorio-motora através do teste de inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (Bencherif et al.) e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em ratos Wistar adultos que foram expostos à fumaça de cigarro durante o gestação. Fêmeas gestantes foram separadas em dois grupos: mães controle (MC) e mães expostas (ME). 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 o período gestacional (21 dias). Na fase adulta, os filhotes foram divididos em quatro grupos: Filhote Controle+Salina (FC-sal), Filhote Controle+Cetamina (FC-cet), Filhote Exposto+Salina (FE-sal) e Filhote Exposto+Cetamina (FE-cet) e submetidos a uma administração intraperitoneal de salina ou cetamina (25 mg/kg) por sete dias (tratamento repetido). Após a realização deste protocolo, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Em seguida, foram mortos por decapitação e suas estruturas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) foram retiradas e utilizadas para a análise neuroquímica. Os resultados mostraram um aumento da atividade locomotora tanto no grupo FC-cet como no grupo FE-cet, ambos em comparação com o grupo FC-sal. Além disso, o grupo FE-cet também mostrou hiperlocomoção quando comparado ao grupo FE-sal. No teste de interação social, o grupo FC-cet apresentou aumento da latência quando comparado ao grupo FC-sal. Em contrapartida, o grupo FE-cet pareceu minimizar, pelo menos em parte, o déficit social gerado pela cetamina. No teste de esquiva inibitória, os animais foram avaliados em diferentes tipos de memória: memória de trabalho, memória de curta e de longa duração. Os animais do grupo FC-cet apresentaram déficit na memória de trabalho quando comparados ao treino do mesmo grupo e também na memória de longa duração quando comparados ao mesmo tipo de memória do grupo FC-sal. Já os grupos FE-sal e FE-cet, ambos apresentaram prejuízo cognitivo nos três tipos de memória, além de déficit na memória de trabalho quando comparados ao treino de cada grupo. No teste de IPP, os animais do grupo FC-cet, bem como o grupo FE-cet mostraram prejuízo na IPP nas 3 intensidades de pré-pulso (PP) (70dB, 75dB e 80dB), quando comparados ao grupo FC-sal. Porém, é importante ressaltar que em 75dB o grupo FE-cet pareceu minimizar os efeitos prejudiciais ao sistema sensorio-motor gerados pela cetamina. Adicionalmente, um aumento da atividade da AChE também foi observado nas 3 estruturas analisadas no grupo FC-cet. Por outro lado, o grupo FE-cet demonstrou exacerbar o efeito gerado pela cetamina em todas as estruturas. Este estudo indica que a exposição pré-natal ao cigarro afeta o comportamento e o sistema colinérgico em estruturas cerebrais da prole adulta submetida ao modelo de esquizofrenia induzido por cetamina. Esses dados apontam para a importância do período pré-natal na patogênese da esquizofrenia.

Palavras-chave: Cetamina; Comportamento; Esquizofrenia; Sistema Colinérgico; Tabagismo Materno.

ABSTRACT

Schizophrenia is a major neuropsychiatric disorder, whose pathophysiology is poorly understood. Prenatal smoking has been studied as a causative factor of obstetric abnormalities, inducing behavioral and neurochemical alterations associated with schizophrenia. The aim of this study was to evaluate locomotor activity, social interaction, memory by inhibitory avoidance test, sensorimotor function by the inhibition by prepulse startle reflex test (Bencherif et al.), and the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in adult Wistar rats that were exposed to cigarette smoke during pregnancy. Pregnant females were separated into two groups: control dams, and exposure dams (ED). Females of ED group were exposed to cigarette smoke three times a day, four cigarettes at a time, totaling 12 cigarettes a day during pregnancy (21 days). In adulthood, the offspring were divided into four groups: Offspring Control Dams + Saline (OCD-sal), Offspring Control Dams + Ketamine (OCD-ket), Offspring Exposure Dams + Saline (OED-sal), and Offspring Exposure Dams + Ketamine (OED-ket) and subjected to an intraperitoneal administration of saline or ketamine (25 mg/kg) for seven days (repeated treatment). Animals were subjected to behavioral tests. Then, they were killed by decapitation and their cerebral structures (prefrontal cortex, hippocampus, and striatum) were removed and used for neurochemical analysis. Results showed increased locomotor activity in both the OCD-ket group and the OED-ket group, both in comparison with OCD-sal group. Furthermore, OED-ket group also showed hyperlocomotion when compared to OED-sal group. In the social interaction test, OCD-ket group increased latency when compared to OCD-sal group. In contrast, the OED-ket group minimized, at least in part, the social deficits generated by ketamine. In the inhibitory avoidance test, the animals were evaluated on different types of memory: working memory, short and long term memory. The animals of the OCD-ket group showed deficits in working memory when compared to the same training group and also in long-term memory when compared to the same type of OCD-sal group memory. The OED-sal and OED-ket groups presented cognitive impairment in the three types of memory, and deficit in working memory when compared to the training of each group. On the IPP test, the animals of the OCD-ket group, and the OED-ket group showed an impairment of IPP in three prepulse intensities (PP) (70dB, 75dB and 80dB) compared to OCD-sal group. However, it is important to note that in the 75dB, OED-ket group diminished the harmful effects on the sensorimotor system generated by ketamine. Additionally, increased AChE activity was also observed in the three structures evaluated in the OCD-ket group. On the other hand, OED-ket group exacerbated the effect generated by ketamine in all structures. This study indicates that exposure to prenatal smoking affects behavior and the cholinergic system in brain structures of adult offspring submitted to the schizophrenia model induced by ketamine. These data point to the importance of the prenatal period in the genesis of schizophrenia.

Keywords: Behavior; Cholinergic System; Ketamine; Maternal Smoking; Schizophrenia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Hiperativação da via dopaminérgica mesolímbica e os sintomas positivos da esquizofrenia	20
Figura 2: Hipoativação da via dopaminérgica mesocortical e os sintomas negativos da esquizofrenia	21
Figura 3: Sinapse colinérgica	23
Figura 4: Esquema para exposição à fumaça de cigarro	32
Figura 5: Desenho experimental..	34
Figura 6: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou à cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade locomotora de machos	39
Figura 7: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou à cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a interação social (A= latência, B= número de contatos, C= tempo total de contatos) de machos	41
Figura 8: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou à cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre o teste de esquiva inibitória de machos	42
Figura 9: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou à cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto de machos.....	44
Figura 10: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou à cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade da acetilcolinesterase no (A= córtex pré-frontal, B= hipocampo, C= estriado) de machos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo da exposição à fumaça de cigarro.	31
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 intraperitoneal.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - Serotonina

Acetil-CoA - Acetil-coenzima A

ACh - Acetilcolina (do inglês *acetylcholine*)

AChE - Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)

ACSh - Iodeto de acetilcolina (do inglês *acetylcholine iodide*)

ADHD – Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (do inglês *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*)

AMPA – Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (do inglês *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)

AMPH - Anfetamina (do inglês *amphetamine*)

ANOVA - Análise de variância (do inglês *analyses of variance*)

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APGs - Antipsicóticos de primeira geração

ASGs - Antipsicóticos de segunda geração

ATV - Área tegumentar ventral

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CET - Cetamina

ChAT - Colina acetiltransferase (do inglês *choline acetyltransferase*)

CHT₁ – Transportador de colina (do inglês *choline transporter*)

D₂ - Receptor dopaminérgico tipo 2

DA - Dopamina

DTNB - 5,5'-Ditiobis-ácido-2-nitrobenzoico (do inglês *5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)*)

E - Dia embrionário

E.P.M - Erro Padrão da Média

FC - Filhotes controles

FE - Filhotes expostos

GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês *gamma-aminobutyric acid*)

Gln - Glutamina

GLU - Glutamato

i.p. - Intraperitoneal

IPP - Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto

mAChR – Receptor muscarínico de acetilcolina (do inglês *muscarinic acetylcholine receptor*)

MC - Mães controles

ME - Mães expostas

MK-801 - Maleato de dizolcipina (do inglês *Dizolcipine Maleate*)

NAcc - Núcleo accumbens

nAChR - Receptor nicotínico de acetilcolina (do inglês *nicotinic acetylcholine receptor*)

NBM - Núcleo basal magnocelular

NE - Norepinefrina

NMDA - *N*-metil-*D*-aspartato

NO - Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

NR1 - Subunidade de receptor NMDA do tipo 1 (do inglês *NMDA receptor type 1*)

P - Pulso sozinho

PP - Pré-pulso

ERO - Espécie reativa de oxigênio

SAL - Salina

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SPSS – Pacote Estatístico para as Ciências Sociais (do inglês *Statistical Package for the Social Science*)

VACHT - Transportador vesicular de acetilcolina (do inglês *vesicular acetylcholine transporter*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Esquizofrenia	14
1.1.1	<i>Sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e GABAérgico: relação com a fisiopatologia da esquizofrenia.....</i>	<i>18</i>
1.1.2	<i>Sistema Colinérgico e a Esquizofrenia.....</i>	<i>22</i>
1.1.3	<i>Tabagismo pré-natal na patogênese da esquizofrenia.....</i>	<i>25</i>
1.1.4	<i>Justificativa.....</i>	<i>27</i>
2.	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Animais.....	30
3.2	Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.....	30
3.3	Cetamina.....	32
3.4	Avaliações comportamentais	34
3.4.1	<i>Atividade locomotora</i>	<i>34</i>
3.4.2	<i>Interação Social</i>	<i>35</i>
3.4.3	<i>Esquiva inibitória.....</i>	<i>36</i>
3.4.4	<i>Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto.....</i>	<i>36</i>
3.5	Análises Neuroquímicas	37

3.5.1	<i>Atividade da AChE</i>	37
3.6	Análise estatística	38
4.	RESULTADOS	39
4.1	Testes comportamentais.....	39
4.1.1	<i>Atividade locomotora</i>	39
4.1.2	<i>Interação social</i>	40
4.1.3	<i>Esquiva inibitória</i>	41
4.1.4	<i>Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto</i>	43
4.2	Teste Neuroquímico	44
4.2.1	<i>Atividade da AChE</i>	44
5.	DISCUSSÃO	47
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave, que afeta de 0,5% a 1,0% da população mundial, sendo uma patologia com efeitos devastadores para os indivíduos acometidos e seus familiares (Ross et al., 2006). É considerado um dos transtornos que mais leva à incapacidade crônica (Javitt, 2010). Seus sintomas iniciam-se predominantemente no período entre o final da adolescência e início da idade adulta, geralmente observados por uma alteração abrupta no perfil social e afetivo (Apa, 1994; Weiden et al., 2007; Nagai et al., 2011; Marsman et al., 2013). O início tardio da esquizofrenia pode ser entendido pela maturação prolongada dos circuitos corticais sugeridos na doença, tais como circuito glutamatérgico, dopaminérgico e ácido gama-aminobutírico (GABA)érgico, particularmente no período da adolescência (O'donnell, 2011).

Os sintomas clínicos são divididos em três classes: sintomas positivos, que abrangem os episódios de psicose, delírio, alucinações e pensamentos desorganizados; sintomas negativos, que correspondem a isolamento social/emocional, embotamento afetivo e anedonia; e déficit cognitivo, caracterizado como prejuízo na memória de trabalho, desorganização, desorientação e falta de atenção (Bowie e Harvey, 2006; Javitt, 2010).

A esquizofrenia é considerada um transtorno debilitante com etiologia e fisiopatologia ainda pouco conhecidas (Rapoport et al., 2005), com diversos fatores que podem contribuir para o seu desenvolvimento, incluindo fatores genéticos e ambientais (Baguelin-Pinaud et al., 2010; Gilmore et al., 2010; Ayhan et al., 2011; Nagai et al., 2011; Gavin e Akbarian, 2012). Visto que a taxa de concordância de

esquizofrenia para gêmeos monozigóticos é de aproximadamente 45% a 60% e em gêmeos dizigóticos existe uma taxa de 10% a 15% (Pientelli et al., 1999) e considerando a ausência de resultados consistentes que apontam um fator genéticoespecífico para a etiologia deste transtorno levou muitos pesquisadores a estudarem os fatores ambientais (Mcguffin e Gottesman, 1999; Lewis e Levitt, 2002; Abdolmaleky et al., 2004; Rapoport et al., 2012; Matriciano et al., 2013). Além disso, sabe-se também que alterações epigenéticas, como a metilação do DNA ou a acetilação de histonas, podem estar envolvidas com várias doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios neurocomportamentais, como o autismo e a esquizofrenia. No entanto, a regulação gênica epigenética e monoalélica é particularmente suscetível aos efeitos ambientais ocorridos durante o período pré e pós-natal (Jirtle e Skinner, 2007).

Uma hipótese global classifica a esquizofrenia como uma doença neurodesenvolvimental, em que as alterações relacionadas aos seus sintomas ocorrem durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) no período gestacional (Rapoport et al., 2005). Estudos indicam que agressões ambientais, tais como o sofrimento pré-natal e/ou perinatal (Baguelin-Pinaud et al., 2010), incluindo 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), podem resultar no aparecimento de sintomas característicos da doença, como a diminuição da interação social e/ou no 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), bem como anormalidades na estrutura cortical e alterações dos sistemas de

neurotransmissores, como o dopaminérgico e o glutamatérgico em humanos (Foerster et al., 1991; Weinstock, 2001). Esses achados foram observados após a adolescência, período em que os episódios agudos da doença são mais comuns.

Com relação à farmacoterapia da esquizofrenia, tem-se conhecimento que seu início foi com a descoberta de dois fármacos, a clorpromazina (1950) e a clozapina (1960) (Lehmann e Ban, 1997). Nos últimos anos, diversos antipsicóticos de primeira (APGs) e segunda geração (ASGs) foram desenvolvidos e os crescentes estudos voltados para o tratamento da doença vêm avançando o conhecimento em relação à sua neurobiologia e neurofarmacologia (Miyamoto et al., 2012). Sabe-se que a maioria dos antipsicóticos, principalmente os APGs, também conhecidos como antipsicóticos típicos, possuem o seu mecanismo de ação voltado para o antagonismo de receptores dopaminérgicos tipo 2 (D_2), demonstrando que o sistema dopaminérgico está envolvido na fisiopatologia da esquizofrenia, visto que observou-se consistente melhora de sintomas positivos com o uso desses fármacos (Nikam e Awasthi, 2008). Porém, pacientes utilizando APGs passaram a apresentar muitos efeitos colaterais, principalmente efeitos secundários extrapiramidais, ocasionando uma baixa aderência ao tratamento (Leucht et al., 2011). Além disso, percebeu-se que o sistema dopaminérgico não poderia explicar completamente a fisiopatologia do transtorno, pois o tratamento com estes fármacos não era capaz de reverter os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (Conn et al., 2008).

Levando em consideração os achados relacionados aos APGs e tentando reverter estes problemas, foram incluídos no mercado os ASGs, também denominados antipsicóticos atípicos, que passaram a desencadear melhora dos sintomas negativos, déficit cognitivo, capacidade funcional, prevenção das recaídas, melhora do grau dos sintomas extrapiramidais e discinesia tardia. Porém, efeitos

colaterais também foram apresentados por estes medicamentos, principalmente em nível metabólico, como ganho de peso, hiperglicemia e dislipidemia (Meyer, 2007; Schultz et al., 2007; Tajima et al., 2009; Leucht et al., 2011). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que o tratamento com ASGs continuou com uma baixa aderência, não muito diferente da adesão ao tratamento com APGs (Dolder et al., 2002; Gilmer et al., 2004; Valenstein et al., 2004). Desta maneira, percebe-se que os fármacos disponíveis para o tratamento deste transtorno possuem êxito somente em parte, mostrando a importância de pesquisas e o desenvolvimento de novas estratégias voltadas para a farmacoterapia e prevenção da esquizofrenia.

Recentemente, o tabagismo materno tem sido estudado como um fator de risco importante para o surgimento da esquizofrenia, visto que está relacionado a distúrbios cognitivos e comportamentais (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Fraga et al. (2011) mostraram que a exposição à fumaça de cigarro durante o período de gestação ocasiona danos ao DNA na prole adulta, um aumento da peroxidação lipídica e danos a proteínas cerebrais em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de roedores.

Embora a fisiopatologia da esquizofrenia não seja totalmente conhecida, a existência de alterações anatômicas e bioquímicas cerebrais já foi demonstrada (Keshavan et al., 2011). A pesquisa em animais tem representado um promissor instrumento para investigar a base neurobiológica do distúrbio neural e comportamental da esquizofrenia, com o intuito de se estabelecerem novas estratégias farmacoterapêuticas (Meyer e Feldon, 2010). Modelos animais farmacológicos de esquizofrenia foram estabelecidos utilizando-se a administração de antagonistas não competitivos de receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), como a fenciclidina (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). Esses fármacos obstruem o canal NMDA, impedindo a entrada de cálcio, podendo levar a um estado psicótico transitório e reversível, mesmo em pessoas saudáveis (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001).

Estudos em roedores descreveram que diferentes doses subanestésicas de cetamina levam a sintomas análogos aos da esquizofrenia (Reddy e Yao, 1996; De Oliveira et al., 2009), como hiperlocomoção, embotamento afetivo (Hunt et al., 2006; Canever et al., 2010), estereotipia e déficit sensorio e cognitivo (Lipska e Weinberger, 2000; Blot et al., 2013; Neill et al., 2014). Estes modelos são adequados para mimetizar a capacidade de reversão e/ou prevenção por fármacos em humanos (O'Neill e Shaw, 1999; Geyer e Ellenbroek, 2003; Kapur e Mamo, 2003; Bubenikova-Valesova et al., 2008; Neill et al., 2010; Meltzer et al., 2011).

1.1.1 *Sistemas glutamatérgico, dopaminérgico e GABAérgico: relação com a fisiopatologia da esquizofrenia*

Dentre as alterações bioquímicas da esquizofrenia estão disfunções nos sistemas glutamatérgico e dopaminérgico, além dos sistemas GABAérgico e colinérgico (Miyamoto et al., 2003; Harrison e Weinberger, 2005), resultando em irregularidades no funcionamento de regiões córtico-basais e levando a sintomas semelhantes aos do transtorno (Rogers et al., 2011; Tost e Meyer-Lindenberg, 2011).

Com relação ao sistema glutamatérgico, sabe-se que o glutamato (GLU) é o aminoácido mais abundante no SNC (Watkins e Evans, 1981) e está envolvido nos

processos de aprendizagem, memória, cognição, neurotoxicidade e neuroplasticidade. Estas funções são mantidas por duas grandes classes de receptores: ionotrópicos (NMDA, Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato) e metabotrópicos (Verkhratsky e Kirchhoff, 2007). Está bem consolidado que alterações no fino controle da transmissão glutamatérgica podem desencadear transtornos psiquiátricos (Javitt, 2010; Goff, 2015). Sendo assim, na esquizofrenia os níveis de GLU, importante para a migração neuronal e sinaptogênese, encontra-se alterado (Moghaddam et al., 1997). Da mesma maneira, pacientes com o transtorno apresentam uma diminuição na função do receptor NMDA (Benneyworth et al., 2011).

Duas teorias opostas são descritas para explicar a participação deste aminoácido na fisiopatologia da esquizofrenia: a teoria da hipofunção glutamatérgica (Kim et al., 1980) e a teoria da hiperfunção glutamatérgica (Deakin et al., 1989). Com relação à primeira, acredita-se que uma deficiência de receptores glutamatérgicos em áreas fronto-corticais desencadeia uma ativação do sistema dopaminérgico mesolímbico e ocasiona, conseqüentemente, o surgimento dos sintomas característicos deste transtorno (Kim et al., 1980; Carlsson e Svensson, 1990; Ohno e Watanabe, 1995). Em contrapartida, a segunda teoria, a de hiperfunção glutamatérgica, descreve que uma hipofunção de receptores NMDA no córtex temporal, induzida por meio de uma maior ativação de receptores AMPA, cainato e metabotrópicos, gera uma compensação do sistema glutamatérgico no córtex frontal (Marsman et al., 2013).

Processos neuroquímicos envolvendo GLU em associação com a liberação de outros neurotransmissores, como a DA, desencadeiam os sintomas da esquizofrenia (Figuras 1 e 2) (Deakin et al., 1989; Deakin e Simpson, 1997; Simpson

et al., 1998; Dursun e Deakin, 2001; Schwartz et al., 2012). Acredita-se que uma hipofunção de receptores NMDA seja determinante para uma maior liberação de DA nestes pacientes (Bressan e Pilowsky, 2003). Os efeitos de fármacos agonistas de receptor NMDA de inibir a liberação de DA no estriado reforçam esta hipótese. Estudos vêm mostrando que este mecanismo ocorre, em parte, pela intensificação do neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA), desempenhando seu efeito inibitório (Javitt et al., 2005). O funcionamento dos neurônios glutamatérgicos na área pré-frontal é controlado rigorosamente por interneurônios GABAérgicos. Desta forma, na esquizofrenia a sinalização GABAérgica encontra-se alterada, bem como a sinalização do receptor NMDA (Hashimoto et al., 2008).

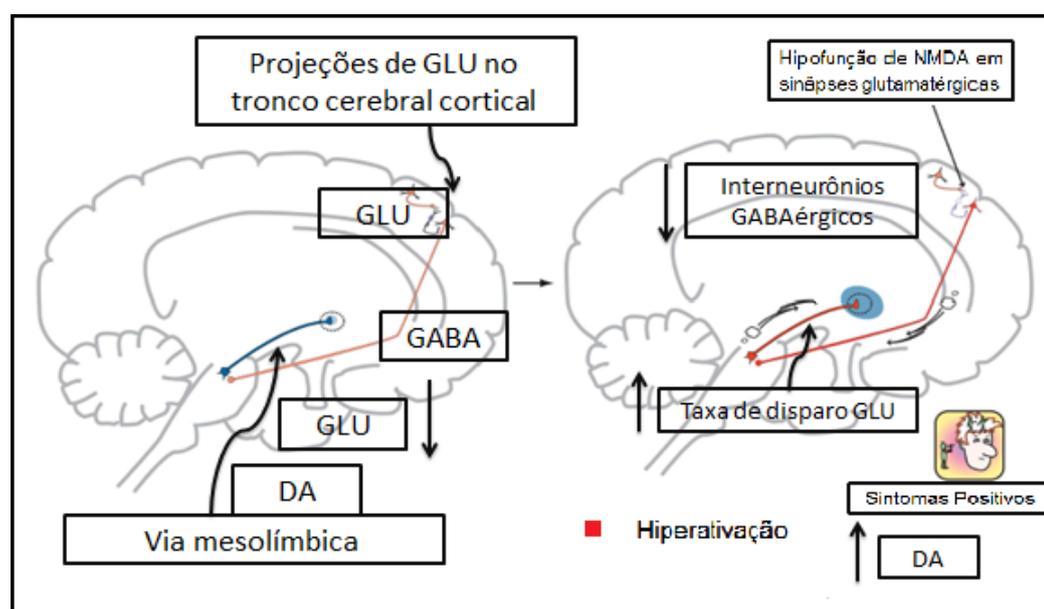


Figura 1: Hiperativação da via dopaminérgica mesolímbica e os sintomas positivos da esquizofrenia. As projeções de glutamato (GLU) no tronco cerebral cortical iniciam no córtex frontal e seguem até a via dopaminérgica mesolímbica. Esta sequência de neurônios normalmente inicia com neurônio glutamatérgico primário que dispara em um interneurônio ácido gama-aminobutírico (GABA)érgico, que libera sinais inibitórios para um neurônio glutamatérgico secundário, fazendo diminuir a taxa de disparo de GLU. Dessa forma, o quarto neurônio (dopaminérgico) dispara taxas normais de dopamina (DA) na via dopaminérgica mesolímbica, não causando sintomas positivos. Com uma hipofunção de receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) essas projeções ficam prejudicadas. Afetando consequentemente o disparo em um interneurônio GABAérgico, fazendo com que ocorra uma diminuição da liberação de sinais inibitórios em um neurônio glutamatérgico secundário, aumentando a taxa de disparo de GLU de forma anormal, que colide com a via dopaminérgica mesolímbica, estimulando a liberação de DA, gerando os sintomas positivos da esquizofrenia. Adaptado de Schwartz et al., 2012.

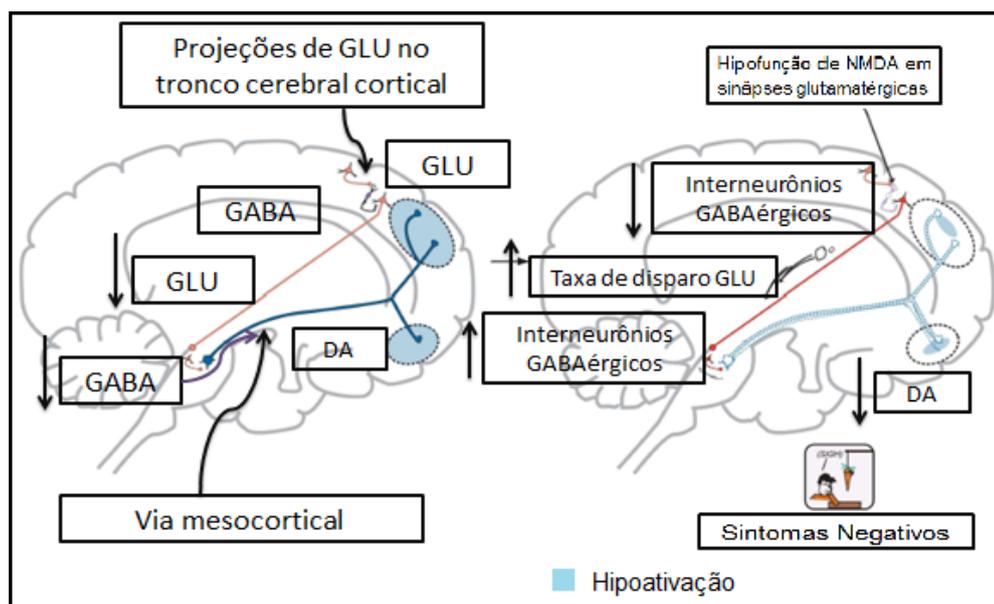


Figura 2: Hipoativação da via dopaminérgica mesocortical e os sintomas negativos da esquizofrenia. Neste caso, acredita-se que ocorram alterações nas projeções de glutamato (GLU) que tem início no córtex frontal se estendendo até a via dopaminérgica mesocortical. Esta sequência de neurônios normalmente inicia com um neurônio glutamatérgico primário que dispara em um interneurônio ácido gama-aminobutírico (GABA)érgico, que libera sinais inibitórios para um neurônio glutamatérgico secundário, fazendo diminuir sua taxa de disparo. Neste caso, o neurônio glutamatérgico secundário colide com outro interneurônio GABAérgico tendo sua função diminuída, este interneurônio colide com projeções de dopamina (DA), mantendo os níveis de DA que chegam ao córtex frontal normais, evitando os sintomas negativos do transtorno. Acredita-se que com uma hipofunção de receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) essas projeções ficam prejudicadas. Levando assim, a uma hipofunção de interneurônios GABAérgicos, aumentando a taxa de disparo de GLU em um neurônio glutamatérgico secundário, colidindo com um segundo interneurônio GABAérgico que é então hiperestimulado, ocasionando um aumento de sinais inibitórios chegando a via dopaminérgica mesocortical, diminuindo a liberação de DA que chega ao córtex frontal, e assim, desencadeando os sintomas negativos. Adaptado de Schwartz et al., 2012.

Este aumento na liberação do neurotransmissor DA está intrinsecamente relacionado a psicose, sendo esta a hipótese predominantemente associada à fisiopatologia da esquizofrenia (Snyder, 1976; Seeman, 1987). Essa teoria foi fortificada quando pesquisadores analisaram que pacientes com esquizofrenia liberavam uma maior quantidade de DA comparados ao grupo controle, quando submetidos a agonistas dopaminérgicos, como as anfetaminas (AMPH) (Laruelle e Innis, 1996). Acredita-se que os sintomas positivos presentes no transtorno sejam gerados devido a este aumento da atividade dopaminérgica na via mesolímbica, compreendida entre a área tegumentar ventral (ATV) e o núcleo accumbens (NAcc) (Ross et al., 2007). Por outro lado, os sintomas negativos são supostamente

causados por uma diminuição dessa atividade na via mesocortical, tendo início também na ATV, seguindo até o córtex pré-frontal (Ross et al., 2007).

1.1.2 Sistema Colinérgico e a Esquizofrenia

O sistema colinérgico vem sendo considerado elemento chave para a regulação de processos cognitivos presentes na esquizofrenia (Davis et al., 1975; Powchik et al., 1998; Sarter et al., 2012). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório relacionado a processos como atenção, memória e função motora, e desempenha seu papel tanto no sistema nervoso periférico (SNP) como no SNC (Winkler et al., 1995; Sarter e Parikh, 2005; Voss et al., 2008). No SNC, a ACh é sintetizada em neurônios colinérgicos pré-sinápticos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT; E.C. 2.3.1.6), a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA). Em seguida, o neurotransmissor é armazenado em vesículas pelo transportador vesicular de ACh (VAChT) para posterior liberação na fenda sináptica (Figura 3) (Oda, 1999; Ribeiro et al., 2006; Zoheir et al., 2012).

Após sua liberação, a ACh pode ligar-se a dois tipos de receptores colinérgicos: muscarínicos (mAChR), presentes em regiões parassimpáticas; e nicotínicos (nAChR), localizados principalmente em junções neuromusculares e gânglios autônomos (Beers e Reich, 1970), desempenhando assim, sua função. Também na fenda sináptica, a enzima acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7), com função regulatória importante no controle da transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica, hidrolisa a ACh em colina e acetato, inativando-a (Soreq e Seidman, 2001). Dessa forma, a colina é constantemente reciclada,

voltando para o neurônio pré-sináptico, mantendo assim a síntese do neurotransmissor (Figura 3) (Collier e Katz, 1974; Tucek, 1985; Zoheir et al., 2012).

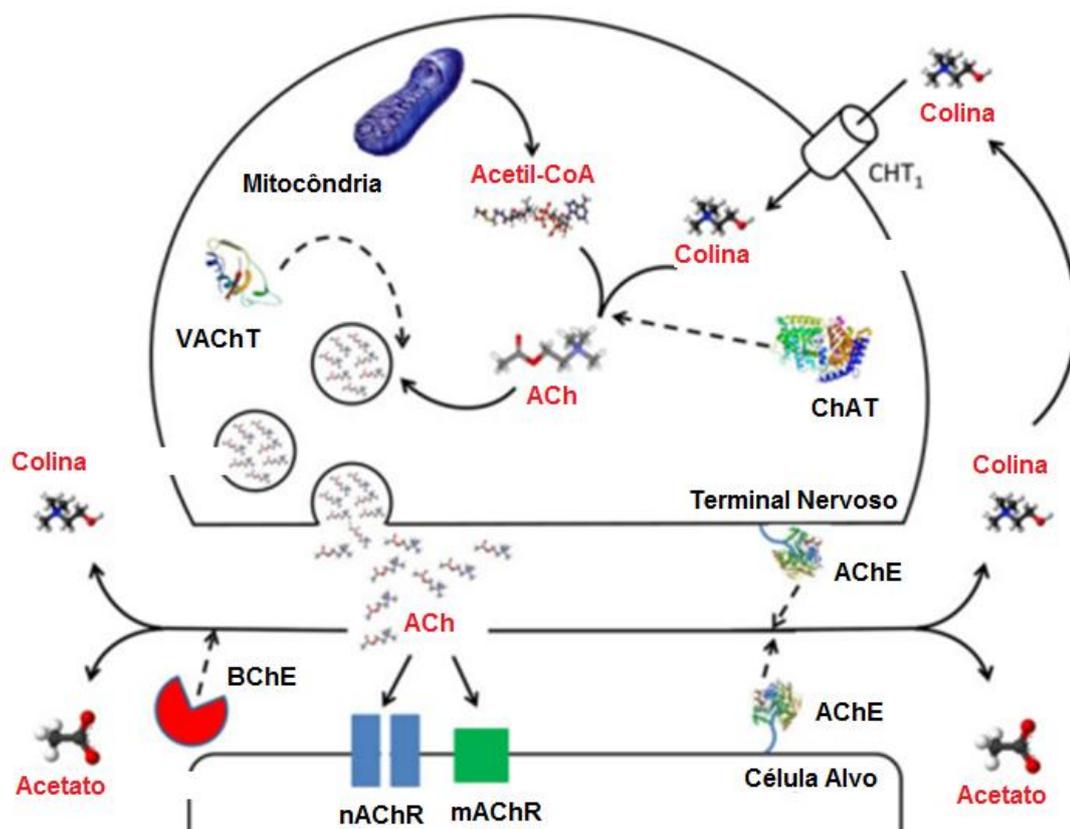


Figura 3: Síntese, armazenamento, liberação, sinapse e degradação da acetilcolina (ACh). A síntese de ACh ocorre em neurônios pré-sinápticos pela colina acetiltransferase (ChAT), a partir de colina e acetil-coenzima A (acetil-CoA). Em seguida, a ACh é armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) para posterior liberação na fenda sináptica, sendo sucedida pela ligação a receptores nicotínicos de ACh (nAChR) e receptores muscarínicos de ACh (mAChR) em neurônios pós-sinápticos. Após a dissociação dos receptores, a ACh liberada na fenda sináptica é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato. A colina é constantemente reciclada pelo transportador de colina (CHT₁) para manutenção da síntese do neurotransmissor. Fonte: Adaptado de Zoheir et al., 2012.

A AChE é um enzima amplamente distribuída no SNC (Oda, 1999) e muitos estudos indicam que a atividade desta enzima encontra-se aumentada em algumas estruturas cerebrais, como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de animais submetidos ao modelo farmacológico de esquizofrenia induzido por cetamina (Zugno et al., 2013a; Zugno et al., 2013b). Esta hiperatividade enzimática leva possivelmente a uma maior degradação de neurotransmissores ACh, apoiando

evidências que sugerem uma diminuição deste neurotransmissor em pacientes esquizofrênicos (Bencherif et al., 2012). Em contrapartida, um estudo de Chatterjee et al. (2012) indica que doses agudas e crônicas de cetamina induzem aumento da atividade da AChE em córtex cerebral e hipocampo, além de desencadear uma elevação no nível de ACh no córtex, talvez por um mecanismo de proteção neuronal. Sendo assim, alterações no sistema colinérgico estão intrinsecamente relacionadas com sintomas presentes em indivíduos acometidos pelo transtorno, como as disfunções cognitivas (Voss et al., 2008).

Estudos com foco em marcadores neuroquímicos associados às funções cognitivas enfatizam a conexão entre os sistemas colinérgico e glutamatérgico. A atividade colinérgica no córtex cerebral produz uma combinação complexa de efeitos inibitórios e excitatórios que interferem na sinalização glutamatérgica via receptores NMDA (Sarter et al., 2005). Um estudo produzido por Colgin et al. (2003) indica que os sinais colinérgicos induzem uma atividade excitatória do glutamato, favorecendo a aquisição da memória no hipocampo. Portanto, a ACh pode modular a ação do sistema glutamatérgico.

Além disso, o envolvimento do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças mentais tem sido estudado. Neste contexto, alterações nos nAChR são sugeridas na esquizofrenia (Kalman et al., 2005), característica possivelmente associada ao fato de que pacientes fumantes manifestam sintomas positivos da doença de forma mais grave (Ziedonis et al., 1994). Além do mais, o hábito de fumar é mais comum em pacientes esquizofrênicos do que na população em geral. Essa diferença permanece significativa quando o índice de tabagismo em esquizofrênicos é comparado ao mesmo índice de pacientes acometidos por outras doenças psiquiátricas (Mccreadie, 2002; Aguilar et al., 2005).

O tabagismo pré-natal vem sendo considerado um fator de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia (Stathopoulou et al., 2013), acreditando-se que a exposição à fumaça de cigarro durante a gestação age diretamente em neurônios colinérgicos (Garcia-Rill et al., 2007; Gold et al., 2009). Além disso, estudos mostram que indivíduos que foram expostos cronicamente a fumaça de cigarro no período gestacional tiveram maior chance de apresentar sintomas característicos do transtorno, como déficits cognitivos, hiperatividade e distúrbios comportamentais na adolescência (Liu e Zhao, 2004; Abreu-Villaca et al., 2010). Sendo assim, estes estudos sugerem que alterações no sistema colinérgico durante o desenvolvimento do SNC, desencadeadas por agressões ambientais, podem ter um papel importante na fisiopatologia da esquizofrenia.

1.1.3 *Tabagismo pré-natal na patogênese da esquizofrenia*

Problemas de desenvolvimento neurológico podem ser gerados nos filhos de mulheres que iniciaram uma resposta ao estresse durante a gestação (Brixey et al., 1993; O'donnell, 2011). O tabagismo, fator estressante durante o período gestacional, pode desencadear anormalidades obstétricas e baixo peso logo após o nascimento, levando a alterações cognitivas e comportamentais na infância (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Essa alteração precoce no neurodesenvolvimento pode modificar a organização da ligação axonal em projeções sinápticas ao afetar a proliferação celular neuronal, migração e apoptose, essenciais para o SNC em desenvolvimento (Van De Berg et al., 2002).

A exposição pré-natal ao cigarro tem sido relacionada com alterações fisiológicas e de desenvolvimento, aumentando o risco de crianças e adultos de

desenvolverem doenças neuropsiquiátricas (Witschi et al., 1997; Roy et al., 1998). Apesar do mecanismo neurobiológico responsável por essas alterações ser ainda pouco conhecido, acredita-se que modificações no sistema dopaminérgico central estejam relacionadas (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Trabalhos têm demonstrado que exposição à nicotina no período durante a gestação ocasiona mudanças no desenvolvimento de marcadores neuroquímicos de DA, induzindo assim hiperatividade, resultando em danos no sistema dopaminérgico mesolímbico e nigroestriatal (Muneoka et al., 1997; Azam et al., 2007; Blood-Siegfried e Rende, 2010; Azevedo Marques et al., 2011). Acredita-se que a união de fatores genéticos e ambientais desencadeia mudanças no neurodesenvolvimento do sistema dopaminérgico nesta patologia (Gold et al., 2009). Dados da literatura mostram que o sistema colinérgico também está envolvido no aparecimento das alterações do sistema dopaminérgico (Adler et al., 1990; Tojima e Ito, 2000). Acredita-se que a nicotina gera alterações no sistema dopaminérgico por ter ação direta em receptores colinérgicos nicotínicos (Azam et al., 2007).

Sabe-se que existe uma grande variedade de componentes presentes na fumaça do cigarro, muitos deles com alta toxicidade. Alguns estudos mostraram que a exposição à nicotina e ao monóxido de carbono no período pré-natal gera efeitos negativos na prole. Neste contexto, o monóxido de carbono pode levar à diminuição do transporte de oxigênio para o feto, induzindo hipóxia em tecidos do embrião (Benowitz et al., 2000). Além disso, a nicotina é conhecida como fator causador de morte celular em estruturas embrionárias (Roy et al., 1998; Slotkin, 2004), danificando células e tecidos, modificando a formação, sobrevivência e diferenciação de células cerebrais (Slotkin et al., 1993; Song et al., 1998).

A administração *in vitro* de nicotina em embriões murinos foi avaliada a partir da dissecação para fora do útero no dia embrionário (E) 8,5. O estudo mostrou que a exposição à nicotina induz um aumento de Ca^{2+} nos tecidos dos embriões, acarretando má formação e apoptose. Esse aumento se deve à maior entrada pela ativação de nAChR, ocasionando uma elevação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e apoptose (Zhao e Reece, 2005).

O tecido cerebral é muito sensível ao ataque de ERO (Halliwell, 1999), característica explicada, em parte, pela reduzida habilidade de regeneração das células cerebrais quando comparadas aos outros órgãos do corpo, além da elevada taxa metabólica e menos defesas antioxidantes (Andersen, 2004). Do mesmo modo, as evidências mostram que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia da esquizofrenia (Pazvantoglu et al., 2009; Zhang et al., 2009). Do et al. (2009) propõem que um desequilíbrio *redox* induzido por agressões ambientais acarreta muitas alterações comportamentais na vida adulta, como alterações emocionais, sociais e cognitivas, colaborando para o surgimento dos sintomas característicos deste transtorno.

1.1.4 Justificativa

Como já citado, estudos vêm abordando a associação entre fatores genéticos e ambientais para a etiologia da esquizofrenia (Shorter e Miller, 2015). Levando em consideração a hipótese neurodesenvolvimental em que agressões ambientais no período pré-natal têm demonstrado afetar o desenvolvimento do SNC, que os mecanismos responsáveis por essas alterações não são completamente entendidos, e ainda, que tais processos são, em grande parte, responsáveis por déficits

comportamentais na fase adulta, este trabalho auxilia em um melhor entendimento com relação à fisiopatologia da esquizofrenia. Além disso, trabalhos abordando o presente tema auxiliam na evolução da farmacoterapia e possíveis prevenções relacionadas ao transtorno.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais em ratos adultos submetidos a um modelo experimental de esquizofrenia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre a atividade locomotora em ratos adultos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;
- Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre a interação social em ratos adultos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;
- Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre a memória e o aprendizado em ratos adultos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;
- Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre a função sensorio-motora em ratos adultos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina;
- Avaliar o efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro sobre a atividade da enzima AChE, em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de ratos adultos submetidos a um modelo animal de esquizofrenia induzido pela administração de cetamina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Este estudo foi do tipo experimental, utilizando um modelo animal. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo número 118/2012 (ANEXO A). Os procedimentos foram executados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetadas para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados.

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas adultos com aproximadamente 60 dias de vida, pesando em média 250 g a 300 g. 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 de $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.2 Protocolo de exposição à fumaça de cigarro

O estudo utilizou um total de 25 ratas Wistar jovens virgens que foram 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 controles (MC) (n=10), cujos animais não receberam a fumaça de cigarro, e o grupo de mães expostas (ME), que recebeu a fumaça de cigarro (n=15). Um número maior de fêmeas no grupo cigarro foi escolhido devido ao fato de que o estresse gerado pela exposição poderia

provocar aborto ou canibalismo por parte das mães logo após o nascimento dos filhotes (Desantis e Schmaltz, 1984).

As fêmeas grávidas foram identificadas por funcionários do biotério da universidade, sendo que as não grávidas foram excluídas do experimento e descartadas por procedimentos adequados. As fêmeas participantes permaneceram separadas em seus respectivos grupos até o último dia de gestação (21 dias). Durante todo este período, as ratas do grupo ME foram expostas à inalação passiva da fumaça de cigarro 3 vezes ao dia (8 h, 11 h e 14 h), 4 cigarros em cada exposição, totalizando 12 cigarros/dia. O cigarro utilizado neste protocolo foi o da marca comercial Marlboro® vermelho, cujos componentes incluem alcatrão (10 mg), nicotina (0,8 mg) e monóxido de carbono (10 mg). Cada cigarro prosseguiu 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).

Tabela 1: Protocolo da exposição à fumaça de cigarro.

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

Fonte: do autor

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 foi levada à câmara por uma seringa de 60 mL adaptada a uma entrada na estrutura (Figura 4). O protocolo de exposição acima descrito, bem como a escolha

do tipo de cigarro foi feita com base em estudo anteriormente publicado (Zugno et al., 2013a).

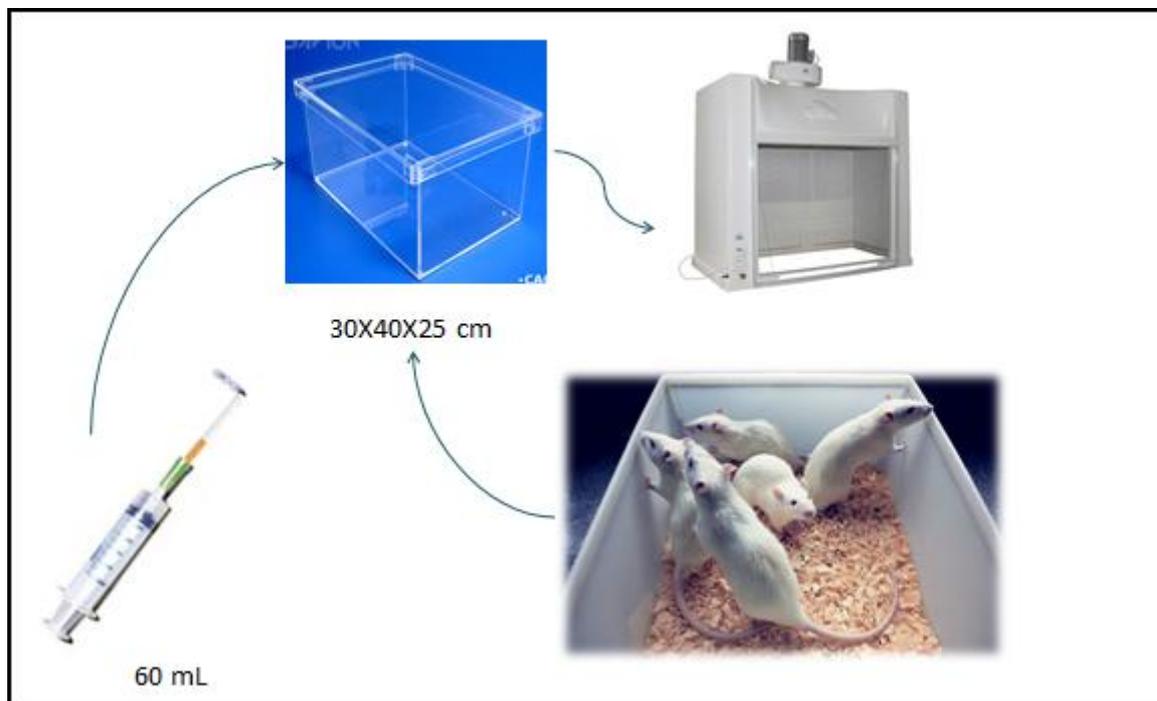


Figura 4: Esquema para exposição à fumaça de cigarro. Foi utilizada uma câmara de acrílico com dimensões de 30X40X25 cm, localizada no interior de uma capela de exaustão. Foram colocadas 5 ratas por vez para inalação da fumaça de cigarro. A fumaça foi levada à câmara por uma seringa de 60 mL adaptada a uma entrada na câmara. Fonte: do autor.

Após o período de gestação, os ratos filhotes machos foram mantidos junto à mãe para a amamentação por 21 dias. A quantidade total de animais obtida no acasalamento foi de 140 machos. Em seguida, estes foram submetidos ao desmame. As mães foram utilizadas para outro trabalho referente à mesma linha de estudo, e as fêmeas filhotes foram descartadas por procedimentos adequados pelo biotério da universidade.

3.3 Cetamina

Após o desmame, os machos permaneceram com alimentação e água disponíveis até completarem 60 dias de vida. Ao chegarem à fase adulta, esses animais foram divididos em 4 diferentes grupos, conforme a tabela 2.

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 intraperitoneal.

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)

Fonte: do autor.

A partir dessa divisão, iniciou-se o protocolo de administração, em que os animais receberam injeções intraperitoneais de cetamina (25 mg/kg) ou salina, 1 injeção/dia com um intervalo de 24 horas entre cada administração, conforme o grupo pertinente, durante um período de sete dias (tratamento repetido) (Figura 5). Esta dose foi preparada em solução salina no volume de 1 mL/100 g de cetamina (Becker e Grecksch, 2004; Imre et al., 2006; Tomiya et al., 2006; Canever et al., 2010).

Após a última administração, tempo determinado conforme o protocolo de execução de cada teste, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (atividade locomotora, interação social, esQUIVA inibitória e inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto (IPP)). Posteriormente, os animais foram mortos por decapitação sem anestesia e as estruturas cerebrais foram dissecadas (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) e congeladas em freezer -80°C para futura análise da atividade da enzima AChE.

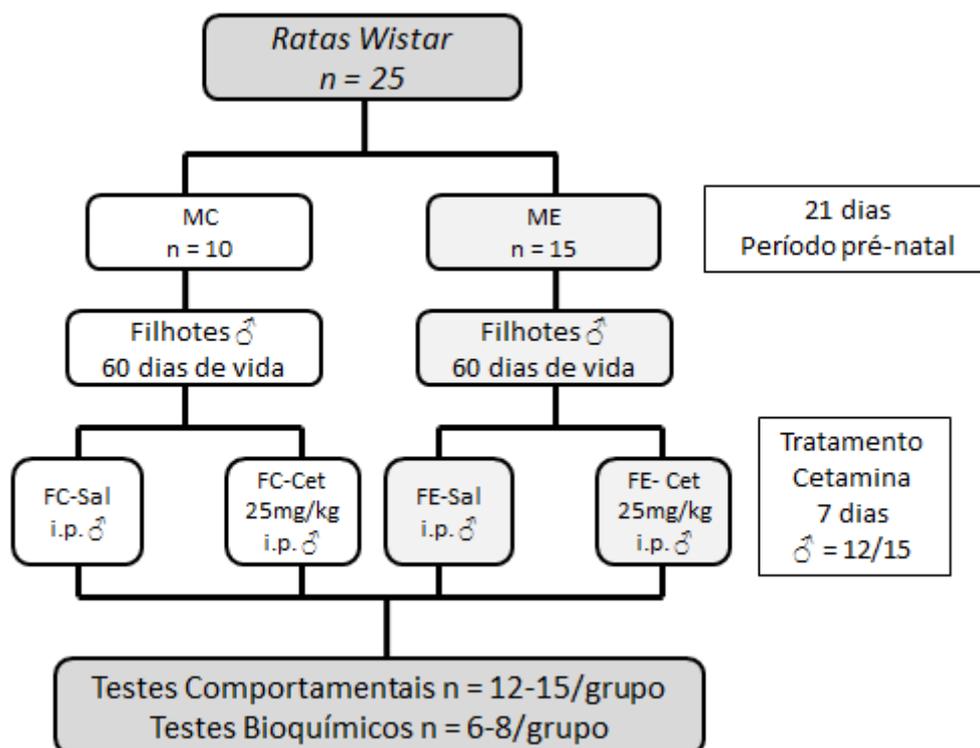


Figura 5: Desenho experimental. Ratas Wistar grávidas foram divididas em dois grupos distintos: Mães Controles (MC), que não foram expostas à fumaça de cigarro, e Mães Expostas à fumaça de cigarro (ME). Os filhotes machos provenientes de MC e ME foram subdivididos em 4 diferentes grupos: Filhotes Controles + Salina (FC-Sal), Filhotes Controles + Cetamina (FC-Cet), Filhotes Expostos + Salina (FE-Sal) e Filhotes Expostos + Cetamina (FE-Cet) e receberam tratamento repetido (sete dias) com salina ou cetamina (25 mg/kg) i.p. de acordo com grupo experimental. Essa subdivisão foi feita aos 60 dias de vida da prole (fase adulta). Após a última injeção, os grupos da prole foram submetidos aos testes comportamentais e, em seguida, foram mortos por decapitação, as estruturas cerebrais foram dissecadas e utilizadas para testes bioquímicos. Fonte: do autor.

3.4 Avaliações comportamentais

Para avaliação comportamental, os mesmos animais foram usados para a realização dos testes de atividade locomotora, interação social e esQUIVA inibitória.

Por outro lado, para o teste de IPP diferentes animais foram utilizados.

3.4.1 Atividade locomotora

Trinta minutos após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram submetidos individualmente à exploração durante o período de 15 minutos em uma caixa de atividade locomotora com 50 x 25 x 50 cm de dimensões, onde a atividade é avaliada automaticamente (Activity Monitor, Insight Laboratory Equipment[®], Ribeirão Preto, SP). O teste avalia a atividade locomotora pela distância percorrida (em centímetros) pelo animal, dividindo o tempo total de avaliação em blocos de 5 minutos (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011). A distância total foi então calculada somando-se as mudanças de posições controladas pelo sistema (Zugno et al., 2013a).

3.4.2 Interação Social

Após a última administração de cetamina ou salina, os animais foram isolados e privados de água e comida por um período de seis horas. Posteriormente, foram colocados em duplas, em uma caixa de acrílico (60 x 60 x 30 cm) com piso sólido. O teste consistiu em analisar a interação das duplas, que pertenciam ao mesmo grupo experimental, porém de caixas diferentes por um período de 15 minutos. A avaliação comportamental em relação ao perfil social dos animais de forma individual não foi realizada, apenas em pares (Schneider e Przewlocki, 2005). Durante este intervalo, foram analisados a latência para iniciar o contato entre os animais (seguir ou se aproximar do parceiro, montagem sobre o parceiro, cheirar ou limpar a pele ou pêlo de qualquer parte do corpo do parceiro), o tempo total em que os animais permaneceram em contato e o número total de contatos (Niesink e Van Ree, 1989; Schneider e Przewlocki, 2005).

3.4.3 Esquiva inibitória

A avaliação foi realizada em uma caixa de acrílico, cujo piso é constituído de barras paralelas de metal, com uma plataforma junto à parede esquerda do aparelho (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003). O teste comportamental foi iniciado com uma sessão denominada treino, que ocorreu 24 horas após a última dose de cetamina ou salina. Os animais foram então colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer com as quatro patas nas barras de metal foi anotado e denominado de latência. Após a descida do animal, este recebeu um choque de 0,4 mA por 2 segundos.

Imediatamente após o treino, o roedor foi submetido à segunda sessão, denominada como teste, sendo colocado novamente na plataforma e a latência anotada. Porém, nenhum choque a partir de então foi acionado, avaliando desta maneira, a memória de trabalho. Uma hora e meia depois, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo para avaliação da memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003) e, após 24 horas, para avaliação da memória de longa duração (Bevilaqua et al., 2003; De Lima et al., 2005).

3.4.4 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto

A quantificação da IPP foi realizada com base no protocolo descrito por Levin et al. (2011). Foi utilizada uma caixa de medida de sobressalto com vedação sonora (Insight[®], São Paulo, Brasil). O protocolo foi composto por 74 testes pseudo-randomizados, divididos em sete categorias distintas, apresentados com um intervalo de 20 segundos: 1) 20 apresentações de pulso sozinho (P), com uma

intensidade de 120 dB por 50 ms; 2) 8 apresentações de cada intensidade de pré-pulso (PP) sozinho, intensidades de 70, 75 e 80 dB, com 3000 Hz de frequência por 20 ms; 3) 10 apresentações de cada intensidade de PP + P, com um intervalo de 50 ms. A média da amplitude de sobressalto após as sessões de P, bem como a média da amplitude da resposta de sobressalto após as sessões de PP+P foram calculadas para cada animal. O nível de IPP para cada animal foi determinado pela expressão da amplitude de sobressalto de PP+P, como uma redução percentual a partir da amplitude de sobressalto de P, sendo calculada de acordo com a seguinte equação: $\% \text{ IPP} = 100 - [(PP/P) \times 100]$. Desta forma, 0% corresponde à ausência de diferença entre a amplitude de sobressalto após as sessões de P e PP+P e, conseqüentemente, à ausência de inibição da resposta de sobressalto. O resultado indica a porcentagem de IPP, avaliando assim as funções sensório-motoras dos animais (Hoffman e Ison, 1980; Weiss e Feldon, 2001).

3.5 Análises Neuroquímicas

3.5.1 Atividade da AChE

A atividade da enzima foi dosada a partir do método de Ellman et al. (1961). A taxa de hidrólise foi analisada em um meio de incubação contendo 0,8 mM de ACh, 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) e 1,0 mM de 5,5'-ditiobis-ácido-2-nitrobenzoico (DTNB). Foram utilizados 50 μ L de cada amostra adicionadas à solução e pré-incubadas por 3 minutos.

Em seguida, a hidrólise foi analisada pela formação de ânions amarelos (diânion tiolato) de DTNB, mensurados em 412 nm de absorvância por 2 minutos em intervalos de 30 segundos a uma temperatura de 25°C. A atividade da enzima das

amostras analisadas foi expressa em μmol de iodeto de acetilcolina (ACSh) por hora por mg de proteína. As amostras foram avaliadas em duplicata. As proteínas foram determinadas pelo de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Análise estatística

Os resultados referentes à análise bioquímica da atividade da AChE e também referentes aos testes comportamentais de atividade locomotora, interação social e IPP foram obtidos pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, acompanhada do teste de Newman-Keuls quando F foi significativo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os resultados do teste comportamental de esQUIVA inibitória foram expressos por mediana e intervalos interquartis e analisado pelos testes de Wilcoxon, para comparações dentro de grupos individuais, e Kruskal-Wallis H, para comparações entre os grupos. Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente. Dois programas foram utilizados para a realização das análises estatísticas: *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) e o software Estatística 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Testes comportamentais

4.1.1 Atividade locomotora

A figura 6 demonstra o efeito da exposição à fumaça de cigarro no início da vida e da administração de cetamina sobre a atividade locomotora da prole adulta. A análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) revelou diferença entre as variáveis Cetamina e Salina [$F(1,41)=115,81$; $p<0,01$] e interação entre as variáveis Cigarro e Cetamina [$F(1,41)=5,26$; $p<0,05$]. As diferenças entre as variáveis foram indicadas pelo pós-teste de Newman-Keuls, descritas a seguir.

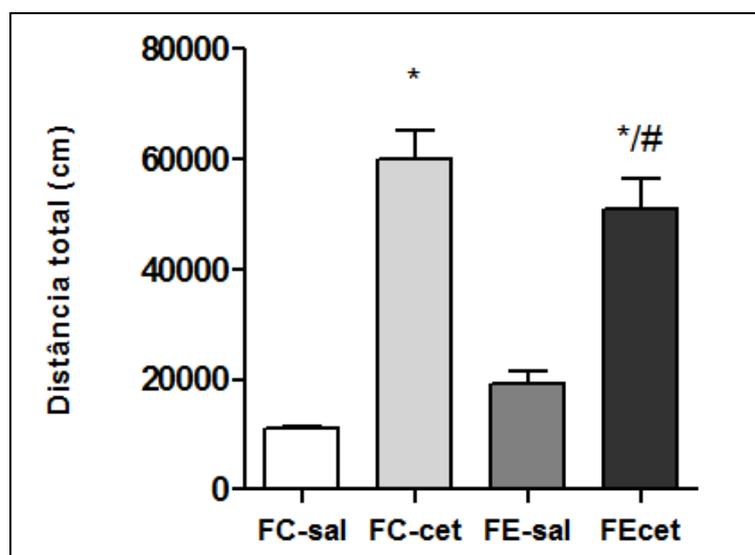


Figura 6: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da administração de cetamina na fase adulta sobre a atividade locomotora de machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM, $n=12-15$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). # diferente do grupo de filhotes 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.

Os grupos de animais FC-cet e FE-cet apresentaram aumento da distância percorrida, quando comparados ao grupo de FC-sal ($p<0,01$). O grupo de FE-cet também demonstrou aumento neste quesito quando comparado ao grupo FE-sal

($p < 0,01$). É importante observar que o resultado apresentado pelos dois agentes em associação (cigarro e cetamina) foi semelhante ao resultado apresentado somente pela cetamina.

4.1.2 Interação social

A figura 7 descreve os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no início da vida e da administração de cetamina sobre os indicadores de interação social (latência, número de contatos e tempo total de contatos) na prole com aproximadamente 60 dias de vida. A análise estatística via ANOVA de duas vias revelou diferença entre as seguintes variáveis no parâmetro latência: Cigarro e Controle [F (1,17)=6,45; $p < 0,05$], Cetamina e Salina [F (1,17)=86,05; $p < 0,01$], além de interação entre as variáveis Cigarro e Cetamina [F (1,17)=8,77; $p < 0,01$]. As diferenças entre as variáveis foram também especificadas pelo pós-teste de Newman-Keuls.

A latência, ilustrada na figura 7A, mostrou-se alterada no grupo de FC-cet, revelando-se aumentada em relação ao grupo FC-sal ($p < 0,01$). Observou-se também um aumento no tempo que os animais levaram para se tocar pela primeira vez no grupo FE-cet, quando comparado com os grupos de FC-sal ($p < 0,01$) e FE-sal ($p < 0,01$). Ainda neste parâmetro, a exposição à fumaça de cigarro minimizou os efeitos gerados pela cetamina. Tal efeito pode ser observado, pois o grupo de FE-cet mostrou efeito significativo na latência, quando comparados ao grupo FC-cet ($p < 0,01$).

Nos parâmetros número total de contatos (figura 7B) e tempo total de contato (figura 7C), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados.

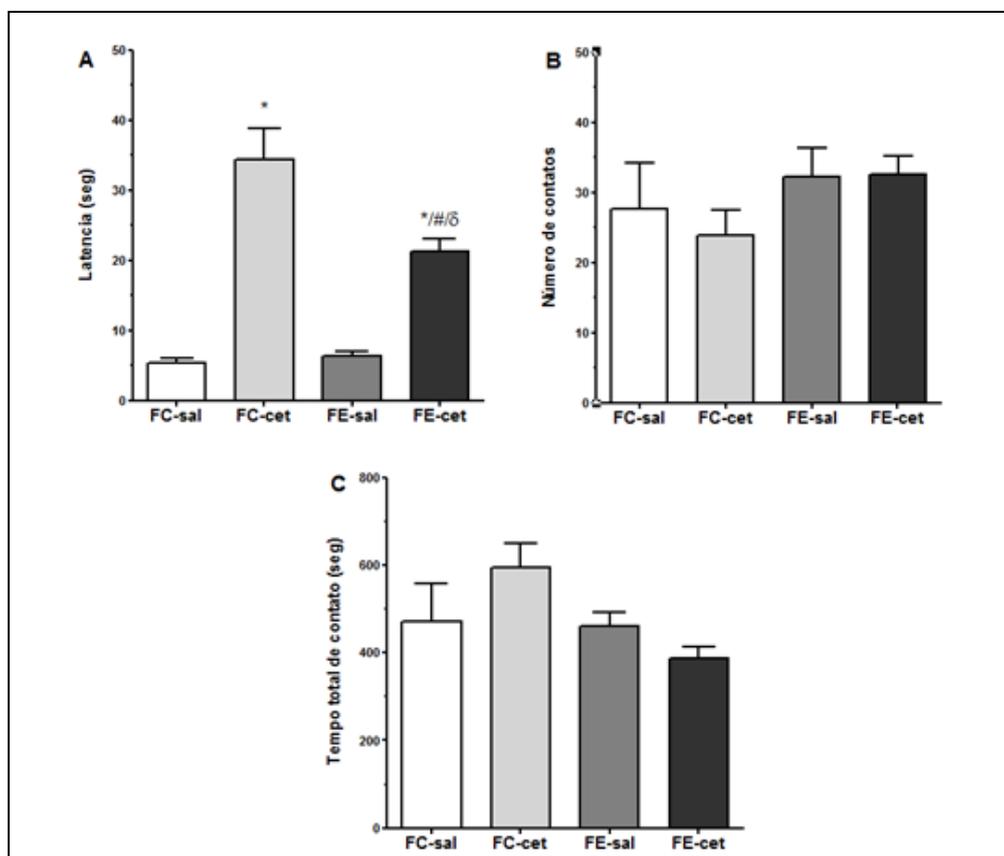


Figura 7: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da administração de cetamina na fase adulta sobre a interação social (A= latência, B= número de contatos, C= tempo total de contatos). Os valores foram expressos como média \pm EPM, n=12-15. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). δ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina (FC-cet). # 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.

4.1.3 Esquiva inibitória

A figura 8 demonstra os efeitos da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e da administração de cetamina sobre o perfil cognitivo da prole adulta, a partir do teste de esquiva inibitória. Inicialmente, foi realizado o teste não paramétrico para amostras dependentes do tipo *Wilcoxon*, para avaliar alterações ocorridas em cada grupo. Os resultados indicaram que os animais do grupo FC-sal apresentaram

aumento na latência nos três tipos de memória ($p<0,01$) (memória de trabalho, memória de curta duração e memória de longa duração), ou seja, aprenderam quando comparados ao treino deste mesmo grupo. Nos grupos de FC-cet, FE-sal e FE-cet, somente na memória de trabalho não foi possível observar o aprendizado dos animais quando estes foram comparados ao treino de seus respectivos grupos.

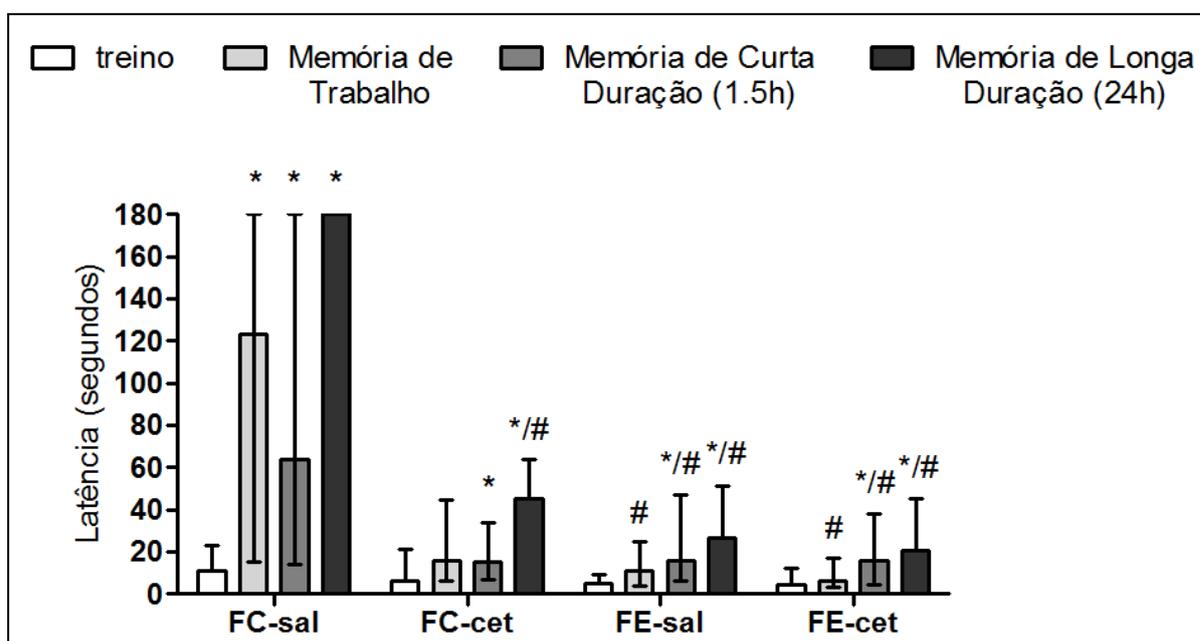


Figura 8: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da administração de cetamina na fase adulta sobre o teste de esquiva inibitória de machos. Os valores foram expressos por mediana e intervalos interquartil, $n=12-15$. * diferente do treino de cada grupo. # diferente do mesmo tipo de memória do grupo de filhotes controle + salina (FC-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.

Em seguida, foi realizado o teste não paramétrico para amostras independentes do tipo *Kruskal-Wallis H* para realizar a comparação dos mesmos tipos de memória em grupos distintos. Esses resultados indicaram que o grupo FC-cet demonstrou déficit de aprendizado durante a memória de longa duração quando comparado ao mesmo tipo de memória no grupo de FC-sal ($p<0,01$). Nesta mesma avaliação, os roedores do grupo FE-sal demonstraram diminuição da memória de trabalho ($p<0,05$) e de curta ($p<0,05$) e longa ($p<0,01$) duração quando comparados

aos mesmos tipos de memória do grupo de FC-sal, evidenciando o efeito prejudicial na cognição desses animais ocasionado pelo estresse pré-natal. Os animais do grupo FE-cet igualmente revelaram déficit cognitivo na memória de trabalho ($p<0,01$), na memória de curta duração ($p<0,05$) e na memória de longa duração ($p<0,01$), quando comparados às memórias do grupo FC-sal.

4.1.4 Inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto

A figura 9 demonstra os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no início da vida e da administração de cetamina na função sensório-motora da prole adulta utilizando-se o teste de IPP. Os resultados estatísticos através do modelo ANOVA de duas vias revelou diferença entre as seguintes variáveis em 70dB: Cetamina e Salina [F (1,34)=18,03; $p<0,01$] e interação entre as variáveis Cigarro e Cetamina [F (1,34)=4,25; $p<0,05$]; em 75dB: revelou diferença entre as variáveis Cetamina e Salina [F (1,34)=28,95; $p<0,01$] e interação entre Cigarro e Cetamina [F (1,34)=4,97; $p<0,05$]; em 80dB: revelou diferença entre Cetamina e Salina [F (1,34)=30,42; $p<0,01$] e interação entre as variáveis Cigarro e Cetamina [F (1,34)=4,22; $p<0,05$]. As diferenças entre as variáveis foram especificadas pelo pós-teste de Newman-Keuls.

O grupo FC-sal apresentou inibição do sobressalto mediante PP por apresentarem valores normais, ou seja, aumento da porcentagem de IPP. A prole pertencente ao grupo FC-cet apresentou déficit de IPP quando comparada ao grupo FC-sal nas três intensidades estudadas (70 dB, 75 dB e 80 dB) ($p<0,01$). Da mesma maneira, o grupo de FE-cet demonstrou déficit significativo de IPP quando comparado aos animais do grupo FC-sal nas mesmas intensidades ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,01$, respectivamente), revelando um efeito similarmente prejudicial ao perfil

cognitivo da prole submetida aos dois agentes em associação (cigarro + cetamina) àquela submetida apenas à administração de cetamina na fase adulta nas intensidades de PP de 70 dB e 80 dB. No entanto, em 75 dB, os resultados demonstram uma possível melhora no déficit sensório-motor dos animais pertencentes ao grupo FE-cet, quando comparados ao grupo FC-cet ($p < 0,05$). Estes resultados são reforçados pelo aumento da IPP nos animais FE-sal quando comparados ao grupo FC-cet em todas as intensidades ($p < 0,01$).

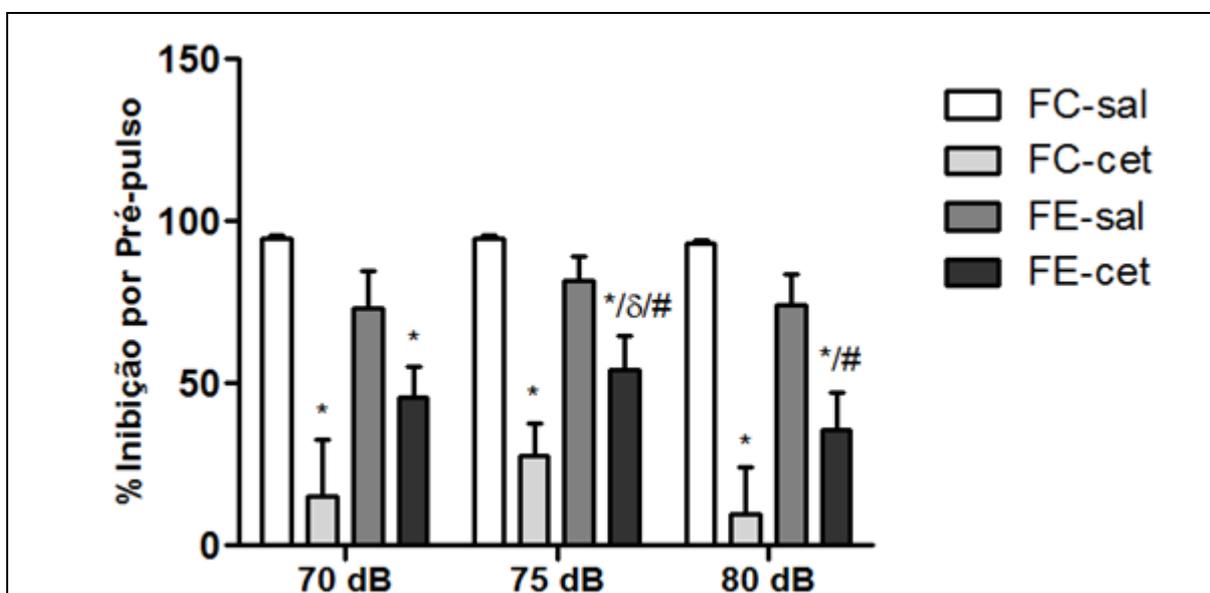


Figura 9: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da administração de cetamina na fase adulta sobre a inibição por pré-pulso do reflexo do sobressalto de machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM, $n=8-10$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-sal). δ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina (FC-cet). # 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.

4.2 Teste Neuroquímico

4.2.1 Atividade da AChE

A atividade da AChE foi avaliada em três estruturas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e estriado. A figura 10 demonstra o efeito da exposição à fumaça de cigarro no período pré-natal e da administração de cetamina sobre a atividade da

enzima AChE nestas três estruturas da prole adulta. A ANOVA de duas vias revelou interações entre as seguintes variáveis no córtex pré-frontal: Cigarro e Controle ($p < 0,01$), Cetamina e Salina ($p < 0,01$) e Cigarro e Cetamina ($p < 0,01$). O resultado dessas interações foi especificado pelas diferenças indicadas pelo pós-teste de Newman-Keuls.

Na figura 10A, a atividade da AChE no córtex pré-frontal mostrou-se aumentada no grupo de FC-cet quando comparado ao grupo de FC-sal ($p < 0,05$). Nos animais do grupo de FE-cet, os valores da atividade da AChE também se apresentaram aumentados quando comparados aos grupos de FC-sal ($p < 0,01$), FC-cet ($p < 0,01$) e FE-sal ($p < 0,01$).

A figura 10B revela os resultados encontrados com relação à atividade da AChE no hipocampo desses animais. Foram observadas interações entre as seguintes variáveis: Cigarro e Controle ($p < 0,01$), Cetamina e Salina ($p < 0,01$) e Cigarro e Cetamina ($p < 0,01$). Quando avaliadas as diferenças entre grupos, foi possível observar que o grupo de FE-cet, assim como em córtex pré-frontal, mostrou aumento na atividade da AChE quando comparado ao grupo de animais de FC-sal ($p < 0,01$), FC-cet ($p < 0,01$) e FE-sal ($p < 0,01$). Da mesma maneira, o grupo de FC-cet apresentou um aumento da atividade da AChE quando comparado ao grupo FC-sal ($p < 0,01$).

No estriado (figura 10C), foram encontradas interações significativas entre as variáveis Cigarro e Controle ($p < 0,01$), Cetamina e Salina ($p < 0,01$) e Cigarro e Cetamina ($p < 0,01$). Nesta estrutura, o aumento da atividade da AChE foi também observado nos grupos FC-cet e FE-cet. O primeiro grupo (FC-cet), dentre as estruturas analisadas, foi o que mais obteve aumento na atividade da enzima AChE quando comparado ao grupo de FC-sal ($p < 0,01$). Por outro lado, o grupo de FE-cet

obteve resposta muito semelhante às apresentadas em córtex pré-frontal e hipocampo. Este grupo apresentou um aumento desta atividade enzimática quando comparados aos grupos FC-sal ($p<0,01$), FC-cet ($p<0,01$) e FE-sal ($p<0,01$).

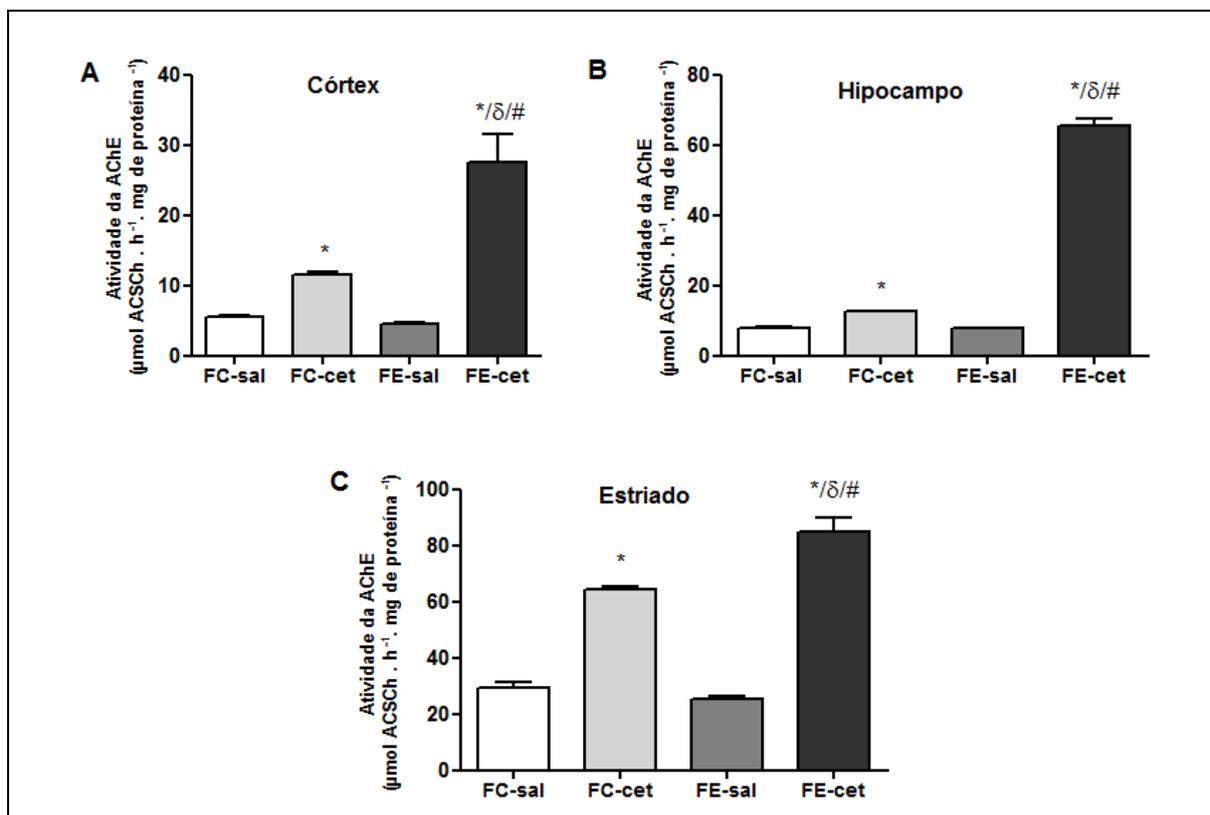


Figura 10: Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da administração de cetamina na fase adulta sobre a atividade da acetilcolinesterase em (A) córtex pré-frontal, (B) hipocampo e (C) estriado de machos. Os valores foram expressos como média \pm EPM, $n=6-8$. * diferente do grupo de filhotes controle + salina (FC-Sal). δ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina (FC-cet). # 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.

5. DISCUSSÃO

Devido à associação entre alterações ambientais durante o período gestacional e à suscetibilidade para o desenvolvimento da esquizofrenia, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da exposição à fumaça de cigarro durante o período pré-natal sobre parâmetros comportamentais e atividade da AChE em estruturas cerebrais de animais submetidos a um modelo experimental de esquizofrenia na fase adulta, investigando a predisposição desta prole a desenvolver o transtorno.

Alguns estudos pré-clínicos durante o período gestacional mostram que a exposição à nicotina desencadeia uma disfunção do sistema dopaminérgico (Fung e Lau, 1989; Muneoka et al., 1999) e induz hiperatividade nos filhotes quando adultos, elevando de forma direta a liberação de DA em estriado e córtex pré-frontal (Muneoka et al., 1997; Azam et al., 2007; Blood-Siegfried e Rende, 2010). Tal fato colabora para o entendimento dos resultados do presente trabalho, em que a exposição à fumaça de cigarro no período gestacional juntamente com a administração de cetamina na fase adulta induziu aumento da atividade locomotora. Segundo alguns autores, a nicotina tem ação direta em receptores nicotínicos nos terminais dopaminérgicos, desencadeando a liberação de dopamina no estriado (Rapier et al., 1990; Grady et al., 1992; Clarke e Reuben, 1996; Wonnacott, 1997), levando a alterações no comportamento a longo prazo (Gold et al., 2009).

Isto sugere que a nicotina tem como principal sítio de ação os receptores colinérgicos, que levam a modificações no desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos, elevando o risco de indivíduos expostos ao cigarro desenvolverem esquizofrenia (Lichtensteiger et al., 1988; Azam et al., 2007). Ao mesmo tempo, esse aumento da liberação de neurotransmissores induzido pela exposição ao cigarro

durante o neurodesenvolvimento desencadeia alterações entre as interações DA, ACh e GLU, devido também a uma modificação na integração funcional entre os sistemas colinérgico e glutamatérgico nas regiões mesocorticolímbicas em períodos diferentes de desenvolvimento (Wonnacott et al., 2006).

Estudos com modelos animais de esquizofrenia mostram que alterações na função glutamatérgica cortical podem estar associadas a uma disfunção tanto no sistema dopaminérgico como colinérgico (Grace, 1991; Carlsson et al., 1999; Jentsch e Roth, 1999; Coyle et al., 2003). A cetamina, substância usada em modelos animais desta doença, leva a uma hipofunção glutamatérgica e mimetiza os sintomas da esquizofrenia (De Oliveira et al., 2011; Smith et al., 2011). Estes estudos corroboram os achados deste trabalho, no qual a administração de cetamina aumentou a atividade locomotora dos animais. Rodvelt et al. (2008) observaram que o bloqueio do receptor NMDA pela cetamina induz hipersensibilidade à nicotina no estriado e que a nicotina reforçou o aumento da liberação de DA, sendo que esta resposta foi mediada pelo bloqueio de receptor NMDA.

Os achados do presente estudo relacionados à atividade locomotora elucidam que tanto o cigarro e cetamina juntos, como a cetamina administrada isoladamente, alteram o comportamento motor dos animais. Resultados que comprovam a indução de sintomas positivos da esquizofrenia pela cetamina, e ajudam a compreender que a hiperlocomoção induzida por esta droga é possivelmente devido ao bloqueio do receptor NMDA. Por outro lado, a hiperlocomoção gerada pela combinação de dois fatores (cigarro + cetamina) é provavelmente devido a uma interação mais complexa entre os sistemas colinérgico, dopaminérgico e glutamatérgico.

Estudos pré-clínicos utilizam o teste de interação social com o intuito de avaliar o comportamento relacionado aos sintomas negativos (Sams-Dodd, 1995; Deroza et al., 2012). Neste sentido, mediante os resultados do teste de interação social demonstrados pelo presente estudo, pode-se observar o concreto efeito da cetamina como indutor de sintomas negativos devido ao aumento da latência nos animais do grupo FC-Cet. Tal achado está em concordância com alterações sociais encontradas em pacientes esquizofrênicos (Neill et al., 2010).

Cornelius (2014) realizou um estudo caso-controle que teve como objetivo avaliar o risco de desenvolvimento de esquizofrenia e a gravidade de seus sintomas associados à exposição ao cigarro pré-natal e, dessa forma, mostrou que tal associação leva a um maior agravamento dos sintomas negativos. Esta classe de sintomas é de certa forma menos impactante. Contudo, podem ser mais incapacitantes e menos passivos ao tratamento. Dentre as características desses sintomas estão diminuída expressão e/ou reação emocional, reduzida interação social e apatia (Ross et al., 2006).

Diferentes modelos animais de esquizofrenia mostram alterações no comportamento social, dentre eles estão os tratamentos com anfetaminas ou antagonistas de receptor NMDA (Sams-Dodd, 1995;1997;1998; Becker e Grecksch, 2004). A administração de cetamina, substância utilizada neste estudo para mimetizar os sintomas da esquizofrenia, tem se mostrado um bom modelo animal, em particular, para os sintomas negativos (Zugno et al., 2013a).

A exposição à nicotina, em alguns estudos, vem sendo associada com alterações, a longo e curto prazo, em sistemas de excitação e humor mediados por receptor NMDA, envolvido na esquizofrenia (Knott et al., 2006), sendo considerado um fator prognóstico para o início do transtorno (Weiser et al., 2004). Por outro lado,

trabalhos vêm mostrando o tabagismo como fator protetor (Zammit et al., 2003), ou seja, em humanos a nicotina pode provocar o abrandamento de alterações cognitivas geradas pela cetamina (Knott et al., 2011). Dessa forma, o uso do cigarro em alguns casos é possivelmente uma maneira de automedicação, quando relacionado aos sintomas cognitivos, afetivos, efeitos colaterais de alguns fármacos (Levin et al., 1996) e também sintomas negativos (Chambers et al., 2001; Deroza et al., 2012). Estes estudos corroboram os dados encontrados no parâmetro latência do teste de interação social, em que o grupo FE-cet mostrou diferença significativa comparado ao grupo FC-cet, revelando a exposição à fumaça de cigarro no período pré-natal como um possível fator minimizador dos sintomas negativos gerados pela cetamina.

Acredita-se que o mecanismo envolvido neste processo esteja ligado à ativação de nAChR pela nicotina em neurônios dopaminérgicos na ATV da via de recompensa mesocorticolímbica, desencadeando o aumento de DA no NAcc e córtex pré-frontal (Dani e Heinemann, 1996; Watkins et al., 2000; Dani e De Biasi, 2001). Porém, é importante salientar que o estudo em questão teve como propósito avaliar os efeitos da exposição pré-natal à fumaça de cigarro em relação à presença de sintomas negativos na prole durante a fase adulta. Diferentemente de outros estudos que mostraram um efeito redutor de sintomas negativos, em que os animais são diretamente expostos ao tabagismo (Deroza et al., 2012). Ademais, ainda não se sabe ao certo se a nicotina interfere de forma benéfica na esquizofrenia e, até o momento, não existem teorias explicando a associação entre uma má evolução na esquizofrenia em longo prazo e o tabagismo. A agregação desses dois fatores pode ser também devido à alta vulnerabilidade à dependência de nicotina como a uma

maior suscetibilidade para uma forma mais grave de esquizofrenia (Aguilar et al., 2005).

O presente estudo também abordou resultados relativos ao teste de esquia inibitória com o objetivo de analisar o perfil cognitivo dos animais, e assim verificar se a exposição ao cigarro durante a gestação e/ou administração de cetamina na idade adulta são capazes de gerar déficit de memória tardiamente. O tabagismo durante a gravidez tem sido relacionado com déficit da função cognitiva e auditiva (Fried et al., 2003), deficiência de aprendizagem, comportamento inadequado (Eskenazi e Trupin, 1995) e déficit de atenção e hiperatividade (ADHD) (Eskenazi e Trupin, 1995; Milberger et al., 1996; Linnet et al., 2003; Thapar et al., 2003; Button et al., 2005; Button et al., 2007).

Sabe-se que a fumaça do cigarro contém compostos bioativos que causam alterações no desenvolvimento cerebral e mudanças neuroquímicas irreversíveis (Naeye, 1992; Slotkin, 1999). A nicotina possui a capacidade de cruzar a barreira placentária, desencadeando alterações no crescimento e no comportamento da prole (Vaglenova et al., 2008). Esta substância apresenta um efeito neuroteratogênico, levando ao dano celular, alterações na atividade e desenvolvimento sináptico e desencadeando um déficit funcional e cognitivo na prole de fumantes (Slotkin, 1999).

Em concordância com dados que mostram o prejuízo cognitivo em indivíduos esquizofrênicos devido ao tabagismo durante a gravidez, os resultados do presente trabalho mostram que a prole de ratas expostas à fumaça de cigarro, e também aqueles adicionalmente submetidos ao modelo de cetamina na fase adulta, apresentaram prejuízo nos três tipos de memória (de trabalho, curta e longa), quando comparados aos mesmos tipos de memória no grupo controle. Esses

resultados evidenciam o provável dano cognitivo causado pelo cigarro pré-natal, prejuízo este que se mantém até a idade adulta.

A nicotina está compreendida em múltiplas vias de neurotransmissores, como os sistemas colinérgico e catecolaminérgico. Alterações por longos períodos nesses sistemas podem estar envolvidas nas mudanças comportamentais ocorridas pela exposição pré-natal (Levin et al., 1993; Ernst et al., 2001; Slotkin, 2004). Alguns estudos mostram que indivíduos com o transtorno apresentam uma menor expressão de nAChRs do tipo $\alpha 7$ (Guan et al., 1999; Breese et al., 2000; Marutle et al., 2001), e que polimorfismos no local de produção do gene deste receptor estão envolvidos com o déficit sensorial dos pacientes (Leonard et al., 2002). Os receptores do tipo $\alpha 7$ são expressos maciçamente durante as fases de desenvolvimento. Desta forma, a exposição ao cigarro pré-natal leva à sua ativação e insensibilização, desencadeando a sua disfunção em longo prazo (Srinivasan et al., 2011).

Adicionalmente, a nicotina hiperestimula o desenvolvimento de receptores colinérgicos e, conseqüentemente, descontinua a migração neuronal, proliferação e diferenciação celular, induzindo uma menor produção neuronal e função sináptica anormal e diminuída (Slotkin, 1998; Ernst et al., 2001). Um estudo realizado por Eppolito et al. (2010) mostrou que a exposição à nicotina pré e pós-natal desencadeia prejuízo cognitivo e comportamento ansiogênico elevado, além de resultar em alterações no sistema colinérgico em longo prazo. Estas informações podem explicar, ao menos de forma parcial, os resultados comportamentais alterados neste estudo, e que mostram a influência do período gestacional em mecanismos cognitivos, mesmo na fase adulta.

O teste comportamental em questão também demonstrou prejuízo cognitivo, com déficit em memória de trabalho no grupo FC-cet quando comparado ao treino. Porém, somente durante a memória de longa duração houve diferença significativa quando comparado ao mesmo tipo de memória do grupo FC-sal. A deficiência na memória de trabalho é uma das alterações cognitivas envolvidas na esquizofrenia. Segundo Timofeeva e Levin (2011), a memória de trabalho é um processo ativo, que armazena temporariamente as informações relevantes para uma tarefa comportamental em curso particular. As alterações cognitivas presentes na esquizofrenia têm sido relatadas por desempenhar um papel fundamental neste transtorno (Lewis et al., 2005; Lewis e Gonzalez-Burgos, 2006).

Estudos vinculam estas alterações cognitivas com os receptores NMDA. Um trabalho realizado por Mohn et al. (1999) demonstrou que a redução de NMDAR1 (NR1) em ratos geneticamente modificados desencadeou déficit social e cognitivo. Outros trabalhos avaliaram o efeito crônico da cetamina em parâmetros bioquímicos e comportamentais e demonstraram que a administração desta substância também leva a déficits cognitivos em ratos, mesmo após a suspensão do tratamento (Chatterjee et al., 2011; Zungo et al., 2014b). As alterações comportamentais produzidas por esta substância são, em parte, vinculadas ao bloqueio de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, desencadeando uma desinibição da atividade neural nas estruturas do sistema límbico, como o córtex pré-frontal (Moghaddam et al., 1997). Este mecanismo leva à demasiada liberação de GLU e DA nessas regiões (Moghaddam et al., 1997; Lorrain et al., 2003; Razoux et al., 2007).

Indivíduos com esquizofrenia apresentam alterações cognitivas anteriormente e imediatamente após o surgimento de psicose, características que podem indicar o

fator cognitivo como um traço marcador para o surgimento do transtorno (Zaytseva et al., 2015). Trabalhos realizados por Green et al. (2000) e Green et al. (2004) sugerem que o grau de déficit cognitivo desencadeia um impacto no desempenho social e auxilia na decisão do prognóstico de recuperação destes pacientes. Isto ressalta a importância do presente estudo, em que o enfoque no período pré-natal traz resultados relevantes, que podem complementar estudos relacionados ao prejuízo cognitivo presente na esquizofrenia, auxiliando no entendimento do transtorno.

Outro teste comportamental realizado neste estudo foi a verificação da IPP, que vem paralelamente sendo considerado um bom instrumento para avaliação do perfil cognitivo (Salum et al., 2007). A inibição por pré-pulso é classificada como um endofenótipo neurofisiológico (Greenwood et al., 2007), e o déficit da IPP é relacionado com alguns sintomas da esquizofrenia, como o transtorno de pensamento e distração (Turetsky et al., 2007).

As estruturas corticais e límbicas, como córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, estão relacionadas com o controle das funções sensório-motoras (Swerdlow et al., 2001). Estas estruturas cerebrais estão alteradas na esquizofrenia (Swerdlow e Geyer, 1998) e o transtorno em questão apresenta sintomas como dano intelectual e prejuízo em funções de memória, atenção e execução (Weickert et al., 2000). O teste de IPP tem como objetivo avaliar o controle desempenhado por estas estruturas sobre o sistema de filtro sensório-motor ou detectar déficits nesse processo. O mecanismo de filtro parece preservar o sistema nervoso de um elevado número de informações (Weiss e Feldon, 2001).

Desta forma, avaliando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se perceber um déficit de IPP nos animais tratados com cetamina, dados que se

repetem nas três intensidades de pré-pulso (70 dB, 75 dB e 80 dB). Tais resultados confirmam estudos mostrando que os antagonistas de receptor NMDA induzem prejuízo na IPP (Mansbach e Geyer, 1991; Swerdlow et al., 1998; Duncan et al., 2001; Levin et al., 2005; Imre et al., 2006; Monte et al., 2013; Zugno et al., 2014a). Alguns estudos mostram que a cetamina induz déficit neste processo de forma dependente da dose utilizada (Mansbach e Geyer, 1991; Swerdlow et al., 1998).

Uma provável explicação para o surgimento desses efeitos é sugerida por um estudo realizado por Bakshi e Geyer (1998), em que a infusão de MK-801, um antagonista de receptor NMDA, leva a um prejuízo na IPP possivelmente devido a alterações em estruturas do sistema límbico, como a amígdala e o hipocampo dorsal, além de descrever uma presumível relação também com o córtex pré-frontal medial neste processo. Acredita-se que estes receptores estejam fixados em interneurônios GABAérgicos, e o bloqueio destes receptores desencadeie uma interrupção da inibição da atividade neuronal nestas regiões.

O sistema de óxido nítrico (NO) vem sendo abordado como outra possibilidade de mecanismo com relação ao efeito comportamental gerado pela cetamina (Salum et al. 2007). O NO produzido e liberado como consequência da ativação de receptores NMDA atua bloqueando a recaptção de DA e, portanto, aumentando a liberação deste neurotransmissor (Kiss e Vizi, 2001; Rocchitta et al., 2005). Manipulações que alteram o sistema nitrérgico, juntamente com os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, indicam o possível envolvimento do NO no controle de atividades comportamentais (Snyder e Ferris, 2000).

Os resultados encontrados no teste de IPP, com relação ao efeito da cetamina, mostram-se relevantes, considerando que as alterações cognitivas são sintomas importantes, com provável valor preditivo (Green, 1996), e que estão

presentes em indivíduos com esquizofrenia. A IPP é regulada pelo circuito córtico-límbico-estriado-pálido, sofrendo prejuízo mediante algumas particularidades experimentais, como a utilização de antagonistas de receptor NMDA (Gogos et al., 2012).

Alterações na função cognitiva e processamento do sistema auditivo também vêm sendo associados ao tabagismo durante o período gestacional (Saxton, 1978; Picone et al., 1982; Sexton et al., 1990; McCartney et al., 1994; Fried et al., 1998;2003; Jacobsen et al., 2006; Jacobsen et al., 2007). O que fortalece os resultados encontrados neste estudo, em que a exposição à fumaça do cigarro associada à cetamina na fase adulta desencadeou déficit da IPP quando comparado ao grupo FC-sal em todas as intensidades de pré-pulso.

Acredita-se que as alterações comportamentais observadas na prole exposta ao tabagismo gestacional, como o prejuízo na IPP (Popke et al., 1997), estejam vinculadas, parcialmente à nicotina que atua em nAChRs durante o período de desenvolvimento do SNC (Slotkin et al., 1987; Navarro et al., 1989). A nicotina durante a gravidez pode, então, descontinuar o desenvolvimento das áreas cerebrais responsáveis pela inibição do reflexo do sobressalto (Popke et al., 1997; Heath e Picciotto, 2009) que se encontram, sobretudo, no mesencéfalo (Fendt et al., 2001). Os colículo superior e inferior e o tálamo são regiões envolvidas na regulação da IPP, que por sua vez são inervadas por projeções de ACh (Beninato e Spencer, 1986; Broide et al., 1995; Broide et al., 1996; Happe e Morley, 2004).

No entanto, é válido ressaltar que os resultados deste trabalho demonstraram uma possível reversão dos efeitos da cetamina pela exposição à fumaça de cigarro em 75 dB. Por outro lado, o efeito gerado somente pela cetamina e aquele gerado pela combinação de dois fatores de risco (cigarro + cetamina) foi semelhante nas

outras duas intensidades de PP, considerando a ausência de diferença significativa em comparação com o grupo FC-cet. Tal fato indica que possivelmente o resultado encontrado no teste de IPP neste estudo seja devido, em sua maior parte, ao efeito da cetamina, que leva então a um déficit no sistema de filtro sensorio-motor. Todavia, de igual importância, o grupo de FE-cet demonstrou que a exposição à fumaça de cigarro, em duas intensidades, não foi capaz de minimizar os efeitos gerados pelo fármaco antagonista de receptor NMDA.

O presente estudo também avaliou a atividade da AChE com o intuito de observar a existência de alguma alteração nesta enzima, devido a exposição à fumaça de cigarro e/ou à cetamina. Sabe-se que a ACh é um neurotransmissor excitatório, essencial para funções motora, de memória, aprendizado, controle do fluxo sanguíneo cerebral, percepção e atenção seletiva (Schetinger et al., 1999; Yu e Dayan, 2002). Dados na literatura mostram que níveis alterados desse neurotransmissor vêm sendo associados a delírios e alucinações (Burt, 2000; Hasselmo, 2006), e indica que o seu metabolismo possui uma alta relação com funções cognitivas (Hasselmo, 2006).

A esquizofrenia é vinculada a uma série de disfunções cognitivas. Dessa maneira, o sistema colinérgico vem sendo considerado fundamental para a modulação neural de mecanismos subjacentes a esses sintomas (Davis et al., 1975; Powchik et al., 1998; Sarter et al., 2012). A atividade aumentada da enzima AChE desencadeia uma hidrólise exacerbada e consequente diminuição de ACh em receptores colinérgicos, levando à função cerebral reduzida, sintoma observado no transtorno (Haroutunian et al., 1994; Guan et al., 1999). Paralelo a isso, fármacos inibidores da AChE vêm sendo estudados com o intuito de melhorar parâmetros cognitivos de indivíduos esquizofrênicos (Ribeiz et al., 2010).

Nesta avaliação, os resultados demonstraram que os animais que receberam somente administração de cetamina desenvolveram um aumento da atividade da AChE nas três estruturas analisadas (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado), o que poderia levar possivelmente a uma degradação de ACh nessas estruturas. Esses dados corroboram estudos prévios em que antagonistas de receptores do tipo NMDA, administrados cronicamente, também aumentaram a atividade da AChE (Zugno et al., 2013b; Zugno et al., 2014b; Zugno et al., 2015). Uma possível explicação para tal alteração é que a cetamina vem sendo considerada também um antagonista nAChR (Scheller et al., 1996; Chatterjee et al., 2012), aumentando assim a quantidade de ACh na fenda, ativando de forma exacerbada a enzima AChE e prejudicando a formação de memória no hipocampo (Chatterjee et al., 2012). Esse resultado poderia ser uma consequência desse processo, tornando-se um mecanismo compensatório (Zugno et al., 2015).

As alterações bioquímicas apoiam os resultados encontrados nos testes comportamentais de avaliação do perfil cognitivo desses animais. O prejuízo no filtro sensorio-motor pela cetamina com consequente redução da IPP acompanha o aumento da AChE nas três regiões estudadas. Um estudo realizado por Ballmaier et al. (2002) mostrou que o uso de um inibidor da enzima AChE (rivastigmina) desencadeou o aumento de ACh no núcleo basal magnocelular (NBM) – região de onde sobretudo se originam neurônios colinérgicos corticopetal, finalizados em regiões corticais e camadas (Lysakowski et al., 1989; Wenk, 1997) – com decorrente redução do déficit na IPP gerado pela injeção de uma imuno toxina em neurônios colinérgicos no NBM. Este estudo confirma que os neurônios colinérgicos do NBM estão envolvidos na filtragem de estímulo sensorio-motor.

Acredita-se que o NBM regula o mecanismo sensório motor por meio de projeções para áreas como córtex pré-frontal e regiões límbicas (Ballmaier et al., 2001), estruturas relacionadas com o controle dessas funções e que paralelamente mostraram alteração bioquímica no presente estudo. Como referido acima, a ACh é um neurotransmissor envolvido em processos de memória e aprendizado, o que condiz também com os resultados encontrados no teste de esquiva inibitória, sendo possível que estas alterações comportamentais sejam devido a alterações no sistema colinérgico, com o aumento da degradação de ACh pela enzima AChE.

O presente estudo também mostrou valores de AChE exacerbados na presença de um segundo agente adverso (fumaça de cigarro), quando comparado aos grupos FC-sal, FC-cet e FE-sal, corroborando estudos anteriores em que a exposição pré-natal à fumaça de cigarro também foi capaz de exacerbar os efeitos gerados somente pela cetamina administrada de forma aguda (Zugno et al., 2013a). Vale lembrar que o presente estudo colaborou para a confirmação de que a fumaça de cigarro pode acentuar esses efeitos, também em um modelo crônico de esquizofrenia.

Estudos mostram que a nicotina estimula nAChR induzindo episódios neurodesenvolvimentais por “substituir” a ACh (Navarro et al., 1989; Eriksson et al., 2000). A exposição à nicotina pode então afetar o desenvolvimento de estruturas como cerebelo, hipocampo e córtex sensorial, alterando dessa forma funções sensoriais, motoras e de memória (Roy e Sabherwal, 1998). Estes estudos auxiliam no melhor entendimento dos resultados encontrados nesse trabalho, em que a cetamina e a exposição ao cigarro juntos afetaram o sistema colinérgico, possivelmente aumentando a degradação da ACh, o que poderia explicar as alterações comportamentais encontradas, como déficit de memória e redução da

atividade do filtro sensório-motor. Portanto, roedores machos submetidos à exposição à fumaça de cigarro e à cetamina parecem apresentar uma predisposição a alterações colinérgicas nas áreas estudadas. Essa predisposição é também possivelmente ocasionada por alterações nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico induzidas pela nicotina (Lichtensteiger et al., 1988; Azam et al., 2007; Wang et al., 2011).

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a fase de desenvolvimento pré-natal sofre influências provenientes de agressões ambientais, como o tabagismo no período gestacional. Os 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 também comportamentais não são ainda completamente entendidas. Sendo assim, estudos na mesma linha, como a análise da produção e utilização de um análogo de nicotina como possível agente medicamentoso contra a esquizofrenia, e o aprofundamento de resultados já existentes se faz necessário para uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, considerando ainda que o tema abordado é crucial para elucidar a importância do período de desenvolvimento em determinar a suscetibilidade a doenças crônicas na fase adulta.

REFERÊNCIAS

- Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, Shafa R, Stone W, Glatt SJ, Tsuang MT. Methyloomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;15(1):51-9.
- Abreu-Villaca Y, Filgueiras CC, Guthierrez M, Medeiros AH, Mattos MA, Pereira Mdos S, Manhaes AC, Kubrusly RC. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob Res* 2010;12(7):776-80.
- Adler LE, Gerhardt GA, Franks R, Baker N, Nagamoto H, Drebing C, Freedman R. Sensory physiology and catecholamines in schizophrenia and mania. *Psychiatry Res* 1990;31(3):297-309.
- Aguilar MC, Gurpegui M, Diaz FJ, De Leon J. Nicotine dependence and symptoms in schizophrenia: naturalistic study of complex interactions. *Br J Psychiatry* 2005;186:215-21.
- Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 2004;10(25):S18-25.
- Apa. "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases". fourth edition (DSM-IV). Washington, DC APA; 1994.
- 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.
- Azevedo Marques L, Giera M, Lingeman H, Niessen WM. Analysis of acetylcholinesterase inhibitors: bioanalysis, degradation and metabolism. *Biomed Chromatogr* 2011;25(1-2):278-99.

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

Bakshi VP, Geyer MA. Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the noncompetitive NMDA antagonist dizocilpine. *J Neurosci* 1998;18(20):8394-401.

Ballmaier M, Casamenti F, Zoli M, Pepeu G, Spano P. Selective immunolesioning of cholinergic neurons in nucleus basalis magnocellularis impairs prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience* 2001;108(2):299-305.

Ballmaier M, Casamenti F, Scali C, Mazzoncini R, Zoli M, Pepeu G, Spano PF. Rivastigmine antagonizes deficits in prepulse inhibition induced by selective immunolesioning of cholinergic neurons in nucleus basalis magnocellularis. *Neuroscience* 2002;114(1):91-8.

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.

Beers WH, Reich E. Structure and activity of acetylcholine. *Nature* 1970;228(5275):917-22.

Bencherif M, Stachowiak MK, Kucinski AJ, Lippiello PM. Alpha7 nicotinic cholinergic neuromodulation may reconcile multiple neurotransmitter hypotheses of schizophrenia. *Med Hypotheses* 2012;78(5):594-600.

Beninato M, Spencer RF. A cholinergic projection to the rat superior colliculus demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase and choline acetyltransferase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1986;253(4):525-38.

Benneyworth MA, Roseman AS, Basu AC, Coyle JT. Failure of NMDA receptor hypofunction to induce a pathological reduction in PV-positive GABAergic cell markers. *Neurosci Lett* 2011;488(3):267-71.

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.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 2003;17(4):897-902.

Blood-Siegfried J, Rende EK. The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J Midwifery Womens Health* 2010;55(2):143-52.

Blot K, Bai J, Otani S. The effect of non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 on neuronal activity in rodent prefrontal cortex: an animal model for cognitive symptoms of schizophrenia. *J Physiol Paris* 2013;107(6):448-51.

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.

Breese CR, Lee MJ, Adams CE, Sullivan B, Logel J, Gillen KM, Marks MJ, Collins AC, Leonard S. Abnormal regulation of high affinity nicotinic receptors in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2000;23(4):351-64.

Bressan RA, Pilowsky LS. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr* 2003;25(3):177-83.

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.

Broide RS, Robertson RT, Leslie FM. Regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the developing rat somatosensory cortex by thalamocortical afferents. *J Neurosci* 1996;16(9):2956-71.

Broide RS, O'connor LT, Smith MA, Smith JA, Leslie FM. Developmental expression of alpha 7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. *Neuroscience* 1995;67(1):83-94.

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

Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M, Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32(5):1014-23.

Burt T. Donepezil and related cholinesterase inhibitors as mood and behavioral controlling agents. *Curr Psychiatry Rep* 2000;2(6):473-8.

Button TM, Thapar A, McGuffin P. Relationship between antisocial behaviour, attention-deficit hyperactivity disorder and maternal prenatal smoking. *Br J Psychiatry* 2005;187:155-60.

Button TM, Maughan B, McGuffin P. The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev* 2007;83(11):727-32.

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.

Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999;4:37-43.

Carlsson M, Svensson A. Interfering with glutamatergic neurotransmission by means of NMDA antagonist administration discloses the locomotor stimulatory potential of other transmitter systems. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;36(1):45-50.

Chambers RA, Krystal JH, Self DW. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001;50(2):71-83.

Chatterjee M, Ganguly S, Srivastava M, Palit G. Effect of 'chronic' versus 'acute' ketamine administration and its 'withdrawal' effect on behavioural alterations in mice: implications for experimental psychosis. *Behav Brain Res* 2011;216(1):247-54.

Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology* 2012;63(6):1161-71.

- 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.
- Clarke PB, Reuben M. Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *Br J Pharmacol* 1996;117(4):595-606.
- Colgin LL, Kubota D, Lynch G. Cholinergic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(5):2872-7.
- Collier B, Katz HS. Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol* 1974;238(3):639-55.
- Conn PJ, Tamminga C, Schoepp DD, Lindsley C. Schizophrenia: moving beyond monoamine antagonists. *Mol Interv* 2008;8(2):99-107.
- Cornelius MD. People with schizophrenia are more likely to have a mother who smoked during pregnancy than people without the condition. *Evid Based Nurs* 2014;17(3):80
- Coyle JT, Tsai G, Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003:318-27.
- Dani JA, Heinemann S. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 1996;16(5):905-8.
- Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70(4):439-46.
- Davis AJ, Holzbauer M, Sharman DF. Postnatal development of dopamine deamination in the striatum of the rat. *Br J Pharmacol* 1975;55(4):558-60.
- De Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 2005;156(1):139-43.
- 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 Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MP, Streck EL, Quevedo J, Zugno AI. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis* 2011;26(1):69-77.

Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J Neurochem* 1989;52(6):1781-6.

Deakin JF, Simpson MD. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiatr Res* 1997;31(2):277-95.

Deroza PF, Ghedim FV, Heylmann AS, De Luca RD, Budni J, Souza RP, Quevedo J, Zugno AI. Effect of cigarette smoke exposure in the behavioral changes induced by ketamine. *Schizophr Res* 2012;141(1):104-5.

Desantis DT, Schmaltz LW. The mother-litter relationship in developmental rat studies: cannibalism vs caring. *Dev Psychobiol* 1984;17(3):255-62.

Do KQ, Cabungcal JH, Frank A, Steullet P, Cuenod M. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19(2):220-30.

Dolder CR, Lacro JP, Dunn LB, Jeste DV. Antipsychotic medication adherence: is there a difference between typical and atypical agents? *Am J Psychiatry* 2002;159(1):103-8.

Duncan EJ, Madonick SH, Parwani A, Angrist B, Rajan R, Chakravorty S, Efferen TR, Szilagyi S, Stephanides M, Chappell PB, Gonzenbach S, Ko GN, Rotrosen JP. Clinical and sensorimotor gating effects of ketamine in normals. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(1):72-83.

Dursun SM, Deakin JF. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *J Psychopharmacol* 2001;15(4):297-301.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.

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.

- Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF. Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32(3):336-45.
- Eriksson P, Ankarberg E, Fredriksson A. Exposure to nicotine during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain nicotinic receptors and in behaviour of adult mice. *Brain Res* 2000;853(1):41-8.
- Ernst M, Moolchan ET, Robinson ML. Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001;40(6):630-41.
- Eskenazi B, Trupin LS. Passive and active maternal smoking during pregnancy, as measured by serum cotinine, and postnatal smoke exposure. II. Effects on neurodevelopment at age 5 years. *Am J Epidemiol* 1995;142(9):19-29.
- Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull* 2009;35(3):528-48.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology* 2001;156(2-3):216-24.
- 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. *J Psychiatr Res* 2011;45(11):1497-503.
- 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.
- Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 9- to 12-year olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol* 1998;20(3):293-306.
- Fried PA, Watkinson B, Gray R. Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol* 2003;25(4):427-36.

Fung YK, Lau YS. Effects of prenatal nicotine exposure on rat striatal dopaminergic and nicotinic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;33(1):1-6.

Garcia-Rill E, Buchanan R, Mckeon K, Skinner RD, Wallace T. Smoking during pregnancy: postnatal effects on arousal and attentional brain systems. *Neurotoxicology* 2007;28(5):915-23.

Gavin DP, Akbarian S. Epigenetic and post-transcriptional dysregulation of gene expression in schizophrenia and related disease. *Neurobiol Dis* 2012;46(2):255-62.

Geyer MA, Ellenbroek B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(7):1071-9.

Gilmer TP, Dolder CR, Lacro JP, Folsom DP, Lindamer L, Garcia P, Jeste DV. Adherence to treatment with antipsychotic medication and health care costs among Medicaid beneficiaries with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2004;161(4):692-9.

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.

Goff DC. Drug development in schizophrenia: are glutamatergic targets still worth aiming at? *Curr Opin Psychiatry* 2015;28(3):207-15.

Gogos A, Kwek P, Van Den Buuse M. The role of estrogen and testosterone in female rats in behavioral models of relevance to schizophrenia. *Psychopharmacology* 2012;219(1):213-24.

Gold AB, Keller AB, Perry DC. Prenatal exposure of rats to nicotine causes persistent alterations of nicotinic cholinergic receptors. *Brain Res* 2009;23:88-100.

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

Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 1991;41(1):1-24.

Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem* 1992;59(3):848-56.

Green MF. What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am J Psychiatry* 1996;153(3):321-30.

Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? *Schizophr Bull* 2000;26(1):119-36.

Green MF, Kern RS, Heaton RK. Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. *Schizophr Res* 2004;72(1):41-51.

Greenwood TA, Braff DL, Light GA, Cadenhead KS, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Gur RE, Gur RC, Mintz J, Nuechterlein KH, Olincy A, Radant AD, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Swerdlow NR, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Schork NJ. Initial heritability analyses of endophenotypic measures for schizophrenia: the consortium on the genetics of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2007;64(11):1242-50.

Guan ZZ, Zhang X, Blennow K, Nordberg A. Decreased protein level of nicotinic receptor alpha7 subunit in the frontal cortex from schizophrenic brain. *Neuroreport* 1999;10(8):1779-82.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31(4):261-72.

Happe HK, Morley BJ. Distribution and postnatal development of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in the rodent lower auditory brainstem. *Brain Res Dev Brain Res* 2004;153(1):29-37.

Haroutunian V, Davidson M, Kanof PD, Perl DP, Powchik P, Losonczy M, Mccrystal J, Purohit DP, Bierer LM, Davis KL. Cortical cholinergic markers in schizophrenia. *Schizophr Res* 1994;12(2):137-44.

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.

Hashimoto T, Arion D, Unger T, Maldonado-Aviles JG, Morris HM, Volk DW, Mirnics K, Lewis DA. Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2008;13(2):147-61.

Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16(6):710-5.

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. *J Psychiatr Res* 2009;43(16):1287-93.

Heath CJ, Picciotto MR. Nicotine-induced plasticity during development: modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology* 2009;1:254-62.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 1980;87(2):175-89.

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.

Izquierdo I, Barros DM, Mello E Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. 1998;393(6686):635-6.

Jacobsen LK, Slotkin TA, Westerveld M, Mencil WE, Pugh KR. Visuospatial memory deficits emerging during nicotine withdrawal in adolescents with prenatal exposure to active maternal smoking. *Neuropsychopharmacology* 2006;31(7):1550-61.

Jacobsen LK, Slotkin TA, Mencil WE, Frost SJ, Pugh KR. Gender-specific effects of prenatal and adolescent exposure to tobacco smoke on auditory and visual attention. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(12):2453-64.

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

Javitt DC, Hashim A, Sershen H. Modulation of striatal dopamine release by glycine transport inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(4):649-56.

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.

Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1999;20(3):201-25.

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;8(4):253-62.

Kalman D, Morissette SB, George TP. Co-morbidity of smoking in patients with psychiatric and substance use disorders. *Am J Addict* 2005;14(2):106-23.

Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(7):1081-90.

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.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 1980;20(3):379-82.

Kiss JP, Vizi ES. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci* 2001;24(4):211-5.

Knott V, McIntosh J, Millar A, Fisher D, Villeneuve C, Ilivitsky V, Horn E. Nicotine and smoker status moderate brain electric and mood activation induced by ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85(1):228-42.

Knott VJ, Millar AM, McIntosh JF, Shah DK, Fisher DJ, Blais CM, Ilivitsky V, Horn E. Separate and combined effects of low dose ketamine and nicotine on behavioural and neural correlates of sustained attention. *Biol Psychol* 2011;88(1):83-93.

Laruelle M, Innis RB. Images in neuroscience. SPECT imaging of synaptic dopamine. *Am J Psychiatry* 1996;153(10).

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.

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.

Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res* 2007;2:152-67.

Lehmann HE, Ban TA. The history of the psychopharmacology of schizophrenia. *Can J Psychiatry* 1997;42(2):152-62.

Leonard S, Gault J, Hopkins J, Logel J, Vianzon R, Short M, Drebing C, Berger R, Venn D, Sirota P, Zerbe G, Olincy A, Ross RG, Adler LE, Freedman R. Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59(12):1085-96.

Leucht C, Heres S, Kane JM, Kissling W, Davis JM, Leucht S. Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia--a critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res* 2011;127(1-3):83-92.

Levin ED, Briggs SJ, Christopher NC, Rose JE. Prenatal nicotine exposure and cognitive performance in rats. *Neurotoxicol Teratol* 1993;15(4):251-60.

Levin ED, Wilson W, Rose JE, Mcevoy J. Nicotine-haloperidol interactions and cognitive performance in schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 1996;15(5):429-36.

Levin ED, Petro A, Caldwell DP. Nicotine and clozapine actions on pre-pulse inhibition deficits caused by N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptor blockade. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(4):581-6.

Levin R, Calzavara MB, Santos CM, Medrano WA, Niigaki ST, Abilio VC. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) present deficits in prepulse inhibition of startle specifically reverted by clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(7):1748-52.

Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:409-32.

Lewis DA, Gonzalez-Burgos G. Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat Med* 2006;12(9):1016-22.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(4):312-24.

Lichtensteiger W, Ribary U, Schlumpf M, Odermatt B, Widmer HR. Prenatal adverse effects of nicotine on the developing brain. *Prog Brain Res* 1988;73:137-57.

Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodriguez A, Kotimaa A, Moilanen I, Thomsen PH, Olsen J, Jarvelin MR. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry* 2003;160(6):1028-40.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 2000;23(3):223-39.

Liu Q, Zhao B. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br J Pharmacol* 2004;141(4):746-54.

Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 2003;117(3):697-706.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.

Lysakowski A, Wainer BH, Bruce G, Hersh LB. An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 1989;28(2):291-336.

Mansbach RS, Geyer MA. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology* 1991;105(2):162-8.

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.

Marutle A, Zhang X, Court J, Piggott M, Johnson M, Perry R, Perry E, Nordberg A. Laminar distribution of nicotinic receptor subtypes in cortical regions in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 2001;22(1-2):115-26.

Matrisciano F, Tueting P, Dalal I, Kadriu B, Grayson DR, Davis JM, Nicoletti F, Guidotti A. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology* 2013;68:184-94.

Mccartney JS, Fried PA, Watkinson B. Central auditory processing in school-age children prenatally exposed to cigarette smoke. *Neurotoxicol Teratol* 1994;16(3):269-76.

Mccreadie RG. Use of drugs, alcohol and tobacco by people with schizophrenia: case-control study. *Br J Psychiatry* 2002;181:321-5.

Mcguffin P, Gottesman, Ii. Risk factors for schizophrenia. *N Engl J Med* 1999;341(5):370-1.

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.

Meltzer HY, Horiguchi M, Massey BW. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology* 2011;213(2-3):289-305.

Meyer JM. Antipsychotic safety and efficacy concerns. *J Clin Psychiatry* 2007;14:20-6.

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

Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Chen L, Jones J. Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? *Am J Psychiatry* 1996;153(9):1138-42.

Miyamoto S, Miyake N, Jarskog LF, Fleischhacker WW, Lieberman JA. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Mol Psychiatry* 2012;17(12):1206-27.

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.

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997;17(8):2921-7.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999;98(4):427-36.

Monte AS, De Souza GC, McIntyre RS, Soczynska JK, Dos Santos JV, Cordeiro RC, Ribeiro BM, De Lucena DF, Vasconcelos SM, De Sousa FC, Carvalho AF, Macedo DS. Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. *J Psychopharmacol* 2013;27(11):1032-43.

Muneoka K, Nakatsu T, Fuji J, Ogawa T, Takigawa M. Prenatal administration of nicotine results in dopaminergic alterations in the neocortex. *Neurotoxicol Teratol* 1999;21(5):603-9.

Muneoka K, Ogawa T, Kamei K, Muraoka S, Tomiyoshi R, Mimura Y, Kato H, Suzuki MR, Takigawa M. Prenatal nicotine exposure affects the development of the central serotonergic system as well as the dopaminergic system in rat offspring: involvement of route of drug administrations. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;102(1):117-26.

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

Navarro HA, Seidler FJ, Eylers JP, Baker FE, Dobbins SS, Lappi SE, Slotkin TA. Effects of prenatal nicotine exposure on development of central and peripheral cholinergic neurotransmitter systems. Evidence for cholinergic trophic influences in developing brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251(3):894-900.

Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, Mclean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 2010;128(3):419-32.

Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES, Dwyer DM. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24(5):822-35.

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

Niesink RJ, Van Ree JM. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology* 1989;28(4):411-8.

Nikam SS, Awasthi AK. Evolution of schizophrenia drugs: a focus on dopaminergic systems. *Curr Opin Investig Drugs* 2008;9(1):37-46.

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

O'Neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology* 1999;145(3):237-50.

Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 1999;49(11):921-37.

Ohno M, Watanabe S. Persistent increase in dopamine release following activation of metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 1995;200(2):113-6.

Pazvantoglu O, Selek S, Okay IT, Sengul C, Karabekiroglu K, Dilbaz N, Erel O. Oxidative mechanisms in schizophrenia and their relationship with illness subtype and symptom profile. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009;63(5):693-700.

Picone TA, Allen LH, Olsen PN, Ferris ME. Pregnancy outcome in North American women. II. Effects of diet, cigarette smoking, stress, and weight gain on placentas, and on neonatal physical and behavioral characteristics. *Am J Clin Nutr* 1982;36(6):1214-24.

Popke EJ, Tizabi Y, Rahman MA, Nespors SM, Grunberg NE. Prenatal exposure to nicotine: effects on prepulse inhibition and central nicotinic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58(4):843-9.

Powchik P, Davidson M, Haroutunian V, Gabriel SM, Purohit DP, Perl DP, Harvey PD, Davis KL. Postmortem studies in schizophrenia. *Schizophr Bull* 1998;24(3):325-41.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol* 1997;8(8):713-7.

Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S. Nicotinic modulation of [3H]dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterisation. *J Neurochem* 1990;54(3):937-45.

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

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

Razoux F, Garcia R, Lena I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(3):719-27.

Reddy RD, Yao JK. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55(1-2):33-43.

Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem* 2006;97(1):1-12.

Ribeiz SR, Bassitt DP, Arrais JA, Avila R, Steffens DC, Bottino CM. Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs* 2010;24(4):303-17.

Rocchitta G, Migheli R, Mura MP, Grella G, Esposito G, Marchetti B, Miele E, Desole MS, Miele M, Serra PA. Signaling pathways in the nitric oxide and iron-induced dopamine release in the striatum of freely moving rats: role of extracellular Ca²⁺ and L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res* 2005;14(1):18-29.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 2003;975(1-2):207-13.

Rogers TD, Dickson PE, Heck DH, Goldowitz D, Mittleman G, Blaha CD. Connecting the dots of the cerebro-cerebellar role in cognitive function: neuronal pathways for cerebellar modulation of dopamine release in the prefrontal cortex. *Synapse* 2011;65(11):1204-12.

Ross BM, Seguin J, Sieswerda LE. Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids Health Dis* 2007;6:21.

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

Roy TS, Sabherwal U. Effects of gestational nicotine exposure on hippocampal morphology. *Neurotoxicol Teratol* 1998;20(4):465-73.

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.

Sams-Dodd F. Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behav Pharmacol* 1995;6(1):55-65.

Sams-Dodd F. Effect of novel antipsychotic drugs on phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in the rat social interaction test. *Behav Pharmacol* 1997;8(2-3):196-215.

Sams-Dodd F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 1998;18(4):293-304.

- Sarter M, Parikh V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(1):48-56.
- Sarter M, Nelson CL, Bruno JP. Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2005;31(1):117-38.
- 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.
- Saxton DW. The behaviour of infants whose mothers smoke in pregnancy. *Early Hum Dev* 1978;2(4):363-9.
- Scheller M, Bufler J, Hertle I, Schneck HJ, Franke C, Kochs E. Ketamine blocks currents through mammalian nicotinic acetylcholine receptor channels by interaction with both the open and the closed state. *Anesth Analg* 1996;83(4):830-6.
- Schetteringer MR, Bonan CD, Frassetto SS, Wyse AT, Schierholt RC, Webber A, Dias RD, Sarkis JJ, Netto CA. Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat. *Biochem Mol Biol Int* 1999;47(3):473-8.
- Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(1):80-9.
- Schultz SH, North SW, Shields CG. Schizophrenia: a review. *Am Fam Physician* 2007;75(12):1821-9.
- Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM. Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. *Front Pharmacol* 2012;3(195).
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987;1(2):133-52.
- Sexton M, Fox NL, Hebel JR. Prenatal exposure to tobacco: II. Effects on cognitive functioning at age three. *Int J Epidemiol* 1990;19(1):72-7.
- Shorter KR, Miller BH. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Prog Biophys Mol Biol* 2015;118(1-2):1-7.
- Simpson MD, Slater P, Deakin JF. Comparison of glutamate and gamma-aminobutyric acid uptake binding sites in frontal and temporal lobes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998;44(6):423-7.

Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, Whitmore WL, Seidler FJ. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240(2):602-11.

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. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285(3):931-45.

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

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

Smith JW, Gastambide F, Gilmour G, Dix S, Foss J, Lloyd K, Malik N, Tricklebank M. A comparison of the effects of ketamine and phencyclidine with other antagonists of the NMDA receptor in rodent assays of attention and working memory. *Psychopharmacology* 2011;217(2):255-69.

Snyder SH. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. *Am J Psychiatry* 1976;133(2):197-202.

Snyder SH, Ferris CD. Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry* 2000;157(11):1738-51.

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.

Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001;2(4):294-302.

Srinivasan R, Pantoja R, Moss FJ, Mackey ED, Son CD, Miwa J, Lester HA. Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *J Gen Physiol* 2011;137(1):59-79.

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;1136:185-92.

Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 1998;24(2):285-301.

Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology* 2001;156(2-3):194-215.

Swerdlow NR, Bakshi V, Waikar M, Taaid N, Geyer MA. Seroquel, clozapine and chlorpromazine restore sensorimotor gating in ketamine-treated rats. *Psychopharmacology* 1998;140(1):75-80.

Tajima K, Fernandez H, Lopez-Ibor JL, Carrasco JL, Diaz-Marsa M. Schizophrenia treatment. Critical review on the drugs and mechanisms of action of antipsychotics. *Actas Esp Psiquiatr* 2009;37(6):330-42.

Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, Van Den Bree M, Thomas H, Harold G, Hay D. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 2003;160(11):1985-9.

Timofeeva OA, Levin ED. Glutamate and nicotinic receptor interactions in working memory: importance for the cognitive impairment of schizophrenia. *Neuroscience* 2011;195:21-36.

Tojima T, Ito E. Bimodal effects of acetylcholine on synchronized calcium oscillation in rat cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2000;287(3):179-82.

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.

Tost H, Meyer-Lindenberg A. Dopamine-glutamate interactions: a neural convergence mechanism of common schizophrenia risk variants. *Biol Psychiatry* 2011;69(10):912-3.

Tucek S. Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J Neurochem* 1985;44(1):11-24.

Turetsky BI, Calkins ME, Light GA, Olincy A, Radant AD, Swerdlow NR. Neurophysiological endophenotypes of schizophrenia: the viability of selected candidate measures. *Schizophr Bull* 2007;33(1):69-94.

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.

Valenstein M, Blow FC, Copeland LA, McCarthy JF, Zeber JE, Gillon L, Bingham CR, Stavenger T. Poor antipsychotic adherence among patients with schizophrenia: medication and patient factors. *Schizophr Bull* 2004;30(2):255-64.

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.

Verkhatsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 2007;13(1):28-37.

Voss B, Thienel R, Leucht S, Kircher T. Therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. A systematic overview. *Nervenarzt* 2008;79(1):47-8.

Wang H, Davila-Garcia MI, Yarl W, Gondre-Lewis MC. Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. *Neuroscience* 2011;188:168-81.

Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981;21:165-204.

- Watkins SS, Koob GF, Markou A. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine Tob Res* 2000;2(1):19-37.
- Weickert TW, Goldberg TE, Gold JM, Bigelow LB, Egan MF, Weinberger DR. Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57(9):907-13.
- Weiden PJ, Buckley PF, Grody M. Understanding and treating "first-episode" schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am* 2007;30(3):481-510.
- Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 2001;65(5):427-51.
- Weiser M, Reichenberg A, Grotto I, Yasvitzky R, Rabinowitz J, Lubin G, Nahon D, Knobler HY, Davidson M. Higher rates of cigarette smoking in male adolescents before the onset of schizophrenia: a historical-prospective cohort study. *Am J Psychiatry* 2004;161(7):1219-23.
- Weiss IC, Feldon J. Environmental animal models for sensorimotor gating deficiencies in schizophrenia: a review. *Psychopharmacology* 2001;156(2-3):305-26.
- Wenk GL. The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem* 1997;67(2):85-95.
- Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 1995;375(6531):484-7.
- Witschi H, Joad JP, Pinkerton KE. The toxicology of environmental tobacco smoke. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:29-52.
- Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 1997;20(2):92-8.
- Wonnacott S, Barik J, Dickinson J, Jones IW. Nicotinic receptors modulate transmitter cross talk in the CNS: nicotinic modulation of transmitters. *J Mol Neurosci* 2006;30(1-2):137-40.
- Yu AJ, Dayan P. Acetylcholine in cortical inference. *Neural Netw* 2002;15(4-6):719-30.
- Zammit S, Allebeck P, Dalman C, Lundberg I, Hemmingsson T, Lewis G. Investigating the association between cigarette smoking and schizophrenia in a cohort study. *Am J Psychiatry* 2003;160(12):2216-21.

Zaytseva Y, Chan RC, Poppel E, Heinz A. Luria revisited: cognitive research in schizophrenia, past implications and future challenges. *Philos Ethics Humanit Med* 2015;10(1):015-0026.

Zhang XY, Chen Da C, Xiu MH, Wang F, Qi LY, Sun HQ, Chen S, He SC, Wu GY, Haile CN, Kosten TA, Lu L, Kosten TR. The novel oxidative stress marker thioredoxin is increased in first-episode schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2009;113(2-3):151-7.

Zhao Z, Reece EA. Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2005;74(5):383-91.

Ziedonis DM, Kosten TR, Glazer WM, Frances RJ. Nicotine dependence and schizophrenia. *Hosp Community Psychiatry* 1994;45(3):204-6.

Zoheir N, Lappin DF, Nile CJ. Acetylcholine and the alpha 7 nicotinic receptor: a potential therapeutic target for the treatment of periodontal disease? *Inflamm Res* 2012;61(9):915-26.

Zugno AI, Fraga DB, De Luca RD, Ghedim FV, Deroza PF, Cipriano AL, Oliveira MB, Heylmann AS, Budni J, Souza RP, Quevedo J. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: potential relevance to schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2013a;47(6):740-6.

Zugno AI, Juliao RF, Budni J, Volpato AM, Fraga DB, Pacheco FD, Deroza 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* 2013b;28(3):501-8.

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* 2014a;259:223-31.

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* 2014b;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.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normalizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 118/2012

Professor Responsável: Alexandra Ioppi Zugno

Equipe: Alexandra Heymann, Bruna da Silva Rodrigues, Cátia Rocha, Flávia da Rosa Silveira, Gustavo Mastella, Marlana B. Oliveira, Patrícia Gomes, Renata D'altoé de Luca e Thayane de Bem.

Título: "AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE ANIMAIS EXPOSTOS CRONICAMENTE A FUMAÇA DE CIGARRO DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL: IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA".

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 313 ratos machos e ratas fêmeas, Wistar, adultos, pesando em média 250g a 300g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

Comentários: Serão utilizados ratos machos e ratas fêmeas, Wistar, adultos, para o acasalamento, o estudo usará um total de 25 fêmeas e 25 machos. Após o desmame, as mães anteriormente expostas à fumaça de cigarro serão mortas por decapitação. Os filhotes destas gestações, após 60 dias de vida serão submetidos à administração de cetamina na dose de 25 mg/kg, num período de sete dias. Deste modo, há a solicitação de uso de 157 machos e 156 fêmeas, totalizando 313 animais (50 adultos e 263 filhotes), totalizando a média de 10,5 animais por ninhada. Aprovado para 25 machos, 25 fêmeas e 313 filhotes oriundos do acasalamento, caso o nº de nascimento seja inferior, o projeto deverá solicitar autorização a CEUA.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 118/2012

Principal Investigator: Alexandra Ioppi Zugno.

Researchers: Alexandra Heymann, Bruna da Silva Rodrigues, Cátia Rocha, Flávia da Rosa Silveira, Gustavo Mastella, Marlana B. Oliveira, Patrícia Gomes, Renata D'altoé de Luca e Thayane de Bem.

Project title: "BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL EVALUATION IN ANIMALS CHRONICALLY EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE DURING PRENATAL PERIOD: IMPLICATIONS IN THE DEVELOPMENT OF SCHIZOPHRENIA".

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, 05 de novembro de 2012.

Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA