

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

CURSO DE FARMÁCIA

MARIANA BITTENCOURT DE OLIVEIRA

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À FUMAÇA DE CIGARRO, DURANTE O
PERÍODO PRÉ-NATAL, NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA
ESQUIZOFRENIA EM RATOS: ANÁLISE COMPORTAMENTAL E
NEUROQUÍMICA**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2013

MARIANA BITTENCOURT DE OLIVEIRA

EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À FUMAÇA DE CIGARRO, DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL, NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA EM RATOS: ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Farmacêutico no curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador(a): Prof. (ª) Dra. Alexandra Ioppi Zugno

Co-Orientador(a): Dra. Ana Maria Volpato

CRICIÚMA, JUNHO DE 2013

MARIANA BITTENCOURT DE OLIVEIRA

EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À FUMAÇA DE CIGARRO, DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL, NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA EM RATOS: ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutico, no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de Pesquisa em Neurociências (Comportamental e Bioquímica).

Criciúma, 25 de Junho de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Alexandra Ioppi Zugno - Doutora - (UNESC) – Orientador

Prof. Emilio Luiz Streck - Doutor - (UNESC)

Prof. (a) Silvia Dal Bó - Doutora - (UNESC)

Dedico este trabalho a meus pais e irmãos, por sempre apoiarem minhas decisões e sonhos, e por sempre me ensinar que esforço, responsabilidade, perseverança e humildade são essenciais para que estes sonhos se concretizem. Vocês são meu orgulho e exemplos de vida. Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por sempre iluminar meu caminho, alimentando minha fé e força para vencer os obstáculos da vida, e por permitir que este sonho se realize.

Agradeço aos meus amados pais, Edgar de Oliveira e Arlete Bittencourt de Oliveira, por todo amor e dedicação que sempre tiveram pelos filhos, e que com muita luta e perseverança, sempre se dedicam para concretizar os sonhos de toda a família. Sou eternamente agradecida por todos os ensinamentos, desde a infância e pela bela educação que deram aos três filhos.

Agradeço aos meus queridos irmãos, Cristiano Bittencourt de Oliveira e Maicon Bittencourt de Oliveira por sempre me apoiarem e ajudarem toda a família na realização de seus anseios. Sou profundamente grata a vocês, juntamente à minhas queridas cunhadas, Simone Daniel de Oliveira e Gislaine de Assunção Teixeira, por abençoarem minha vida com meus lindos e apaixonantes sobrinhos, Rafaela Daniel de Oliveira e Lucas Teixeira de Oliveira, eu amo vocês, família!

Agradeço a todos os meus colegas de Iniciação Científica, desde aqueles que me acolheram, até aqueles que eu acolhi, e “chefinhas”, Ana Maria Volpato, Daiane Bittencourt Fraga (eterna chefinha) e Josiane Budni, por tudo que me ensinaram até hoje, pelo companheirismo e amizade sempre. Obrigada por me ajudarem a por em prática o objetivo deste trabalho, por todo o esforço e dedicação que tiveram para que este fosse concretizado.

Agradeço a todos os professores, sem exceção, que passaram seus conhecimentos e experiências durante esses nove semestres, fazendo com que eu tivesse cada dia mais certeza da profissão que escolhi exercer. Em especial, agradeço a minha professora, orientadora e amiga, Alexandra Ioppi Zugno, que me ajudou e acompanhou na realização deste trabalho e fez com que eu me apaixonasse pela pesquisa durante esses dois anos de convívio. Obrigada por todo auxílio e por ser essa mãe que és para todos os teus alunos.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar. Mas, o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

**TRABALHO DE ACORDO COM AS NORMAS
DA REVISTA BRAIN RESEARCH
VERSÃO PORTUGUÊS**

Título: EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À FUMAÇA DE CIGARRO, DURANTE O PERÍODO PRÉ-NATAL, NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DA ESQUIZOFRENIA EM RATOS: ANÁLISE COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA

Mariana Bittencourt de Oliveira, Ana Maria Volpato, Gustavo Antunes Mastella, Sullivan Artur Citadin, Patrícia Gomes Wessler, Alexandra S. Heylmann, Flávia da Rosa Silveira, João Quevedo, Alexandra Ioppi Zugno*.

Laboratório de Neurociências, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), and Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

***Autor correspondente:**

Profa. Alexandra Ioppi Zugno, MD, PhD

Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

Fax: +55 48 3431-2618

E-mail: alz@unesc.net

RESUMO

Introdução: A esquizofrenia é um transtorno neuropsiquiátrico grave com fisiopatologia pouco conhecida. O tabagismo durante o período pré-natal vem sendo estudado como fator causador de anormalidades obstétricas, levando a alterações cognitivas e comportamentais associadas a esquizofrenia.

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi avaliar ratos e ratas Wistar com 60 dias de vida, e que foram expostos à fumaça de cigarro durante o período pré-natal. As ratas foram expostas à inalação passiva de 12 cigarros ao dia, durante o período gestacional (21 dias). Os filhotes (machos e fêmeas), quando atingiram a fase adulta, foram submetidos à administração de salina ou cetamina na dose de 25 mg/kg i.p., por um período de sete dias (tratamento crônico). Após a realização deste protocolo, os animais passaram por testes comportamentais, em seguida mortos por decaptação e suas estruturas cerebrais retiradas foram utilizadas para a realização de testes bioquímicos.

Resultados: A análise comportamental mostrou-se alterada, por influência tanto da cetamina como do cigarro. Em contrapartida, os testes bioquímicos mostraram-se alterados por influência da cetamina em machos. Nesse mesmo parâmetro, a exposição a fumaça de cigarro foi capaz de exacerbar os efeitos da cetamina em machos. As alterações em nível bioquímico foram menores nas fêmeas. É possível que as diferenças entre machos e fêmeas possam ser atribuídas ao perfil hormonal diferenciado.

Conclusão: A exposição ao cigarro afeta o comportamento e o sistema colinérgico em estruturas cerebrais da prole adulta submetida ao modelo de cetamina. Esses dados apontam para a importância do período pré-natal na gênese da esquizofrenia.

Palavras-chave: Esquizofrenia, Tabagismo Materno, Gestação, Acetilcolinesterase, Atividade Locomotora, Interação Social.

1. Introdução

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave, que normalmente afeta de 0,5% a 1,0% da população mundial. Seus sintomas iniciam-se predominantemente no período entre o final da adolescência e início da idade adulta, geralmente indicado por uma alteração abrupta no perfil social e afetivo (APA, 1994; Marsman e col., 2011; Nagai e col., 2011; Weiden e col., 2007). O paciente esquizofrênico apresenta sintomas positivos, que abrangem os episódios de psicose, delírio, alucinações e pensamentos desorganizados; sintomas negativos, caracterizados por isolamento social/emocional, embotamento afetivo e anedonia; e déficit cognitivo, identificado por prejuízo da memória de trabalho, desorganização, desorientação e falta de atenção. (Bowie e Harvey, 2006; Javitt, 2010).

Alguns fatores de risco conhecidos da doença englobam alterações ambientais presentes no início da vida. Nesse contexto, o aumento da prevalência de esquizofrenia está associada a eventos que induzem alterações no ambiente intrauterino, tais como: exposição materna ao estresse (Lee e col., 2007), infecção e/ou ativação do sistema imunológico (Boksa, 2008; Clarke e col., 2009; Fatemi e Folsom, 2009); deficiências nutricionais (Brown e Susser, 2008; Susser e col., 2008) e complicações obstétricas (Cannon e col., 2002; Haukvik e col., 2009). Da mesma forma, o tabagismo durante o período gestacional pode desencadear anormalidades obstétricas e baixo peso logo após o nascimento, levando a alterações cognitivas e comportamentais na infância, podendo então, o tabagismo durante a gestação ser um fator de risco para o surgimento da doença (Baguelin-Pinaud e col., 2010). Além disso, um trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo mostrou que a exposição à fumaça de cigarro durante o período de gestação ocasiona uma elevação da peroxidação lipídica e de danos em proteínas cerebrais em todas as estruturas estudadas: córtex pré-frontal, hipocampo e estriado (Fraga e col., 2011).

Apesar da ampla quantidade de estudos, os mecanismos centrais associados a fisiopatologia da doença são pouco entendidos. Contudo, evidências tanto de estudos com humanos como de estudos pré-clínicos sugerem que alterações em um ou mais sistemas de neurotransmissores (dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, adenosinérgico e colinérgico), estejam envolvidas na fisiopatologia da esquizofrenia

(Boison e col., 2011; Harrison e Weinberg, 2005; Lara e col., 2006; Miyamoyto e col., 2003; Pickard, 2011).

Especificamente, a indicação da sinapse glutamatérgica como um alvo em doenças psiquiátricas surgiu em 2004 (Javitt, 2004). O glutamato é o aminoácido mais abundante no sistema nervoso central (SNC) (Watkins e Evans, 1981). Está envolvido nos processos de aprendizado, memória, cognição, neurotoxicidade e neuroplasticidade. Estes processos são mantidos por duas grandes classes de receptores: ionotrópicos (NMDA, AMPA e KAINATO) e metabotrópicos (Verkhratsky e Kirchhoff, 2007). Alterações no fino controle da transmissão glutamatérgica podem desencadear transtornos psiquiátricos (Javitt, 2010).

As teorias que associam a função do sistema glutamatérgico aos sintomas da esquizofrenia apontam que os sintomas psicóticos podem ser resultado tanto da hipofunção glutamatérgica como da hiperfunção glutamatérgica (Deakin e col., 1989; Kim e col., 1980). A primeira, descreve que pacientes sob observação que recebiam doses subanestésicas de fenciclidina ou cetamina, antagonistas de receptores NMDA, apresentavam sintomas psicóticos ou exacerbavam os sintomas positivos, negativos e cognitivos da patologia em questão (Anand e col., 2000; Bakker e Amini, 1961; Krystal e col., 1994; Luby e col., 1959; Rosenbaum e col., 1959). A segunda teoria, a da hiperfunção glutamatérgica, descreve que uma hipofunção de receptores NMDA no córtex temporal, induzida por meio de uma maior ativação de receptores AMPA, Kainato e metabotrópicos induz uma compensação da ação glutamatérgica no córtex pré-frontal. Essa hipótese revela um mecanismo mais complexo da patologia, como alteração na atividade sináptica e o funcionamento anormal de receptores glutamatérgicos (Marsman e col., 2011).

Além disso, o envolvimento do sistema colinérgico na fisiopatologia das doenças mentais têm sido frequentemente apontado. Especificamente, mudanças nos receptores de acetilcolina (ACh) são observadas na esquizofrenia. O hábito de fumar é significativamente maior em esquizofrênicos do que na população em geral. Ademais, essa diferença permanece significativa quando o índice de tabagismo em esquizofrênicos é comparado ao mesmo índice de pacientes acometidos por outras doenças psiquiátricas (Aguilar e col., 2005; Lherena e col., 2003; Mccreadile, 2002). Estudos com foco em marcadores neuroquímicos associados as funções cognitivas enfatizam a conexão entre os sistemas colinérgico e glutamatérgico. A atividade colinérgica no cortex produz uma combinação complexa de efeitos inibitórios e

excitatórios que interferem na sinalização glutamatérgica via receptores NMDA (Sarter e col., 2005). Em um estudo produzido por Colgin e col. (2003), indica que os sinais colinérgicos induzem uma atividade excitatória do glutamato que favorece a aquisição da memória no hipocampo. Portanto, a ACh pode modular a ação do sistema glutamatérgico.

A pesquisa que utiliza modelos animais funciona como uma ferramenta importante para novas descobertas associadas a fisiopatologia da doença. Modelos animais farmacológicos são amplamente utilizados para a indução de alterações comportamentais e neuroquímicas. Entre eles, a administração de antagonistas não competitivos de receptores glutamatérgicos NMDA, como a fenciclidina (Elsworth e col., 2011; Hashimoto e col., 2007), o MK-801 (Boulay e col., 2010; Su e col., 2007) e a cetamina (Canever e col., 2010; De Oliveira e col., 2009; De Oliveira e col., 2011; Fraga e col., 2011). Esses fármacos agem obstruindo o canal NMDA, e, conseqüentemente impedindo o influxo de cálcio intracelular. Através desse mecanismo um estado similar ao estado psicótico em humanos pode ser induzido, com características transitórias e reversíveis (Javitt e col., 2000; Mechri e col., 2001).

Observando os achados da literatura que indicam: i – o ambiente intrauterino inadequado favorece a incidência de transtornos psiquiátricos na prole adulta; ii – o sinergismo entre a ação glutamatérgica e colinérgica pode estar entre os mecanismos fisiopatológicos associados aos sintomas presentes na esquizofrenia. O presente estudo tem como objetivo geral testar a hipótese de que o tabagismo materno durante a gestação induz alterações comportamentais e bioquímicas na prole de ratos wistar (machos e fêmeas) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais

A execução de todos os procedimentos experimentais seguiram após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA-protocolo número 118/2012) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Estes procedimentos foram feitos de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, e a partir das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

Foram utilizados ratos machos e ratas fêmeas, Wistars, adultos, pesando em média 250g a 300g. Estes, foram obtidos do Biotério da Universidade e mantidos em gaiolas em ciclos de 12h dia-noite, com alimentação e água disponíveis, com temperatura entre $22 \pm 1^\circ \text{C}$.

2.2 Exposição Pré-Natal à Fumaça de Cigarro

O estudo em questão utilizou um total de 26 ratas Wistar, que foram mantidas com um rato Wistar macho cada, para acasalamento durante o período de sete dias. Em seguida, as fêmeas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (n=10), nesse caso, os animais não foram expostos à fumaça de cigarro; e o grupo das ratas que foram expostas à fumaça de cigarro (n= 16). Um número maior de fêmeas no grupo cigarro foi escolhido devido ao fato de que o estresse provocado pela fumaça de cigarro pode provocar aborto ou canibalismo por parte das mães logo após o nascimento dos filhotes.

Durante todo o período de gestação (21 dias) as ratas gestantes foram expostas à fumaça de cigarro 3 vezes ao dia (8h, 11h e 14h). Um número de 4 cigarros foi utilizado em cada exposição, totalizando 12 cigarros/dia. Cada cigarro prosseguiu com um tempo de inalação de 6 minutos, com 1 minuto de intervalo entre cada queima, totalizando 72 minutos de exposição à fumaça de cigarro por dia.

Foram utilizados cigarros disponibilizados comercialmente (Marlboro®) por conter alcatrão (10mg), nicotina (0,8mg) e monóxido de carbono (10mg). O procedimento foi realizado utilizando-se uma câmara de acrílico com dimensões de 30X40X25 cm, onde as fêmeas foram colocadas, aproximadamente 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 mesma. O protocolo de exposição acima descrito bem como a escolha do tipo de cigarro foi feita com base em estudo anterior publicado pelo nosso grupo (Zugno e col., 2013).

2.3 Tratamento Cetamina

Após o nascimento da prole das fêmeas expostas ou não à fumaça de cigarro, machos e fêmeas foram mantidos junto à mãe para amamentação, e após 21 dias foram submetidos ao desmame. Em seguida, os filhotes machos foram separados dos filhotes fêmeas e todos permaneceram com alimentação e água disponível até chegarem à fase adulta, 60 dias de vida. Ao completarem os 60 dias de vida. A prole de machos e fêmeas foi subdividida aleatoriamente em 4 grupos: 1: Filhotes das mães controles + salina i.p. (FC-sal i.p.); 2: Filhotes das mães controles + cetamina 25mg/kg i.p. (FC-cet 25mg/kg i.p.); 3: Filhotes de mães expostas + salina i.p. (FE-sal i.p.); 4: Filhotes de mães expostas + cetamina 25mg/kg i.p. (FE-cet 25mg/kg i.p.). Cada grupo foi formado por um número entre 12 e 15 animais (detalhado na Figura 1).

Após a divisão dos grupos o protocolo de injeções foi iniciado, onde os animais receberam doses intraperitoneais de cetamina ou salina, conforme o grupo pertinente, durante um período de sete dias (tratamento crônico). Estudos anteriores, incluindo um que foi realizado em nosso laboratório, descreveram que diferentes doses subanestésicas de antagonista não competitivo de receptor NMDA (cetamina), em modelos animais, levam a sintomas análogos aos da esquizofrenia (Oliveira e col., 2009; Reddy e Yao, 1996). Após a última injeção, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (atividade locomotora e interação social). Após as avaliações comportamentais, os animais foram mortos por decapitação e as estruturas cerebrais foram dissecadas (córtex prefrontal, hipocampo e estriado), congeladas em freezer - 80°C até a análise da atividade da acetilcolinesterase.

2.4 Teste Campo Aberto

Trinta minutos após a última dose 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 dimensão, sendo que 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 e col., 2010; De Oliveira e col., 2011). A distância total foi então calculada somando-se as mudanças de posições controladas pelo sistema (Zugno e col., 2013).

2.5 Teste de 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 (Schneidert e Przewlocki, 2005). Durante este intervalo, foi analisada a latência para iniciar o contato entre os animais (seguir ou se aproximar do parceiro, montagem sobre o parceiro, cheirar ou grooming 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).

A diminuição da interação social vem sendo estudada como um comportamento característico em modelos animais de esquizofrenia e autismo (Dicicco-Bloom e col., 2006; Mohn e col., 1999; Moldin e col., 2006; Schneidert e Przewlocki, 2005).

2.6 Atividade da Acetilcolinesterase

A atividade da enzima foi dosada a partir do método de Ellman e col. (1961). Foi analisado a hidrólise da acetilcolina (ACSh) numa concentração de 0,8 mM em 1 ml de uma solução com presença de 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) e 1,0 mM de DTNB. Foram utilizados cinquenta 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, mensurado em 412 nm de absorbância por 2 minutos em intervalos de 30 segundos a uma temperatura de 25°C. A atividade da enzima das amostras analisadas foi expressa em μ mol de ACSh por hora por miligrama de proteína.

2.7 Determinação de Proteína

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e col. (1951), e a albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. Todas as amostras analisadas foram dosadas em duplicatas.

2.8 Análise Estatística

Os resultados foram obtidos pela análise de variância de três vias (ANOVA), acompanhado pelo teste de Newman-Keuls quando F foi significativo. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (Média \pm E.P.M). Foi considerado significativo estatisticamente valores com $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Estatística 7.0.

3. Resultados

3.1 Atividade Locomotora

A Figura 2 demonstra o efeito da administração de cetamina (dose de 25mg/kg) e da exposição a fumaça de cigarro no início da vida sobre a atividade locomotora da prole de machos e fêmeas. A análise de variância de três vias (Three-way ANOVA) revelou interações entre as seguintes variáveis: Cigarro e Gênero [$F(1,85)=4,03$, $p<0,05$], Cetamina e Gênero [$F(1,85)=14,9$, $p<0,01$]. O resultado dessas interações foi especificado pelas diferenças indicadas pelo pós-teste de Newman Kweuls, descritas a seguir. Os animais do grupo FE-Sal machos apresentaram aumento da distância percorrida em relação ao grupo FC-Sal machos ($p=0,02$). Esse resultado não foi observado em fêmeas ($p=0,41$). Isso indica que a exposição a fumaça de cigarro no início da vida gera aumento da locomoção na prole de machos adultos, enquanto as fêmeas são preservadas desse efeito.

Além disso, o grupo FC-Cet machos apresentaram aumento da atividade locomotora em relação ao grupo controle FC-Sal ($p=0,0006$). Essa diferença foi também observada em fêmeas ($p=0,0001$). Não foram observadas diferenças entre os grupos FC-Cet machos e FC-Cet fêmeas, indicando que a cetamina afeta a atividade locomotora de maneira similar em ambos os gêneros.

O grupo FE-Cet machos apresentaram aumento da atividade locomotora ($p=0,001$) em relação ao grupo controle FE-Sal. Essa diferença também foi observada em fêmeas ($p=0,001$). Não foram observadas diferenças entre os grupos FE-Cet machos e FE-Cet fêmeas ($p=0,10$), assim como entre os grupos FE-Cet e FC-Cet em ambos os gêneros. Isso indica que machos e fêmeas apresentam respostas semelhantes no parâmetro atividade locomotora quando submetidos a dois agentes adversos (cigarro e cetamina). Além disso, a combinação desses dois agentes (cigarro e cetamina) foi semelhante ao efeito gerado somente pela cetamina na atividade locomotora.

3.2 Interação Social

As Figuras 3, 4 e 5 descrevem os efeitos da administração de cetamina (dose de 25mg/kg) e da exposição a fumaça de cigarro no início da vida sobre os indicadores de interação social (latência, número de contatos e tempo total de

contato) na prole de machos e fêmeas. O parâmetro mais afetado na avaliação de interação social foi a latência. A resposta comportamental a exposição ao cigarro e a cetamina foi semelhante em machos e fêmeas. Os grupos FC-Cet apresentaram aumento da latência em relação aos respectivos FC-Sal (machos, $p=0,0006$; fêmeas, $p=0,01$). De forma similar, os grupos FE-Cet apresentaram aumento da latência em relação aos grupos FE-Sal (machos, $p=0,001$; fêmeas, $p=0,001$). Não foram observadas diferenças entre gêneros bem como respostas exacerbadas induzidas pela combinação cigarro e cetamina.

Em relação ao número de contatos (Figura 4) não foram observadas interações e diferenças entre os grupos. O tempo total de contato (Figura 5) mostrou-se alterado no grupo de FC-Cet machos. Os valores foram elevados somente em relação ao grupo FC-Cet fêmeas ($p=0,04$) (Figura 5).

3.3 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi verificada em três estruturas diferentes: córtex, hipocampo e estriado. No córtex, a análise de variância de três vias (Three-way ANOVA) revelou interações entre as seguintes variáveis: Cigarro e Cetamina [$F(1,41)=23,46$, $p<0,01$]; Cigarro e Gênero [$F(1,41)=6,16$, $p<0,05$]; Cetamina e Gênero [$F(1,41)=12,50$, $p<0,01$]; Cigarro, Cetamina e Gênero [$F(1,41)=9,54$, $p<0,01$]. O pós-teste de Newman-Keuls demonstra as diferenças entre grupos (Figura 6), descritas a seguir. No córtex do grupo FC-Cet machos, os valores de AChE mostraram-se elevados em relação ao FC-Sal machos ($p=0,02$). Nos animais FE-Cet machos, os valores foram ainda maiores em relação aos grupos FC-Sal machos ($p=0,0001$), FC-Cet machos ($p=0,0001$), FE-Sal ($p=0,0001$). Nas fêmeas, somente o grupo FE-Cet induziram aumento de AChE em relação ao grupo FC-Sal fêmeas ($p=0,02$). Esses valores foram também superiores em relação ao grupo FE-Sal fêmeas ($p=0,02$). Contudo, a resposta desse grupo foi menos exacerbada quando comparada ao mesmo grupo de machos ($p=0,001$).

No hipocampo (Figura 7), foram observadas interações entre todas as variáveis: Cigarro e Cetamina [$F(1,39)=84,92$, $p<0,01$]; Cigarro e Gênero [$F(1,39)=154,99$, $p<0,01$]; Cetamina e Gênero [$F(1,39)=132,97$, $p<0,01$]; Cigarro, Cetamina e Gênero [$F(1,39)=158,83$, $p<0,01$]. Quando avaliadas as diferenças entre grupos foi possível observar que o grupo FC-Cet, não induziu aumento da AChE nos machos em relação ao grupo FC-Sal. Nos machos, somente o grupo FE-Cet

apresentou valores maiores de AChE, em relação ao FC-Sal ($p=0,0001$), FC-Cet ($p=0,0001$) e FE-Sal ($p=0,0001$). O grupo de fêmeas tratadas com cetamina apresentou valores maiores em relação ao grupo controle tratado com salina de mesmo gênero ($p=0,04$). Além disso, as variáveis cigarro e cetamina exerceram efeito menos pronunciados quando comparados ao grupo de machos expostos a fumaça e tratados com cetamina.

As diferenças observadas no estriado (Figura 8) de machos foram semelhantes as diferenças observadas no córtex. Nesse parâmetro foram observadas as seguintes interações: Cigarro e Cetamina [$F(1,39)=23,23$, $p<0,01$] ; Cetamina e Gênero [$F(1,39)=113,9$, $p<0,01$]; Cigarro, Cetamina e Gênero [$F(1,39)=9,51$, $p<0,01$]. Nos animais do grupo FC-Cet machos, os valores de AChE mostram-se elevados em relação ao grupo FC-Sal machos ($p=0,02$). Nos animais do grupo FE-Cet machos, os valores foram ainda maiores em relação aos de mesmo gênero: FC-Sal ($p=0,0001$), FC-Cet ($p=0,0001$), FE-Sal ($p=0,0001$). Nas fêmeas, tanto a cetamina como a combinação de cetamina e fumaça de cigarro induziram aumento semelhante de AChE em relação ao grupo controle tratado com salina (cetamina, $p=0,05$; cigarro, $p=0,0001$). Ainda, é importante ressaltar que os grupos experimentais de fêmeas (FC-Sal, $p=0,04$; FC-Cet, $p=0,0001$ e FE-Cet, $p=0,0001$) apresentaram respostas menos pronunciadas em relação aos machos de mesmos grupos.

4. Discussão

Esse estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos da exposição a fumaça de cigarro no início da vida sobre os parâmetros de: atividade locomotora, interação social e atividade da AChE em ratos (machos e fêmeas) submetidos ao modelo animal de esquizofrenia na idade adulta. Esse estudo é pioneiro no sentido de identificar alterações comportamentais e alterações no sistema colinérgico induzidas por um ambiente intrauterino adverso e pelo tratamento crônico com cetamina na prole de machos e fêmeas wistar.

O tabagismo durante o período gestacional pode desencadear anormalidades obstétricas e baixo peso logo após o nascimento, levando a alterações cognitivas e comportamentais na infância. Portanto, a exposição aos agentes tóxicos do cigarro no início da vida, configuram um fator de risco para o surgimento de esquizofrenia (Baguelin-Pinaud e col., 2010). Além disso, essa alteração precoce no neurodesenvolvimento pode modificar a organização da ligação axonal em projeções sinápticas ao afetar a proliferação celular neuronal, migração e apoptose (Van De Berg e col., 2002), as quais são necessárias para o SNC em desenvolvimento.

Alguns trabalhos com foco na administração de nicotina na fase pós-natal, na adolescência e idade adulta demonstram que a estimulação de receptores colinérgicos influencia não somente o sistema colinérgico como também os sistemas serotoninérgico, (King e col., 1991; Xu e col., 2001), dopaminérgico (Carr e col., 1989; Eddins e col., 2009), e o sistema glutamatérgico. A função desses sistemas é exacerbada na presença de nicotina, o que pode induzir alterações comportamentais e bioquímicas associadas a doenças crônicas (Ferrari e Fior-Chadi, 2007).

Considerando a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia, estudos pré-clínicos demonstram que a exposição a nicotina na fase gestacional induz hiperatividade na prole na fase adulta e afeta diretamente a população de neurônios dopaminérgicos, estimulando a liberação de dopamina nas áreas do estriado e córtex-pré-frontal (Azam e col., 2007). Essa observação corrobora com os nossos resultados que indicam hiperlocomoção em machos submetidos a exposição a fumaça de cigarro no início da vida. Uma revisão publicada por Azam e colaboradores (2007) indica que os principais sítios de ação da nicotina em produzir essas mudanças são os receptores de acetilcolina, os quais influenciam alterações no desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos. Por meio desses mecanismos o risco de desenvolvimento da

esquizofrenia poderia ser elevado em indivíduos expostos ao cigarro no período pré-natal (Azam e col., 2007; Lichtensteiger e col., 1988).

Além disso, a nicotina também afeta o funcionamento do sistema glutamatérgico. Na maioria das sinapses hipocampais, o glutamato ativa dois tipos principais de receptores ionotrópicos, os receptores AMPA e N-metil-D-aspartato (NMDA), localizados nas membranas somatodendríticas pós-sinápticas e concentrados nas espinhas dendríticas (Bliss e Collingridge, 1993; Ritter e col., 2001). Assim como os receptores colinérgicos, tanto os receptores AMPA como NMDA são funcionalmente expressos nos neurônios hipocampais nas fases do neurodesenvolvimento (Cottrell e col., 2000). Um estudo recente demonstrou que a exposição crônica de nicotina durante o período gestacional gera efeitos em longo prazo sobre a atividade glutamatérgica hipocampal da prole. Especificamente, a nicotina provoca uma maior ativação das subunidades dos receptores de glutamato no cérebro de filhotes recém-natos. Em contrapartida, na idade adulta esses animais apresentam uma diminuição na atividade dessas subunidades (NR1, NR2c, e GluR2). Portanto, uma ativação prematura dos receptores colinérgicos induzida pela nicotina durante o refinamento da arquitetura neuronal induz alterações persistentes que alteram a expressão de mediadores de neurotransmissão excitatória e plasticidade sináptica, necessárias para a aquisição do aprendizado e memória no hipocampo (Wang e col., 2011).

É possível que a interação entre os sistemas colinérgico, dopaminérgico e glutamatérgico tenham gerado as alterações comportamentais (atividade locomotora e latência) em FE-Cet. Contudo, é importante ressaltar que os efeitos comportamentais provocados pela cetamina são semelhantes aos efeitos da combinação cigarro e cetamina. Ambas as intervenções geraram hiperlocomoção e aumento da latência na análise da interação social. É possível inferir que a hiperlocomoção gerada pela cetamina é resultado do bloqueio do receptor NMDA enquanto a hiperlocomoção gerada pela combinação cigarro e cetamina é resultado de uma interação mais complexa entre os sistemas colinérgico e glutamatérgico.

Os nossos dados relativos a atividade da AChE demonstram que o bloqueio do receptor NMDA induzido pela cetamina gera degradação de ACh, evidenciada pelo aumento da AChE em grupos tratados com cetamina. Ainda, os valores de AChE foram exacerbados na presença de um segundo agente adverso (fumaça de cigarro). A ACh é um neurotransmissor excitatório sintetizado no neurônio pré-sináptico pela

colina acetil transferase, a partir da colina e acetil-coenzima A. Este neurotransmissor apresenta papel fundamental nas funções motora, cognitivas e de memória. Em pacientes esquizofrênicos, as disfunções cognitivas são frequentemente encontradas e relacionam-se a alterações com o sistema colinérgico (Voss e col., 2008). A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima regulatória importante no controle da transmissão do impulso nervoso através da sinapse colinérgica pela hidrólise e inativação da acetilcolina (ACh) em colina e acetato (Soreq e Seidman, 2001). Pode-se concluir que os machos submetidos à exposição à fumaça de cigarro e a cetamina apresentam uma predisposição a alterações colinérgicas nas áreas estudadas. Essa predisposição é também possivelmente ocasionada por alterações nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico induzidas pela nicotina (Azam e col., 2007; Lichtensteiger e col., 1988; Wang e col., 2011).

As diferenças entre gêneros (dimorfismo sexual) têm sido reportadas em vários aspectos da esquizofrenia, incluindo epidemiologia, curso da doença e resposta ao tratamento com antipsicóticos. Parte dos resultados é atribuída ao diferente perfil hormonal observado entre homens e mulheres acometidos pelo transtorno (Mendrek e Stip, 2011). Especificamente, os dados da literatura apontam para um papel protetor do estrogênio (Grigoriadis e Seeman, 2002; Seeman, 1996, 1997). Por exemplo, existe uma relação inversa entre o período de menarca e o primeiro episódio psicótico e primeira hospitalização (Cohen e col., 1999). Além disso, estudos clínicos mostram uma correlação entre as concentrações plasmáticas de estrogênio e a intensidade dos sintomas psicóticos (Chang e Renshaw, 1986; Kendell e col., 1987). De forma similar, os sintomas da esquizofrenia em mulheres apresentam variabilidade durante o ciclo menstrual, representado por uma piora do quadro clínico durante a fase folicular (concentração baixa de estrogênio) e uma melhora dos sintomas na fase mid-luteal (alta concentração de estrogênio) (Bergemann e col., 2007; Gattaz e col., 1994; Hendrick e col., 1996).

No nosso estudo, as respostas comportamentais dos grupos experimentais foram semelhantes em machos e fêmeas. Contudo, os valores de AChE observados nos grupos de fêmeas seguiram um padrão diferente. A magnitude de resposta em fêmeas foi menor nesse parâmetro. Portanto, é possível que as fêmeas apresentem certa proteção as alterações no sistema colinérgico provocadas por agentes adversos (cetamina e fumaça de cigarro) devido ao seu perfil hormonal. As diferenças

neuroquímicas entre homens e mulheres esquizofrênicos ainda representam um desafio para futuras pesquisas.

Por fim, deve ser ressaltada a importância da epigenética como base dos mecanismos pelos quais as alterações intrauterinas induzem a incidência de doenças na prole adulta (Amaral e Mattick, 2008). Dois mecanismos epigenéticos têm sido frequentemente relatados: a metilação dos resíduos de citosina nos dinucleotídeos do DNA e modificações covalentes de histonas (Amaral e Mattick, 2008; Goldberg e col., 2007). Esses processos, em parte, fornecem a base molecular para estudos experimentais e epidemiológicos que demonstram que o período inicial de vida é crítico em determinar a susceptibilidade a doenças crônicas na idade adulta (Amaral e Mattick, 2008).

5. Legendas

Figura 1: Desenho esquemático dos grupos experimentais e análises do estudo.

Foi utilizado um número de 26 ratas Wistar que estavam no período gestacional e divididas em dois grupos distintos: Mães Controle (MC) que não foram expostas à fumaça de cigarro durante o período pré-natal, e Mães Expostas à fumaça de cigarro (ME). Os filhotes provenientes de MC e ME, foram subdivididos em 8 diferentes grupos (machos e fêmeas) e receberam um tratamento crônico (sete dias) com salina ou cetamina 25 mg/kg i.p., de acordo com grupo. 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.

Figura 2: Atividade Locomotora. Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade locomotora de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=12-15. * diferente do grupo de filhotes controle + salina de mesmo gênero (FC-Sal machos ou fêmeas). Legendas: 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).

Figura 3: Interação Social (Latência). Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a latência de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=12-15. * diferente do grupo de filhotes controle + salina de mesmo gênero (FC-Sal machos ou fêmeas). $\bar{\sigma}$ diferente do grupo de filhotes expostos + salina de mesmo gênero (FE-Sal machos ou fêmeas). Legendas: 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).

Figura 4: Interação Social (n. de contatos). Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre o número de contatos de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=12-15. Sem diferenças. Legendas: 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).

Figura 5: Interação Social (Tempo Total de Contatos). Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre o tempo total de contato de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=12-15. # diferente do grupo de filhotes controle + cetamina 25 mg/kg de gênero diferente (FC-Cet 25mg/kg). Legendas: 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).

Figura 6: AChE Córtex. Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade da AChE no córtex de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=6-8. * diferente do grupo de filhotes controle + salina de mesmo gênero (FC-Sal). ϵ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina de mesmo gênero (FC-Cet). # diferente do grupo de filhotes expostos + cetamina de gênero diferente (FE-Cet 25mg/kg). $\bar{\sigma}$ diferente do grupo de filhotes expostos + salina de mesmo gênero (FE-Sal). Legendas: 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).

Figura 7: AChE Hipocampo. Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade da AChE no hipocampo de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=6-8. * diferente do grupo de filhotes controle + salina de mesmo gênero (FC-Sal machos e fêmeas). ϵ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina de mesmo gênero (FC-Cet 25 mg/kg). # diferente do grupo de filhotes

expostos + cetamina de gênero diferente (FE-Cet 25 mg/kg). $\bar{\sigma}$ diferente do grupo de filhotes expostos +salina de mesmo gênero (FE-Sal). Legenda: 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).

Figura 8: AChE Estriado. Efeito da exposição pré-natal à fumaça de cigarro e/ou da cetamina na fase adulta (dose de 25mg/kg) sobre a atividade de AChE no estriado de machos e fêmeas. Os valores foram expressos como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), n=6-8. * diferente do grupo de filhotes controle + salina de mesmo gênero (FC+Sal machos ou fêmeas). ϵ diferente do grupo de filhotes controle + cetamina de mesmo gênero (FC-Cet 25 mg/kg). # diferente do grupo de filhotes controle + salina de gênero diferente (FC-Sal). # diferente do grupo de filhotes controle + cetamina de gênero diferente (FC-Cet 25 mg/kg). # diferente do grupo de filhotes expostos + cetamina de gênero diferente (FE-Cet 25 mg/kg). $\bar{\sigma}$ diferente do grupo de filhotes expostos + salina de mesmo gênero (FE-Sal). Legendas: 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).

Referências

- Aguilar, MC., Gurpegui, M., Dias, F., De Leon, J., 2005. Nicotine dependence and symptoms in schizophrenia: naturalistic study of complex interactions. *Br. J. Psychiatry*. 186, 215-221.
- Amaral, PP., Mattick, JS., 2008. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome*. 19(7–8), 454–492.
- Anand, A., Charney, DS., Oren, DA., Berman, RM., Hu XS., Cappiello, A., Krystal, JH., 2000. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry*. 57(3), 270-276.
- APA - American Psychiatric Association, “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases”, fourth edition (DSM-IV). **Washington, DC: APA**, 1994.
- Azam, L., Chen, Y., Leslie, FM., 2007. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*. 144, 1347-1360.
- Baguelin-Pinaud, A., Robert, S., Ménard, JF., Thibaut F., 2010. Prenatal exposure to tobacco and risk for schizophrenia: a retrospective epidemiological study. *Comprehensive Psychiatry*. 51, 106-109.
- Bakker, CB., Amini, FB., 1961. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. *Compr Psychiatry*. 2, 269-280.
- Bergemann, N., Parzer, P., Runnebaum, B., Resch, F., Mundt, C., 2007. Estrogen, menstrual cycle phases, and psychopathology in women suffering from schizophrenia. *Psychol. Med*. 37,1427–1436.
- Bliss, TV., Collingridge, GL., 1993. A synaptic model of memory: longterm potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31–39.
- Boison, D., Singer, P., Shen, HY., Feldon, J., Yee, BK., 2011. Adenosine hypothesis of schizophrenia - Opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 62(3),1527-1543.
- Boksa, P., 2008. Maternal infection during pregnancy and schizophrenia. *Journal Psychiatry Neuroscience*. 33, 183–185.

- Boulay, D., Bergis, O., Avenet, P., Griebel, G., 2010. The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 35(2), 416-27.
- Bowie, CR., Harvey, PD., 2006. Schizophrenia from a neuropsychiatric perspective. *Mont Sinai Journal Medicine*. 73, 993 - 8.
- Brown, AS., Susser, ES., 2008. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 34, 1054-1063.
- Canever, L., Oliveira, L., De luca, RD., Correa, PT., Fraga, DB., Matos, MP., Scaini, G., Quevedo, J., Streck, EL., Zugno, AI., 2010. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 3(6), 421-427.
- Cannon, M., Jones, PB., Murray, RM., 2002. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *American Journal of Psychiatry*. 159, 1080-1092.
- Carr, LA., Rowell, PP., Pierce, WM Jr., 1989. Effects of subchronic nicotine administration on central dopaminergic mechanisms in the rat. *Neurochem Res*. 14, 511–515.
- Chang, SS., Renshaw, DC., 1986. Psychosis and pregnancy. *Compr. Ther*. 12, 36–41.
- Clarke, MC., Tanskanen, A., Huttunen, M., Whittaker, JC., Cannon, M., 2009. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 9, 1025-1030.
- Cohen, RZ., Seeman, MV., Gotowiec, A., Kopala, L., 1999. Earlier puberty as a predictor of later onset of schizophrenia in women. *Am. J. Psychiatry*. 156, 1059–1064.
- Colgin, LL., Kubota, D., Lynch, G., 2003. Cholinergic plasticity in the hippocampus. *Neurosci*. 100, 2872-2877.
- Cottrell, JR., Dube, GR., Egles, C., Liu, G., 2000. Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 84, 1573–1587.

- Deakin, JF., Slater, P., Simpson, MD., Gilchrist, AC., Skan, WJ., Royston, MC., Reynolds, GP., Gross, AJ., 1989. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry*. 52, 1781-1786.
- De Oliveira, L., Fraga, DB., De Luca, RD., Canever, L., Ghedim, FV., Matos, MP., Streck, EL., Quevedo, J., Zugno, AI., 2011. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 26(1), 69-77.
- De Oliveira, L., Spiazzi, CM., Bortolin, T., Canever, L., Petronilho, F., Mina, FG., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., Zugno, AI., 2009. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Progress In Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 33, 1003-1008.
- Dicicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Dager, SR., Schmitz, C., Schultz, RT., Crawley, J., Young, LJ., 2006. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J. Neurosci*. 26, 6807-6906.
- Eddins, D., Petro, A., Williams, P., Cerutti, DT., Levin, ED., 2009. Nicotine effects on learning in zebrafish: the role of dopaminergic systems. *Psychopharmacology*. 202, 103–109.
- Ellman, GL., Courtney, KD., Andres, V Jr., Feather-Stone, RM., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
- Elsworth, JD., Groman, SM., Jentsch, JD., Valles, R., Shahid, M., Wong, E., Marston, H., Roth, RH., 2011. Aripiprazole effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology*. 62(3),1442-1452.
- Fatemi, SH., Folsom, TD., 2009. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin*. 35, 528-548.
- Ferrari, MF., Fior-Chadi, DR., 2007. Chronic nicotine administration. Analysis of the development of hypertension and glutamatergic neurotransmission. *Brain Res Bull*. 72, 215–224.
- 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., Pizzol, FD., Zugno, AI., 2011. 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*. 45(11), 1497-1503.

- Gattaz, WF., Vogel, P., Riecher-Rossler, A., Soddu, G., 1994. Influence of the menstrual cycle phase on the therapeutic response in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 36, 137–139.
- Goldberg, AD., Allis, CD., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 128(4), 635–638.
- Grigoriadis, S., Seeman, MV., 2002. The role of estrogen in schizophrenia: implications for schizophrenia practice guidelines for women. *Can. J. Psychiatry*. 47, 437–442.
- Haukvik, UK., Lawyer, G., Bjerkan, PS., Hartberg, CB., Jönsson, EG., Mcneil, T., Agartz, I., 2009. Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 43, 1287-1293.
- Harrison, PJ., Weinberger, DR., 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*. 10, 40-68.
- Hashimoto, K., Fujita, Y., Iyo, M., 2007. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology*. 32, 514-521.
- Hendrick, V., Altshuler, LL., Burt, VK., 1996. Course of psychiatric disorders across the menstrual cycle. *Harv. Rev. Psychiatry*. 4, 200–207.
- Javitt, DC., Shelley, AM., Silipo, G., Lieberman, JA., 2000. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry*. 57, 1131-1137.
- Javitt, DC., 2004. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 9, 984–997, 979.
- Javitt, DC., 2010. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci*. 47, 4-16.
- Kendell, RE., Chalmers, JC., Platz, C., 1987. Epidemiology of puerperal psychoses. *Br. J. Psychiatry*. 150, 662–673.

- Kim, JS., Kornhuber, HH., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 20, 379-382.
- King, JA., Dávila-García, M., Azmitia, EC., Strand, FL., 1991. Differential effects of prenatal and postnatal ACTH or nicotine exposure on 5-HT high affinity uptake in the neonatal rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 9, 281–286.
- Krystal, JH., Karper, LP., Seibyl, JP., Freeman, GK., Delaney, R., Bremner, JD., Heninger, GR., Bowers, MB Jr., Charney, DS., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 51, 199-214.
- Lara, DR., Dall'igna, OP., Ghisolfi, ES., Brunstein, MG., 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30, 617-629.
- Lee, PR., BRADY, DL., SHAPIRO, RA., DORSA, DM., KOENIG, JI., 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Research.* 1156, 152–167.
- Lherena, A., De La Rubia, A., Peñas-Lledó, EM., 2003. Schizophrenia and tobacco smoking in a Spanish psychiatric hospital. *Schizophr. Res.* 60, 313-317.
- Lichtensteiger, W., Ribary, U., Schlumpf, M., Odermatt, B., Widmer, HR., 1988. Prenatal adverse effects of nicotine on the developing brain. *Prog Brain Res.* 73, 137-157.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
- Luby, ED., Cohen, BD., Rosenbaum, G., Gottlieb, JS., Kelley, R., 1959. Study of a new schizophrenomimetic drug: serenyl. *Arch Neurol Psychiatry.* 71, 363-369.
- Marsman, A., Van Den Heuvel, MP., Klomp, DW., Kahn, RS., Luijten, PR., Hulshoff Pol, HE., 2011. Glutamate in Schizophrenia: A Focused Review and Meta-Analysis of 1H-MRS Studies. *Schizophrenia Bulletin.* 39(1),120-129.
- Mccreadie, RG., 2002. On behalf of the Scottish Comorbidity Study Group: Use of drugs, alcohol and tobacco by people with schizophrenia: case-control study. *J. Psychiatry.* 181, 321-325.

- Mechri, A., Saoud, M., Khiari, G., D'amato, T., Dalery, J., Gaha, L., 2001. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine. *Encephale*. 27, 53-59.
- Mendrek, A., Stip, E., 2011. Sexual dimorphism in schizophrenia: is there a need for gender-based protocols? *Expert Rev Neurother*. 11(7), 951-959.
- Miyamoto, S., Lamantia, AS., Duncan, GE., Sullivan, P., Gilmore, JH., Lieberman, JA., 2003. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*. 3(1), 27-39.
- Mohn, AR., Gainetdinov, RR., Caron, MG., Koller, BH., 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 98, 427-436.
- Moldin, SO., Rubenstein, JL., Hyman, SE., 2006. Can autism speak to neuroscience? *J. Neurosci*. 26, 6893-6896.
- Nagai, T., Ibi, D., Yamada, K., 2011. Translational Research in Neurodevelopmental Disorders: Development of Etiology-Based Animal Models: Animal Model for Schizophrenia That Reflects Gene-Environment Interactions. *Biol. Pharm. Bull*. 34, 1364-1368.
- Niesink, RJM., Van Ree JM., 1989. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacol*. 28, 411-418.
- Pickard, B., 2011. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med*. 13, 25.
- Reddy, RD., Yao, JK., 1996. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 55, 33-43.
- Ritter, LM., Unis, AS., Meador-Woodruff, JH., 2001. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 127, 123-133.
- Rosenbaum, G., Cohen, BD., Luby, ED., Gottlieb, JS., Yelen, D., 1959. Comparison of sernyl with other drugs: simulation of schizophrenic performance with sernyl, LSD-25, and amobarbital (amytal) sodium; I. Attention, motor function, and proprioception. *Arch Gen Psychiatry*. 1, 651-656.

- Sarter, M., Nelson, CL., Bruno, JP., 2005. Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 31, 117-138.
- Schneidert, T., Przewlocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 30, 80–89.
- Seeman, MV., 1996. The role of estrogen in schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* 21, 123–127.
- Seeman, MV., 1997. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am. J. Psychiatry.* 154, 1641–1647.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature Reviews of Neuroscience.* 2, 294-302.
- Su, YA., Si, TM., Zhou, DF., Guo, CM., Wang, XD., Yang, Y., Shu, L., Liang, JH., 2007. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT 2A/2C receptors. *Eur J Pharmacol.* 564(1-3), 123-130.
- Susser, E., St Clair, D., He, L., 2008. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. *Annals New York Academic Science.* 1136, 85-92.
- Van De Berg, WD., Schimitz, C., Steinbusch, HW., Blanco, CE., 2002. Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: a combined TUNEL and stereological study. *Experimental Neurology.* 174, 29-36.
- Verkhatsky, A., Kirchhoff, F., 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist.* 13, 28-37.
- Voss, B., Thienel, R., Leucht, S., Kircher, T., 2008. Therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. A systematic overview. *Nervenarzt.* 79(1), 47-8, 50-2, 54-9.
- Wang, H., Dávila-García, MI., Yarl, W., Gondré-Lewis, MC., 2011. Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. *Neuroscience.* 188, 168-181.
- Watkins, JC., Evans, RH., 1981. Excitatory Amino Acid Transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 21, 165-204.

- Weiden, P.J., Buckley, P.F., Grody, M., 2007. Understanding and Treating “First-Episode” Schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 30, 481-510.
- Xu, Z., Seidler, F.J., Ali, S.F., Slikker, W Jr., Slotkin, T.A., 2001. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 914, 166–178.
- Zugno, A.I., Fraga, D.B., De Luca, R.D., Ghedim, F.V., Deroza, P.F., Cipriano, A.L., Oliveira, M.B., Heylmann, A.S., Budni, J., Souza, R.P., Quevedo, J., 2013. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: Potential relevance to schizophrenia. *Journal Of Psychiatric Research.* 47(6),1-7.

Figura 1.

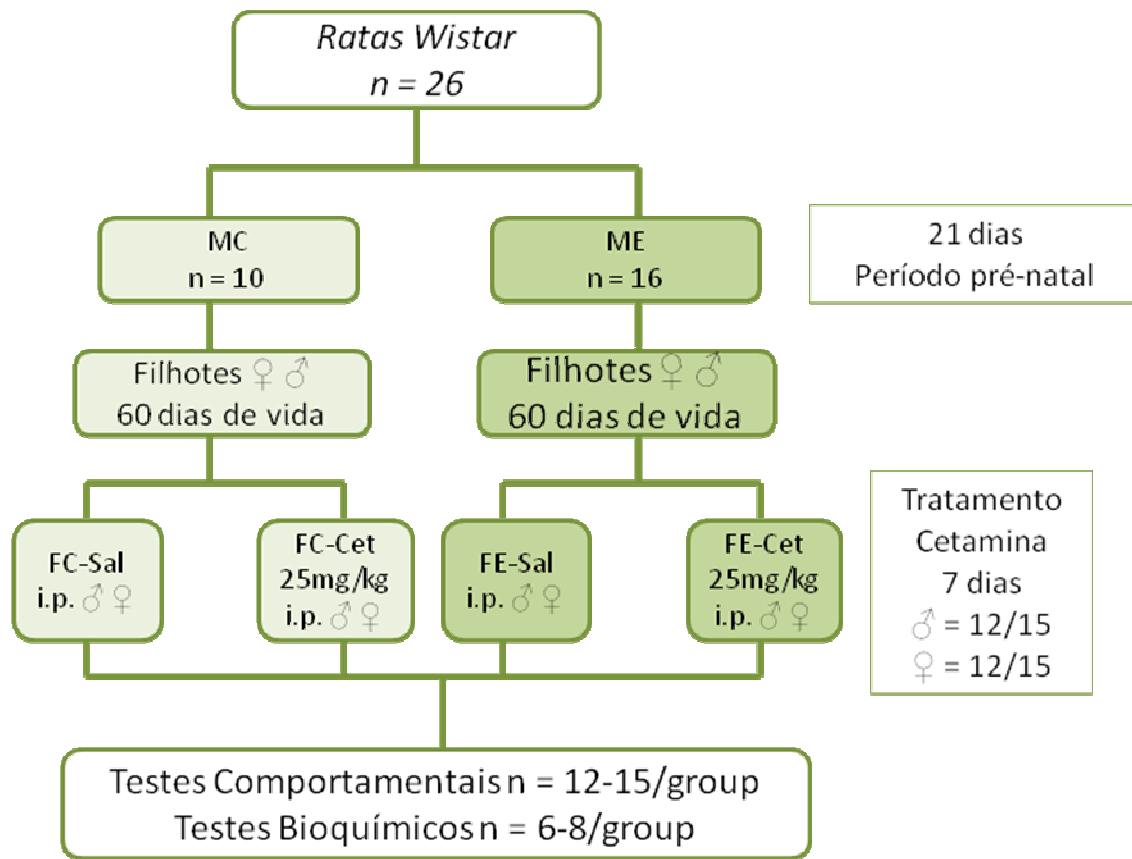


Figura 2.

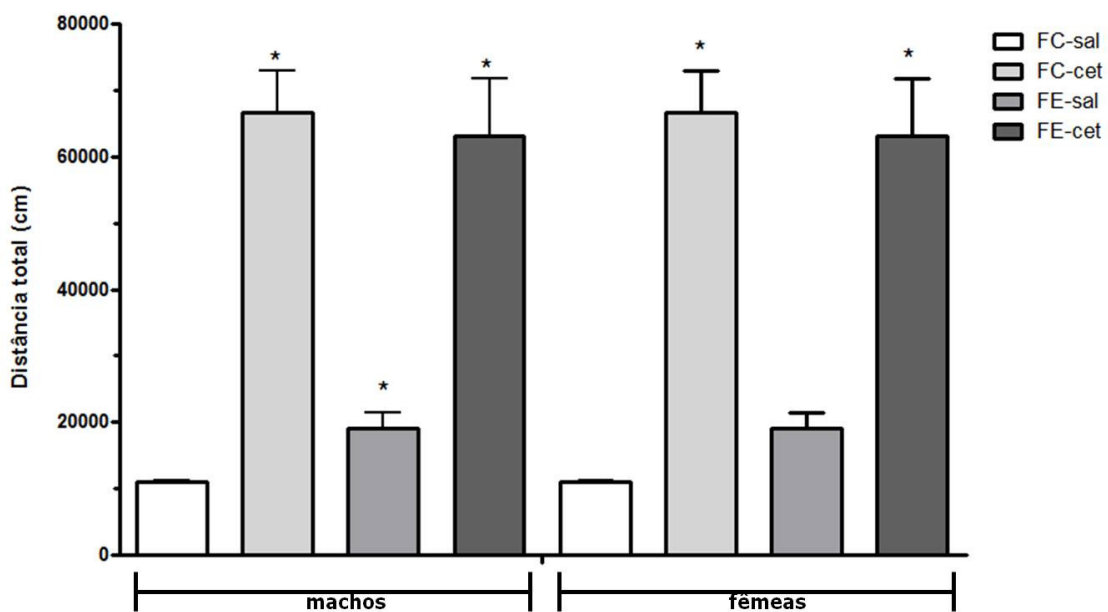


Figura 3.

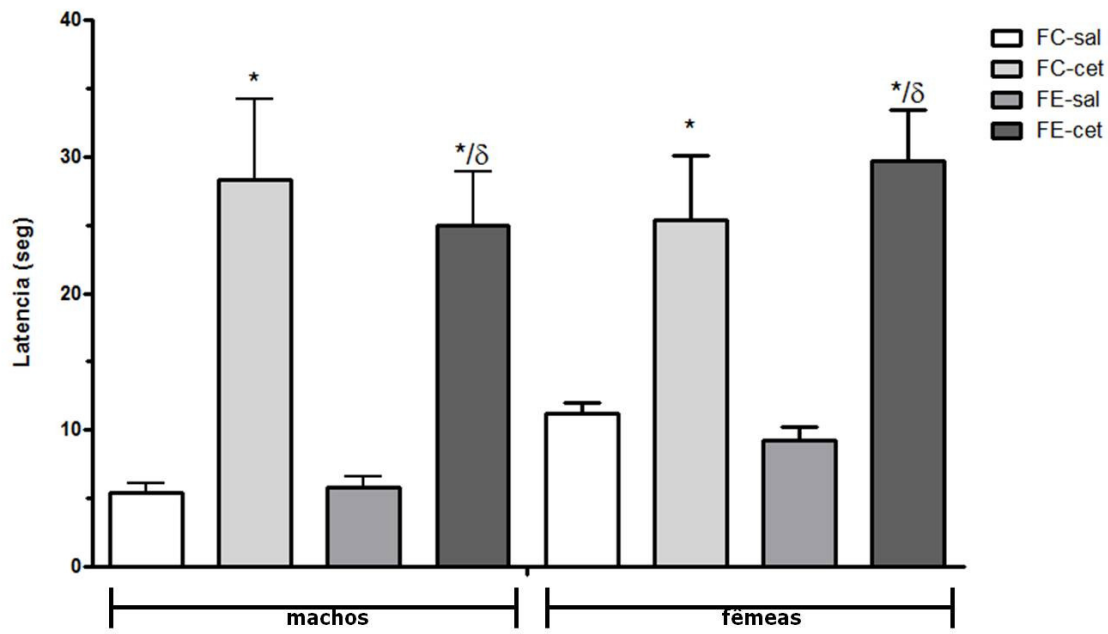


Figura 4.

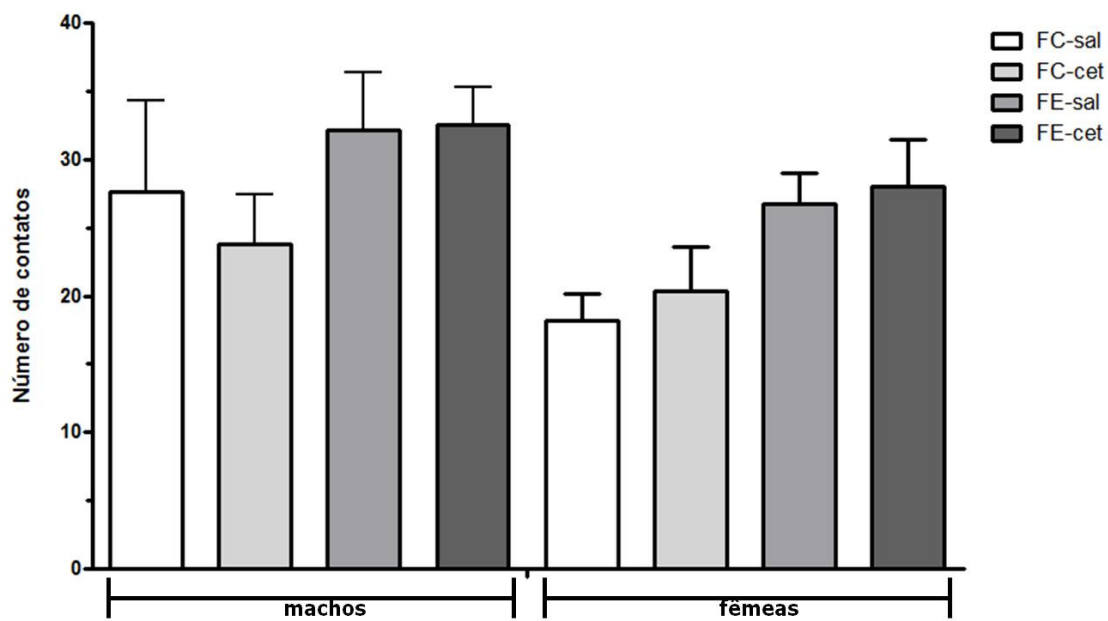


Figura 5.

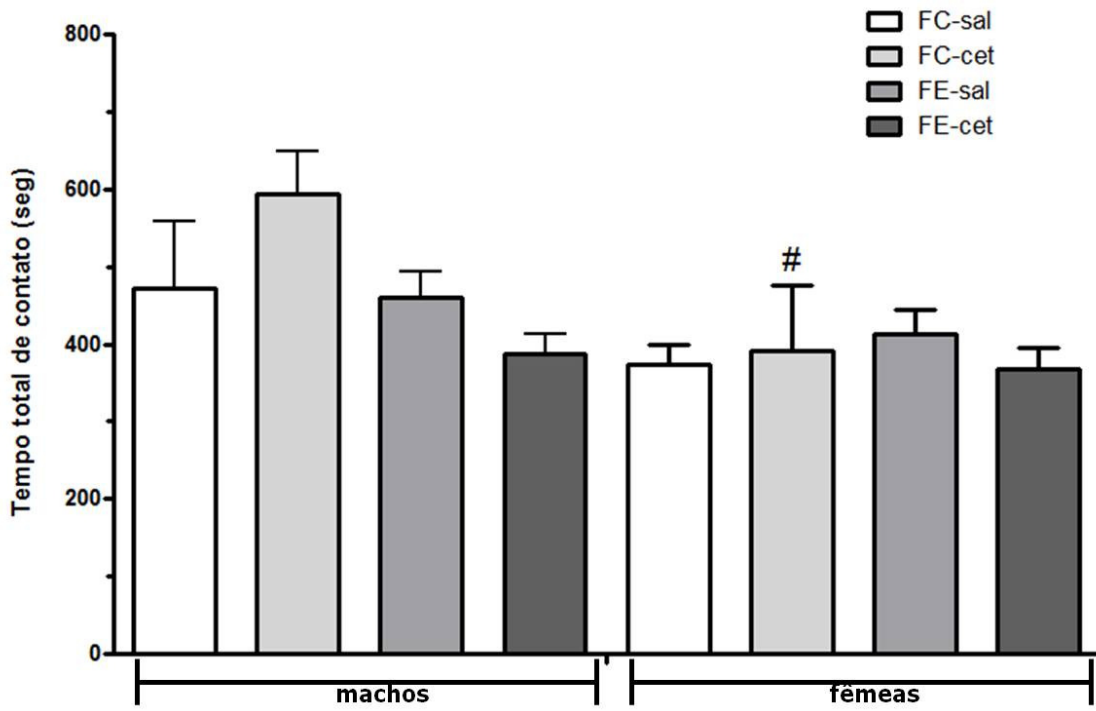


Figura 6.

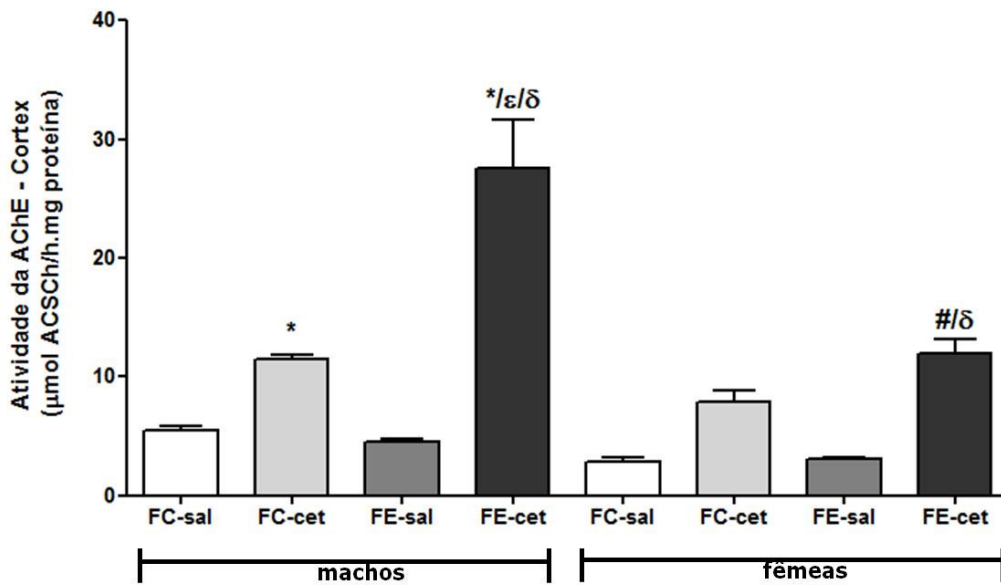


Figura 7.

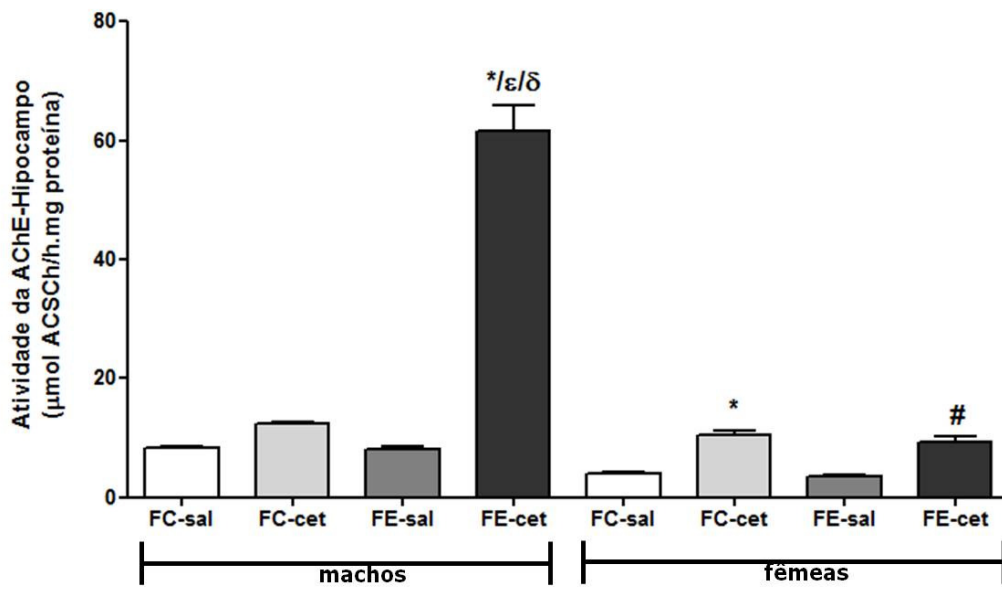
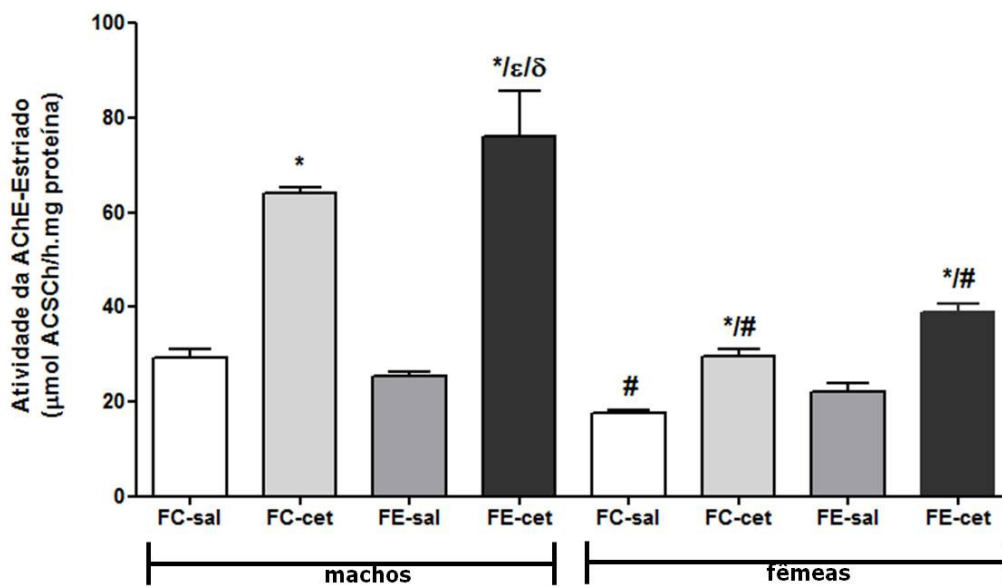


Figura 8.



**TRABALHO DE ACORDO COM AS NORMAS
DA REVISTA BRAIN RESEARCH
VERSÃO INGLÊS**

Title: EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE DURING THE PRENATAL PERIOD, IN THE PREDISPOSITION TO THE DEVELOPMENT OF SCHIZOPHRENIA IN RATS: BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL ANALYSIS

Mariana Bittencourt de Oliveira, Ana Maria Volpato, Gustavo Antunes Mastella, Sullivan Artur Citadin, Patrícia Gomes Wessler, Alexandra S. Heylmann, Flávia da Rosa Silveira, João Quevedo, Alexandra Ioppi Zugno.

Laboratório de Neurociências, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), and Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

***Autor correspondente:**

Profa. Alexandra Ioppi Zugno, MD, PhD

Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense 88806-000 Criciúma, SC, Brazil

Fax: +55 48 3431-2618

E-mail: alz@unesc.net

ABSTRACT

Introduction: Schizophrenia is a severe neuropsychiatric disorder with poorly understood pathophysiology. Cigarette smoking during the prenatal period has been studied as a causative factor of obstetric abnormalities, leading to cognitive and behavioral changes associated with schizophrenia.

Objective: The objective of this study was to evaluate Wistar rats males and females at 60 days of life, and were exposed to cigarette smoke during the prenatal period. The rats were exposed to passive inhalation of 12 cigarettes a day during pregnancy (21 days). The offsprings (males and females) when they reached adulthood, were submitted to the administration of saline or ketamine at a dose of 25 mg / kg ip, for a period of seven days (chronic treatment). After completion of this protocol, the animals have gone through behavioral tests then killed by decapitation and their brain structures removed were used for biochemical testing.

Results: The behavioral analysis was altered by the influence of ketamine as much cigarette. In contrast, the biochemical tests were altered by the influence of ketamine in males. In that same parameter, exposure to cigarette smoke was able to exacerbate the effects of ketamine in males. Changes in biochemical level were lower in females. It is possible that the differences between males and females can be attributed to different hormonal profile.

Conclusion: Exposure to cigarette smoke affects the behavior and the cholinergic system in the brain structures of adult offspring subjected to ketamine model. These data point to the importance of the prenatal period in the genesis of schizophrenia.

Keywords: Schizophrenia, Cigarette, Prenatal, Acetylcholinesterase, Locomotor Activity, Social Interaction.

1. Introduction

Schizophrenia is a serious neuropsychiatric disease, which usually reaches 0.5% to 1.0% of the world population. Initial symptoms are mainly between late adolescence and early adulthood, usually indicated by a sharp change in the social and emotional profile (APA, 1994; Marsman et al., 2011; Nagai et al., 2011; Weiden et al., 2007). The schizophrenic patient presents positive symptoms, which include episodes of psychosis, delirium, hallucinations, disorganized thoughts, negative symptoms, characterized by social isolation / emotional, blunted affect and anhedonia, and cognitive impairment, identified by loss of working memory, disorganization, disorientation and attention deficit. (Bowie and Harvey, 2006; Javitt, 2010).

Some known risk factors for the disease include environmental changes present in early life. In this context, the increased prevalence of schizophrenia is associated with events that induce changes in the intrauterine environment, such as exposure to maternal stress (Lee et al., 2007), infection and / or immune system activation (Boksa, 2008; Clarke et al., 2009; Folsom and Fatemi, 2009), nutritional deficiencies (Brown and Susser, 2008; Susser et al., 2008) and obstetric complications (Cannon et al., 2002; Haukvik et al., 2009). In the same way, smoking during pregnancy can trigger abnormalities obstetric and low weight at birth, leading to cognitive and behavioral changes in childhood and ,besides, smoking during pregnancy is a risk factor for the onset of the disease (Baguelin-Pinaud et al., 2010). In addition, recent reports showed that exposure to cigarette smoke during pregnancy causes an elevation of lipid peroxidation and damage to brain proteins in all studied structures: the prefrontal cortex, hippocampus and striatum (Fraga et al., 2011).

Despite the large number of studies, the central mechanisms associated with the pathophysiology of the disease are poorly understood. However, there is evidence from studies in humans and in pre-clinical studies suggest that alterations in one or more neurotransmitter systems (dopaminergic, serotonergic, glutamatergic, and cholinergic adenosinergic) are involved in the pathophysiology of schizophrenia (Boison et al., 2011; Harrison and Weinberg, 2005; Lara et al., 2006; Miyamoyto et al., 2003; Pickard, 2011).

Specifically, the indication of the glutamatergic synapse as a target in psychiatric disorders appeared in 2004 (Javitt, 2004). Glutamate is the most abundant amino acid in the central nervous system (CNS) (Watkins and Evans, 1981). Is

involved in the processes of learning, memory, cognition, neuroplasticity and neurotoxicity. These processes are supported by two major classes of receptors: ionotropic (NMDA, AMPA and kainate) and metabotropic (Verkhratsky and Kirchhoff, 2007). Changes in the fine control of glutamatergic transmission can trigger psychiatric disorders (Javitt, 2010).

Theories linking the function of the glutamatergic system to schizophrenia symptoms indicate that psychotic symptoms may be the result of both glutamatergic hypofunction as overacting glutamatergic (Deakin et al., 1989; Kim et al., 1980). The first, which describes patients under observation who received subanesthetic doses of phencyclidine or ketamine, NMDA receptor antagonists, had exacerbated psychotic symptoms or positive symptoms, negative and cognitive pathology in question (Anand et al., 2000; Bakker and Amini, 1961; Krystal et al., 1994; Luby et al., 1959, Rosenbaum et al., 1959). The second theory, the glutamatergic hyperactivity discloses that a hypofunction of NMDA receptors in the temporal cortex, induced by an increased activation of AMPA, kainate and metabotropic induces a compensation glutamatergic action at the prefrontal cortex. This hypothesis reveals a mechanism more complex pathology, such as changes in synaptic activity and abnormal functioning of glutamate receptors (Marsman et al., 2011).

Besides, the involvement of the cholinergic system in the pathophysiology of mental diseases has been often pointed out. Specifically, changes in the receptors of acetylcholine (ACh) are observed in schizophrenia. The habit of smoking is significantly higher in schizophrenic patients than in the general population. Moreover, this difference remained significant when the rate of smoking among schizophrenics is compared to the same rate of patients suffering from other psychiatric illnesses (Aguilar et al., 2005; Lherena et al., 2003; Mccreadile, 2002). Studies focusing on neurochemical markers associated cognitive functions emphasize the connection between cholinergic and glutamatergic systems. The cholinergic activity in the cortex produces a complex combination of excitatory and inhibitory effects that interfere with glutamatergic signaling via NMDA receptors (Sarter et al., 2005). In a study made by Colgin et al. (2003) indicates that the signals induce cholinergic excitatory activity of glutamate which favors the acquisition of memory in the hippocampus. Therefore, ACh modulate the action of the glutamatergic system.

The research using animal models serves as an important tool for new discoveries associated with the pathophysiology of the disease. Pharmacological

animal models are widely used to induce behavioral and neurochemical changes. Among them, the administration of non-competitive antagonists of NMDA glutamatergic receptors, such as phencyclidine (Elsworth et al., 2011; Hashimoto et al., 2007), MK-801 (Boulay et al., 2010; Su et al., 2007) and ketamine (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2009; De Oliveira et al., 2011; Fraga et al., 2011). These drugs act by blocking the NMDA channel, and consequently preventing the influx of intracellular calcium. This mechanism similar to a state psychotic state in humans can be induced, transient and reversible features (Javitt et al., 2000; Mechri et al., 2001).

In conclusion, the findings in the literature indicate that: i - the intrauterine environment inappropriate favors the incidence of psychiatric disorders in the adult offspring, ii - the synergism between the glutamatergic and cholinergic action may be among the pathophysiological mechanisms associated with symptoms present in schizophrenia. The present study aims to test the general hypothesis that maternal smoking during pregnancy induces behavioral and biochemical (activity of the enzyme acetylcholinesterase) in the offspring of Wistar rats (males and females) submitted to an animal model of schizophrenia induced by ketamine (glutamatergic receptor antagonist - NMDA).

2. Materials and Methods

2.1 Animals

The performance of all experimental procedures followed after being approved by the Ethics in Research (CEUA), Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) from the protocol number XXX. These procedures were done in accordance with international recommendations for the care and use of laboratory animals, and from recommendations for the use of animals of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC).

Were used male rats and female rats, Wistar, adult, weighing on average 250g to 300g. These were obtained from the Biotério of the University and kept in cages in cycles of 12 h day-night, with food and water available, with temperatures at 22 ± 1 °C.

2.2 Prenatal Exposure to Cigarette Smoke

This study used a total of 26 Wistar female rats, which were kept with a male Wistar rats each for mating. After the second day of contact, females were randomly assigned into two groups of exposure 1: n = 10 control - animals not exposed to cigarette smoke, and the group of female rats that were exposed to cigarette smoke (n = 16). A higher number of females in the cigarette group was chosen due to the fact that the stress caused by cigarette smoke can cause miscarriage or cannibalism by dams soon after birth of the pups.

During all the gestation period (21 days) the pregnant rats were exposed to cigarette smoke 3 times a day (8h, 11h and 14h). A number of four cigarettes was used for each exposure, a total of 12 cigarettes / day. Every cigarette with a continued inhalation time of 6 minutes with 1 minute interval between each firing, totaling 72 minutes of exposure to cigarette smoke per day.

Were used Commercially available cigarettes (Marlboro®) to contain alcatrão (10mg), nicotine (0.8 mg) and carbon monoxide (10mg). The procedure was performed using an acrylic chamber with dimensions of 30X40X25 cm, where females were placed approximately 5 rats per time inhalation of cigarette smoke. The smoke was brought to the chamber through a 60 ml syringe adapted to input the same. The

exposure protocol described above as well as the choice of the type of cigarette was based on a previous study published by our group (Zugno et al., 2013).

2.3 Ketamine treatment

After the birth of offspring of females exposed or not exposed to cigarette smoke, males and females were kept with the mother for breastfeeding, and after 21 days were weaned. Then the male pups were separated from the female pups and all remained with food and water available until they reach adulthood, 60 days. In this period were then randomly set to 4 different groups: 1: Offspring Control Dams + saline i.p. (OCD-sal i.p.); 2: Offspring Control Dams + ketamine 25mg/kg i.p. (OCD-ket 25mg/kg i.p.) ; 3: Offspring Exposure Dams + saline i.p. (OED-sal i.p.); 4: Offspring Exposure Dams + ketamine 25mg/kg i.p. (OED-ket 25mg/kg i.p.). Each group was composed by a number between 12 and 15 animals (detailed in Figure 1).

After the separation began the protocol of injections where animals received intraperitoneal doses of ketamine or saline as relevant group during a period of seven days (chronic treatment). Previous studies, including one that was carried out in our laboratory, we have described different subanesthetic doses of noncompetitive antagonist of NMDA (ketamine) in animal models, lead to symptoms similar to schizophrenia (De Oliveira et al., 2009; Reddy and Yao, 1996). After the last injection, the animals were subjected to behavioral tests (locomotor activity and social interaction). After the behavioral evaluations, animals were killed by decapitation and the brain structures were dissected (prefrontal cortex, hippocampus and striatum), frozen at -80 °C until analysis of acetylcholinesterase activity.

2.4 Open Field Test

Thirty minutes after administration of the last dose of ketamine or saline, the animals were individually subjected to the exploration during 15 minutes in a box locomotor activity 50 x 25 x 50 cm size, where by the activity is measured automatically (Activity Monitor, Laboratory Equipment Insight, Ribeirão Preto, SP). The test assesses the locomotor activity by the distance traveled (in cm) by the animal by dividing the total time assessment in blocks of 5 minutes (Canever et al., 2010; De Oliveira et al., 2011). The distance was then calculated by adding up the changes of positions controlled by the system (Zugno et al., 2013).

2.5 Social Interaction Test

After the last administration of ketamine or saline, the animals were isolated and deprived of food and water for a period of six hours. Later they were placed in pairs in an acrylic box (60 x 60 x 30 cm) with solid floor. The test consisted of analyzing the interaction of pairs, belonging to the same experimental group, but in different boxes for a period of 15 minutes. The behavioral assessment in relation to the social profile of the animals was not performed individually, only in pairs (Schneidert and Przewlocki, 2005). During this interval, we analyzed the latency to initiate contact between the animals (following or approaching the partner, the partner mounting, grooming or sniffing any part of the partner's body), the total time the animals remained in contact and the total number of contacts (Niesink and Van Ree, 1989; Schneider and Przewlocki, 2005).

The decrease in social interaction has been studied as a characteristic behavior in animal models of schizophrenia and autism (Dicicco-Bloom et al., 2006; Mohn et al., 1999; Moldin et al., 2006; Schneidert and Przewlocki, 2005).

2.6 Activity of Acetylcholinesterase

The enzyme was dosed from the method of Ellman et al. (1961). We analyzed the hydrolysis of acetylcholine (ACSh) at a concentration of 0.8 mM in 1 ml of a solution in the presence of 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 1.0 mM DTNB (5,5'-dithiobisnitrobenzoic acid). Fifty microliters was used for each sample added to the solution and preincubated for 3 minutes.

Then, the hydrolysis was analyzed by the formation of yellow anions (thiolate dianion) of DTNB measured absorbance at 412 nm for 2 minutes at intervals of 30 seconds at a temperature of 25 ° C. The enzyme activity of the samples was expressed in micromoles of ACSh per hour per milligram of protein.

2.7 Protein Determination

Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951), and bovine serum albumin was used as standard. All samples were assayed in duplicate.

2.8 Statistical Analysis

The results were obtained by analysis of variance three-way (ANOVA) followed by Newman-Keuls test when F is significant, and the data were expressed as mean

and standard error of mean (Mean \pm SEM). Was considered statistically significant with p values <0.05 . All analyzes were performed using the statistical software 7.0.

3. Results

3.1 Locomotor Activity

Figure 2 shows the effect of ketamine (25mg/kg dose) and exposure to cigarette smoke in early life on the locomotor activity of offspring of males and females. The variance analysis of three-way (three-way ANOVA) revealed interactions between the following variables: Cigarette and Gender [$F(1,85) = 4.03, p < 0.05$], Ketamine and Gender [$F(1,85) = 14.9, p < 0.01$]. The result of these interactions was specified for the differences indicated by the post-test Newman Kweuls, described below. The animals of Group FE-Sal males showed increased distance traveled compared to group FC-Sal males ($p = 0.02$). This result was not observed in females ($p = 0.41$). This indicates that exposure to cigarette smoke in early life causes increased locomotion in the offspring of adult males and females are preserved this effect.

In addition, the group FC-Cet males showed increased locomotor activity compared to control group FC-Sal ($p = 0.0006$). This difference was also seen in females ($p = 0.0001$). No differences were observed between groups FC-Cet males and FC-Cet females, indicating that ketamine affects locomotor activity similarly in both genders.

The group FE-Cet males showed increased locomotor activity ($p = 0.001$) compared to the control group FE-Sal. This difference was also seen in females ($p = 0.001$). No differences were observed between groups FE-Cet males and FE-Cet females ($p = 0.10$), as well as between groups FE-Cet and FC-Cet in both genders. This indicates that males and females have similar responses in parameter locomotor activity when subjected to two adverse agents (cigarette and ketamine). Furthermore, the combination of these two agents (cigarette and ketamine) was similar to the effect generated only by ketamine on locomotor activity.

3.2 Social Interaction

The figures 3, 4 and 5 describes the effects of ketamine (25mg/kg dose) and exposure to cigarette smoke in early life on indicators of social interaction (latency, number of contacts and total contact time) in the offspring of males and females. The most affected parameter in the evaluation of social interaction was the latency. The behavioral response to exposure to cigarette smoke and ketamine were similar in

males and females. The groups FC-Cet showed increased latency compared to the respective FC-Sal (males, $p = 0.0006$; females, $p = 0.01$). Similarly, the groups FE-Cet showed increased latency in relation to the groups FE-Sal (males, $p = 0.001$; females $p = 0.001$). No differences were observed between genders and exaggerated responses induced by the combination cigarette and ketamine.

Regarding the number of contacts (Figure 4) were not observed interactions and differences between groups. The total time of contact was altered in the group of FC-Cet males. The values were elevated only in relation to group FC-Cet females ($p = 0.04$) (Figure 5).

3.3 Activity of acetylcholinesterase (AChE)

AChE activity was observed in three different structures: cortex, hippocampus and striatum. In the cortex, the analysis of variance of three-way (three-way ANOVA) revealed interactions between the following variables: Cigarette and Ketamine [$F(1,41) = 23.46$, $p < 0.01$]; Cigarette and Gender [$F(1,41) = 6.16$, $p < 0.05$]; Ketamine and Gender [$F(1,41) = 12.50$, $p < 0.01$]; Cigarette, Ketamine and Gender [$F(1,41) = 9.54$, $p < 0.01$]. The post-Newman-Keuls test demonstrates the differences between groups (Figure 6), described below. In the cortex of the group FC-Cet males AChE show values were elevated compared to the group FC-Sal males ($p = 0.02$). In the animals FE-Cet males, the values were even higher than in the groups FC-Sal males ($p = 0.0001$), FC-Cet males ($p = 0.0001$), FE-Sal ($p = 0.0001$). In females, only the combination of FE-Cet induced increase of AChE in relation to the group FC-Sal females ($p = 0.02$). These values were also higher than in group FE-Sal females ($p = 0.02$). However, the response of this group was less exacerbated when compared to the same group of males ($p = 0.001$).

In the hippocampus (Figure 7), interactions were found between all variables: Cigarette and Ketamine [$F(1,39) = 84.92$, $p < 0.01$]; Cigarette and Gender [$F(1,39) = 154.99$, $p < 0.01$]; Ketamine and Gender [$F(1,39) = 132.97$, $p < 0.01$]; Cigarette, Ketamine and Gender [$F(1,39) = 158.83$, $p < 0.01$]. When evaluated the differences between groups was observed that the group FC-Cet, did not induce increased AChE in males than in group FC-Sal. In males, only the group FE-Cet showed higher AChE, compared to FC-Sal ($p = 0.0001$), FC-Cet ($p = 0.0001$), FE-Sal ($p = 0.0001$). The group of females treated with ketamine showed higher values compared to the control group treated with saline of the same gender ($p = 0.04$). In addition, the variables

cigarette and ketamine pronounced less effect exerted when compared to males exposed to smoke and treated with ketamine.

The differences observed in the striatum (Figure 8) of male rats were similar to the differences observed in the cortex. In this parameter were observed following interactions: Cigarette and Ketamine [$F(1,39) = 23.23, p < 0.01$]; Ketamine and Gender [$F(1,39) = 113.9, p < 0.01$]; Cigarette, Ketamine and Gender [$F(1,39) = 9.51, p < 0.01$]. In the animals at the group FC-Cet males, the values of AChE show up high in relation to the group FC-Sal males ($p = 0.02$). In the animals at the group FE-Cet males, the values were still higher compared to the same genre: FC-Sal ($p = 0.0001$), FC-Cet ($p = 0.0001$), FE-Sal ($p = 0.0001$). In females, both ketamine and the combination ketamine and cigarette smoke induced similar increase of AChE in the control group treated with saline (ketamine, $p = 0.05$; cigarette, $p = 0.0001$). Still, it is important to note that the experimental groups of females (FC-Sal, $p = 0.04$, FC-Cet, $p = 0.0001$ and FE-Cet, $p = 0.0001$) had responses less pronounced compared to males of the same groups.

4. Discussion

This study aimed to evaluate the effects of exposure to cigarette smoke in early life on the parameters: locomotor activity, social interaction and AChE activity in rats (males and females) submitted to an animal model of schizophrenia in adulthood. This study is the first to identify behavioral changes and changes in the cholinergic system induced by an adverse intrauterine environment and by chronic treatment with ketamine in the offspring of male and female Wistar.

Smoking during pregnancy can trigger abnormalities obstetric and low weight at birth, leading to cognitive and behavioral changes in childhood. Therefore, exposure to toxic agents in cigarettes early in life, constitute a risk factor for the onset of schizophrenia (Baguelin-Pinaud et al., 2010). Furthermore, this change in early neurodevelopment may modify the lead organization in axonal synaptic projections to affect neuronal cell proliferation, migration and apoptosis (Van De Berg et al., 2002), which are necessary for the central nervous system (CNS) development.

Some work focused on the administration of nicotine in the postnatal phase in adolescence and adulthood demonstrate that stimulation of cholinergic receptors influences not only the cholinergic system as well as the serotonergic, (King et al., 1991, Xu et al., 2001), dopaminergic (Carr et al., 1989; Eddins et al., 2009) and glutamatergic. The function of these systems is exacerbated in the presence of nicotine, which can induce behavioral and biochemical changes associated with chronic diseases (Ferrari and Fior-Chadi, 2007).

Considering the dopaminergic hypothesis of schizophrenia, preclinical studies demonstrate that exposure to nicotine during pregnancy induces hyperactivity in the adult offspring and directly affects the population of dopaminergic neurons by stimulating the release of dopamine in areas of the striatum and prefrontal cortex (Azam et al., 2007). This observation corroborates our results indicate that hyperlocomotion in males subjected to exposure to cigarette smoke in early life. A review published by Azam et al. (2007) indicates that the major sites of action of nicotine in producing these changes are acetylcholine receptors, which influence changes in the development of dopaminergic neurons. Through these mechanisms the risk of developing schizophrenia could be elevated in individuals exposed to smoke in the prenatal period (Azam et al., 2007; Lichtensteiger et al., 1988).

In addition, nicotine also affects the functioning of glutamatergic system. Most of the hippocampal synapses, glutamate activates two major types of ionotropic, AMPA and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors located in postsynaptic membranes somatodendritic and concentrated in dendritic spines (Bliss and Collingridge, 1993; Ritter et al., 2001). As cholinergic receptors, both NMDA and AMPA receptors are functionally expressed in the hippocampal neurons stages of neurodevelopment (Cottrell et al., 2000). A recent study showed that chronic exposure to nicotine during pregnancy generates long-term effects on the activity of hippocampal glutamatergic offspring. Specifically, nicotine causes an increased activation of the subunits of glutamate receptors in the brain of young neonates. In contrast, in adulthood these animals show a decrease in the activity of these subunits (NR1, NR2C, and GluR2). Therefore, a premature activation of cholinergic receptors induced by nicotine during the refinement of neuronal architecture induces persistent changes that alter the expression of mediators of excitatory neurotransmission and synaptic plasticity necessary for the acquisition of learning and memory in the hippocampus (Wang et al., 2011).

It is possible that the interaction between systems cholinergic, dopaminergic and glutamatergic have generated behavioral changes (locomotor activity and latency) in FE-Cet. However, it is important to note that the behavioral effects caused by ketamine are similar to the effects of cigarette and ketamine combination. Both interventions resulted hyperlocomotion and increased latency in the analysis of social interaction. It is possible to infer that the hyperlocomotion generated by ketamine is a result of blockage of the NMDA receptor while hyperlocomotion generated by combining cigarette and ketamine is the result of a more complex interaction between cholinergic systems and glutamatergic.

Our data regarding the activity of AChE show that blockade of NMDA- receptors induced by ketamine generates the degradation of ACh, evidenced by the increase in AChE ketamine treated groups. Further, the values of AChE were exacerbated in the presence of a second adverse agent (cigarette smoke). Acetylcholine is an excitatory neurotransmitter synthesized in the presynaptic neuron by choline acetyl transferase from choline and acetyl coenzyme A. This neurotransmitter has a fundamental role in motor functions, cognitive and memory. In schizophrenic patients, cognitive dysfunction are frequently encountered and are related to changes in the cholinergic system (Voss et al., 2008). The acetylcholinesterase (AChE) is an important regulatory

enzyme in controlling the transmission of nerve impulses through the cholinergic synapse by hydrolysis and inactivation of acetylcholine (ACh) into choline and acetate (Soreq and Seidman, 2001). It can be concluded that males subjected to exposure to cigarette smoke and ketamine show a predisposition to cholinergic changes in the areas studied. This predisposition is also possibly caused by alterations in the dopaminergic and glutamatergic induced by nicotine (Azam et al., 2007; Lichtensteiger et al., 1988; Wang et al., 2011).

Gender differences (sexual dimorphism) have been reported in various aspects of schizophrenia, including epidemiology, disease course and response to treatment with antipsychotics. Part of the results is attributed to the different hormonal profile observed between men and women affected by the disorder (Mendrek and Stip, 2011). Specifically, the literature points to a protective role of estrogen (Grigoriadis and Seeman, 2002; Seeman, 1996, 1997). For example, there is an inverse relationship between the period of menarche and first psychotic episode and first hospitalization (Cohen et al., 1999). Additionally, clinical studies show a correlation between plasma concentrations of estrogen and intensity of psychotic symptoms (Chang and Renshaw, 1986; Kendell et al., 1987). Similarly, the symptoms of schizophrenia in women have variability during the menstrual cycle, represented by a worsening of symptoms during the follicular phase (low concentration of estrogen) and an improvement of symptoms in mid-luteal phase (high estrogen levels) (Bergemann et al., 2007; Gattaz et al., 1994; Hendrick et al., 1996).

In our study, the behavioral responses of the experimental groups were similar in males and females. However, the values of AChE observed in female groups followed a different pattern. The magnitude of response in females was lower in this parameter. Therefore, it is possible that females show some protection changes in the cholinergic system caused by adverse agents (ketamine and cigarette smoke) because of their hormonal profile. The neurochemical differences between men and women with schizophrenia still represent a challenge for future research.

Finally, it should be emphasized the importance of epigenetic mechanisms as a basis by which changes induce intrauterine disease incidence in the adult offspring (Amaral and Mattick, 2008). Two epigenetic mechanisms have often been reported: the methylation of cytosine residues of the dinucleotides in DNA and covalent modifications of histones (Amaral and Mattick, 2008; Goldberg et al., 2007). These processes, in part, provide the molecular basis for experimental and epidemiological

studies showing that early period of life is critical in determining susceptibility to chronic diseases in adulthood (Amaral and Mattick, 2008).

5. Legends

Figure 1: Schematic diagram of the experimental groups and study analyzes. It was used a total of 26 Wistar Dams which were in gestational period and were dividid in two distinct groups: Control Dams (CD) that weren't exposed to cigarette smoke during the prenatal period, and Exposed Dams (ED) that were exposed to cigarette smoke. After the birth of the offspring of these dams, this offspring are 60 days (adulthood) were subdivided into eight (males and females) different groups and received chronic treatment (7 days) of saline or ketamine 25 mg/kg i.p., according to the relevant group. After administration of the last injection, these animals were subjected to behavioral tests, and then killed by decapitation and its cerebral structures removed were used for biochemical tests.

Figure 2: Locomotor Activity. Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) on the locomotor activity of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 12-15. * Different from control group of offspring + saline of the same gender (OCD-Sal male or female). Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 3: Social Interaction (Latency). Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the latency of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 12-15. * Different from control group of offsprings + saline of the same gender (OCD-Sal male or female). \emptyset different from group exposed offsprings + saline of the same gender (OED-salt male or female). Lengend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 4: Social Interaction (no. of contacts). Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the number of contacts of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error

of Mean), n = 12-15. No differences. Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 5: Social Interaction (Total time of contact). Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the total time of contact of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 12-15. # Different from the control group of offsprings + ketamine 25 mg / kg of different genre (OCD-Cet 25mg/kg). Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 6: AChE Cortex. Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the AChE activity in the cortex of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 6-8. * Different from control group of offsprings + saline of the same gender (OCD-Sal). ϵ different from the control group of offsprings from the same genre + ketamine (OCD-Cet). # Different from group exposed offsprings of different genre + ketamine (25mg/kg OED-Cet). $\bar{\sigma}$ different from group exposed offsprings + saline of the same gender (OED-Sal). Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 7: AChE Hippocampus. Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the AChE activity in the hippocampus of males and females. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 6-8. * Different from control group of offsprings + saline of the same gender (OCD-Sal males and females). ϵ different from the control group of offsprings from the same genre + ketamine (OCD-Cet 25 mg / kg). # Offsprings different from the group exposed to different genus + ketamine (OED-Cet 25 mg / kg). $\bar{\sigma}$ different from group exposed offsprings + saline of the same gender (OED-Sal). Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine),

OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Figure 8: AChE Striatum. Effect of prenatal exposure to cigarette smoke and / or ketamine in adulthood (dose 25mg/kg) about the AChE activity in the striatum of male and female. Values are expressed as mean \pm SEM (Standard Error of Mean), n = 6-8. * Different from control group of offsprings + saline of the same gender (OCD-Sal male or female). ϵ different from the control group of offsprings from the same genre + ketamine (OCD-Cet 25 mg / kg). # Different from the control group of offsprings of different genre + saline (OCD-Sal). # Different from the control group chicks of different genus + ketamine (25 mg OCD-Cet / kg). # Offsprings different from the group exposed to different genus + ketamine (OED-Cet 25 mg / kg). σ different from group exposed offsprings + saline of the same gender (OED-Sal). Legend: OCD-Sal (control offsprings treated with saline), OCD-Cet (control offsprings treated with ketamine), OED-Sal (exposed offsprings treated with saline), OED-Cet (exposed offsprings treated with ketamine).

Referências

- Aguilar, MC., Gurpegui, M., Dias, F., De Leon, J., 2005. Nicotine dependence and symptoms in schizophrenia: naturalistic study of complex interactions. *Br. J. Psychiatry*. 186, 215-221.
- Amaral, PP., Mattick, JS., 2008. Noncoding RNA in development. *Mamm Genome*. 19(7–8), 454–492.
- Anand, A., Charney, DS., Oren, DA., Berman, RM., Hu XS., Cappiello, A., Krystal, JH., 2000. Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine: support for hyperglutamatergic effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Arch Gen Psychiatry*. 57(3), 270-276.
- APA - American Psychiatric Association, “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases”, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994.
- Azam, L., Chen, Y., Leslie, FM., 2007. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience*. 144, 1347-1360.
- Baguelin-Pinaud, A., Robert, S., Ménard, JF., Thibaut F., 2010. Prenatal exposure to tobacco and risk for schizophrenia: a retrospective epidemiological study. *Comprehensive Psychiatry*. 51, 106-109.
- Bakker, CB., Amini, FB., 1961. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. *Compr Psychiatry*. 2, 269-280.
- Bergemann, N., Parzer, P., Runnebaum, B., Resch, F., Mundt, C., 2007. Estrogen, menstrual cycle phases, and psychopathology in women suffering from schizophrenia. *Psychol. Med*. 37,1427–1436.
- Bliss, TV., Collingridge, GL., 1993. A synaptic model of memory: longterm potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31–39.
- Boison, D., Singer, P., Shen, HY., Feldon, J., Yee, BK., 2011. Adenosine hypothesis of schizophrenia - Opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 62(3),1527-1543.

- Boksa, P., 2008. Maternal infection during pregnancy and schizophrenia. *Journal Psychiatry Neuroscience*. 33, 183–185.
- Boulay, D., Bergis, O., Avenet, P., Griebel, G., 2010. The glycine transporter-1 inhibitor SSR103800 displays a selective and specific antipsychotic-like profile in normal and transgenic mice. *Neuropsychopharmacology*. 35(2), 416-27.
- Bowie, CR., Harvey, PD., 2006. Schizophrenia from a neuropsychiatric perspective. *Mont Sinai Journal Medicine*. 73, 993 - 8.
- Brown, AS., Susser, ES., 2008. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 34, 1054-1063.
- Canever, L., Oliveira, L., De luca, RD., Correa, PT., Fraga, DB., Matos, MP., Scaini, G., Quevedo, J., Streck, EL., Zugno, AI., 2010. A rodent model of schizophrenia reveals increase in creatine kinase activity with associated behavior changes. *Oxid Med Cell Longev*. 3(6), 421-427.
- Cannon, M., Jones, PB., Murray, RM., 2002. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *American Journal of Psychiatry*. 159, 1080-1092.
- Carr, LA., Rowell, PP., Pierce, WM Jr., 1989. Effects of subchronic nicotine administration on central dopaminergic mechanisms in the rat. *Neurochem Res*. 14, 511–515.
- Chang, SS., Renshaw, DC., 1986. Psychosis and pregnancy. *Compr. Ther*. 12, 36–41.
- Clarke, MC., Tanskanen, A., Huttunen, M., Whittaker, JC., Cannon, M., 2009. Evidence for an interaction between familial liability and prenatal exposure to infection in the causation of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*. 9, 1025-1030.
- Cohen, RZ., Seeman, MV., Gotowiec, A., Kopala, L., 1999. Earlier puberty as a predictor of later onset of schizophrenia in women. *Am. J. Psychiatry*. 156, 1059–1064.
- Colgin, LL., Kubota, D., Lynch, G., 2003. Cholinergic plasticity in the hippocampus. *Neurosc*. 100, 2872-2877.
- Cottrell, JR., Dube, GR., Egles, C., Liu, G., 2000. Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 84, 1573–1587.

- Deakin, JF., Slater, P., Simpson, MD., Gilchrist, AC., Skan, WJ., Royston, MC., Reynolds, GP., Gross, AJ., 1989. Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry*. 52, 1781-1786.
- De Oliveira, L., Fraga, DB., De Luca, RD., Canever, L., Ghedim, FV., Matos, MP., Streck, EL., Quevedo, J., Zugno, AI., 2011. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metab Brain Dis*. 26(1), 69-77.
- De Oliveira, L., Spiazzi, CM., Bortolin, T., Canever, L., Petronilho, F., Mina, FG., Dal-Pizzol, F., Quevedo, J., Zugno, AI., 2009. Different sub-anesthetic doses of ketamine increase oxidative stress in the brain of rats. *Progress In Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 33, 1003-1008.
- Dicicco-Bloom, E., Lord, C., Zwaigenbaum, L., Dager, SR., Schmitz, C., Schultz, RT., Crawley, J., Young, LJ., 2006. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J. Neurosci*. 26, 6807-6906.
- Eddins, D., Petro, A., Williams, P., Cerutti, DT., Levin, ED., 2009. Nicotine effects on learning in zebrafish: the role of dopaminergic systems. *Psychopharmacology*. 202, 103-109.
- Ellman, GL., Courtney, KD., Andres, V Jr., Feather-Stone, RM., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.
- Elsworth, JD., Groman, SM., Jentsch, JD., Valles, R., Shahid, M., Wong, E., Marston, H., Roth, RH., 2011. Aripiprazole effects on cognitive and monoamine dysfunction elicited by subchronic phencyclidine administration. *Neuropharmacology*. 62(3),1442-1452.
- Fatemi, SH., Folsom, TD., 2009. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophrenia Bulletin*. 35, 528-548.
- Ferrari, MF., Fior-Chadi, DR., 2007. Chronic nicotine administration. Analysis of the development of hypertension and glutamatergic neurotransmission. *Brain Res Bull*. 72, 215-224.
- 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., Pizzol, FD., Zugno, AI., 2011. 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*. 45(11), 1497-1503.

- Gattaz, WF., Vogel, P., Riecher-Rossler, A., Soddu, G., 1994. Influence of the menstrual cycle phase on the therapeutic response in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 36, 137–139.
- Goldberg, AD., Allis, CD., Bernstein, E., 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 128(4), 635–638.
- Grigoriadis, S., Seeman, MV., 2002. The role of estrogen in schizophrenia: implications for schizophrenia practice guidelines for women. *Can. J. Psychiatry.* 47, 437–442.
- Haukvik, UK., Lawyer, G., Bjerkan, PS., Hartberg, CB., Jönsson, EG., Mcneil, T., Agartz, I., 2009. Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research.* 43, 1287-1293.
- Harrison, PJ., Weinberger, DR., 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry.* 10, 40-68.
- Hashimoto, K., Fujita, Y., Iyo, M., 2007. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology.* 32, 514-521.
- Hendrick, V., Altshuler, LL., Burt, VK., 1996. Course of psychiatric disorders across the menstrual cycle. *Harv. Rev. Psychiatry.* 4, 200–207.
- Javitt, DC., Shelley, AM., Silipo, G., Lieberman, JA., 2000. Deficits in auditory and visual context-dependent processing in schizophrenia: defining the pattern. *Arch Gen Psychiatry.* 57, 1131-1137.
- Javitt, DC., 2004. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 9, 984–997, 979.
- Javitt, DC., 2010. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatry Relat Sci.* 47, 4-16.
- Kendell, RE., Chalmers, JC., Platz, C., 1987. Epidemiology of puerperal psychoses. *Br. J. Psychiatry.* 150, 662–673.

- Kim, JS., Kornhuber, HH., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 20, 379-382.
- King, JA., Dávila-García, M., Azmitia, EC., Strand, FL., 1991. Differential effects of prenatal and postnatal ACTH or nicotine exposure on 5-HT high affinity uptake in the neonatal rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 9, 281–286.
- Krystal, JH., Karper, LP., Seibyl, JP., Freeman, GK., Delaney, R., Bremner, JD., Heninger, GR., Bowers, MB Jr., Charney, DS., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 51, 199-214.
- Lara, DR., Dall'igna, OP., Ghisolfi, ES., Brunstein, MG., 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30, 617-629.
- Lee, PR., BRADY, DL., SHAPIRO, RA., DORSA, DM., KOENIG, JI., 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Research.* 1156, 152–167.
- Lherena, A., De La Rubia, A., Peñas-Lledó, EM., 2003. Schizophrenia and tobacco smoking in a Spanish psychiatric hospital. *Schizophr. Res.* 60, 313-317.
- Lichtensteiger, W., Ribary, U., Schlumpf, M., Odermatt, B., Widmer, HR., 1988. Prenatal adverse effects of nicotine on the developing brain. *Prog Brain Res.* 73, 137-157.
- Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., Randall, RJ., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
- Luby, ED., Cohen, BD., Rosenbaum, G., Gottlieb, JS., Kelley, R., 1959. Study of a new schizophrenomimetic drug: serenyl. *Arch Neurol Psychiatry.* 71, 363-369.
- Marsman, A., Van Den Heuvel, MP., Klomp, DW., Kahn, RS., Luijten, PR., Hulshoff Pol, HE., 2011. Glutamate in Schizophrenia: A Focused Review and Meta-Analysis of 1H-MRS Studies. *Schizophrenia Bulletin.* 39(1),120-129.
- Mccreadie, RG., 2002. On behalf of the Scottish Comorbidity Study Group: Use of drugs, alcohol and tobacco by people with schizophrenia: case-control study. *J. Psychiatry.* 181, 321-325.

- Mechri, A., Saoud, M., Khiari, G., D'amato, T., Dalery, J., Gaha, L., 2001. Glutaminergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine. *Encephale*. 27, 53-59.
- Mendrek, A., Stip, E., 2011. Sexual dimorphism in schizophrenia: is there a need for gender-based protocols? *Expert Rev Neurother*. 11(7), 951-959.
- Miyamoto, S., Lamantia, AS., Duncan, GE., Sullivan, P., Gilmore, JH., Lieberman, JA., 2003. Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv*. 3(1), 27-39.
- Mohn, AR., Gainetdinov, RR., Caron, MG., Koller, BH., 1999. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 98, 427-436.
- Moldin, SO., Rubenstein, JL., Hyman, SE., 2006. Can autism speak to neuroscience? *J. Neurosci*. 26, 6893–6896.
- Nagai, T., Ibi, D., Yamada, K., 2011. Translational Research in Neurodevelopmental Disorders: Development of Etiology-Based Animal Models: Animal Model for Schizophrenia That Reflects Gene-Environment Interactions. *Biol. Pharm. Bull*. 34, 1364-1368.
- Niesink, RJM., Van Ree JM., 1989. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacol*. 28, 411-418.
- Pickard, B., 2011. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med*. 13, 25.
- Reddy, RD., Yao, JK., 1996. Free radical pathology in schizophrenia: a review. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 55, 33–43.
- Ritter, LM., Unis, AS., Meador-Woodruff, JH., 2001. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 127, 123–133.
- Rosenbaum, G., Cohen, BD., Luby, ED., Gottlieb, JS., Yelen, D., 1959. Comparison of sernyl with other drugs: simulation of schizophrenic performance with sernyl, LSD-25, and amobarbital (amytal) sodium; I. Attention, motor function, and proprioception. *Arch Gen Psychiatry*. 1, 651-656.

- Sarter, M., Nelson, CL., Bruno, JP., 2005. Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 31, 117-138.
- Schneidert, T., Przewlocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 30, 80–89.
- Seeman, MV., 1996. The role of estrogen in schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* 21, 123–127.
- Seeman, MV., 1997. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am. J. Psychiatry.* 154, 1641–1647.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature Reviews of Neuroscience.* 2, 294-302.
- Su, YA., Si, TM., Zhou, DF., Guo, CM., Wang, XD., Yang, Y., Shu, L., Liang, JH., 2007. Risperidone attenuates MK-801-induced hyperlocomotion in mice via the blockade of serotonin 5-HT 2A/2C receptors. *Eur J Pharmacol.* 564(1-3), 123-130.
- Susser, E., St Clair, D., He, L., 2008. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. *Annals New York Academic Science.* 1136, 85-92.
- Van De Berg, WD., Schimitz, C., Steinbusch, HW., Blanco, CE., 2002. Perinatal asphyxia induced neuronal loss by apoptosis in the neonatal rat striatum: a combined TUNEL and stereological study. *Experimental Neurology.* 174, 29-36.
- Verkhatsky, A., Kirchhoff, F., 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist.* 13, 28-37.
- Voss, B., Thienel, R., Leucht, S., Kircher, T., 2008. Therapy of cognitive deficits in schizophrenia with acetylcholinesterase inhibitors. A systematic overview. *Nervenarzt.* 79(1), 47-8, 50-2, 54-9.
- Wang, H., Dávila-García, MI., Yarl, W., Gondré-Lewis, MC., 2011. Gestational nicotine exposure regulates expression of AMPA and NMDA receptors and their signaling apparatus in developing and adult rat hippocampus. *Neuroscience.* 188, 168-181.
- Watkins, JC., Evans, RH., 1981. Excitatory Amino Acid Transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 21, 165-204.

- Weiden, P.J., Buckley, P.F., Grody, M., 2007. Understanding and Treating "First-Episode" Schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am.* 30, 481-510.
- Xu, Z., Seidler, F.J., Ali, S.F., Slikker, W Jr., Slotkin, T.A., 2001. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 914, 166–178.
- Zugno, A.I., Fraga, D.B., De Luca, R.D., Ghedim, F.V., Deroza, P.F., Cipriano, A.L., Oliveira, M.B., Heylmann, A.S., Budni, J., Souza, R.P., Quevedo, J., 2013. Chronic exposure to cigarette smoke during gestation results in altered cholinesterase enzyme activity and behavioral deficits in adult rat offspring: Potential relevance to schizophrenia. *Journal Of Psychiatric Research.* 47(6),1-7.

Figure 1.

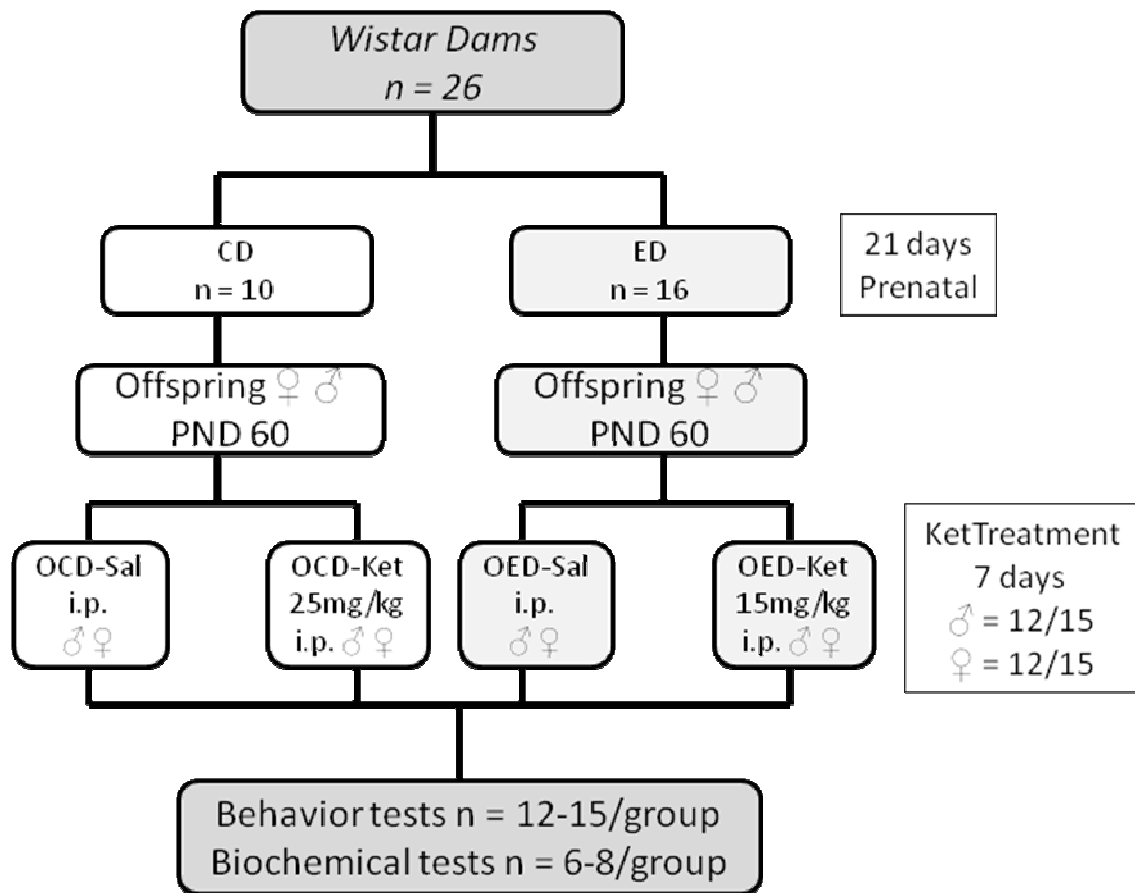


Figure 2.

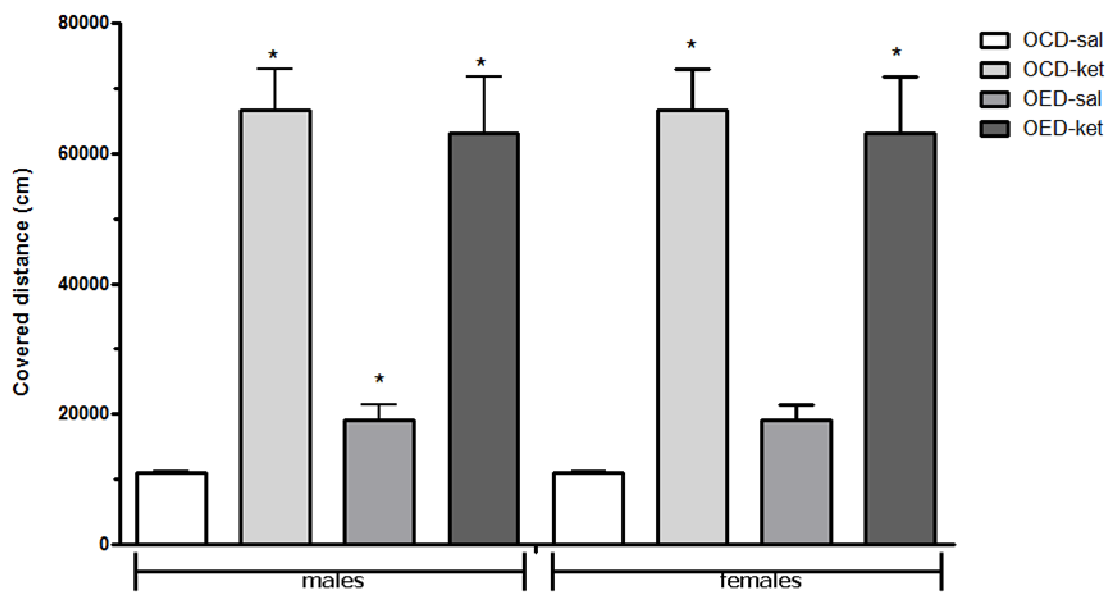


Figure 3.

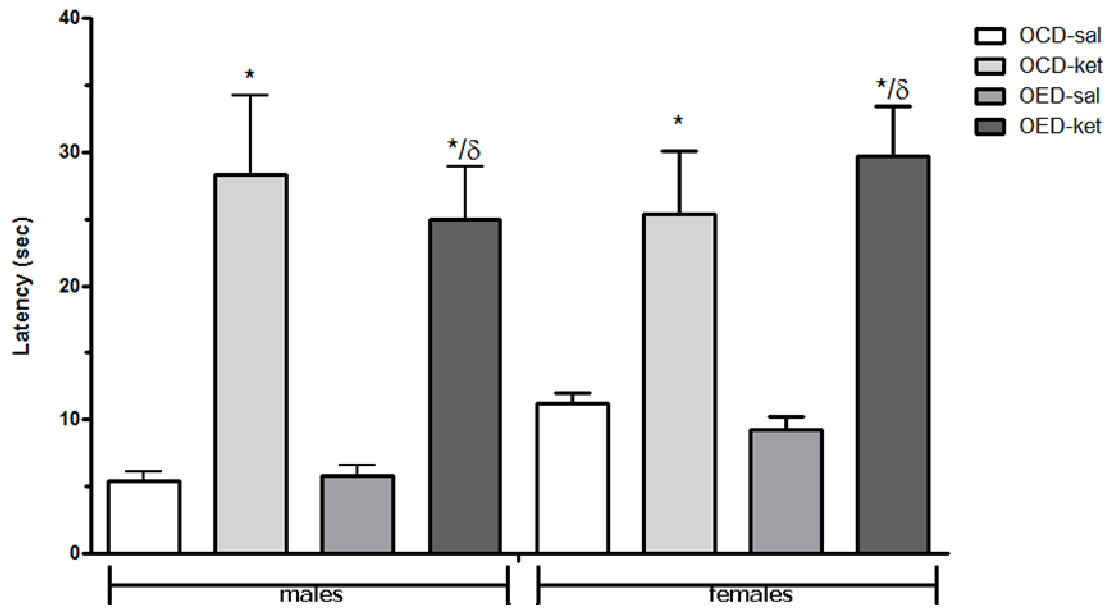


Figure 4.

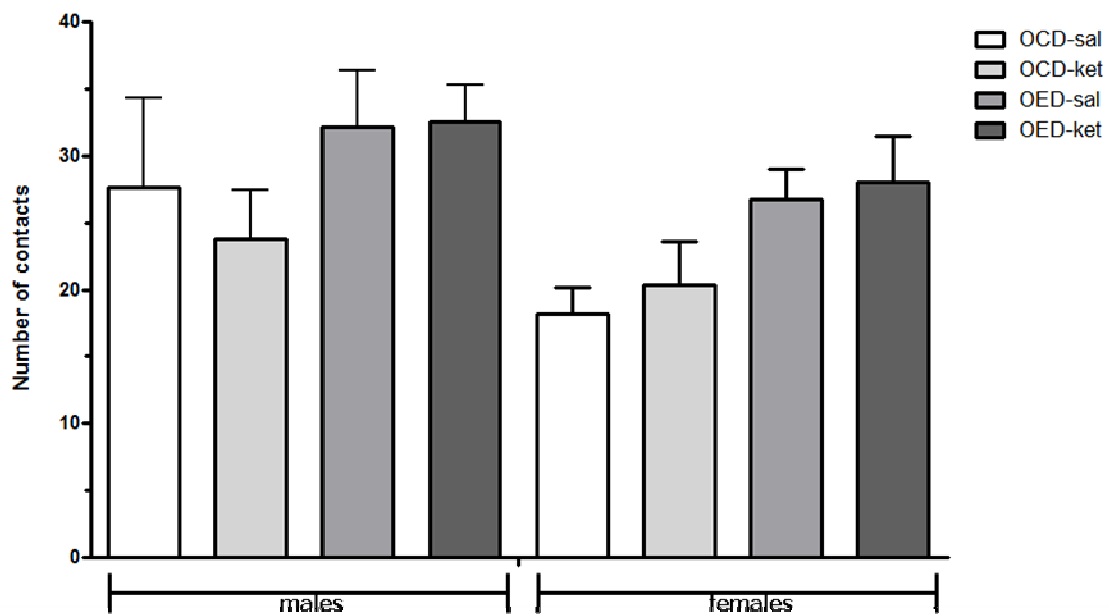


Figure 5.

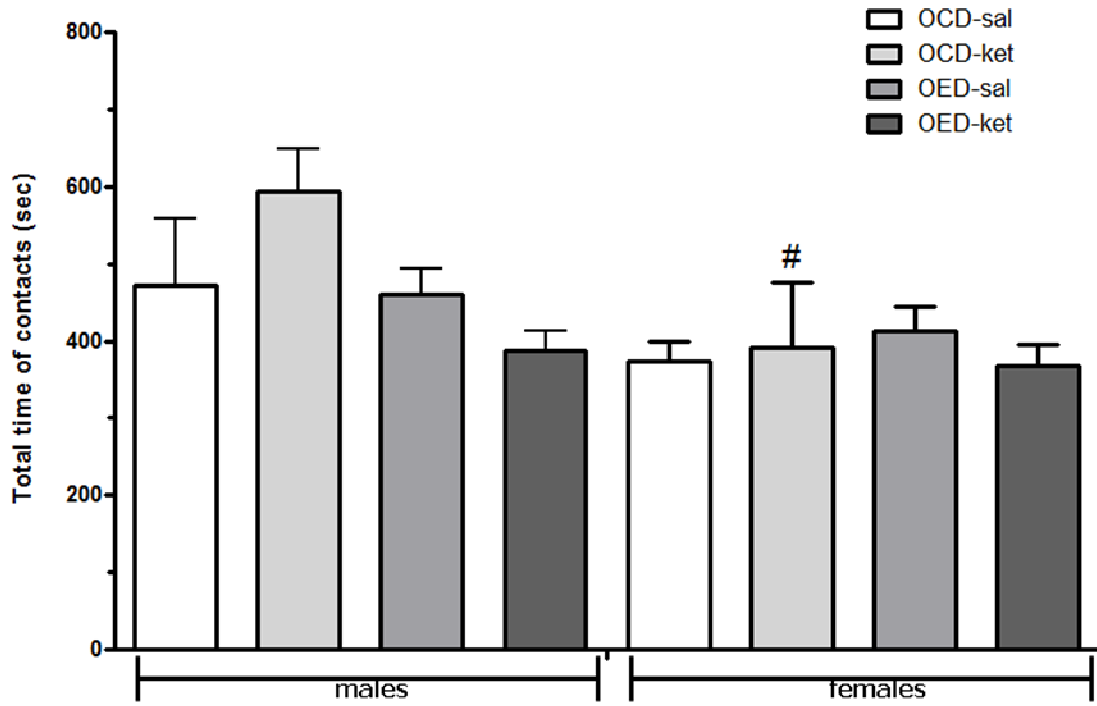


Figure 6.

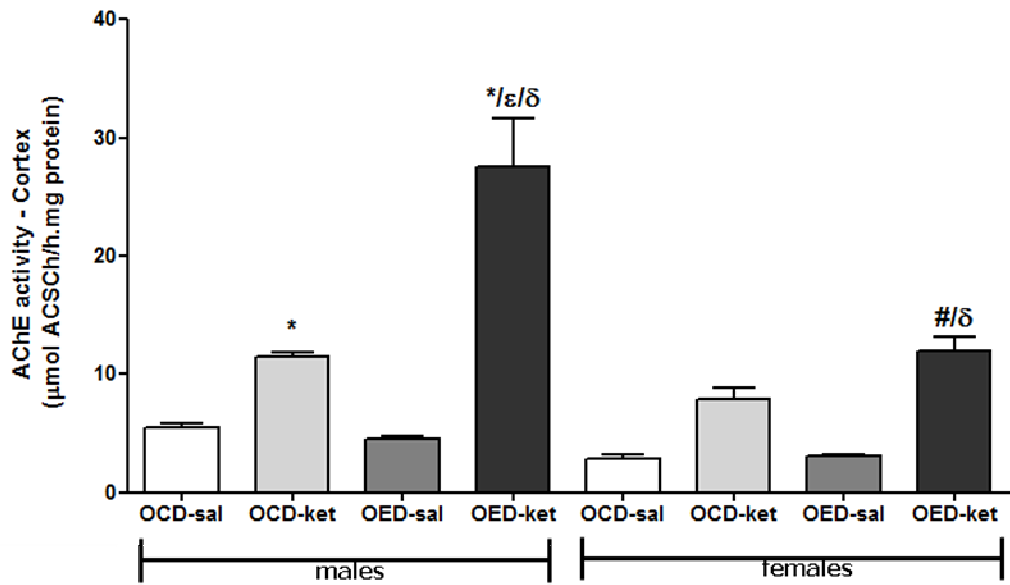


Figure 7.

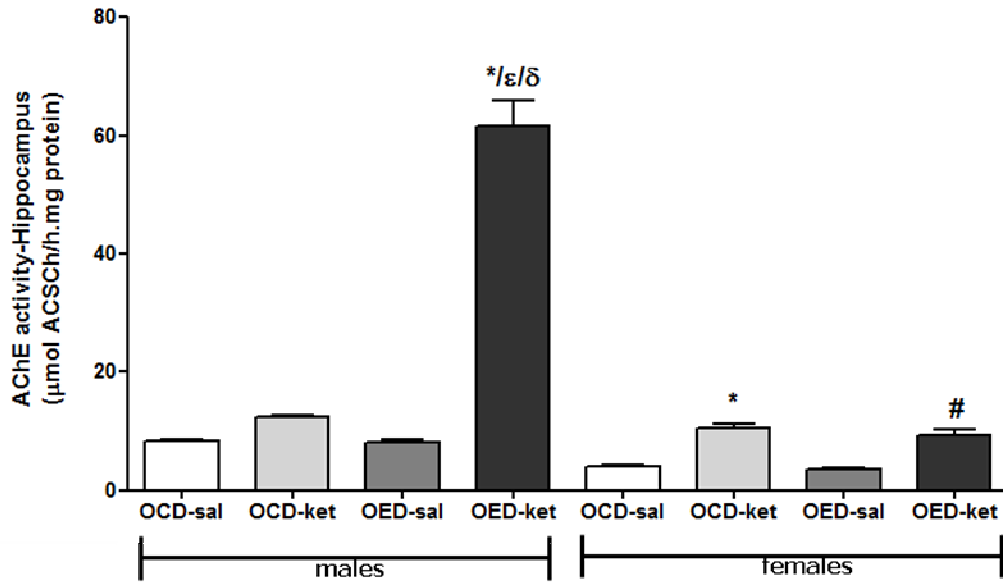


Figure 8.

