



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ana Carolina Dutra Tavares

**A exposição crônica à cafeína altera a resposta à nicotina durante a
adolescência?: susceptibilidade à nicotina, comportamento e neuroquímica**

Rio de Janeiro

2016

Ana Carolina Dutra Tavares

**A exposição crônica à cafeína altera a resposta à nicotina durante a adolescência?:
susceptibilidade à nicotina, comportamento e neuroquímica**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

T231 Tavares, Ana Carolina Dutra.
A exposição crônica à cafeína altera a resposta à nicotina durante a adolescência?: susceptibilidade à nicotina, comportamento e neuroquímica / Ana Carolina Dutra Tavares – 2016.
131 f.

Orientador: Yael de Abreu Villaça.
Coorientador: Anderson Ribeiro Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Cafeína – Efeito fisiológico - Teses. 2. Nicotina – Efeito fisiológico – Teses. 3. Adolescentes – Fumo – Teses. 4. Adolescentes – Conduta – Teses. 5. Camundongos como animais de laboratório – Teses. I. Villaça, Yael de Abreu. II. Carvalho, Anderson Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 663.93:613.84-053.6

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ana Carolina Dutra Tavares

**A exposição crônica à cafeína altera a resposta à nicotina durante a adolescência?:
susceptibilidade à nicotina, comportamento e neuroquímica**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de outubro de 2016.

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Faculdade de Formação de Professores - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Pablo Pandolfo
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. David do Carmo Malvar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Yael, agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho e ainda por todo apoio, dedicação e confiança durante este período. Você é um exemplo de competência. Um referencial a ser seguido.

Ao meu coorientador Anderson, agradeço por todo apoio, dedicação e, principalmente, por ter me apresentado a esta equipe há 8 anos atrás, sendo um exemplo diário desde então.

Aos colaboradores deste trabalho, Pedro, Sylvão e Fê, agradeço de todo o meu coração a participação de vocês neste estudo. Sem vocês ele não teria se concretizado. Obrigada pelo apoio, companheirismo e principalmente pela amizade.

Ao Ulisses, por toda ajuda, presteza e paciência no HPLC.

Aos outros “tios”, Alex, Cláudio e Thomas, agradeço pelo apoio e por contribuírem, direta ou indiretamente, neste trabalho e na minha formação.

À Fundação Capes, pela concessão da bolsa de estudos, garantindo suporte financeiro para a realização deste trabalho e também o meu provimento pessoal ao longo destes 4 anos.

Aos meus pais João e Claudia, obrigada por tudo!!!! Sem vocês com certeza eu não teria completado mais essa jornada. Obrigada pelo apoio, dedicação, incentivo, amor e confiança. Não há palavras para descrever o quanto eu os amo!!!!!!!!!!

Ao meu irmão Pedro, agradeço pelo companheirismo, confiança, pelas risadas e por estar sempre presente na minha vida. Te amo demais!!!!

Ao André, meu companheiro de laboratório que se tornou meu companheiro na vida, obrigada por estar sempre presente, pelos incentivos e por me tranquilizar quando estou prestes a surtar. Te amo muito!!

Aos presentes que a UERJ me deu, amigos que levarei por toda a vida. Ju, obrigada pelo companheirismo, por se preocupar e me divertir com seu jeito engraçado; Fê, obrigada por estar sempre presente, com seu jeito extrovertido e protetor; Paulinho, amigo inesperado, porém muito querido; Ju, Anna Diva e Elaine, obrigada pelas conversas animadas e pelas de auto-ajuda também, que a vida nos mantenha sempre próximas.

A todos os integrantes do laboratório: Jefferson, Fabi, Dani, Ana Cristina, Mônica, Natalie, Jemima, Bruna, Vítor, Gabriel, Jamille, Bruno e Wandilson, por tornarem o dia-a-dia divertido e agradável.

Quanto mais aumenta o nosso conhecimento, mais evidente fica a nossa ignorância.

J. Kennedy

RESUMO

TAVARES, Ana Carolina Dutra. *A exposição crônica à cafeína altera a resposta à nicotina durante a adolescência?*: susceptibilidade à nicotina, comportamento e neuroquímica. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Cafeína e nicotina estão entre as substâncias psicoativas mais consumidas no mundo e há evidências de associação e interação entre essas drogas. A cafeína é consumida durante toda a vida, já o uso de tabaco frequentemente se inicia na adolescência. Este trabalho tem como objetivo avaliar, durante a adolescência de camundongos Suíços, os efeitos da exposição crônica à cafeína na susceptibilidade à nicotina (subprojeto1), e os efeitos da coexposição sobre diferentes comportamentos (subprojeto2). A exposição à cafeína se estendeu desde o primeiro dia de cruzamento das progenitoras até o último dia de avaliação comportamental das proles. Foram formados 3 grupos experimentais: CAF0,3 – livre acesso à solução de cafeína 0,3g/L como única fonte de líquido (n=16 ninhadas); CAF0,1 - livre acesso à solução de cafeína 0,1g/L como única fonte de líquido (n=9 ninhadas); Grupo Controle (CONT) – livre acesso à água potável (n=15 ninhadas). No subprojeto 1, em PN30, os animais foram designados para o teste do campo aberto (CA), ou preferência condicionada ao local (CPP). Quantificamos, através de cromatografia líquida de alta eficiência, a concentração de dopamina, DOPAC, norepinefrina e o *turnover* (DOPAC/dopamina) no córtex cerebral. No subprojeto 2, somente os grupos CONT e CAF0,3 foram mantidos. Em PN30, foram implantadas minibombas osmóticas contendo nicotina (12mg/Kg/dia) ou salina. A coexposição se estendeu até PN45. Os animais foram testados durante a vigência da coexposição, ou em condição de retirada da nicotina. Em PN44 ou PN49, foram realizados o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o CA; em PN45 ou PN50, ocorreram os testes do reconhecimento de objetos (RO) e o nado forçado (NF). No subprojeto 1, no CA, a nicotina produziu um aumento na locomoção, não houve interferência da cafeína. Foi identificado efeito ansiogênico da maior dose de cafeína, que foi revertido pela administração aguda de nicotina. No CPP, todos os grupos responderam positivamente ao condicionamento com nicotina, não havendo interferência da cafeína. Não foram identificados efeitos da cafeína e/ou nicotina na concentração de monoaminas no córtex cerebral. No subprojeto 2, durante a vigência da coexposição, no LCE, foi identificado efeito ansiolítico da nicotina. Já durante o período de retirada da coexposição, a cafeína apresentou efeitos ansiolíticos. A retirada de nicotina provocou aumento da atividade locomotora e gerou diminuição na atividade exploratória. No CA, os animais expostos à cafeína apresentaram redução na atividade locomotora e aumento no comportamento associado a ansiedade tanto na vigência como na abstinência. No RO, a cafeína causou redução da atividade exploratória. Adicionalmente, foi identificado déficit cognitivo provocado pela nicotina, efeito não encontrado nos animais co-expostos. Durante a retirada da nicotina, o déficit cognitivo não foi mais identificado. No teste do NF, foi identificado efeito anti-depressivo decorrente da exposição à nicotina. Na abstinência da nicotina, a cafeína demonstrou efeitos do tipo depressivo. Esses dados mostram que a exposição crônica à cafeína não altera a susceptibilidade à cafeína durante a adolescência, apesar disso, foram identificadas interações funcionais entre essas drogas nos diferentes testes comportamentais utilizados, sendo necessários estudos posteriores para melhor entender os mecanismos envolvidos nessas interações.

Palavras-chave: Cafeína. Nicotina. Adolescência. Susceptibilidade. Comportamento.

ABSTRACT

TAVARES, Ana Carolina Dutra. *Does chronic exposure to caffeine alter nicotine response during adolescence?: susceptibility to nicotine, behavior and neurochemistry*. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Caffeine and nicotine are on top of the list of psychoactive substances consumed in the world. Epidemiological data demonstrate the co-consumption and experimental studies support the idea of interactions between these drugs. Caffeine is consumed throughout life, while smoking usually starts during adolescence. The objective of this study was evaluate, during the adolescence of Swiss mice, the effects of the chronic exposure to caffeine on the susceptibility to nicotine (subproject 1), as well the effects of co-exposure on different behaviors (subproject 2). Caffeine exposure extended from the first day of mating until the last day of the behavioral tests. The animals were split into 3 experimental groups: CAF0.3 - free access to caffeine 0.3g/L as the only source of liquid (n=16 litters); CAF0.1 - free access to caffeine 0.1g/L as the only source of liquid (n=9 litters); control group (CONT) - free access to drinking water (n=15 litters). In subproject 1, on PN30, animals were tested in an open field (OF) or conditioned place preference (CPP) chamber. Nicotine (0,5mg/Kg, i.p.) or saline were administered immediately before the OF test. In the CPP, the animals associate the environment with the effects of nicotine (0,5mg/Kg, i.p.). Dopamine, the metabolic DOPAC, norepinephrine and turnover (DOPAC/dopamine) were quantified in the cerebral cortex through HPLC. In subproject 2, we only used CONT and CAF0.3 mice. On PN30, osmotic minipumps filled with nicotine (12mg/Kg/day) or saline were used, and the animals were co-exposed until PN45. Animals were tested either during co-exposure or after 5 days after the end of nicotine exposure. Mice were tested in the elevated plus maze (EPM) and OF on PN44 or PN49. Object recognition (OR) and forced swimming (FS) tests were run on PN45 and PN50. In subproject 1, nicotine increased locomotor activity in the OF, caffeine did not interfere with this result. Caffeine was anxiogenic at the higher dose but this effect was reversed by nicotine. In CPP, all groups were conditioned and caffeine failed to interfere with the effect of nicotine. Neither caffeine nor nicotine changed the concentrations of monoamines in the cerebral cortex. In subproject 2, during co-exposure, nicotine was anxiolytic in the EPM. Distinctively, during nicotine withdrawal, caffeine evoked an anxiolytic effect. Nicotine withdrawal evoked an increase in locomotor activity in CONT-NIC group, and a reduction in exploratory activity. In the OF, caffeine presented a reduction in locomotor activity and increased anxiety-like behavior both during co-exposure and during nicotine withdrawal. In the OR, CAF animals explored less the objects. In addition, nicotine evoked cognitive impairment was not identified in mice co-exposed to caffeine and nicotine. During nicotine withdrawal, this deficit was no longer identified. In the FS, nicotine evoked an anti-depressant effect. Distinctively, during nicotine withdrawal caffeine evoked an increase in depressive-like behavior. Altogether, these data show that chronic exposure to caffeine does not alter the susceptibility to nicotine during adolescence. Nevertheless, functional interactions between these drugs were identified in different behavioral tests used, requiring further studies to better understand the mechanisms that underlie these interactions.

Keywords: Caffeine. Nicotine. Adolescence. Susceptibility. Behavior.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Estrutura química da cafeína, teofilina e teobromina..... | 20 |
| Figura 2 - | Efeitos da cafeína sobre diferentes alvos bioquímicos em relação aos seus níveis em humanos..... | 23 |
| Figura 3 - | Linha temporal dos subprojetos 1 e 2..... | 40 |
| Figura 4 - | Linha temporal do início da exposição à cafeína até o início dos testes comportamentais nas proles (subprojeto 1)..... | 41 |
| Figura 5 - | Fotografia em vista superior do campo aberto..... | 43 |
| Figura 6 - | Equipamento usado para a realização do CPP..... | 44 |
| Figura 7 - | Linha temporal do Teste de Preferência Condicionada ao Local (CPP)..... | 47 |
| Figura 8 - | Animal logo após a cirurgia de implantação da minibomba osmótica, ainda sob efeito da anestesia..... | 49 |
| Figura 9 - | Linha temporal do início da exposição à cafeína até o último dia de testes comportamentais nas proles (subprojeto 2)..... | 51 |
| Figura 10 - | Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado..... | 53 |
| Figura 11 - | Fotografia em vista superior do teste do RO. Primeira sessão: treinamento (objetos iguais)..... | 54 |
| Figura 12 - | Fotografia em vista superior do teste do RO. Segunda sessão: avaliação do aprendizado e memória (objetos diferentes)..... | 55 |
| Figura 13 - | Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado..... | 56 |
| Figura 14 - | Evolução da massa corporal das mães..... | 60 |
| Figura 15 - | Evolução do consumo de ração das mães, corrigido pela massa corporal..... | 61 |
| Figura 16 - | Evolução do consumo de líquido pelas mães, corrigido pela massa corporal..... | 62 |
| Figura 17 - | Evolução da massa corporal das proles..... | 63 |
| Figura 18 - | Evolução do consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles..... | 63 |
| Figura 19 - | Evolução do consumo de líquido, corrigido pela massa corporal, das | |

| | |
|---|----|
| proles..... | 64 |
| Figura 20 - Evolução da massa corporal das proles: período de coexposição..... | 65 |
| Figura 21 - Evolução do consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles: período de coexposição..... | 66 |
| Figura 22 - Evolução do consumo de solução, corrigido pela massa corporal, das proles que foram expostas cronicamente, ou não, à cafeína, desde a gestação até a idade de PN45 e que receberam minibombas osmóticas contendo nicotina, ao completarem PN30..... | 67 |
| Figura 23 - Média da ambulação total em 5 minutos no teste do campo aberto..... | 68 |
| Figura 24 - Percentual de ambulação no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto..... | 69 |
| Figura 25 - Média total do tempo despendido no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto..... | 70 |
| Figura 26 - Tempo despendido, em segundos, pelas proles que receberam nicotina no lado não preferido durante o condicionamento..... | 71 |
| Figura 27 - Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais..... | 72 |
| Figura 28 - Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais..... | 72 |
| Figura 29 - <i>Turnover</i> de dopamina no córtex cerebral dos animais que foram expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento..... | 73 |
| Figura 30 - Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais que foram expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento..... | 73 |
| Figura 31 - Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento..... | 74 |
| Figura 32 - Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento..... | 75 |
| Figura 33 - <i>Turnover</i> de dopamina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento..... | 75 |
| Figura 34 - Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Figura 35 - Percentual de entradas nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição..... | 77 |
| Figura 36 - Percentual de entradas nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição..... | 78 |
| Figura 37 - Percentual de tempo despendido nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição..... | 79 |
| Figura 38 - Percentual de tempo despendido nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição..... | 80 |
| Figura 39 - Atividade locomotora, dada através das entradas nos braços fechados, em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição..... | 81 |
| Figura 40 - Atividade locomotora, dada através das entradas nos braços fechados, em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição..... | 82 |
| Figura 41 - Número de <i>head dips</i> realizados em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição..... | 83 |
| Figura 42 - Número de <i>head dips</i> realizados em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição..... | 84 |
| Figura 43 - Média da ambulação total em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição..... | 85 |
| Figura 44 - Média da ambulação total em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição..... | 85 |
| Figura 45 - Percentual de entradas no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição..... | 86 |
| Figura 46 - Percentual de entradas no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição..... | 87 |
| Figura 47 - Tempo de permanência no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição..... | 88 |
| Figura 48 - Tempo de permanência no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição..... | 88 |
| Figura 49 - Tempo de interação com os objetos na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição..... | 89 |

| | |
|--|----|
| Figura 50 - Tempo de interação com os objetos na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição.... | 90 |
| Figura 51 - Percentual do tempo de exploração na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição..... | 90 |
| Figura 52 - Percentual do tempo de exploração na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição.... | 91 |
| Figura 53 - Tempo, em segundos, despendido explorando o objeto A2 (familiar) ou o objeto B (novo) ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição..... | 92 |
| Figura 54 - Tempo, em segundos, despendido explorando o objeto A2 (familiar) ou o objeto B (novo) ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição..... | 92 |
| Figura 55 - Tempo de imobilidade, em segundos, ao longo de 6 minutos no teste do nado forçado durante a vigência da coexposição..... | 93 |
| Figura 56 - Tempo de imobilidade, em segundos, ao longo de 6 minutos no teste do nado forçado durante a abstinência da coexposição..... | 94 |
| Figura 57 - Níveis plasmáticos de cotinina..... | 95 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| ABST | Abstinência |
| ACh | Acetilcolina |
| AFMU | 5-acetilamina-6-formilamina-3-metiluracil |
| AMPc | 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico |
| ANOVA | análise de variância |
| ANOVAR | análises de variância com medidas repetidas |
| BA | braço aberto |
| BF | braço fechado |
| C | dia de cruzamento |
| CA | teste do campo aberto |
| CAF | animais que foram expostos à cafeína |
| CAF0,1 | grupo cafeína 0,1 |
| CAF0,3 | grupo cafeína 0,3 |
| Ce | centro |
| Ce+Pe | centro mais periferia |
| ChAT | colina acetil-transferase |
| CONT | grupo controle |
| CPP | <i>Conditioned Place Preference</i> |
| CYP1A2 | Enzima membro do sistema citocromo P450 |
| DA | dopamina |
| DCF | Departamento de Ciências Fisiológicas |
| DEH | dose equivalente em humanos |
| DOPAC | 3,4-di-hidroxifenilacético |
| FPLSD | <i>Fisher's Protected Least Significant Difference</i> |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IBRAG | Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes |
| LCE | teste do labirinto em cruz elevado |
| NF | teste do nado forçado |
| NIC | nicotina |

| | |
|-------|---|
| NIH | <i>National Institutes of Health</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| P | valor de prova |
| PN | dias de vida pós natal |
| PVDF | filtro de fluoreto de polivinilideno |
| RO | teste do reconhecimento de objetos |
| SAL | salina |
| SNC | sistema nervoso central |
| SNP | sistema nervoso periférico |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| USFDA | <i>United States - Food and Drug Administration</i> |
| VIG | Vigência |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|--|
| mg/kg/min | miligramas por quilogramas por minuto |
| A1 | receptores de adenosina subtipo A1 |
| A2a | receptores de adenosina subtipo A2a |
| A2b | receptores de adenosina subtipo A2b |
| A3 | receptores de adenosina subtipo A3 |
| GABA _A | receptores para Ácido Gama-Aminobutírico do tipo A |
| μmol/l | micromol por litro |
| mmol/l | milimol por litro |
| mg | miligrama |
| mg/ml | miligrama por microlitro |
| mg/g | miligrama por grama |
| mg/pessoa/dia | miligrama por pessoa por dia |
| mg/dia | miligrama por dia |
| mg/kg | miligrama por quilograma |
| μg/ml | micrograma por mililitro |
| α2-8 | subunidades de receptor nicotínico colinérgico |
| β2-4 | subunidades de receptor nicotínico colinérgico |
| α4β2 | receptor nicotínico colinérgico do Tipo α4β2 |
| α7 | receptor nicotínico colinérgico do Tipo α7 |
| C | Célsius |
| g/L | grama por litro |
| cm | centímetros |
| ml/g | mililitro por grama |
| HClO ₄ | ácido perclórico |
| g | grama |
| min | minuto |
| mm | milímetro |
| λ | comprimento de onda |
| nm | nanômetro |
| mM | milimolar |

| | |
|-----------|-------------------------------------|
| ml/min | mililitro por minuto |
| pmol | picomol |
| nmol/g | nanomol por grama |
| NaCl | cloreto de sódio |
| mg/Kg/dia | miligrama por quilograma por dia |
| HCl | ácido clorídrico |
| M | molar |
| NaOH | hidróxido de sódio |
| N | normal |
| μl | microlitro |
| ng/ml | nanograma por mililitro |
| Kg | quilograma |
| D2 | receptores dopaminérgicos do tipo 2 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1 | REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 1.1 | Cafeína | 20 |
| 1.1.1 | <u>Aspectos farmacológicos da cafeína</u> | 20 |
| 1.1.2 | <u>Exposição à cafeína durante o desenvolvimento</u> | 25 |
| 1.1.3 | <u>Efeitos da exposição precoce a cafeína em roedores</u> | 26 |
| 1.2 | Nicotina | 27 |
| 1.2.1 | <u>Aspectos farmacológicos da nicotina</u> | 27 |
| 1.2.2 | <u>Tabaco e adolescência</u> | 31 |
| 1.2.2.1 | Efeitos da exposição à nicotina durante a adolescência de roedores..... | 33 |
| 1.3 | Cafeína e nicotina | 34 |
| 2 | OBJETIVOS | 37 |
| 2.1 | Geral | 37 |
| 2.2 | Específicos | 37 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 | Geração dos grupos experimentais | 38 |
| 3.2 | Exposição | 39 |
| 3.2.1 | <u>Medida da massa corporal total</u> | 39 |
| 3.2.2 | <u>Ingestão alimentar e de líquido</u> | 39 |
| 3.3 | Avaliação da susceptibilidade à nicotina – Subprojeto 1 | 40 |
| 3.3.1 | <u>Teste do Campo Aberto</u> | 41 |
| 3.3.2 | <u>Teste da Preferência Condicionada ao Local (CPP)</u> | 43 |
| 3.4 | Avaliação neuroquímica – Subprojeto 1 | 47 |
| 3.5 | Avaliação dos efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência - Subprojeto 2 | 48 |
| 3.5.1 | <u>Implantação da minibomba osmótica</u> | 48 |
| 3.5.2 | <u>Geração dos grupos experimentais</u> | 50 |
| 3.5.3 | <u>Testes comportamentais</u> | 52 |
| 3.5.3.1 | Labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 52 |
| 3.5.3.2 | Campo aberto (CA)..... | 53 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5.3.3 | Reconhecimento de objeto (RO)..... | 54 |
| 3.5.3.4 | Nado forçado (NF)..... | 55 |
| 3.6 | Quantificação da cotinina plasmática | 56 |
| 3.7 | Análises estatísticas | 57 |
| 3.7.1 | <u>Análise da massa corporal e ingestão de ração e líquido</u> | 57 |
| 3.7.2 | <u>Análise dos testes comportamentais – Subprojeto 1</u> | 57 |
| 3.7.3 | <u>Análise da avaliação neuroquímica</u> | 58 |
| 3.7.4 | <u>Análise dos testes comportamentais – Subprojeto 2</u> | 58 |
| 3.7.5 | <u>Análise da cotinina plasmática</u> | 59 |
| 4 | RESULTADOS | 60 |
| 4.1 | Medidas de massa corporal e ingestão | 60 |
| 4.1.1 | <u>Massa corporal e ingestão das mães durante a lactação</u> | 60 |
| 4.1.1.1 | Massa corporal..... | 60 |
| 4.1.1.2 | Ingestão de ração..... | 61 |
| 4.1.1.3 | Ingestão de líquido..... | 61 |
| 4.1.2 | <u>Massa corporal e ingestão das proles até PN30</u> | 62 |
| 4.1.2.1 | Massa corporal..... | 62 |
| 4.1.2.2 | Ingestão de ração..... | 63 |
| 4.1.2.3 | Ingestão de líquido..... | 64 |
| 4.1.3 | <u>Massa corporal e ingestão das proles – durante o período de coexposição (subprojeto 2)</u> | 64 |
| 4.1.3.1 | Massa corporal..... | 65 |
| 4.1.3.2 | Ingestão de ração..... | 66 |
| 4.1.3.3 | Ingestão de líquido..... | 66 |
| 4.2 | Avaliação dos efeitos da exposição crônica à cafeína sobre a susceptibilidade à nicotina – Subprojeto 1 | 67 |
| 4.2.1 | <u>Testes comportamentais</u> | 67 |
| 4.2.1.1 | Teste do campo aberto..... | 67 |
| 4.2.1.2 | Teste da preferência condicionada ao local..... | 70 |
| 4.2.2 | <u>Análise neuroquímica</u> | 71 |
| 4.3 | Testes comportamentais para avaliação dos efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência - Subprojeto 2 | 76 |
| 4.3.1 | <u>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)</u> | 76 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3.2 | <u>Teste do campo aberto</u> | 84 |
| 4.3.3 | <u>Teste do reconhecimento de objeto</u> | 89 |
| 4.3.4 | <u>Teste do nado forçado</u> | 93 |
| 4.3.5 | <u>Cotina em sangue</u> | 94 |
| 5 | DISCUSSÃO | 96 |
| 5.1 | Vias de administração, doses e idades | 96 |
| 5.2 | Efeitos da cafeína sobre a massa corporal e consumos de ração e solução | 99 |
| 5.3 | Efeitos da exposição crônica à cafeína na susceptibilidade à nicotina – comportamento e neuroquímica | 100 |
| 5.4 | Efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência | 103 |
| 5.4.1 | <u>Sobre o comportamento associado à ansiedade</u> | 103 |
| 5.4.2 | <u>Sobre a atividade locomotora</u> | 105 |
| 5.4.3 | <u>Sobre o aprendizado e memória</u> | 106 |
| 5.4.4 | <u>Sobre o comportamento associado à depressão</u> | 107 |
| | CONCLUSÕES | 109 |
| | REFERÊNCIAS | 110 |

INTRODUÇÃO

A ingestão de cafeína pode ser considerada a forma mais frequente de auto-administração de drogas em humanos (GRIFFITHS; WOODSON, 1988; TANDA; GOLDBERG, 2000). Isso se deve principalmente ao fato dela estar presente em muitos alimentos, como o café, chá, cacau e guaraná, além de ser adicionada artificialmente em muitos produtos, como refrigerantes e bebidas energéticas, sem falar nos medicamentos, nos quais a cafeína não possui qualquer valor nutricional, sendo utilizada por seus efeitos estimulantes e vasoconstrictores.

O consumo agudo ou crônico da cafeína parece não ter grandes consequências negativas na saúde, por isso, as agências regulatórias não impõem restrições ao seu uso. Isso torna o seu consumo tão amplo que cerca de 95% das mulheres grávidas ingerem cafeína de alguma forma (JAROSZ; WIERZEJSKA; SIUBA, 2012; WATKINSON; FRIED, 1985). Além disso, por ser considerada uma droga segura, seu uso continua por toda a vida, ocorrendo inclusive durante os períodos de amamentação e por toda a infância (FREDHOLM et al., 1999). Interessantemente, alguns autores tem destacado o fato de que a cafeína pode interagir com outras drogas, como o etanol, opióides e cocaína, influenciando nos seus efeitos (GRESSENS et al., 2001; STREISSGUTH et al., 1980).

Assim como a cafeína, apesar dos riscos à saúde, o tabaco também lidera o *ranking* das drogas mais consumidas no mundo (TANDA; GOLDBERG, 2000). A principal forma de uso do tabaco é através do ato de fumar, processo que promove a liberação da nicotina, que é o mais importante ingrediente psicoativo presente no tabaco (HUANG; ABBOTT; WINZER-SERHAN, 2007). Considera-se que é a nicotina que estabelece e mantém a dependência (DI CHIARA, 2000; STOLERMAN; SHOAIB, 1991).

A grande maioria dos fumantes inicia o hábito durante a adolescência (ARRAZOLA et al., 2010). Esse contato precoce com a droga está diretamente relacionado com a dependência. Esses indivíduos apresentam maior consumo de cigarros e maior dificuldade de parar de fumar quando comparados àqueles que iniciam o hábito mais tardiamente (CHEN; MILLAR, 1998; KLEIN et al., 2004; NELSON et al., 1995; PIERCE; GILPIN, 1996).

Como descrito acima, a cafeína e a nicotina estão entre as drogas lícitas psicoativas mais utilizadas no mundo (TANDA; GOLDBERG, 2000). Adicionalmente, há evidências epidemiológicas que apontam para uma forte associação do uso destas substâncias (KENDLER; MYERS; PRESCOTT, 2007; MARTIN et al., 2008). Contudo, poucos estudos

exploraram a coexposição, principalmente se considerarmos que os trabalhos envolvendo este tema não conduziram suas avaliações durante a adolescência dos animais - que é um período de maior sensibilidade aos efeitos da nicotina -, e não mimetizaram o perfil de exposição à cafeína - uma exposição que se estende ao longo de toda a vida, inclusive durante o período gestacional e infância.

Assim, este estudo tem como objetivo investigar se a interação entre as drogas resulta em alterações no comportamento animal e em níveis de monoaminas no cérebro através do uso de modelos animais de exposição à cafeína durante toda a vida do camundongo e de exposição à nicotina durante a adolescência.

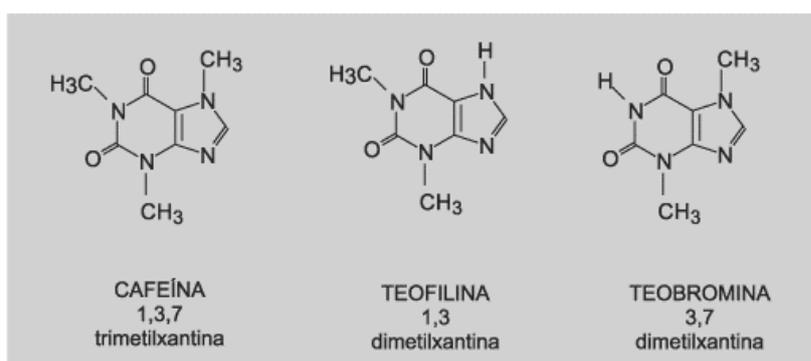
1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Cafeína

1.1.1 Aspectos farmacológicos da cafeína

A cafeína pertence à família química dos alcalóides e dentre os vários alcalóides existentes na natureza, encontram-se as metil-xantinas. Três metil-xantinas são particularmente importantes e uma delas é a cafeína, chamada também de 1,3,7-trimetilxantina, as outras duas são a teofilina e a teobromina (Figura 1). A cafeína é a mais prevalente na dieta, o que nos remete inevitavelmente ao café, no entanto, esta substância está contida naturalmente em muitos outros alimentos como o chá, o cacau e o guaraná, além disso, ela é adicionada artificialmente em muitos produtos como refrigerantes, principalmente os de cola, e bebidas energéticas, sem falar nos medicamentos, onde a cafeína não possui qualquer valor nutricional, sendo utilizada por seus efeitos estimulantes e vasoconstritores.

Figura 1 - Estrutura química da cafeína, teofilina e teobromina



Fonte: ALTIMARI et al., 2006.

No ser humano, no que diz respeito à farmacocinética, a absorção da cafeína a partir do trato gastrointestinal é rápida, chegando a 99% em seres humanos em cerca de 45 minutos após a ingestão (FREDHOLM et al., 1999). A cafeína possui grande solubilidade lipídica e uma baixa ligação às proteínas plasmáticas, o que permite rápida passagem pelas membranas celulares, incluindo a barreira hemato-encefálica e a placenta (FREDHOLM et al., 1999). Não

possui um efeito significativo de primeira passagem e é rapidamente distribuída no leite, tendo o leite humano 75% dos níveis plasmáticos. Seu tempo de meia-vida plasmática em adultos é entre 2 e 4 horas (BENOWITZ, 1998). Não há diferença no tempo de meia-vida em jovens e idosos, mas durante alguns períodos específicos, este tempo pode aumentar consideravelmente, como no terceiro trimestre de gestação, quando a meia-vida é de 10,5 horas, e durante o período neonatal, fase em que a meia-vida plasmática pode ultrapassar 100 horas (TANDA; GOLDBERG, 2000), sendo estas alterações decorrentes de uma menor atividade das enzimas do citocromo P-450 e à imaturidade nas vias de desmetilação e acetilação (FREDHOLM et al., 1999; NEHLIG; DEBRY, 1994). Além disso, pode estar diminuído em fumantes, uma vez que a nicotina é um indutor da CYP1A2, enzima que atua na metabolização da cafeína, adicionalmente, a nicotina aumenta a excreção da cafeína, explicando, talvez, porque os fumantes têm tendência a um maior consumo de cafeína (BRODY et al., 2016; SOARES; FONSECA, 2004). A metabolização da cafeína pode originar metabólitos ativos, são eles, a teofilina, teobromina e paraxantina, que também são metilxantinas, sendo a maior parte biotransformada em paraxantina (aproximadamente 80%) (SOARES; FONSECA, 2004). O *clearance* da cafeína é aproximadamente 1-3 mg/kg/min, após ingestão de baixas doses. No entanto, para maiores doses, há diminuição do *clearance*. A saturação do metabolismo da cafeína deve-se, em grande parte, ao metabolismo da paraxantina, pois esta acumula-se no plasma, levando a uma redução do *clearance* da cafeína (MANDEL, 2002), contribuindo para a ação farmacológica da cafeína, especialmente durante um consumo a longo prazo e em altas doses. Finalmente, os metabólitos ativos são biotransformados em metabólitos inativos, sendo os principais metabólitos excretados na urina o ácido 1-metilúrico, AFMU, 1-metilxantina, ácido 1,7-dimetilúrico e 1,7-dimetilxantina. Apenas uma pequena porcentagem é excretada na forma de cafeína inalterada.

No que tange a farmacocinética em roedores, existem algumas diferenças em relação aos humanos. Em humanos, a formação da paraxantina representa de 72-80% do metabolismo da cafeína, já nos roedores, há produção de quantidades similares de paraxantina e teofilina (ARNAUD, 1985; BERTHOU et al., 1992). O tempo de meia-vida da cafeína em roedores varia entre 40-70 minutos, contudo durante a gestação e período neonatal, o tempo de meia-vida está aumentado, tanto em humanos como em roedores (NEHLIG; DEBRY, 1994).

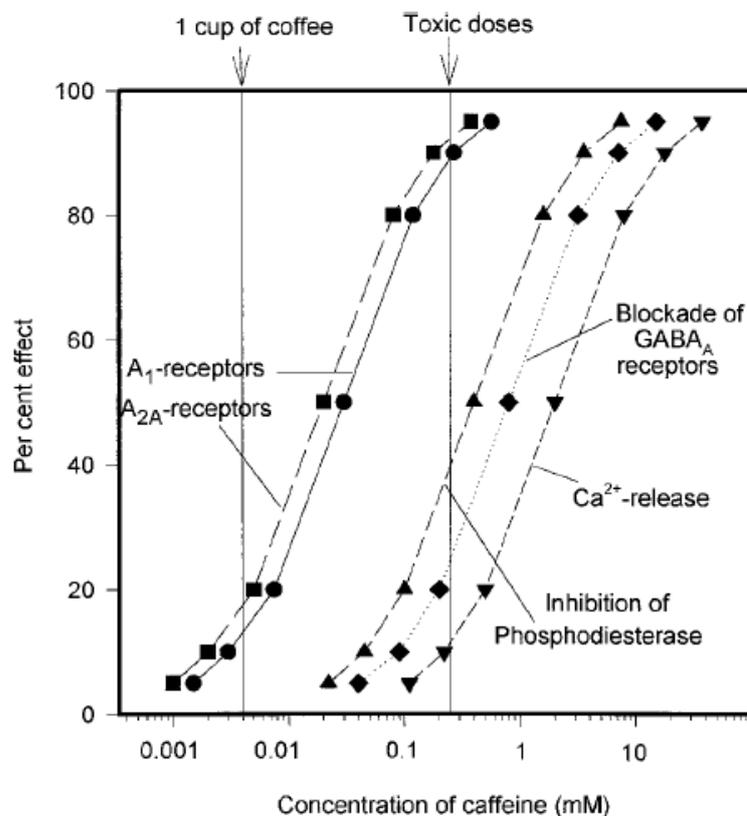
O principal mecanismo de ação da cafeína é o antagonismo dos receptores de adenosina. A adenosina é um neurotransmissor inibitório que atua diminuindo a taxa de disparo de potenciais de ação no sistema nervoso, além de produzir outros efeitos no organismo, como a dilatação dos vasos sanguíneos, redução da frequência cardíaca, da

pressão sanguínea e da temperatura corporal. Muitas das ações inibitórias da adenosina podem ser atribuídas a inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios dependentes de cálcio, sendo estes efeitos mediados por receptores acoplados a proteína G, porém a adenosina também pode desempenhar ações excitatórias (LOPES; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2011). Foram identificados 4 subtipos de receptores de adenosina: A₁, que são amplamente expressos no cérebro, possuindo maior densidade no hipocampo, córtex e cerebelo (RIBEIRO; SEBASTIAO; DE MENDONCA, 2002); A_{2a}, são mais prevalentes no estriado e tubérculo olfatório, porém também são expressos no córtex, amígdala, hipocampo, tálamo e cerebelo (ROSIN et al., 1998; SVENNINGSSON et al., 1997, 1998); A_{2b}, são encontrados em astrócitos e somente são ativados em altas concentrações de adenosina (HOSLI; HOSLI, 1988); A₃, que majoritariamente são encontrados periféricamente, particularmente em mastócitos e testículos (SCHUBERT et al., 1994). Em relação à cafeína, o antagonismo dos receptores A₁ e A₂ explica o efeito estimulante da cafeína, principalmente por sua ligação ao receptor A_{2a} (PHILLIS; EDSTROM, 1976), mas o bloqueio dos receptores A₁ tem também algum papel nos efeitos estimulatórios desta droga (MANDEL, 2002).

A cafeína, no entanto, possui efeito dose-dependente. Em doses maiores, esta droga também pode atuar inibindo as enzimas fosfodiesterases, que constituem uma família de enzimas que são responsáveis pela hidrólise intracelular do AMPc, assim, ao inibi-las, a cafeína produz, indiretamente, um aumento de AMPc intracelular. Em altas concentrações, a cafeína também pode interagir com receptores GABA_A, bloqueando-os através de ação no mesmo local de ligação dos benzodiazepínicos (DALY, 2007; SHI et al., 2003). Em concentrações maiores ainda, não alcançadas pelo consumo habitual de café, a cafeína torna-se tóxica, sendo capaz de sensibilizar os receptores de rianodina, que são canais de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático. Desta forma, pode desencadear pequenos tremores musculares involuntários, justamente por influenciar a liberação intracelular de íons cálcio. Após a ingestão de duas ou três xícaras de café forte, a concentração de cafeína no plasma e no cérebro é de cerca de 100µmol/l, para que haja a sensibilização dos receptores de rianodina é necessária uma concentração de aproximadamente 10mmol/l (Figura 2) (CORSETTI et al., 2007; HOLMGREN; NORDÉN-PETTERSSON; AHLNER, 2004).

Sabe-se também que a cafeína aumenta a taxa de renovação de monoaminas, como a serotonina, dopamina e noradrenalina (BICKFORD et al., 1985; FERNSTROM; BAZIL; FERNSTROM, 1984; HADFIELD; MILIO, 1989).

Figura 2 - Efeitos da cafeína sobre diferentes alvos bioquímicos em relação aos seus níveis em humanos



Nota: Observar que a cafeína é capaz de bloquear significativamente os efeitos da adenosina sobre os receptores A_{2A} (mais potente) e A₁ já em baixas concentrações, alcançadas após uma única xícara de café. Para inibir a degradação de nucleótidos cíclicos através da inibição da fosfodiesterase, são necessárias concentrações 20 vezes mais elevadas; para bloquear os receptores de GABA_A, concentrações 40 vezes mais elevadas; e para mobilizar depósitos de cálcio intracelulares, são necessárias concentrações 100 vezes mais elevadas. Estes últimos níveis não são improváveis de serem alcançados em seres humanos através do uso normal de bebidas que contêm cafeína.

Fonte: FREDHOLM et al., 1999.

As metilxantinas são bem conhecidas por sua ação estimulante do sistema nervoso central, nos seres humanos tais efeitos traduzem-se por uma redução da fadiga, insônia, melhora da concentração e capacidade de pensamento mais clara e também na capacidade do desempenho de atividades motoras. Estudos confirmam que a cafeína reduz o tempo de reação, melhora a capacidade mental, a performance em testes de associação, e produz um aumento na velocidade de realização de cálculos, embora a precisão não sofra grandes melhorias (SOARES; FONSECA, 2004). No entanto, estes benefícios só se fazem sentir até um limite de 200 mg de cafeína que, quando ultrapassado, aumentam os níveis de ansiedade e podem induzir ataques de pânico. Indivíduos com problemas de ansiedade e pânico são especialmente sensíveis aos efeitos da cafeína (SMITH, 2002).

Em relação a produção de tolerância aos efeitos da cafeína, sabe-se que esta se desenvolve para alguns efeitos apenas, tanto em humanos como em animais, porém não se

sabe ao certo o mecanismo por trás desse efeito (FREDHOLM et al., 1999). A sensibilidade individual e a frequência de consumo são fatores que podem influenciar neste processo. Doses maiores que 350 mg diários de cafeína consumidos durante um mês podem provocar o aparecimento de síndrome de abstinência, que se manifesta por dores de cabeça, irritabilidade, dificuldade na concentração, náuseas, ansiedade, cansaço, depressão e sonolência. Não é grave e desaparece em poucos dias (SOARES; FONSECA, 2004).

No que diz respeito ao café, os hábitos de consumo e a quantidade ingerida variam de acordo com a localidade. Somado a isso, tem o fato de que existem várias formas de preparação do café, o que faz com que a quantidade extraída de cafeína seja diferente, sem falar na composição genética do grão. Sendo assim, o conteúdo de cafeína em cada xícara de café pode variar consideravelmente, indo de 40 a 180 mg/150 mL de café. Todavia, a cafeína, como dito anteriormente, está presente numa grande variedade de produtos e a concentração de cafeína nestes também pode variar bastante, como exemplo, temos: chá, 24 a 50 mg/150ml, 15 a 29 mg/180ml de refrigerante e 1 a 36 mg/28g de chocolate (FREDHOLM et al., 1999).

Se considerarmos todas as fontes de cafeína, o consumo diário estimado no mundo é de 70 a 76 mg/pessoa/dia. Mas estes valores podem chegar a mais de 400 mg/pessoa/dia em países como a Finlândia, Holanda e Suécia. No Brasil estima-se uma média de consumo diário de cafeína seja de 40 mg/pessoa/dia (FREDHOLM et al., 1999).

A ingestão de cafeína pode ser considerada a forma mais frequente de auto-administração de drogas em humanos (GRIFFITHS; WOODSON, 1988). O consumo agudo ou crônico da cafeína parece não ter grandes consequências negativas na saúde, por isso, as agências regulatórias não impõem restrições ao seu uso. De fato, esta droga não é classificada como uma droga que causa dependência no DSM-IV (TANDA; GOLDBERG, 2000). O seu consumo é tão amplo que cerca de 95% das mulheres grávidas ingerem alguma cafeína (JAROSZ; WIERZEJSKA; SIUBA, 2012; WATKINSON; FRIED, 1985), sendo reportado em um estudo que 20% das gestantes e 14,3% de mulheres no pós-parto consomem cafeína em doses que excedem 300mg/dia em (SANTOS; MATIJASEVICHA; DOMINGUES, 2012). Além disso, por ser considerada uma droga segura, seu uso continua por toda a vida, ocorrendo inclusive durante a amamentação e toda a infância. Nos EUA, a média diária de ingestão de cafeína é de 3 mg/kg em indivíduos acima de 10 anos. Em crianças, a faixa de consumo é de 0,5 a 1,8 mg/kg, proveniente principalmente de refrigerantes (FREDHOLM et al., 1999). Além disso, pelo menos 77% das crianças ingerem cafeína na dieta, com tendência de aumento ao longo dos anos (TANDA; GOLDBERG, 2000).

1.1.2 Exposição à cafeína durante o desenvolvimento

A exposição a diferentes fatores ambientais como, por exemplo, a drogas terapêuticas e recreacionais, radiações ionizantes, solventes orgânicos, durante o período intrauterino pode interferir no desenvolvimento cerebral do feto. Para o feto, a mãe não é somente uma proteção contra o meio externo, mas também uma fonte para a exposição a fatores ambientais que, se forem capazes de atravessar a placenta, poderão influenciar no desenvolvimento cerebral do feto (GRESSENS et al., 2001; STREISSGUTH et al., 1980).

Aproximadamente 70% das mulheres consomem cafeína diariamente durante a gestação (FRARY et al., 2005). Em relação à exposição fetal, devemos levar em consideração que, durante o terceiro trimestre gestacional, o tempo de meia-vida da cafeína é maior, além de atravessar livremente as membranas celulares, inclusive a placenta. De fato, níveis elevados de cafeína foram relatados em crianças prematuras nascidas de mulheres que foram consumidoras pesadas de cafeína (KHANNA; SOMANI, 1984), e em recém-nascidos, a concentração de cafeína no plasma e no fluido cerebrospinal é similar (SOMANI; KHANNA; BADA, 1980; TURMEN; LOURIDAS; ARANDA, 1979). Durante os 7-9 primeiros meses de vida pós-natal existe deficiência de enzimas necessárias para realizar a desmetilação e acetilação da cafeína, assim, a meia-vida plasmática pode estar de 8 a 37 vezes maior quando comparado a adultos (TANDA; GOLDBERG, 2000).

Estudos mostram que a cafeína ingerida em doses de 35 a 336 mg pela lactante dá origem a concentrações plasmáticas de 2,4 a 4,7 µg/ml na lactante e origina concentrações no leite materno de 1,4 a 7,2 µg/ml. Estas concentrações no leite materno levam a estimativa de 1,3 a 3,1 mg de cafeína de ingestão diária pela criança (SOARES; FONSECA, 2004).

De modo geral, o consumo moderado de cafeína é considerado seguro para o feto e durante a amamentação (TANDA; GOLDBERG, 2000). Contudo, quando consumida em grandes quantidades durante a gestação, a cafeína tem sido associada com baixo peso ao nascer e aumento do risco de aborto espontâneo (FERNANDES et al., 1998). Além disso, a exposição gestacional a cafeína tem sido associada com déficits neurocomportamentais como alteração do desenvolvimento neuromuscular, maior irritabilidade em recém-nascidos (LOOMANS et al., 2012), defeitos no tubo neural, por exemplo, espinha bífida (SCHMIDT et al., 2009) e problemas sociais durante a infância (CHIU et al., 2009). Estudos mostram ainda que crianças que ingeriram cafeína são mais susceptíveis à síndromes metabólicas, como

obesidade e hipertensão (CAYETANOT; LARNICOL; PEYRONNET, 2009; JAMES; GREGG, 2004).

1.1.3 Efeitos da exposição precoce a cafeína em roedores

O uso de roedores tem se mostrado efetivo na caracterização de fenômenos fisiológicos, da patologia e dos fatores de risco associados com a exposição precoce a uma série de substâncias neurotóxicas, como por exemplo, a cafeína. Ratos e camundongos apresentam uma série de comportamentos bem estabelecidos na literatura e que são amplamente utilizados como ferramentas para estudar diversas condições neuropatológicas associadas com distúrbios do sistema nervoso (RUSSELL; SAGVOLDEN; JOHANSEN, 2005; SAGVOLDEN et al., 2005). Além disso, os roedores são fáceis de criar e manter em laboratório e são bem conhecidos do ponto de vista biológico.

Em relação à cafeína, estudos em roedores confirmam seu baixo potencial teratogênico em doses baixas. Contudo, quando administrada em doses mais altas (equivalente ao consumo superior a 7 copos de café por dia), a cafeína tem sido associada com redução do crescimento (NEHLIG; DEBRY, 1994) e da massa cerebral dos fetos (TANAKA; NAKAZAWA; ARIMA, 1987) e uma série de distúrbios neurocomportamentais em roedores.

A administração intraperitoneal de cafeína (50 mg/kg, 3 vezes ao dia) em filhotes de ratos de 7 dias de idade produz morte neuronal no córtex parietal, córtex temporal, núcleo estriado, células granulares do giro denteado, tálamo e hipotálamo (KANG et al., 2002). Outros estudos também mostram a influência da exposição à cafeína durante a gestação. Uma exposição de 0,04% na água de beber produz maior perda de massa cerebral do que de massa corporal (TANAKA; NAKAZAWA; ARIMA, 1984, 1987), o que reforça os efeitos desta droga sobre o sistema nervoso. Sabe-se também que, em comparação aos controles, os animais expostos à cafeína apresentam menores níveis de ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, colesterol e proteínas no cérebro (NAKAMOTO et al., 1986, 1988, 1991).

Como descrito acima, o efeito primário da cafeína é o bloqueio dos receptores de adenosina A₁ e A_{2A}, neste sentido, um estudo realizado por Guillet e Kellog (1991), mostrou que o tratamento neonatal com cafeína altera a sensibilidade de ligantes a estes receptores (A₁) em determinadas áreas cerebrais. Adicionalmente, estudos em roedores mostram que existem efeitos secundários em diversas classes de neurotransmissores, como a noradrenalina,

dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA, que influenciam diferentes funções fisiológicas (DALY; BRUNS; SNYDER, 1981).

Estas alterações neuroquímicas produzidas pela exposição à cafeína durante o desenvolvimento podem resultar em alterações no padrão de comportamento destes animais tardiamente. Em ratos, a exposição a doses moderadas de cafeína (10mg/Kg/dia) durante toda a gestação interferiu negativamente com o reconhecimento de objetos e o comportamento no labirinto radial em machos e fêmeas (SOELLNER; GRANDYS; NUNEZ, 2009). A exposição durante o período gestacional de cafeína na água de beber contendo 0,2 ou 0,3mg/mL (equivalente a 28 e 36mg/kg de dose) resulta em aumento da locomoção e de atividade vertical (*rearing*) em ratos adolescentes testados no campo aberto (HUGHES; BEVERIDGE, 1990). Contudo, outro estudo realizado pelo mesmo grupo em machos cujas mães foram expostas à cafeína durante a gestação e lactação a doses de 26 ou 45mg/kg, mostrou que houve diminuição da locomoção e aumento de defecação no teste do campo aberto (HUGHES; BEVERIDGE, 1991). Contudo, os efeitos produzidos pela administração crônica à cafeína são diferentes daqueles produzidos pela exposição aguda (GUILLET, 1990; GUILLET; KELLOG, 1991).

De particular interesse para este estudo, alguns autores tem chamado atenção para o fato de que, a cafeína pode interagir com outras drogas, como o etanol, opióides e cocaína, influenciando nos seus efeitos (GRESSENS et al., 2001; STREISSGUTH et al., 1980).

1.2 Nicotina

1.2.1 Aspectos farmacológicos da nicotina

Apesar dos riscos à saúde, o tabaco é uma das drogas mais consumidas no mundo. A principal forma de uso do tabaco é através do ato de fumar. Anualmente em todo o mundo, são fumados 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros por mais de 1 bilhão de fumantes, dos quais 80% desses vivem nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2004; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - BANCO MUNDIAL, 2000). No mundo, 12% de todas as mortes em adultos com 30 anos ou mais, foram associadas ao tabaco. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em inglês *World Health Organization* (WHO), nos próximos 30

anos o tabagismo será responsável por 10 milhões de mortes a cada ano e 70% delas ocorrerão em países em desenvolvimento (WHO, 2012; WHO et al., 1999).

O processo de fumar libera nicotina, que é o mais importante ingrediente psicoativo presente no tabaco (HUANG; ABBOTT; WINZER-SERHAN, 2007). Considera-se que é a nicotina que estabelece e mantém a dependência (DI CHIARA, 2000; STOLERMAN; SHOAI, 1991). A nicotina é rapidamente absorvida pelos pulmões devido a extensa superfície alveolar e a fácil dissolução da nicotina no fluido pulmonar (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005). A quantidade de nicotina absorvida pelo corpo pode ser influenciada por sua concentração na fumaça do cigarro, pela frequência e pela profundidade das tragadas. Quantidades variando entre 0,3 e 1,6 mg de nicotina (com média em torno de 1,0 mg) serão absorvidas pelo corpo por cigarro fumado (BENOWITZ; HUKKANEN; JACOB, 2009).

Uma vez no sangue, a nicotina se distribui rapidamente por todo o organismo. As regiões corporais que possuem maior afinidade pela nicotina são o fígado, os rins, o baço e principalmente o sistema nervoso (URAKAWA et al., 1994). A nicotina atinge o cérebro em 10 a 20 segundos após a absorção (BENOWITZ; ZEVIN; JACOB, 1998), propagando-se por todas as áreas, das regiões mais internas até o córtex (ROSEMBERG, 1999). Sua maior concentração no sangue, em uso regular, se dá após 5 a 10 minutos do início do consumo e sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 2 horas no homem (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005). Considerando-se os valores das meias-vidas subsequentes, a nicotina se mantém, em um fumante regular, em níveis sanguíneos detectáveis por pelo menos 6 a 8 horas depois de cessado o consumo (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005). Desta forma, ainda que esta concentração diminua substancialmente durante a noite, quem fuma até o momento de dormir mantém concentrações significativas de nicotina durante o sono, tornando a exposição à nicotina uma intoxicação permanente, com múltiplas doses, permanecendo por 24h da vida do tabagista. Nenhuma outra droga age desta forma.

A nicotina é metabolizada principalmente no fígado (80% a 90%) e em menor proporção nos pulmões e rins (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005). A cotinina é o metabólito da nicotina que se apresenta em maior quantidade (70% a 80%), ela pode ser medida no sangue, urina e saliva (NEL; MORGAN, 1996), tendo meia-vida de eliminação longa, cerca de 40 horas em humanos (HUKKANEN; JACOB; BENOWITZ, 2005) e de 5,2 horas em roedores (KYEREMATEN; VESELL, 1991). Estas propriedades da cotinina permitem que ela seja frequentemente utilizada para estimar a quantidade de nicotina a que o indivíduo se expôs (DAVIS et al., 1991).

As ações da nicotina no sistema nervoso central (SNC) são mediadas por receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) (DANI; BERTRAND, 2007), que são canais catiônicos pentaméricos amplamente expressos em sítios pré e pós-sinápticos no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (LEONARD et al., 2001). No desenvolvimento cerebral, nAChRs são detectados desde o início do desenvolvimento embrionário em humanos, surgindo já no primeiro trimestre, e em roedores, sendo encontrados em torno do 10º dia embrionário (ABREU-VILLAÇA; FILGUEIRAS; MANHÃES, 2011; TRIBOLLET et al., 2004). Em mamíferos, já foram clonadas 8 subunidades α ($\alpha 2$ a $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$) e 3 subunidades β ($\beta 2$ a $\beta 4$) (ELGOYHEN et al., 1994, 2001; LINDSTROM et al., 1996; MCGEHEE; ROLE, 1995; SARGENT, 1993; TASSONYI et al., 2002). Estes receptores são divididos em duas classes de estruturas: heteroméricos, compostos por 2 subunidades α e por 3 subunidades β por pentâmero, ou homoméricos, formados unicamente por subunidades α . No SNC, os subtipos predominantes são o $\alpha 4\beta 2$ (MARUBIO et al., 1999; PICCIOTTO et al., 1995) e o $\alpha 7$ (CHEN; PATRICK, 1997; ORR-URTREGER et al., 1997). A diversidade dos subtipos de nAChR, sua localização (pré ou pós-sináptica) e sua distribuição cerebral contribuem para a extensa variedade de mecanismos em que estes receptores participam no sistema nervoso. A ativação dos receptores pré-sinápticos, de modo geral, promove a liberação de outros neurotransmissores, enquanto que a ativação de receptores pós-sinápticos promove excitação neuronal (ARAMAKIS; METHERATE, 1998; DANI; RADCLIFFE; PIDOPLICHKO, 2000). Desta forma, os nAChRs participam em aspectos fundamentais da plasticidade sináptica envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos incluindo o desenvolvimento neuronal, aprendizado e memória, respostas de reforço induzidas por drogas de abuso (GOPALAKRISHNAM; MOLINARI; SULLIVAN, 1997; JANG et al., 2002; LEVIN; SIMON, 1998; SALAMONE; ZHOU, 2000) e ansiedade (FILE; CHEETA; KENNY, 2000; ROSS et al., 2000).

A nicotina afeta, através do sistema colinérgico, diversos sistemas de neurotransmissores como o dopaminérgico, setotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e o GABAérgico (SLOTKIN; SEIDLER, 2009; XIAO et al., 2009; ZHAO; CHEN; SHARP, 2007). Nesse sentido, estudos evidenciam que o sistema mesocorticolímbico dopaminérgico é o centro do mecanismo da resposta à nicotina (BENOWITZ et al., 1986; CLARK, 1987; GRADY et al., 2002; RAPIER; LUNT; WONNACOTT, 1988), onde ocorre uma grande liberação de dopamina, associada à sensação de prazer e recompensa, em resposta à ação da nicotina sobre nAChRs presentes nestes neurônios dopaminérgicos, constituindo um dos principais componentes do processo da dependência (BALFOUR et al., 1998; DANI; DE

BIASI, 2001; JANHUNEN; AHTEE, 2007). A atividade dos neurônios dopaminérgicos originários da área do tegumento ventral é também modulada por projeções glutamatérgicas e GABAérgicas, sendo que a nicotina atua aumentando a liberação de glutamato pela ativação de nAChRs localizados em terminais glutamatérgicos pre-sinápticos tanto na área do tegumento ventral quanto no núcleo acumbente (D'SOUZA; MARKOU, 2013). Além de atuarem sobre a neurotransmissão excitatória, drogas de abuso como a nicotina, também modulam sinapses inibitórias envolvidas na circuitaria de recompensa. A nicotina induz a liberação de GABA pela ativação de nAChRs localizados em terminais GABAérgicos pre-sinápticos, contudo, a exposição continuada tem o efeito inverso, reduzindo a transmissão GABAérgica (D'SOUZA; MARKOU, 2013). A inibição da transmissão GABAérgica no núcleo acumbente contribui para o aumento da transmissão dopaminérgica e tem importante papel no mecanismo de dependência, uma vez que a inibição da ação do neurotransmissor GABA está relacionada à ativação do comportamento de busca por recompensa e à manutenção do comportamento de adição (CHAMBERS; KRYSTAL; SELF, 2001). O sistema colinérgico possui também relevante participação na síndrome de abstinência da nicotina e no processamento da dependência a esta droga (ARAUJO et al., 1988; KENNY; MARKOU, 2001; STRUEWING et al., 1997; WONNACOTT, 1990).

Apesar de a nicotina ser a principal substância responsável pela dependência ao tabaco, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não foram completamente elucidados. Em particular, tem sido sugerido que tanto a dessensibilização quanto a suprarregulação de nAChRs têm papel nos mecanismos de dependência (BUISSON; BERTRAND, 2001, 2002; DANI; DE BIASI, 2001; QUICK; LESTER, 2002). A dessensibilização é uma característica geral de canais do tipo portão-dependentes de neurotransmissores, e pode ser definida como uma diminuição ou perda de resposta biológica destes canais em resposta a uma estimulação prolongada ou repetitiva. Para nAChRs, a dessensibilização pode ser descrita como um declínio na resposta à nicotina após uma exposição repetitiva à esta droga. O início da dessensibilização é tempo- e concentração-dependente (GARRIDO et al., 2001; KARLIN, 2002). A suprarregulação de nAChRs, que pode ser definida como o aumento do número e/ou afinidade de nAChRs, é observada em cérebros de fumantes e animais expostos à nicotina (ABREU-VILLAÇA et al., 2004; ABREU-VILLAÇA; SEIDLER; SLOTKIN, 2004; NUNES-FREITAS et al., 2011). De fato, foi demonstrado que exposições por curtos períodos de tempo (2 dias) e com doses que produzem níveis plasmáticos de nicotina correspondentes a fumar 2 cigarros, já causam suprarregulação de nAChRs em roedores (ABREU-VILLAÇA et al., 2003b). Acredita-se que

a suprarregulação constitui uma resposta celular à dessensibilização (FENSTER et al., 1999), tendo sido sugerido que as mudanças ocorridas são acompanhadas por um aumento de função dos receptores (BUISSON; BERTRAND, 2002; GOVIND; VEZINA; GREEN, 2010). Os subtipos de receptores nicotínicos mais abundantes no cérebro, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$, sofrem suprarregulação após exposição à nicotina (ABREU-VILLAÇA et al., 2003b; ABREU-VILLAÇA et al., 2004; BUISSON; BERTRAND, 2002). Acredita-se ainda que mecanismos de suprarregulação e dessensibilização estejam envolvidos na regulação de monoaminas do cérebro.

1.2.2 Tabaco e adolescência

Segundo dados recentes da OMS, a prevalência de uso do tabaco nos Estados Unidos é de 18,1%, considerando a população acima de 15 anos; no Brasil este valor é um pouco menor, 16,1%, mas ainda encontra-se bem acima da meta do Ministério da Saúde, que é de 9% e, em países como a Indonésia e Grécia, esse percentual se aproxima dos 40% (WHO, 2015). Além disso, a grande maioria dos fumantes inicia o hábito durante a adolescência (ARRAZOLA et al., 2010) e esse contato precoce com a droga está diretamente relacionado com a dependência: esses indivíduos apresentam maior consumo de cigarros e maior dificuldade de parar de fumar quando comparados aqueles que iniciam o hábito mais tardiamente (CHEN; MILLAR, 1998; KLEIN et al., 2004; NELSON et al., 1995; PIERCE; GILPIN, 1996).

Adicionalmente, adolescentes já expressam sintomas de dependência à nicotina após o consumo de apenas alguns cigarros (DI FRANZA et al., 2000). Após um ano do início do hábito de fumar, a maioria dos adolescentes fumantes relatam tentativas de parar. Entretanto, devido aos efeitos adversos da abstinência, 97% desses adolescentes fumantes ainda continuam a fumar e, dois anos mais tarde, a maioria destes fumantes se dizem dependentes (MCNEILL, 1991).

Em humanos, a adolescência é caracterizada por traços comportamentais como labilidade emocional, impulsividade e comportamento de risco que estão associadas com o aumento de vulnerabilidade para transtornos neuropsiquiátricos, incluindo doenças afetivas e dependência (ANDERSEN, 2003; ARNETT, 1999; SPEAR, 2000; TEICHER et al., 2003; VOLKOW; LI, 2005; WALLACE et al., 2003). Estudos com roedores têm mostrado que

adolescentes exibem diferenças quando comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao estresse (ADRIANI; LAVIOLA, 2004; SLAWECKI, 2005). Ratos adolescentes podem exibir níveis menores ou maiores de ansiedade em análises comportamentais quando comparados com adultos (CHEETA et al., 2001; DOREMUS et al., 2003; ELLIOTT et al., 2005; GENN et al., 2003; IMHOF et al., 1993; PRIMUS; KELLOG, 1989; SLAWECKI, 2005; WALKER; MARCH; HODGSON, 2004), apresentam também elevados níveis de busca pela novidade (ADRIANI; CHIAROTTI; LAVIOLA, 1998), impulsividade (ADRIANI; LAVIOLA, 2003) e comportamento de risco (MACRI'S et al., 2002), assim como redução de resposta ao estresse (ADRIANI; LAVIOLA, 2000). A impulsividade ou um desejo por novidades e experiências excitantes (*sensation seeking*) são comportamentos envolvidos na iniciação do uso de drogas, a intensa busca pela novidade, característica do período da adolescência, tem sido associada a um maior consumo de drogas de abuso (ABREU-VILLAÇA et al., 2006; SPEAR, 2000). Estudos em seres humanos têm encontrado forte correlação entre altas taxas de busca por sensações novas e uso de drogas, incluindo nicotina e etanol (ZUCKERMAN, 1994), além disso, a dependência à nicotina e ao álcool e tem sido associada a altos níveis de impulsividade (MITCHELL, 1999; POULOS; PARKER; LÊ, 1998). De fato, adolescentes são mais propensos a uma variedade de comportamentos de risco, incluindo o uso de drogas (MARTIN et al., 2002). Diversos estudos mostram que é nesse período que frequentemente ocorre a experimentação de drogas como tabaco e álcool (GRANT; HARFORD; GRIGSON, 1987; KANDEL; YAMAGUCHI, 1985; NELSON et al., 1995; WEBSTER; HUNTER; KEATS, 1994). Existem também evidências que o início do uso de drogas está relacionado aos efeitos farmacológicos agudos, como o alívio da ansiedade ou estresse e indução de um estado de euforia (LITTLE, 2000).

Estes comportamentos característicos de adolescentes podem ser explicados pela remodelação pela qual o cérebro do adolescente está passando (POWELL, 2006). Durante a adolescência, o desenvolvimento neural ocorre em regiões associadas com motivação, impulsividade e vício. Áreas como o córtex pré-frontal e outras regiões de projeções dopaminérgicas do prosenencéfalo, apresentam alterações proeminentes durante a adolescência. Dada a importância dessas regiões cerebrais na modulação de mecanismos de recompensa associados ao uso de drogas (KOOB, 1992), não é surpresa constatar que adolescentes respondam de formas diferentes a drogas de abuso quando comparados com adultos (SPEAR, 2002). Durante esta fase, também há perda de aproximadamente metade do número de conexões sinápticas em algumas regiões cerebrais (RAKIC; BOURGEOIS;

GOLDMAN-RAKIC, 1994), o que pode servir para refinar as conexões e aumentar a eficiência cerebral durante a adolescência (CHUGANI, 1996).

Uma região cerebral que é altamente modificada em várias espécies durante adolescência é o córtex pré-frontal, área fortemente relacionada com habilidades cognitivas (DIAMOND, 1991). Autores descrevem um aumento de projeções dopaminérgicas no córtex pré-frontal de adolescentes humanos e ratos (KALSBECK et al., 1988), decorrente da substancial reorganização que o sistema dopaminérgico sofre durante a adolescência. Alterações relacionadas à maturação durante a adolescência também são evidentes em outras regiões cerebrais, como hipocampo de roedores (DUMAS; FOSTER, 1998; WOLFER; LIPP, 1995) e seres humanos (BENES, 1989). Durante este período, esta área apresenta proliferação e maturação de terminais axonais e sinapses (STAMFORD, 1989; TEICHER; ANDERSEN HOSTETTER JR, 1995).

Estudos utilizando roedores adolescentes expostos à nicotina proporcionam suporte neuroquímico e comportamental para a hipótese da adolescência como período crítico (ABREU-VILLAÇA et al., 2003a, 2003b; ABREU-VILLAÇA et al., 2010; ABREU-VILLAÇA; SEIDLER; SLOTKIN, 2003; ADRIANI et al., 2002; LAVIOLA et al., 2003; MIAO et al., 1998; OLIVEIRA-DA-SILVA et al., 2009; RIBEIRO-CARVALHO et al., 2008).

1.2.2.1 Efeitos da exposição à nicotina durante a adolescência de roedores

Estudos mostram diferenças de respostas comportamentais entre roedores adultos e adolescentes (BRIELMAIER; MCDONALD; SMITH, 2007; DOREMUS et al., 2004; ELLIOTT et al., 2005; KOTA et al., 2007; WILMOUTH; SPEAR, 2006). Nesse sentido, os primeiros artigos abordando efeitos da nicotina no sistema nervoso durante a adolescência foram publicados somente em 1999 (TRAUTH et al., 1999) e desde então, vários estudos em animais experimentais vêm demonstrando que o consumo de nicotina durante a adolescência produz alterações neurocomportamentais persistentes (BRIELMAIER; MCDONALD; SMITH, 2007; NOLLEY; KELLEY, 2007; SLAWECKI et al., 2003; SLAWECKI; EHLERS, 2002; SLAWECKI; ROTH, 2004; TRAUTH et al., 2000).

Em consistência com esses achados, trabalhos do nosso grupo também vêm demonstrando que a exposição à nicotina no período da adolescência resulta em uma série de

alterações comportamentais e neuroquímicas. Por exemplo, Abreu-Villaça e colaboradores (2006) demonstraram a influência do comportamento de busca pela novidade, característico de adolescentes, sobre o consumo de nicotina. Nesse trabalho, camundongos adolescentes (PN30) previamente classificados com alta busca por novidade apresentaram um aumento no consumo de nicotina quando comparados àqueles classificados com baixa busca por novidade. Em desenho experimental semelhante, Manhães e colaboradores (2008) demonstraram que o nível de ansiedade durante a retirada da nicotina está associado com o consumo subsequente da droga. Abreu-Villaça e colaboradores (2007) encontraram efeitos negativos da exposição à nicotina durante a adolescência sobre a memória de curto e longo prazo.

No sistema colinérgico, alvo primário da nicotina, Ribeiro-Carvalho e colaboradores (2008) demonstraram que a exposição à nicotina no período da adolescência produziu suprarregulação dos receptores nicotínicos e um efeito sexo-dependente sobre a colina acetiltransferase (ChAT), enzima de síntese da acetilcolina, onde machos apresentaram um aumento na atividade, sugerindo um aumento da densidade da inervação colinérgica, enquanto fêmeas tiveram uma diminuição da atividade, sugerindo uma perda da inervação colinérgica. Esta suprarregulação persiste após alguns dias de retirada, contudo, após 1 mês os efeitos foram revertidos, o que demonstra uma adaptação do sistema nervoso (RIBEIRO-CARVALHO et al., 2009). Também foi descrito aumento na apoptose hipocampal e uma diminuição na densidade neuronal e glial quando comparados ao grupo controle ao fim da exposição à nicotina (OLIVEIRA-DA-SILVA et al., 2009). Mais recentemente, demonstramos que a nicotina combinada com os demais componentes da fumaça de cigarro em parte replica as alterações comportamentais e bioquímicas identificadas em animais expostos somente a nicotina, o que confirma o papel relevante da nicotina nos efeitos da fumaça de cigarros (ABREU-VILLAÇA et al., 2010, 2013, 2015, 2016).

1.3 Cafeína e nicotina

Como descrito nos tópicos acima, a cafeína e nicotina estão entre as drogas lícitas psicoativas mais utilizadas no mundo (TANDA; GOLDBERG, 2000). Interessantemente, muitas evidências epidemiológicas apontam para uma forte associação do uso destas substâncias (KENDLER; MYERS; PRESCOTT, 2007; MARTIN et al., 2008). Já é conhecido

que fumantes consomem mais café que indivíduos não-fumantes e tendem a fazer uso do tabaco preferencialmente enquanto bebem café (BROWN; BENOWITZ, 1989; ROSE; BEHM, 1991; SWANSON; LEE; HOPP, 1994). Além disso, um estudo realizado por Martin e colaboradores (2008), mostrou que, em adolescentes, o consumo igual ou superior de 4 bebidas cafeinadas por dia está associado ao consumo diário de nicotina e que esta coexposição ainda é pouco explorada. Estudos apontam ainda que o uso concomitante de nicotina e cafeína não ocorre ao acaso, mas que existem razões circunstanciais e fisiológicas para isto. Uma das razões que podem levar ao uso concomitante dessas drogas é que um mesmo comportamento pode desencadear o uso de ambas as drogas, como por exemplo, intervalos no trabalho ou estresse. Além disso, interações farmacológicas podem explicar o co-uso. O tempo de meia-vida da cafeína em fumantes é menor, tornando necessária uma maior dose de cafeína para que um determinado efeito seja alcançado (EMUNAN et al., 1982; PARSONS; NELMS, 1978). Adicionalmente, Brody et al. (2016) descrevem que fumantes que consomem acima de 4 xícaras por dia de café apresentaram maior disponibilidade de receptores $\alpha_4\beta_2$ quando comparados a fumantes que não possuem essa frequência de consumo. Em adição a isto, os efeitos obtidos a partir do co-uso são diferentes daqueles obtidos a partir do uso isolado. Um estudo mostrou que o uso de cigarros previne o aumento do estado de alerta provocado pelo uso prévio de cafeína (ROSE, 1987). Em modelos animais, estudos também mostram os efeitos do co-uso dessas drogas sobre diferentes comportamentos como atividade locomotora, auto-administração e reconhecimento de droga (TANDA; GOLDBERG, 2000). White (1988) mostrou que a administração de cafeína (3mg/kg) aumentou a resposta aos efeitos da nicotina em teste de recompensa por comida. Celik, Uzbay e Karakas (2006) realizaram um estudo onde camundongos eram submetidos a sensibilização à nicotina (0,5 ou 2mg/kg) e após esse período foram desafiados com cafeína (5mg/kg). Nesse estudo, o aumento de locomoção induzido pela nicotina foi maior no grupo que recebeu desafio com cafeína. Cohen, Welzl e Bättig (1991) reportaram que a co-administração de cafeína e nicotina provocou aumento da atividade locomotora em ratos. Doses baixas ou moderadas de nicotina produzem diminuição da atividade locomotora; em camundongos tratados cronicamente com cafeína esse efeito é abolido (NIKODIJEVIĆ; JACOBSON; DALY, 1993). Além disso, Shoaib e colaboradores (1999) mostraram que a exposição crônica à cafeína facilitou a aquisição de comportamento de auto-administração de nicotina. De maneira semelhante, Gasior e colaboradores (2000) mostraram que a exposição crônica à cafeína na água de beber (0,25mg/mL) potencializou os efeitos estimulatórios da nicotina

sobre a atividade locomotora e que a exposição a altas concentrações de cafeína (1mg/mL) não alterou os efeitos da nicotina.

Estes estudos demonstram que, a cafeína pode interagir com a nicotina, influenciando nos seus efeitos. Vale destacar que os trabalhos citados acima não conduziram suas avaliações durante a adolescência dos animais, que é um período de maior sensibilidade aos efeitos da nicotina. Somado a isso, poucos estudos mimetizam o perfil de exposição à cafeína da maneira como ele ocorre em humanos, isto é, uma exposição que se estende ao longo de toda a vida, inclusive durante o período gestacional e infância.

Assim, tendo em vista que: 1º) a cafeína possui consumo tão amplo que 95% das mulheres grávidas ingerem alguma cafeína e que este consumo se dá ao longo de toda a vida, principalmente se levarmos em consideração que a cafeína está presente em diversos produtos da dieta; 2º) que alguns autores tem chamado atenção para o fato de que, apesar de apresentar baixa teratogenicidade, a cafeína pode influenciar os efeitos de outras drogas; 3º) muitas evidências epidemiológicas apontam para uma forte associação do uso destas substâncias; 4º) o tabaco é uma das drogas mais consumidas no mundo; 5º) que mais de 90% dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência e que 6º) em comparação aos adultos, os adolescentes apresentam maior dificuldade de abandonar o vício e apresentam sintomas de dependência mais rápido, neste estudo, utilizamos modelos animais de exposição a cafeína durante toda a vida do camundongo e de exposição a nicotina durante a adolescência visando investigar se a interação entre as drogas resulta em alterações no comportamento animal e em níveis de monoaminas no cérebro.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Neste trabalho, realizamos testes neuro-comportamentais para avaliar os efeitos da exposição à cafeína, ao longo de toda a vida do animal na susceptibilidade à nicotina durante a adolescência, assim como os efeitos da coexposição à cafeína e à nicotina durante a adolescência de camundongos.

2.2 Específicos

Assim, este trabalho é constituído de 2 subprojetos. O subprojeto 1 visa avaliar o efeito da exposição crônica à cafeína, durante toda a vida do animal, na susceptibilidade à nicotina durante a adolescência, com os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar os efeitos da exposição à cafeína;
- b) avaliar se a exposição à cafeína interfere na preferência condicionada por lugar e na resposta locomotora induzida pela nicotina;
- c) avaliar os efeitos da exposição à cafeína e/ou nicotina sobre os níveis de monoaminas no córtex.

Já o subprojeto 2 objetiva avaliar os efeitos da coexposição e da retirada da nicotina sobre o comportamento associado à ansiedade, atividade locomotora, aprendizado/memória e comportamento associado à depressão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um trabalho de natureza experimental, sendo integralmente desenvolvido no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Os experimentos descritos aqui foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do IBRAG / UERJ (protocolo nº CEA/038/2014) e estão de acordo com a declaração de Helsinki e com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde (National Institutes of Health - NIH) dos Estados Unidos da América.

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos suíços de ambos os sexos produzidos e mantidos em um biotério próprio do departamento com ciclo diário de 12 horas claro/escuro (escuro a partir das 13 horas), temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, com livre acesso à água e comida.

3.1 Geração dos grupos experimentais

No primeiro dia de cruzamento (C1), os animais (3 fêmeas:1 macho) foram divididos em 3 grupos:

- a) Grupo Cafeína 0,3 (CAF0,3) – composto por 16 ninhadas cujas progenitoras tiveram livre acesso a ração e a uma solução de cafeína de 0,3g/L como única fonte de líquido.
- b) Grupo Cafeína 0,1 (CAF0,1) – composto por 9 ninhadas cujas progenitoras tiveram livre acesso a ração e a uma solução de cafeína de 0,1g/L como única fonte de líquido.
- c) Grupo Controle (CONT) – composto por 15 ninhadas cujas progenitoras tiveram livre acesso a ração e a água potável como fonte de líquido.

Para evitar a influência do tamanho da ninhada, somente foram utilizadas ninhadas cujas mães geraram de 8 a 12 filhotes. O desmame da prole foi realizado em PN21.

3.2 Exposição

O período de exposição se estendeu desde C1 até o último dia de teste comportamental, que, no subprojeto 1, ocorria em PN30 ou PN39 e, no subprojeto 2, em PN45 ou PN50.

Para preparar a solução de cafeína, a droga (cafeína anidra 1,3,7 trimetilxantina, Proquimios, BR) foi diluída em água potável. As concentrações foram escolhidas de acordo com dados prévios da literatura (BJORKLUND et al., 2008; EL YACOUBI et al., 2000, 2005). O grupo controle recebeu água potável durante todo o período de exposição.

Para uma estimativa da quantidade de cafeína ingerida, a massa corporal dos animais e o volume de líquido nas garrafas foram medidos a cada três dias, quando se dava a renovação do conteúdo das garrafas, durante todo o período de exposição. O consumo de ração também foi medido nestes dias.

3.2.1 Medida da massa corporal total

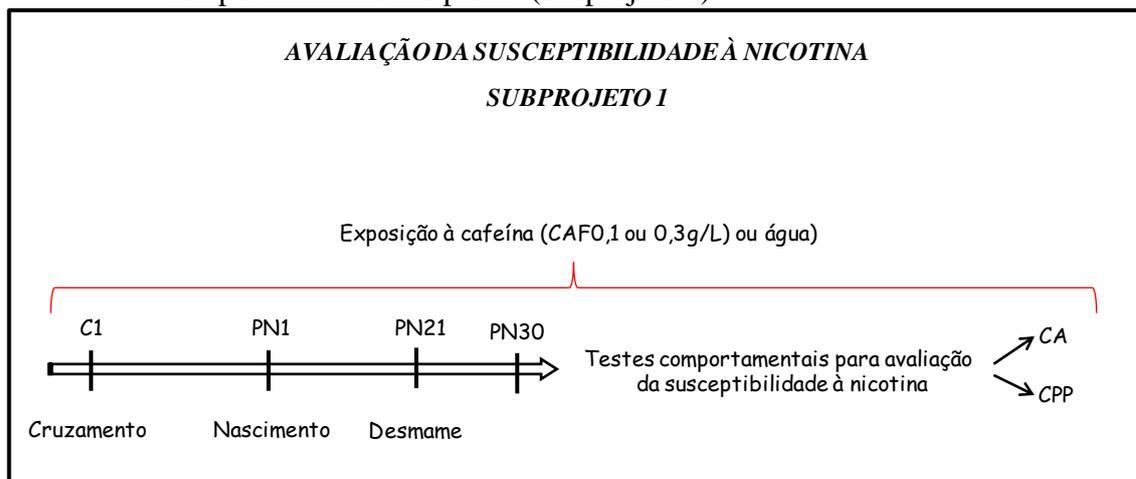
As mães CAF0,3, CAF0,1 E CONT e suas respectivas proles foram pesadas a cada três dias durante toda a exposição à cafeína. Após o desmame, o procedimento foi mantido somente para as proles.

3.2.2 Ingestão alimentar e de líquido

As ingestões alimentar e de líquido das mães foram controladas a cada três dias até o desmame da prole. A quantidade de ração ingerida foi calculada através da diferença entre a quantidade total ofertada e o que restou na gaiola na medição posterior, assim como o volume de líquido consumido, que considerou a diferença entre o volume ofertado e o volume restante na garrafa na aferição posterior.

Para os filhotes, após o desmame, a ingestão alimentar e de líquido também foi avaliada a cada três dias. Quando desmamados, os animais foram separados por sexo, assim, a

Figura 4 - Linha temporal do início da exposição à cafeína até o início dos testes comportamentais nas proles (subprojeto 1)



Legenda: C, dia de cruzamento; PN, dia pós-natal; CA, teste do Campo Aberto; CAF, animais que foram expostos à cafeína; CPP, teste da Preferência Condicionada ao Local.

Fonte: A autora, 2016.

3.3.1 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto (CA) é amplamente empregado para avaliar atividade locomotora e exploratória dos animais e, secundariamente, é capaz também de identificar comportamento associado à ansiedade. Este teste consiste em colocar o animal em uma caixa quadrada, a qual ele pode explorar livremente por 5 minutos.

Em PN30, imediatamente antes da realização do teste, as proles CAF0,3, CAF0,1 E CONT receberam uma injeção de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, USA) ou salina. As injeções foram administradas via intraperitoneal (i.p.). A dose de nicotina, 0,5 mg/Kg, foi escolhida por ser descrita na literatura como uma dose que produz aumento na locomoção dos animais no teste da campo aberto (Briellmaier et al., 2006). Sabendo que a dose utilizada produz um efeito determinado, o objetivo deste teste foi verificar se a exposição crônica à cafeína alteraria a resposta esperada e, desta forma, avaliar a susceptibilidade aos efeitos da nicotina.

Assim, foram gerados 6 grupos experimentais:

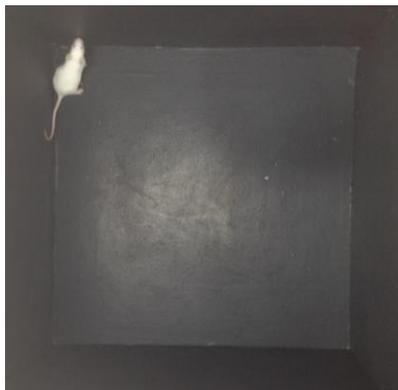
- a) CONT-SAL - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de salina (i.p.);

- b) CONT-NIC - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina (0,5mg/kg, i.p.);
- c) CAF0,1-SAL - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,1g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de salina (i.p.);
- d) CAF0,1-NIC - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,1g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina (0,5mg/Kg, i.p.);
- e) CAF0,3-SAL - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de salina (i.p.);
- f) CAF0,3-NIC - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina (0,5mg/Kg, i.p.).

A caixa do campo aberto tem como dimensões 45,5 cm de comprimento, 34 cm de altura e 45,5 cm de profundidade e possui as paredes e assoalho pintados de preto (Figura 5). Os animais foram testados durante o período claro (entre 11 e 13 horas). Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa e a avaliação do comportamento foi feita a partir do material gravado. Para a realização das contagens, a arena foi dividida em 16 quadrados iguais com o auxílio de um celofane sobreposto a imagem da arena e cada quadrado ultrapassado pelas quatro patas do animal foi utilizado como medida de atividade locomotora. O tempo de permanência em cada quadrado também foi contabilizado pelo programa usado para a contagem. Avaliamos o escore de ambulação total (entradas no C+Pe) como indicador de atividade, e o percentual de ambulação no centro (entradas no C/entradas no C+Pe) e tempo no centro como indicadores de comportamento associado à ansiedade.

Após a realização do teste, os animais foram sacrificados e os cérebros dissecados e armazenados a -80° C para análise neuroquímica posterior (vide item 3.4).

Figura 5 - Fotografia em vista superior do campo aberto



Fonte: A autora, 2016.

3.3.2 Teste da Preferência Condicionada ao Local (CPP)

O CPP envolve o aprendizado pavloviano e consiste em um modelo extensamente aceito e utilizado para estudar propriedades de recompensa de drogas de abuso em roedores (BARDO; BEVINS, 2000; LE FOLL; GOLDBERG, 2005a, 2005b, 2006; TZSCHENTKE; SCHMIDT, 1998).

Neste teste, os animais são condicionados a associar os efeitos da droga ao ambiente em que ela é administrada. O condicionamento é aceito quando o animal despende mais tempo no ambiente onde ele recebeu a droga, o que reflete a associação das propriedades de recompensa da droga com o ambiente. O equipamento usado para a realização do CPP consiste em uma caixa com três compartimentos: um deles é neutro, usado como *start box*; um dos outros compartimentos possui a parede com listras horizontais e piso de aço inox quadriculado, enquanto o outro possui parede com listras verticais e chão em listras de aço inox vazadas (Figura 6).

Figura 6 - Equipamento usado para a realização do CPP



Fonte: A autora, 2016.

O CPP é realizado em 4 etapas.

1ª ETAPA – HABITUAÇÃO

Esta etapa consiste na habituação do animal ao estresse provocado pelas injeções posteriores (i.p.). Assim, nos dois primeiros dias, todos os animais foram submetidos a uma injeção de salina por dia no volume de 0,01mL/g.

2ª ETAPA – PRÉ-TESTE

No terceiro dia, os animais receberam injeção de salina e foram colocados no equipamento para que o explorassem livremente durante 15 minutos. O tempo que o animal permaneceu em cada compartimento foi contabilizado e a maior permanência em um dos compartimentos foi assumida como a preferência do animal. Foi utilizado como critério de exclusão a permanência igual ou superior a 85% tempo total do teste em um mesmo compartimento.

3ª ETAPA – CONDICIONAMENTO

Nesta terceira etapa, os animais foram condicionados durante 8 dias. Primeiramente, os animais foram divididos em Salina ou Nicotina. Foram realizadas duas sessões diárias de condicionamento: uma pela manhã e outra cinco horas após a primeira sessão. Para os animais Nicotina, a droga era administrada somente em uma das sessões diárias, sendo pareada com o lado não-preferido do animal, ou seja, no lado oposto ao que o animal permaneceu por mais tempo durante o pré-teste (modelo *biased*). Dessa forma, em uma das sessões diárias, o animal recebeu a injeção de nicotina e permaneceu confinado no lado não preferido durante 15 minutos, e na outra sessão diária, o animal recebeu solução salina no lado preferido. Os

animais Salina receberam injeção intraperitoneal de salina alternando os ambientes a cada sessão diária em todos os dias de condicionamento.

Com o objetivo de que os animais associassem o ambiente onde eram colocados com os efeitos da nicotina sem interferência de outros fatores como, por exemplo, do ciclo circadiano, a ordem das sessões era alternada. Desta forma, no primeiro dia de condicionamento durante a primeira sessão, os animais Nicotina recebiam a droga e eram colocados no lado não preferido durante 15 minutos e para os animais Salina, o mesmo procedimento foi realizado, porém sem a administração de nicotina. Ainda no primeiro dia, na segunda sessão os animais Nicotina recebiam injeção de salina e eram colocados no lado preferido por 15 minutos, sendo o mesmo procedimento realizado para o grupo Salina. Porém, no segundo dia de condicionamento, na primeira sessão, ambos os grupos recebiam injeção de salina e eram colocados no lado preferido e somente na segunda sessão os animais Nicotina recebiam injeções com a droga sendo, por isso, colocados no lado não preferido. No terceiro dia, a ordem das sessões se invertia de novo, ficando igual ao primeiro dia, e assim sucessivamente até o oitavo dia. Dessa forma, a nicotina podia ser administrada tanto na 1ª como na 2ª sessão, e por isso, para garantir que ao iniciar a segunda sessão, a nicotina administrada anteriormente já tivesse sido metabolizada, o intervalo entre as sessões foi de cinco horas.

Formaram-se os seguintes grupos experimentais:

- a) CONT-SAL - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e que receberam salina (i.p.) em ambos os lados do CPP;
- b) CONT-NIC - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e receberam injeção de nicotina (0,5mg/Kg, i.p.) no lado não preferido do CPP;
- c) CAF0,1-SAL - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,1g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e que receberam salina (i.p.) em ambos os lados do CPP;
- d) CAF0,1-NIC - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,1g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e receberam injeção de nicotina (0,5mg/Kg, i.p.) no lado não preferido do CPP;

- e) CAF0,3-SAL - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e que receberam salina (i.p.) em ambos os lados do CPP;
- f) CAF0,3-NIC - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido após o desmame e receberam injeção de nicotina (0,5mg/Kg, i.p.) no lado não preferido do CPP.

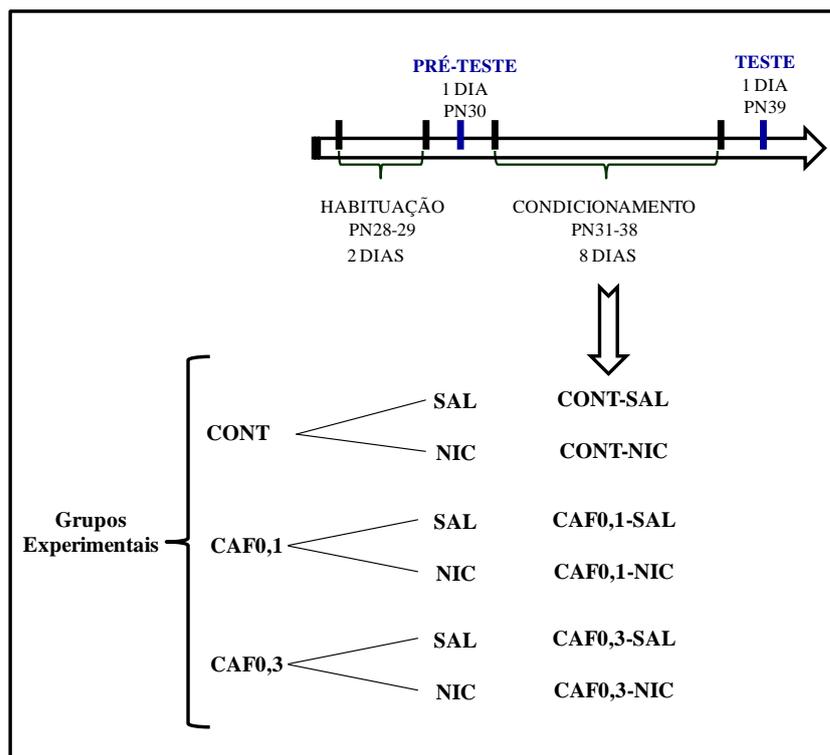
4ª ETAPA- TESTE

No dia do teste, a preferência do animal pelo lado pareado com a nicotina foi testada. Os animais não receberam nenhuma injeção e foram colocados no compartimento neutro, podendo explorar livremente durante 15 minutos.

O condicionamento é aceito se o animal despende mais tempo no lado não preferido no teste em comparação ao pré-teste. Neste trabalho a avaliação do condicionamento será apresentada através do tempo despendido no ambiente não-preferido no dia do pré-teste e no dia do teste.

O CPP se estendeu de PN28 até PN39 (Figura 7). Após o teste, os animais foram sacrificados e os cérebros dissecados e armazenados a 80° C para posterior análise neuroquímica (vide item 3.4).

Figura 7 - Linha temporal do Teste de Preferência Condicionada ao Local (CPP)



Legenda: CAF0,1, grupo cafeína 0,1g/L; CAF0,3, grupo cafeína 0,3g/L; CONT, controle, NIC, nicotina; PN, dia de vida pós-natal; SAL, salina. Animais CAF0,3, CAF0,1 e CONT receberam soluções de cafeína ou água potável ao longo de toda a vida. Animais NIC e SAL foram administrados com nicotina ou salina via intraperitoneal na adolescência.

Fonte: A autora, 2016.

3.4 Avaliação neuroquímica – Subprojeto 1

No subprojeto 1 avaliamos a susceptibilidade à nicotina através dos testes do CA e CPP. O sistema dopaminérgico foi avaliado no córtex cerebral através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High performance liquid chromatography*).

Após as avaliações comportamentais os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Os cérebros foram dissecados, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e permaneceram armazenados em freezer a -80°C até a realização da análise neuroquímica.

Os tecidos foram homogeneizados em uma solução de HClO_4 (0,1M) e ácido ascórbico (20 mM) para promover a desnaturação das proteínas e o rompimento da membrana celular, sendo este procedimento realizado a frio no equipamento Precellys 24-DUAL/Cryolys

(14° C) (Bertin Technologies, França). Após a homogeneização, os tecidos foram centrifugados em uma microcentrífuga de eppendorf (5.200 g por 30 min; 4°C), de forma a precipitar as proteínas. O sobrenadante é filtrado em filtro PVDF (0,22 mm), para preservação da coluna do HPLC. Após o preparo, os tecidos foram diluídos.

A metodologia foi otimizada para as nossas condições analíticas a partir dos artigos de Ohkura, Nai e Nohta (1994) e Yoshitake e colaboradores (2004, 2006). O equipamento utilizado foi um HPLC da marca Shimadzu Prominence LC-20AT com detector de fluorescência (RF- 20A), ajustado para λ de excitação em 345nm e λ de emissão em 480nm. A fase móvel utilizada foi um sistema de gradiente acetonitrila/tampão acetato (20 mM; pH 4,5) contendo EDTA (0,5mM), sendo o gradiente específico para dopamina, DOPAC e norepinefrina com fluxo de 0,1mL/min e tempos de corrida por amostra de 70 minutos. Foram construídas curvas de calibração para cada composto antes das análises, com massas desses analitos de 1, 2 e 4 pmol em cada vial. O coeficiente de variação do método é de até 10% para as catecolaminas e 5HIAA e de 8% para serotonina. A unidade utilizada para expressar essas espécies foi nmol/g de tecido.

3.5 Avaliação dos efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência - Subprojeto 2

Para a realização desta etapa do projeto, usamos o mesmo protocolo de exposição à cafeína, que se estendeu desde o período gestacional até o final dos testes comportamentais.

3.5.1 Implantação da minibomba osmótica

Para avaliar os efeitos da coexposição, foram utilizadas minibombas osmóticas (modelo 2002, Alzet Durect Corporation, Cupertino, EUA) contendo nicotina. Escolhemos essa forma de administração, pois as minibombas osmóticas garantem um fluxo constante de infusão da droga, mantendo-se assim níveis plasmáticos regulares. As minibombas foram preparadas no dia anterior a implantação, por recomendação do fabricante, para que pudessem ficar durante a noite em uma solução salina a 37° C, isto para garantir que a liberação da

nicotina acontecesse de forma homogênea e constante logo após a implantação. Assim, as minibombas dos animais NICOTINA (NIC) foram preenchidas com nicotina *free base* (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluída em solução salina (NaCl 0.9%) de forma a injetar uma dose inicial de 12mg/Kg/dia de nicotina (ABREU-VILLAÇA et al., 2003b, 2004; ABREU-VILLAÇA; SEIDLER; SLOTKIN, 2004), já as minibombas dos animais SALINA (SAL) foram preenchidas apenas com solução salina. O pH foi ajustado para 7,2 através de adição de HCl 6M, para a solução contendo nicotina, ou de NaOH 1N, para a salina. Um dia antes da cirurgia, os animais receberam injeções de antibiótico (Baytril, 2,5mg/kg, administrado via intraperitoneal) e analgésico (Banamine, 2,5mg/kg, administrado via intraperitoneal). Em PN30 os animais foram anestesiados com xilasina (Anasedan, 20mg/kg, i.p) e ketamina (Dopalen, 100mg/kg, i.p). Uma área no dorso do animal foi tricotomizada e posteriormente higienizada com álcool etílico (70%) e uma incisão longitudinal à medula espinhal do animal foi realizada com um bisturi. Com uma tesoura romba o tecido subcutâneo foi divulsionado de forma a permitir a inserção da minibomba osmótica. A incisão foi então suturada, utilizando fio de sutura (catgut simples 3.0) e os animais foram devolvidos para as suas caixas para se recuperarem da anestesia (Figura 8). No dia seguinte a implantação, os animais receberam novamente as injeções de antibiótico e analgésico. O período de liberação do conteúdo das minibombas até seu completo esvaziamento, em ambos os casos, é de 23 dias (informação fornecida pelo fabricante).

Figura 8 - Animal logo após a cirurgia de implantação da minibomba osmótica, ainda sob efeito da anestesia



Fonte: A autora, 2016.

3.5.2 Geração dos grupos experimentais

No subprojeto 2, os animais eram divididos não só em NIC ou SAL, mas em VIGÊNCIA (VIG) ou ABSTINÊNCIA (ABST). Isto é, alguns animais foram submetidos aos testes comportamentais durante a vigência da liberação de nicotina pela minibomba, ou seja, sob efeito da coexposição, enquanto alguns foram submetidos aos testes comportamentais durante retirada de curto prazo de nicotina. Utilizando um modelo já conhecido em nosso laboratório (ABREU-VILLAÇA et al., 2004; ABREU-VILLAÇA; SEIDLER; SLOTKIN, 2004; NUNES-FREITAS et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011; YOUNES-RAPOZO et al., 2013), a minibomba foi implantada em PN30 e os testes comportamentais sob a vigência da nicotina foram realizados em PN44 e PN45 (Figura 9). Como o tempo para total esvaziamento da minibomba é de 23 dias, para manter o mesmo período de exposição dos animais VIG para os animais ABST, em PN45 os animais ABST foram submetidos a uma nova cirurgia para retirada da minibomba. Como já descrito, um dia antes da cirurgia, os animais receberam injeções de antibiótico (Baytril, 2,5mg/kg, administrado via intraperitoneal) e analgésico (Banamine, 2,5mg/kg, administrado via intraperitoneal). Em PN45, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico realizado para a implantação, porém sendo feita a retirada da minibomba. No dia seguinte à remoção da minibomba, os animais receberam novamente as injeções de antibiótico e analgésico. Os testes comportamentais sob a abstinência da nicotina foram realizados em PN49 e PN50 (Figura 9). Durante este período os animais continuaram a receber solução de CAF ou água.

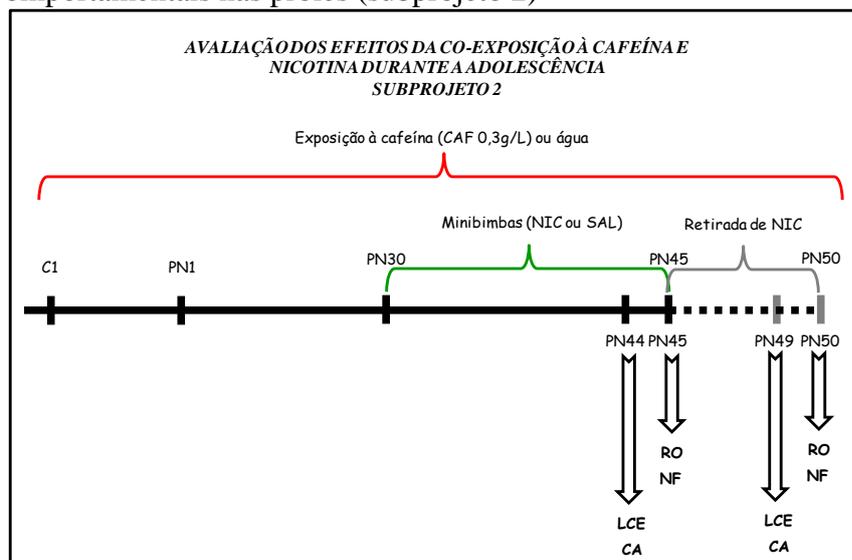
Considerando que no subprojeto 1 apenas o grupo CAF0,3 apresentou alteração comportamental quando comparado ao controle, nesta etapa mantivemos apenas esta dose de cafeína, formando assim os seguintes grupos experimentais:

- a) CONT-SAL VIG OU ABST - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido até o final da realização dos testes comportamentais, nos quais foram implantadas minibombas osmóticas contendo salina e que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período equivalente ao de vigência da coexposição OU que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período equivalente ao de retirada da nicotina;
- b) CONT-NIC VIG OU ABST - Animais cujas mães receberam água como fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido até o final

da realização dos testes comportamentais, nos quais foram implantadas minibombas osmóticas contendo nicotina (12mg/Kg/dia) e que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período de vigência da coexposição *OU* que foram submetidos aos testes comportamentais sob retirada da nicotina;

- c) CAF0,3-SAL VIG *OU* ABST - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido até o final da realização dos testes comportamentais, nos quais foram implantadas minibombas osmóticas contendo salina e que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período equivalente ao de vigência da coexposição *OU* que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período equivalente ao de retirada da nicotina;
- d) CAF0,3-NIC VIG *OU* ABST - Animais cujas mães receberam solução de cafeína a 0,3g/L como única fonte de líquido e que continuaram a receber esta fonte de líquido até o final da realização dos testes comportamentais, nos quais foram implantadas minibombas osmóticas contendo nicotina (12mg/Kg/dia) e que foram submetidos aos testes comportamentais durante o período de vigência da coexposição *OU* que foram submetidos aos testes comportamentais sob retirada da nicotina.

Figura 9 - Linha temporal do início da exposição à cafeína até o último dia de testes comportamentais nas proles (subprojeto 2)



Legenda: C, dia de cruzamento; CA, teste do Campo Aberto; LCE, teste do labirinto em cruz elevado; NIC, nicotina; NF, teste do Nado Forçado; PN, dia pós-natal; RO, teste do Reconhecimento de Objetos; SAL, salina.

Fonte: A autora, 2016.

3.5.3 Testes comportamentais

Ao atingirem a idade de PN44 ou PN49, os animais iniciaram uma bateria de testes comportamentais para avaliação dos efeitos da coexposição sobre diferentes comportamentos. Os testes foram realizados em uma sala com proteção acústica onde os animais eram ambientados por 10 minutos antes da realização dos mesmos. As análises comportamentais foram feitas a partir de vídeos gravados durante os testes.

No primeiro dia de teste, PN44 ou PN49, foram realizados os testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste do campo aberto (CA), o LCE era realizado às 9:00 horas da manhã e o CA, duas horas após o primeiro. No segundo dia de teste, PN45 ou PN50, foram realizados o teste do reconhecimento de objetos (RO), no período claro dos animais e o teste do nado forçado (NF), no período escuro dos animais. O RO possui duas sessões, sendo a segunda sessão realizada três horas após a primeira, sendo assim, a primeira sessão era realizada às 9:00 da manhã e a segunda sessão às 12:00 horas. O teste do NF iniciava as 13:30 horas.

3.5.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE (Figura 10) é considerado um dos melhores testes para análise de ansiedade em modelos experimentais, sendo frequentemente utilizado para a avaliação do efeito de drogas ansiolíticas (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; SALA-ROCA et al., 2002). As expressões comportamentais observadas no teste LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquivas, assim como de atividade geral (FILE, 2001).

O equipamento consiste em um aparelho de acrílico pintado de cinza constituído de 4 braços - 2 abertos (BA) e 2 fechados (BF) - dispostos em forma de cruz e elevado 50 cm do chão. As medidas do aparelho são: BA com 5 cm de largura e 29 cm de comprimento sem paredes e BF com 5 cm de largura, 29 cm de comprimento e paredes com 15 cm de altura. Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais foram transportadas para a sala de teste, local em que os animais foram ambientados por 10 minutos. Em seguida, os animais foram colocados individualmente no centro do equipamento, virados para um dos braços abertos, tendo 5 minutos para explorar o labirinto. Após o término de cada teste, o LCE era limpo com

um pano umedecido com álcool (70%) com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados.

Para avaliação do comportamento associado à ansiedade usamos o percentual de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos; como medida de atividade locomotora, utilizamos o número de entradas nos braços fechados e quantificamos ainda o número de *head dips*, como medida de atividade exploratória.

Figura 10 - Fotografia em vista superior do labirinto em cruz elevado



Nota: Os braços na horizontal são os chamados braços fechados (BF). Os braços na vertical são os chamados braços abertos (BA).

Fonte: A autora, 2016.

3.5.3.2 Campo aberto (CA)

Este teste já foi descrito acima, na seção 3.3.1. Brevemente, este teste é utilizado para avaliar atividade locomotora e exploratória dos animais. O teste foi realizado após o LCE, mantendo um intervalo de 2 horas. Este teste consiste em colocar o animal em uma caixa quadrada, a qual ele pode explorar livremente por 10 minutos (Figura 5). Avaliamos o escore de ambulação total (entradas no C+Pe), como indicador de atividade, e o percentual de ambulação no centro (entradas no C/ entradas no C+Pe) e tempo no centro da arena como indicadores de comportamento associado à ansiedade.

No dia seguinte, PN45 ou PN50, foram realizados os 2 últimos testes comportamentais: o reconhecimento de objetos e o nado forçado.

3.5.3.3 Reconhecimento de objeto (RO)

O teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Rosa e colaboradores (2003), contendo 3 etapas. O experimento foi realizado em uma arena (45,5 cm de comprimento, 34 cm de altura e 45,5 cm de profundidade) com as paredes e assoalho pintados de preto.

1ª ETAPA: AMBIENTAÇÃO

Os animais passaram por uma sessão de ambientação, onde puderam explorar livremente o ambiente por 10 minutos sem a presença de nenhum objeto. No dia anterior foi realizado o teste do campo aberto e este serviu como forma de ambientação para o teste do RO.

2ª ETAPA: PRIMEIRA SESSÃO - TREINO

Nesta sessão, realizada no dia seguinte a ambientação, foram colocados 2 objetos plásticos idênticos com forma de cone (A1 e A2), afastados 10 cm das paredes. Os animais podiam explorar o ambiente e os objetos livremente durante 5 minutos (Figura 11).

Figura 11 - Fotografia em vista superior do teste do RO. Primeira sessão: treinamento (objetos iguais)



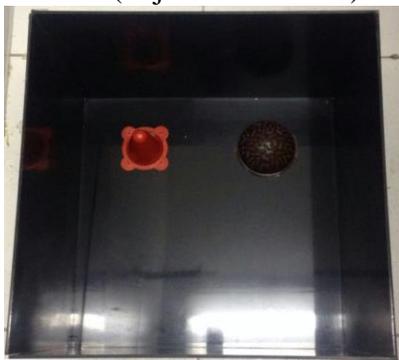
Fonte: A autora, 2016.

3ª ETAPA: SEGUNDA SESSÃO – AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO E MEMÓRIA

O teste para avaliação da memória de curto prazo foi realizado 3 horas após a primeira sessão (treino) por 5 minutos na presença de um objeto novo (B) e um familiar (A2). Todos os

objetos eram feitos de material plástico com tamanho aproximado e com um padrão de cor distinto: azul ou laranja (A1 e A2) e verde ou marrom (B) (Figura 12).

Figura 12 - Fotografia em vista superior do teste do RO. Segunda sessão: avaliação do aprendizado e memória (objetos diferentes)



Fonte: A autora, 2016.

Na primeira e segunda sessão foi quantificado o tempo em que os animais exploraram os objetos. A interação com o objeto foi considerada nos momentos em que o animal cheirava, ou tocava o objeto com o focinho ou as patas dianteiras.

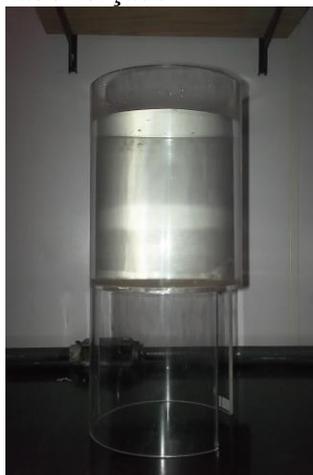
Na segunda sessão, o tempo de interação com os objetos foi quantificado, sendo o tempo total gasto pelos animais interagindo com o objeto novo (B) em relação ao objeto velho (A2) utilizado como medida de memória e aprendizado. Adicionalmente, na 1ª sessão, o tempo de interação com os objetos A1 e A2 foi quantificado e o percentual de tempo desta interação foi usado como medida de atividade exploratória.

3.5.3.4 Nado forçado (NF)

O teste do nado forçado (NF) é o teste mais utilizado para se estudar comportamento associado à depressão em roedores (BOGDANOVA et al., 2013). No presente trabalho usamos um teste modificado do original (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977), onde cada animal foi submetido a uma sessão de 6 minutos de nado forçado. O procedimento do teste é descrito em detalhes em Filgueiras e colaboradores (2006). Neste teste, cada camundongo foi colocado em um recipiente de plástico (diâmetro = 19cm, altura = 25cm) preenchido com água (altura da coluna d'água = 20 cm) a uma temperatura de aproximadamente 25°C (Figura 13).

O tempo de imobilidade foi utilizado como medida para avaliação do comportamento associado à depressão, sendo representado pelo tempo que os animais permaneciam flutuando com as patas e a cauda imóveis com a exceção de pequenos movimentos posturais necessários à manutenção da cabeça do animal fora da água.

Figura 13 - Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado



Fonte: A autora, 2016.

3.6 Quantificação da cotinina plasmática

Para avaliação do nível de exposição gerado pela dose de nicotina administrada através das minibombas osmóticas, foi quantificado o nível de cotinina (o principal metabólito da nicotina). Ao final do período de exposição, PN45, alguns animais não submetidos aos testes comportamentais foram decapitados e o sangue do tronco coletado (2 machos CAF-NIC, 2 machos e 1 fêmea CONT-NIC, 2 machos e 1 fêmea CONT-SAL e 1 macho CAF-SAL).

Os níveis de cotinina no soro foram determinados através do modo espectrofotométrico utilizando um kit de ensaio para cotinina da Orasure Technologies (Pennsylvania, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Em uma placa contendo 96 poços foram pipetados 10 μ l de soro que foram incubados por 30min com 100 μ l de conjugado enzimático (cotinina marcada com peroxidase de raiz forte diluída em uma matriz de proteínas com estabilizantes), em condições isentas de iluminação a temperatura de 15° a 27°C. A placa foi então lavada 5x com 300 μ l de água

destilada e incubada novamente 30min com 100µl de substrato reagente (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), em condições idênticas a primeira incubação. Após este período, a reação foi interrompida com reagente próprio (ácido sulfúrico, 2N) e a placa era então lida com filtro de 450nm, em até 30min. Todo o material utilizado nesse ensaio pertence ao kit adquirido.

3.7 Análises estatísticas

Os dados de massa corporal, ingestão, comportamentais e de neuroquímica foram compilados como médias e erros padrão da média. O valor de significância assumido foi de $p \leq 0,05$.

3.7.1 Análise da massa corporal e ingestão de ração e líquido

Para as mães e filhotes, a análise da massa corporal, ingestão de ração e ingestão de solução foi realizada através de Análises de Variância com medidas repetidas (ANOVA_r) para as variáveis: massa corporal e ingestão corrigida (ingestão/massa corporal). O DIA da medição foi considerado fator de repetição. EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA (CONT, CAF0,1 e CAF0,3) e SEXO foram considerados fatores. Diferenças entre grupos foram submetidas à análise post-hoc através do teste *Fisher's Protected Least Significant Difference* (FPLSD).

3.7.2 Análise dos testes comportamentais – Subprojeto 1

Foram realizadas ANOVAs com os fatores EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA (CONT, CAF0,1 e CAF0,3), EXPOSIÇÃO À NICOTINA (Nicotina e Salina) e SEXO. Para o teste do campo aberto, as variáveis avaliadas foram o escore de ambulação total (entradas no C+Pe) como indicador de atividade, e o percentual de ambulação no centro (entradas no C/ entradas no C+Pe) e tempo no centro como indicadores de ansiedade. Para o teste da preferência

condicionada por lugar, adicionalmente, DIA (Pré-teste e Teste) foi considerado o fator de repetição. O tempo de permanência na câmara definida como não-preferida no pré-teste e teste foi a variável utilizada.

3.7.3 Análise da avaliação neuroquímica

Foram realizadas ANOVAs com os fatores EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA (CONT, CAF0,1 e CAF0,3), EXPOSIÇÃO À NICOTINA (Nicotina e Salina) e SEXO. Para a avaliação neuroquímica, as variáveis avaliadas foram as concentrações de dopamina, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), o *turnover* (DOPAC/dopamina) e norepinefrina no córtex.

3.7.4 Análise dos testes comportamentais – Subprojeto 2

Foram realizadas ANOVAs com os fatores EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA (CONT, CAF0,1 e CAF0,3), EXPOSIÇÃO À NICOTINA (Nicotina e Salina) e SEXO. Para o teste do labirinto em cruz elevado, as variáveis avaliadas foram o percentual de entradas nos braços abertos (entradas no BA/ entradas no BA+BF), percentual de tempo nos braços abertos (tempo no BA/ tempo total), entradas nos braços fechados e número de *head dips*. No teste do campo aberto, o escore de ambulação total (entradas no C+Pe) foi utilizado como indicador de atividade, e o percentual de ambulação no centro (entradas no C/ entradas no C+Pe) e tempo no centro como indicadores de ansiedade. No teste de nado forçado, a variável utilizada para a análise do comportamento associado à depressão foi o tempo de imobilidade. Quanto ao teste do reconhecimento de objetos, para a comparação do tempo de exploração nos objetos em cada sessão, além dos fatores citados acima, OBJETO foi considerado o fator de repetição (A1 ou A2 para a 1ª sessão, B ou A2 para a 2ª sessão). Adicionalmente, foi calculado o percentual de exploração, dado pelo tempo de exploração nos dois objetos durante a 1ª sessão.

Para todos os testes comportamentais (subprojetos 1 e 2) e para a análise neuroquímica, quando efeitos significativos de - EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA, EXPOSIÇÃO À

NICOTINA ou interações entre estes fatores eram encontrados, eram realizadas comparações entre grupos pelas análises comparativas post-hoc FPLSD ou teste T pareado.

3.7.5 Análise da cotinina plasmática

Devido ao n incompleto, não foi realizada análise estatística dos níveis séricos de cotinina.

4 RESULTADOS

4.1 Medidas de massa corporal e ingestão

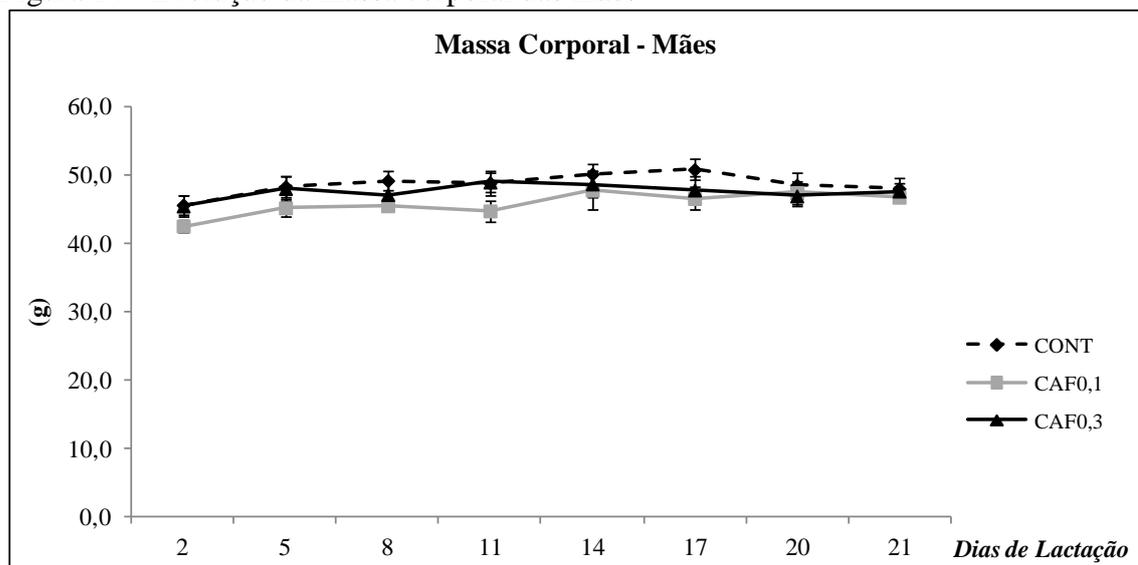
4.1.1 Massa corporal e ingestão das mães durante a lactação

4.1.1.1 Massa corporal

Ao longo do período da lactação, apesar de sutil, houve uma variação na massa corporal das mães (DIA: $F_{4,8; 167,2} = 5,2$; $p \leq 0,001$). No entanto, essa variação foi proporcional nas mães dos 3 grupos experimentais.

A massa corporal é considerada uma medida de avaliação da toxicidade de uma droga. Assim, estes resultados sugerem que as doses de cafeína que foram utilizadas no presente trabalho não produziram efeitos tóxicos (Figura 14).

Figura 14 - Evolução da massa corporal das mães



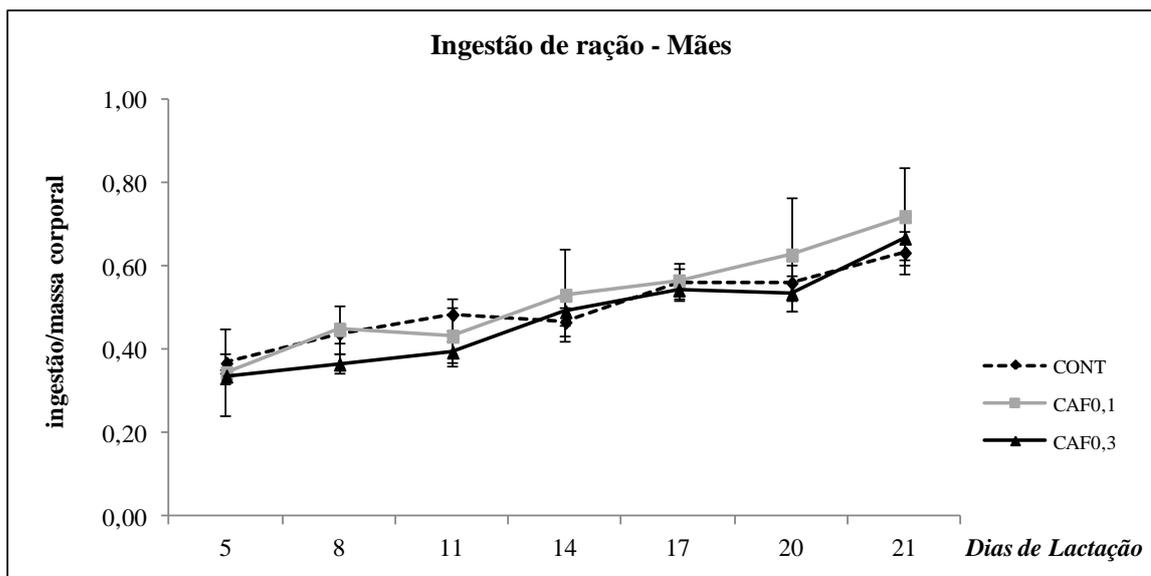
Legenda: Grupo CONT (n=15), animais que receberam água como fonte de líquido desde a gestação até o desmame da prole (PN21); CAF0,1 (n=8), animais foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL; CAF0,3 (n=15), animais expostos à cafeína na concentração 0,3g/mL. Valores representam média \pm EPM. g, gramas.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.1.2 Ingestão de ração

Durante o período da lactação, ocorreu um aumento no consumo de ração pelas progenitoras dos 3 grupos experimentais (DIA: $F_{3,8; 110,6} = 21,3$; $p \leq 0,001$) (Figura 15).

Figura 15 - Evolução do consumo de ração das mães, corrigido pela massa corporal



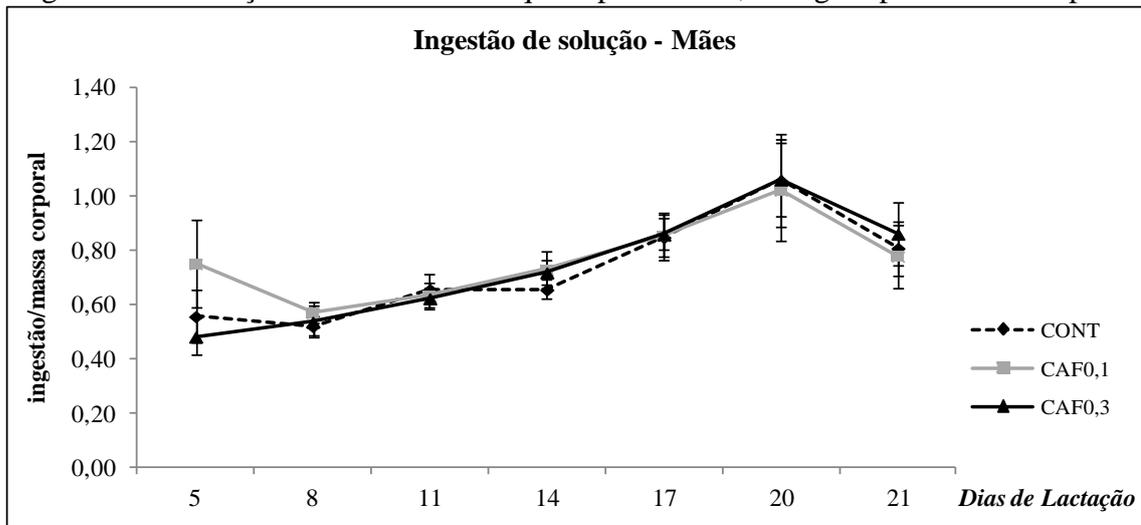
Legenda: Evolução do consumo de ração corrigido pela massa corporal, das mães que receberam água (CONT = 13) como fonte de líquido desde a gestação até o desmame da prole (PN21) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 = 5) ou 0,3g/mL (CAF0,3 = 14). Valores representam média ± EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.1.3 Ingestão de líquido

Houve um aumento na ingestão de líquido (DIA: $F_{3,4; 72,9} = 12,6$; $p \leq 0,001$), ao longo do período da lactação pelas mães nos 3 grupos experimentais (Figura 16).

Figura 16 - Evolução do consumo de líquido pelas mães, corrigido pela massa corporal



Legenda: Consumo de líquido, corrigido pela massa corporal, das mães que receberam água como fonte de líquido desde a gestação até o desmame da prole (PN21) (CONT = 12) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3 = 14). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

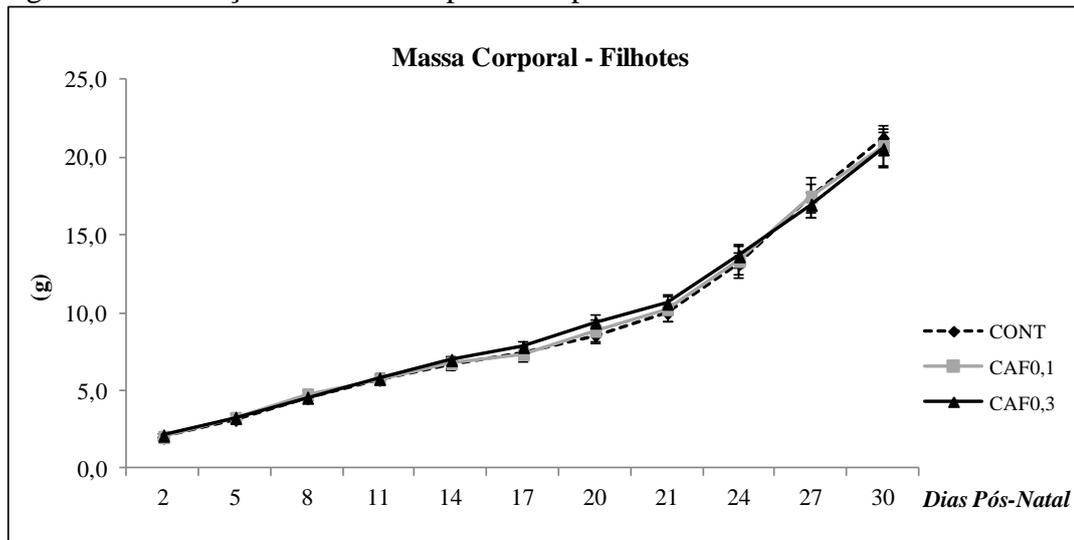
4.1.2 Massa corporal e ingestão das proles até PN30

Os dados de massa corporal e ingestão de ração e de líquido apresentados a seguir correspondem a todas as ninhadas geradas para a elaboração do presente trabalho. Isto porque a distribuição para os subprojetos 1 e 2 e, conseqüentemente, para os diferentes testes comportamentais, somente ocorreu na idade de PN30. Até atingirem tal idade, todos os animais foram submetidos a procedimentos idênticos.

4.1.2.1 Massa corporal

As proles dos 3 grupos experimentais apresentaram aumento de massa corporal (DIA: $F_{1,5; 44,6} = 673,3$; $p \leq 0,001$), não havendo porém, diferenças entre eles (Figura 17). Isso indica que a exposição à cafeína durante o desenvolvimento não produziu efeitos tóxicos capazes de alterar o ganho de massa corporal.

Figura 17 - Evolução da massa corporal das proles



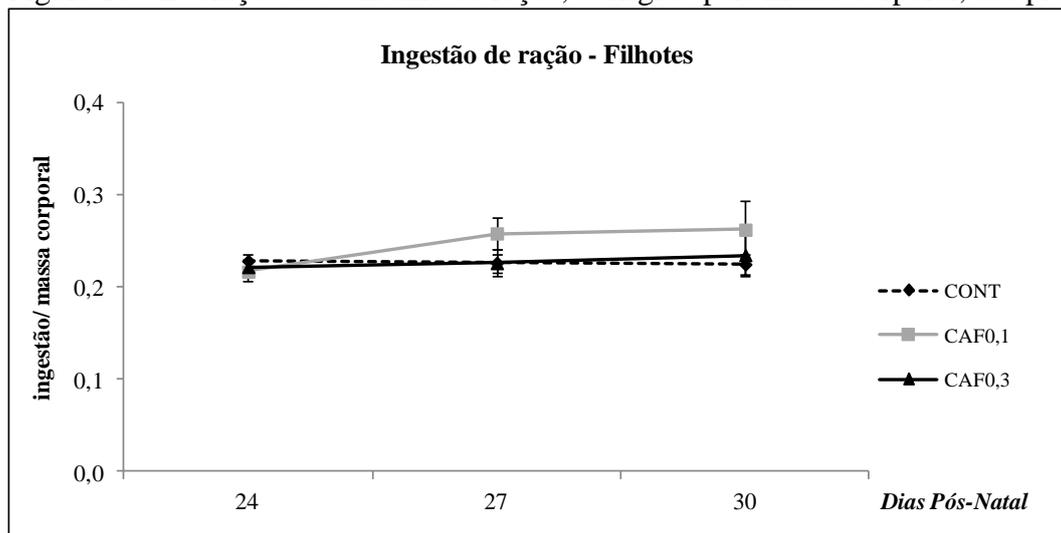
Legenda: Massa corporal das proles que não foram expostas à cafeína durante o desenvolvimento (CONT = 12) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3 = 13) até a idade de PN30. Valores representam média \pm EPM. g, gramas.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.2.2 Ingestão de ração

Não foram encontradas diferenças no consumo de ração pelas proles dos 3 grupos experimentais (Figura 18).

Figura 18 - Evolução do consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles



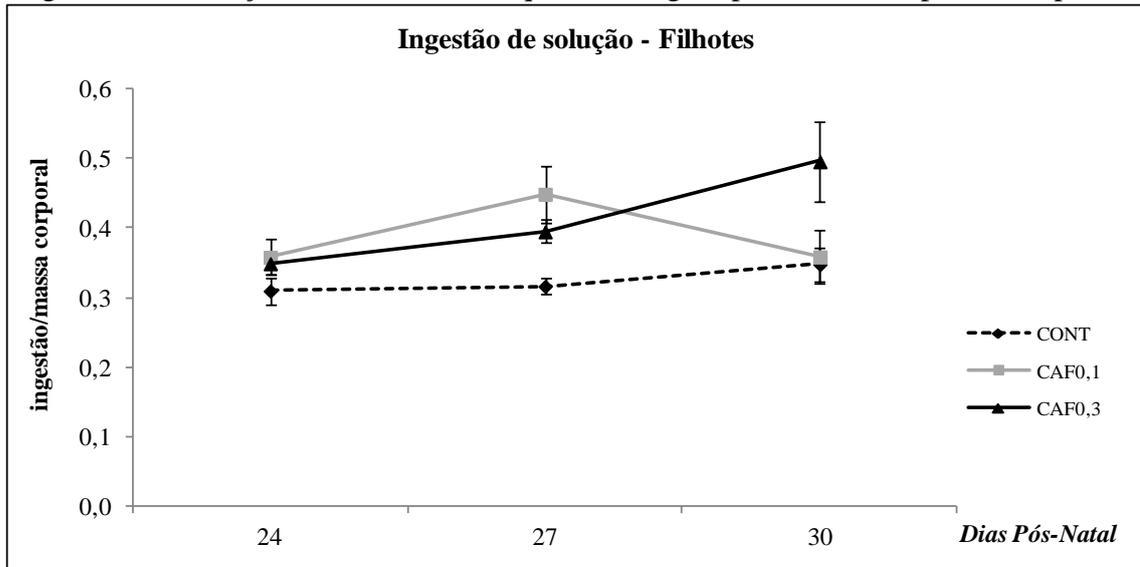
Legenda: Consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles que não foram expostas à cafeína durante o desenvolvimento (CONT = 11) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3 = 16). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.1.2.3 Ingestão de líquido

Em relação ao consumo de líquido das proles ao longo dos dias, não foram encontradas diferenças significativas (Figura 19).

Figura 19 - Evolução do consumo de líquido, corrigido pela massa corporal, das proles



Legenda: Consumo de líquido, corrigido pela massa corporal, das proles que não foram expostas à cafeína durante o desenvolvimento (CONT = 11) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 = 7) ou 0,3g/mL (CAF0,3 = 13). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

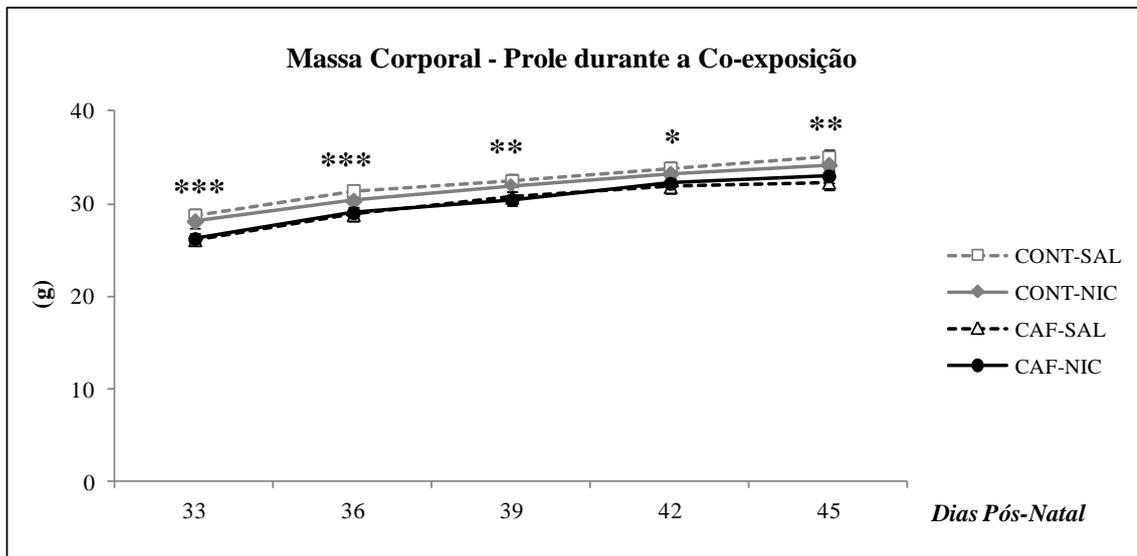
4.1.3 Massa corporal e ingestão das proles – durante o período de coexposição (subprojeto 2)

Ao completarem PN30, os animais destinados ao subprojeto 2, receberam uma minibomba osmótica contendo nicotina ou salina. A dupla exposição se estendeu até PN45, quando os animais avaliados sob condição de vigência da coexposição foram eutanasiados e aqueles que realizaram os testes comportamentais em condições de retirada da nicotina passaram por uma segunda cirurgia. Durante esse período, a cada 3 dias a massa corporal e os consumos de ração e de líquido foram quantificados.

4.1.3.1 Massa corporal

Durante o período de coexposição, os animais CAF (CAF e CAF-NIC) apresentaram menor massa corporal quando comparados aos animais CONT (CONT e CONT-NIC) (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{2,7; 415,3} = 706,1$; $p \leq 0,001$). Esse efeito foi evidente ao longo de todo o período de exposição (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA x DIA: $F_{2,7; 415,3} = 3,0$; $p \leq 0,05$; PN33, $p \leq 0,001$, PN36, $p \leq 0,001$; PN39, $p \leq 0,01$, PN42, $p \leq 0,05$; PN45, $p \leq 0,01$) (Figura 20). Na média, os grupos CAF apresentaram uma diminuição de 5% no ganho de massa corporal em relação aos grupos CONT.

Figura 20 - Evolução da massa corporal das proles: período de coexposição



Legenda: Massa corporal das proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de PN45, na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 18 + ♂ = 20; CONT-NIC - ♀ = 22 + ♂ = 20 / CAF-SAL - ♀ = 22 + ♂ = 20; CAF-NIC - ♀ = 23 + ♂ = 20). Valores representam média ± EPM. * CAF vs. CONT, $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. g, gramas.

Fonte: A autora, 2016.

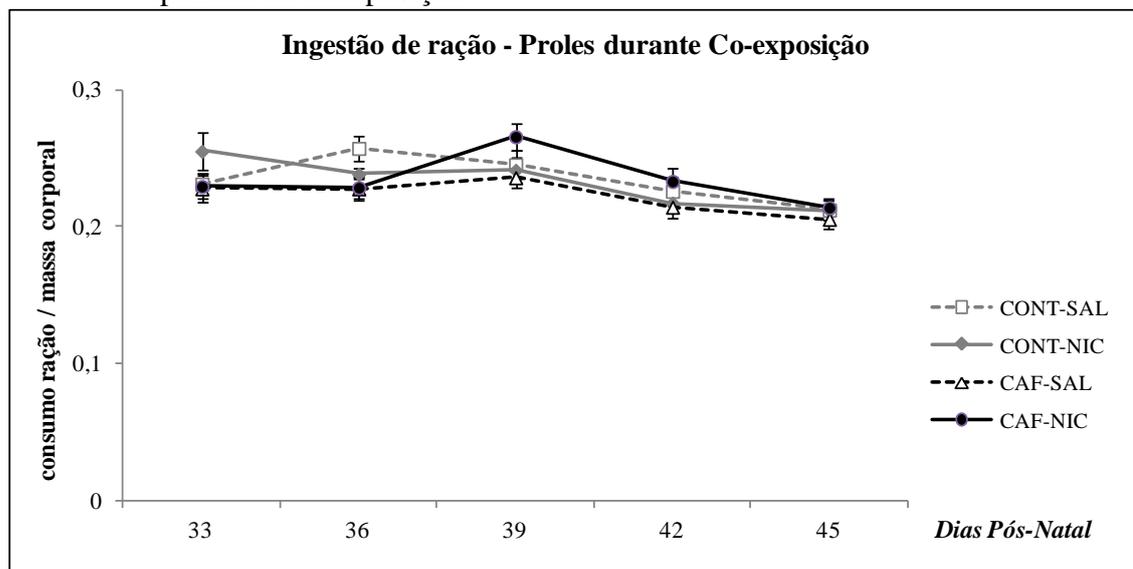
Ao longo dos 5 dias de retirada da nicotina (PN45 a PN50), as medições também foram realizadas, contudo, a análise estatística não detectou diferenças entre os grupos.

4.1.3.2 Ingestão de ração

As proles de todos os grupos experimentais apresentaram redução no consumo de ração ao longo do período de coexposição (DIA: $F_{3,5; 502,9} = 14,4$; $p \leq 0,001$) (Figura 21).

Não foram identificadas diferenças durante o período de retirada da nicotina.

Figura 21 - Evolução do consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles: período de coexposição



Legenda: Consumo de ração, corrigido pela massa corporal, das proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de PN45, na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 18 + ♂ = 20; CONT-NIC - ♀ = 22 + ♂ = 20 / CAF-SAL - ♀ = 22 + ♂ = 20; CAF-NIC - ♀ = 23 + ♂ = 20). Valores representam média \pm EPM.

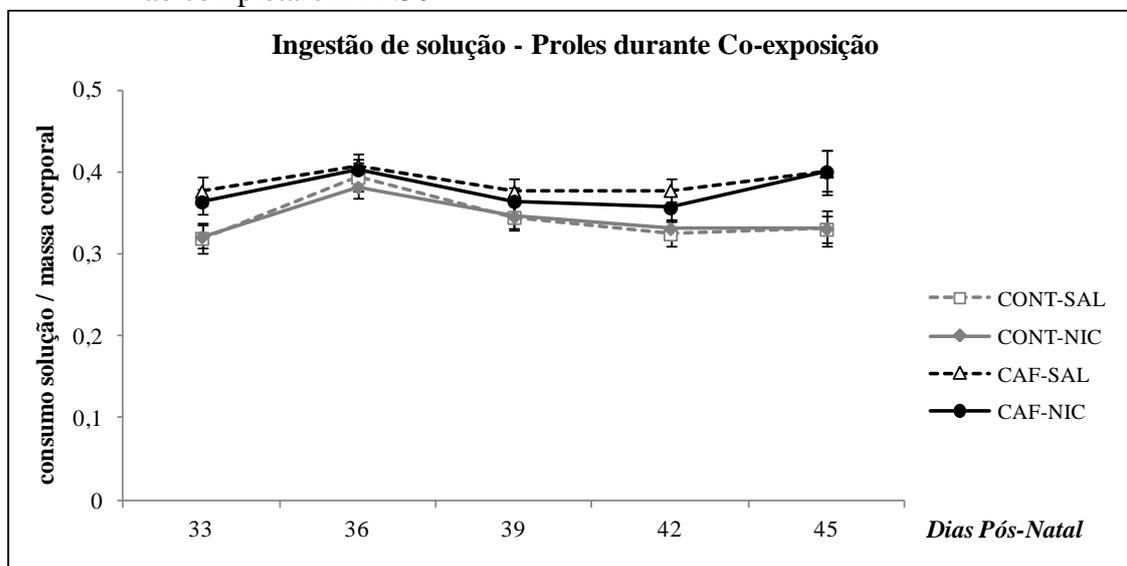
Fonte: A autora, 2016.

4.1.3.3 Ingestão de líquido

Houve flutuação na ingestão de líquido ao longo do período de coexposição (DIA: $F_{3,2; 432,2} = 8,8$; $p \leq 0,001$). Contudo, o volume ingerido não variou em função da exposição às drogas (Figura 22).

Não foram identificadas diferenças durante o período de retirada da nicotina.

Figura 22 - Evolução do consumo de solução, corrigido pela massa corporal, das proles que foram expostas cronicamente, ou não, à cafeína, desde a gestação até a idade de PN45 e que receberam minibombas osmóticas contendo nicotina, ao completarem PN30



Legenda: Consumo de solução, corrigido pela massa corporal, das proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de PN45, na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 18 + ♂ = 20; CONT-NIC - ♀ = 22 + ♂ = 20 / CAF-SAL - ♀ = 22 + ♂ = 20; CAF-NIC - ♀ = 23 + ♂ = 20). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.2 Avaliação dos efeitos da exposição crônica à cafeína sobre a susceptibilidade à nicotina – Subprojeto 1

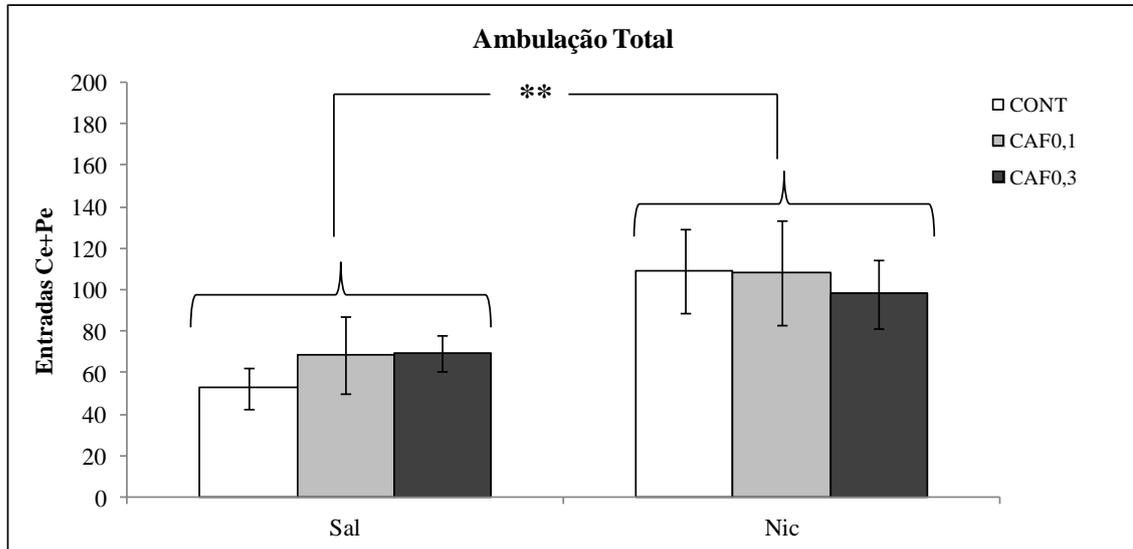
4.2.1 Testes comportamentais

4.2.1.1 Teste do campo aberto

A análise estatística mostrou que os animais que receberam nicotina, independente da exposição crônica à cafeína, apresentaram maior ambulação quando comparados aos animais que receberam salina imediatamente antes do teste (EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,112} = 8,5$; $p \leq 0,01$) (Figura 23). Em relação aos seus respectivos controles, esse aumento foi de 107% para o CONT-NIC, 58% para o CAF0,1-NIC e 41% para o CAF0,3-NIC. Na média, a

nicotina aumentou em 65% a atividade ambulatoria.

Figura 23 - Média da ambulação total em 5 minutos no teste do campo aberto

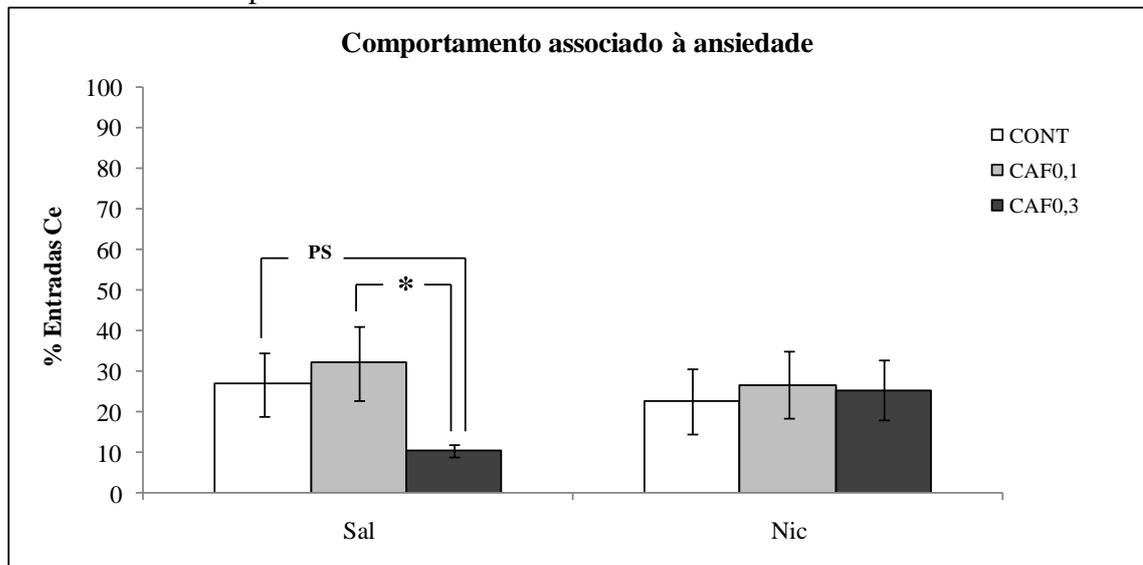


Legenda: Média da ambulação total em 5 minutos no teste do campo aberto dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 10; CONT-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 11) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 6 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 6 + ♂ = 9) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 11; CAF0,3-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 10) e que imediatamente antes do teste receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM. ** p > 0,01.

Fonte: A autora, 2016.

Em relação ao comportamento associado à ansiedade, as medidas utilizadas apresentaram resultados semelhantes, tanto a análise da ambulação como do tempo no centro da arena, demonstraram efeitos ansiogênicos para a CAF0,3. Em relação à ambulação no centro (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{2,53} = 3,2$; $p \leq 0,05$), o grupo CAF0,3-SAL apresentou menor atividade no centro da arena quando comparado ao grupo CAF0,1-SAL ($p \leq 0,05$) e ao CONT-SAL (PS; $p = 0,06$). O grupo CAF0,3-SAL apresentou uma atividade 67% menor que o CAF0,1-SAL e 60% menor que o CONT-SAL. Na presença de nicotina, o efeito ansiogênico da cafeína não foi identificado (CAF0,3-NIC = CAF0,1-NIC = CONT-NIC) (Figura 24).

Figura 24 - Percentual de ambulação no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto

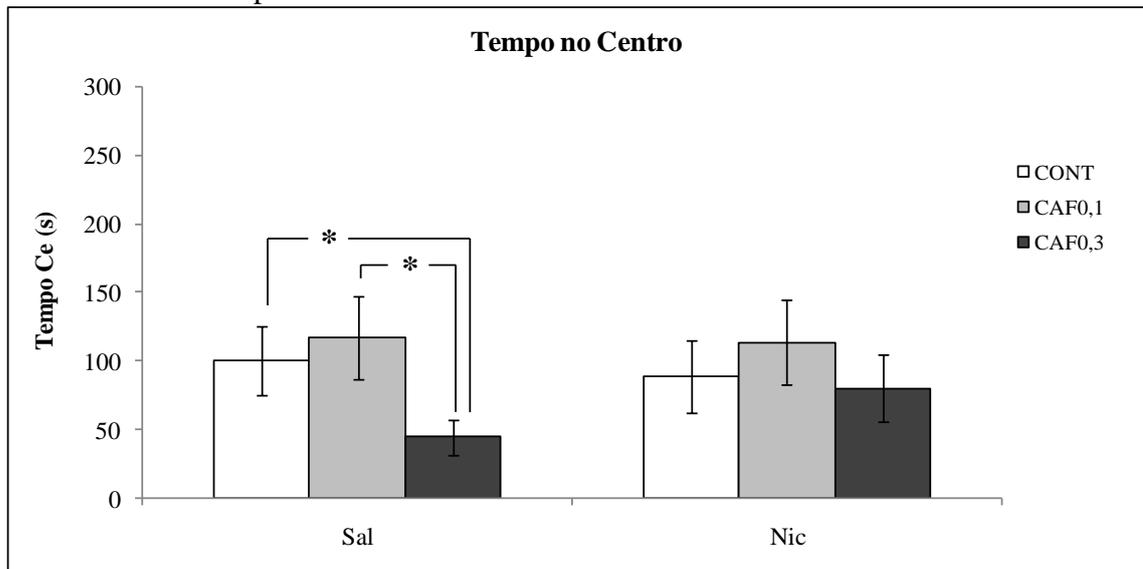


Legenda: Percentual de ambulação no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 10; CONT-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 11) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 6 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 6 + ♂ = 9) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 11; CAF0,3-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 10) e que imediatamente antes do teste receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM. * $p > 0,05$; PS – $p=0,06$.

Fonte: A autora, 2016.

Para o tempo de permanência (EXPOSIÇÃO A CAFEÍNA: $F_{2,51} = 3,9$; $p \leq 0,05$), o grupo CAF0,3-SAL permaneceu menos tempo no centro da arena quando comparado aos grupos CAF0,1-SAL e CONT-SAL ($p \leq 0,05$), sendo o tempo despendido no centro 61% menor que o CAF0,1-SAL e 56% menor que o CONT-SAL. Novamente, não houve efeito ansiogênico na cafeína nos grupos expostos agudamente a nicotina (CAF0,3-NIC = CAF0,1-NIC = CONT-NIC) (Figura 25).

Figura 25 - Média total do tempo despendido no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto



Legenda: Média total do tempo despendido no centro da arena em 5 minutos no teste do campo aberto dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 10; CONT-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 11) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 6 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 6 + ♂ = 9) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 11 + ♂ = 11; CAF0,3-NIC, ♀ = 10 + ♂ = 10) e que imediatamente antes do teste receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM. * $p > 0,05$. s, segundos.

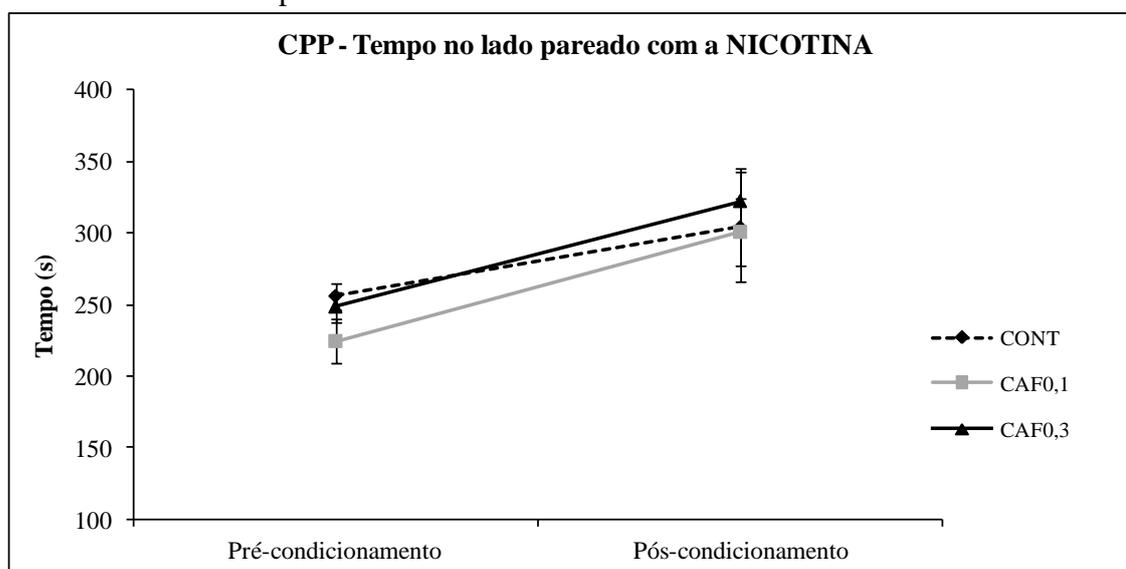
Fonte: A autora, 2016.

4.2.1.2 Teste da preferência condicionada ao local

Para os animais que receberam SALINA durante os dias de condicionamento, a ANOVA mostrou que não houve diferença no tempo despendido no lado não-preferido no pré-teste em relação ao teste (dado não mostrado).

Para os animais que receberam nicotina, a ANOVA indicou efeito do DIA ($F_{1,39} = 11,4$; $p \leq 0,01$), onde os animais permaneceram mais tempo no lado não-preferido no teste quando comparado ao tempo de permanência nesse compartimento no pré-teste (Figura 26). No entanto, a comparação entre o pré-teste e teste para cada grupo indicou que todos os 3 grupos associaram o ambiente aos efeitos da nicotina ($p < 0,05$ para todos os grupos), o que indica que não houve interferência da cafeína no condicionamento.

Figura 26 - Tempo despendido, em segundos, pelas proles que receberam nicotina no lado não preferido durante o condicionamento



Legenda: Tempo, em segundos, que as proles que receberam NICOTINA no lado não preferido durante o condicionamento, passaram neste mesmo lado pós-condicionamento, quando comparados animais que não foram expostos à cafeína (CONT - ♀NIC = 8 + ♂NIC = 7) ou que foram expostas cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1 - ♀NIC = 6 + ♂NIC = 5) ou 0,3g/mL (CAF0,3 - ♀NIC = 9 + ♂NIC = 12). s, segundos.

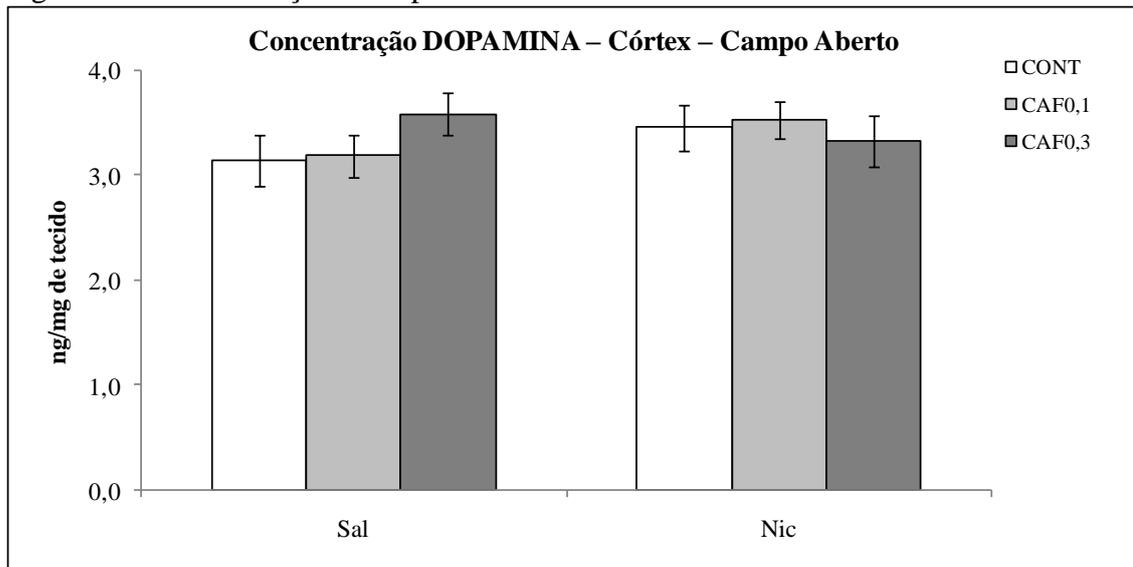
Fonte: A autora, 2016.

4.2.2 Análise neuroquímica

Foram quantificadas as concentrações de dopamina, DOPAC, *turnover* e norepinefrina no córtex cerebral dos animais submetidos ao teste do CA e do CPP.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais compostos por animais previamente testados no campo aberto (Figuras 27 a 30).

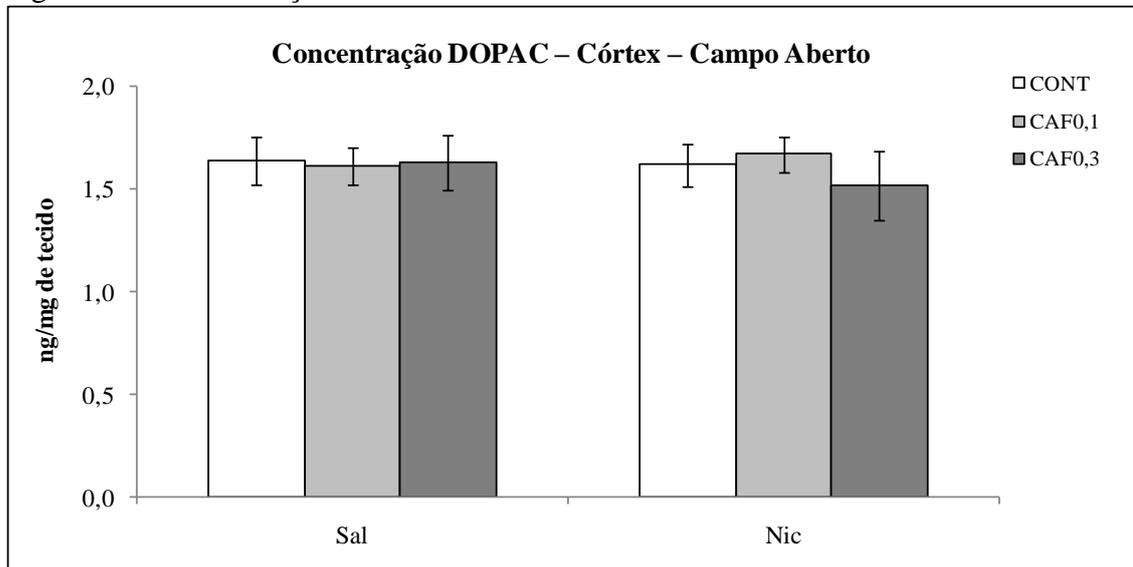
Figura 27 - Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais



Legenda: Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 8; CONT-NIC, ♀ = 5 + ♂ = 10) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 9 + ♂ = 7) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 6; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 6) e que imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

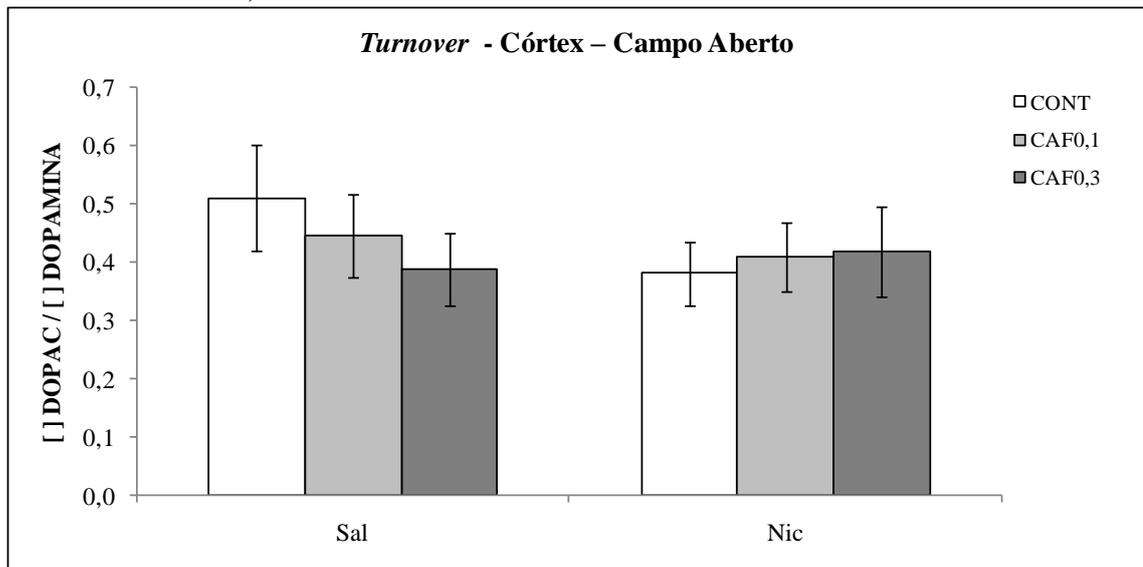
Figura 28 - Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais



Legenda: Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 8; CONT-NIC, ♀ = 5 + ♂ = 10) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 9 + ♂ = 7) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 6; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 6) e que imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

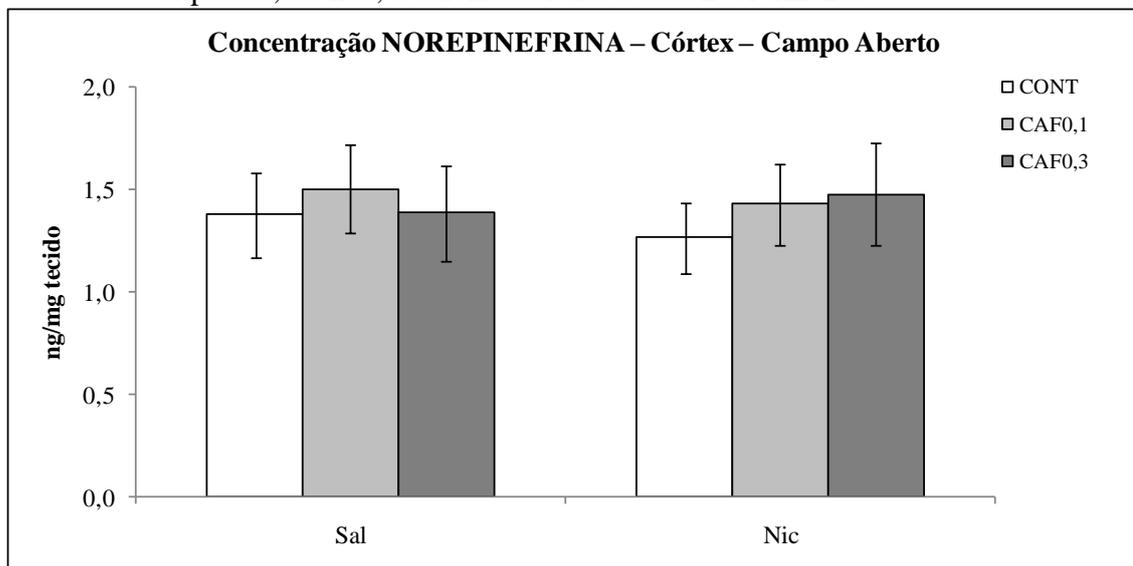
Figura 29 - *Turnover* de dopamina no córtex cerebral dos animais que foram expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento



Legenda: *Turnover* de dopamina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 8; CONT-NIC, ♀ = 5 + ♂ = 10) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 9 + ♂ = 7) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 6; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 6) e que imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 30 - Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais que foram expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento

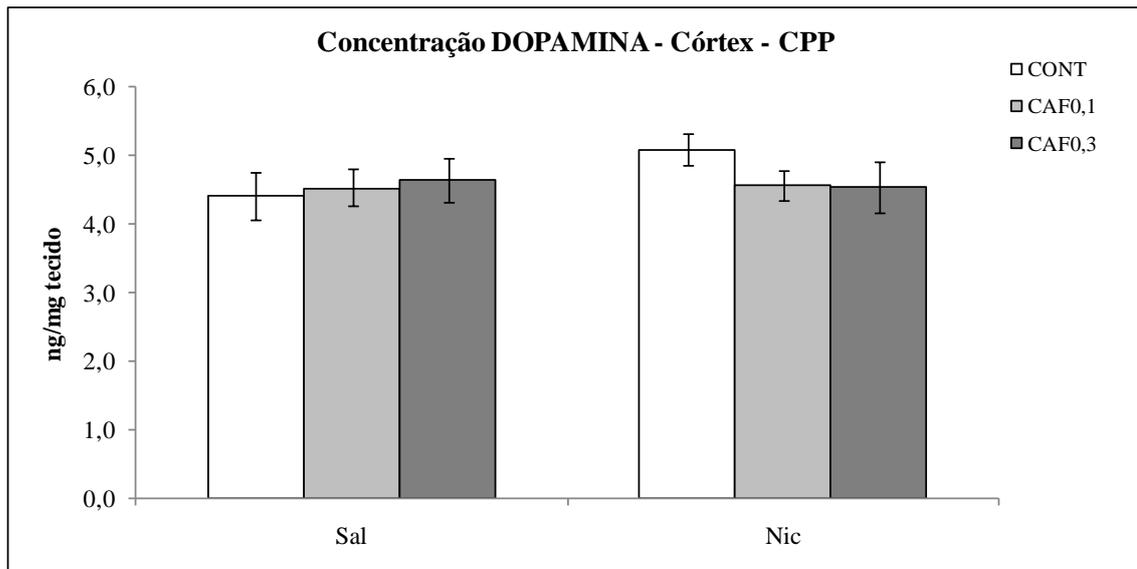


Legenda: Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 8; CONT-NIC, ♀ = 5 + ♂ = 10) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF0,1-NIC, ♀ = 9 + ♂ = 7) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 8 + ♂ = 6; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 6) e que imediatamente antes do teste do campo aberto receberam injeção de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Assim como nos animais testados no CA, a análise do córtex cerebral dos animais testados no CPP indicou que nem a exposição crônica à cafeína nem a exposição à nicotina foram capazes de promover alterações significativas nos parâmetros neuroquímicos avaliados (Figuras 31 a 34).

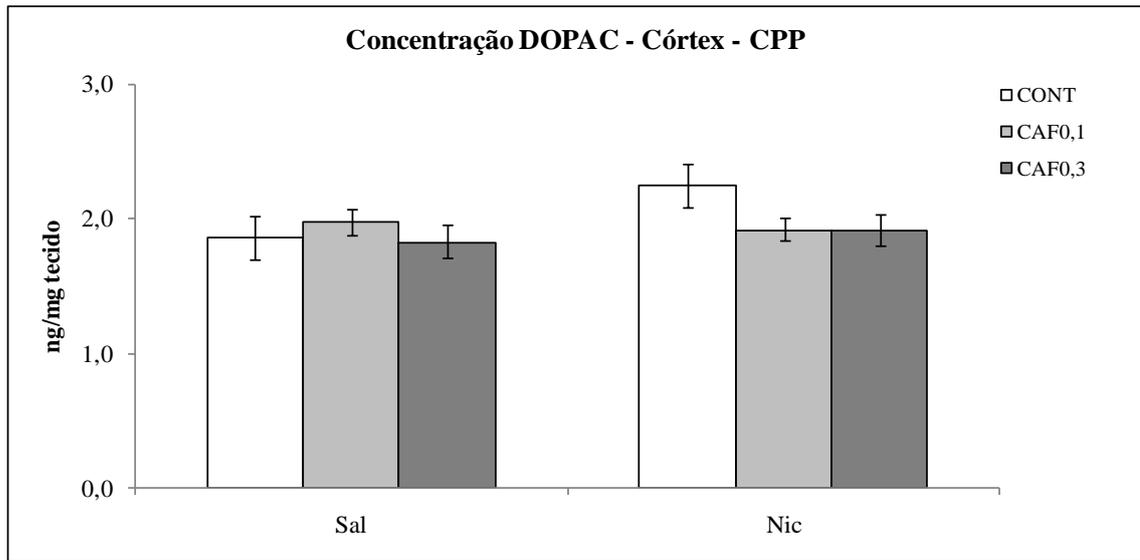
Figura 31 - Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento



Legenda: Concentração de dopamina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CONT-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,1-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) e que durante os dias de condicionamento receberam injeções de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

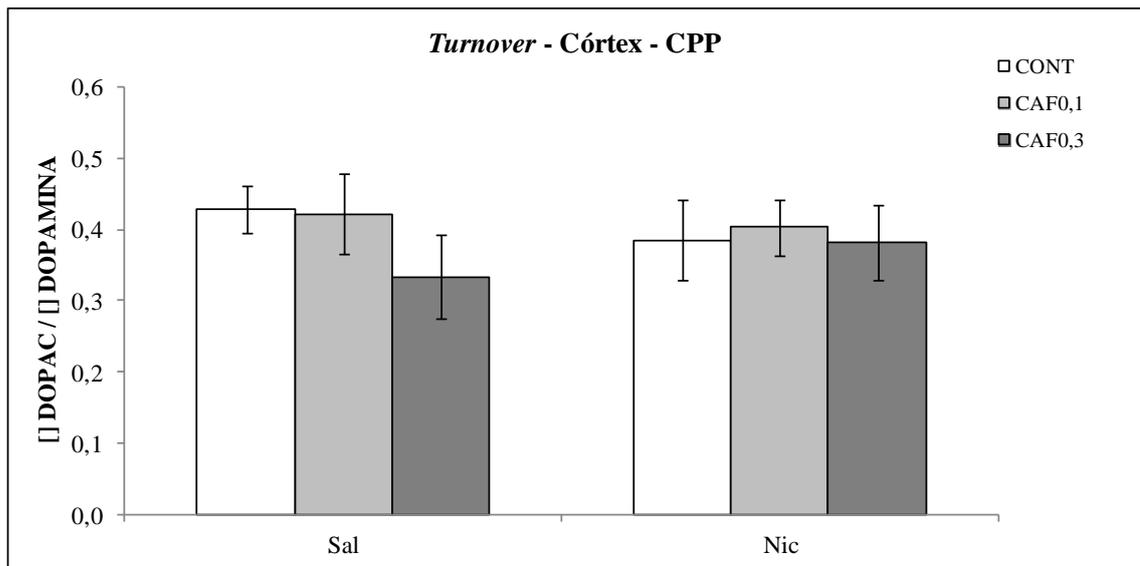
Figura 32 - Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento



Legenda: Concentração de DOPAC no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CONT-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,1-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) e que durante os dias de condicionamento receberam injeções de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

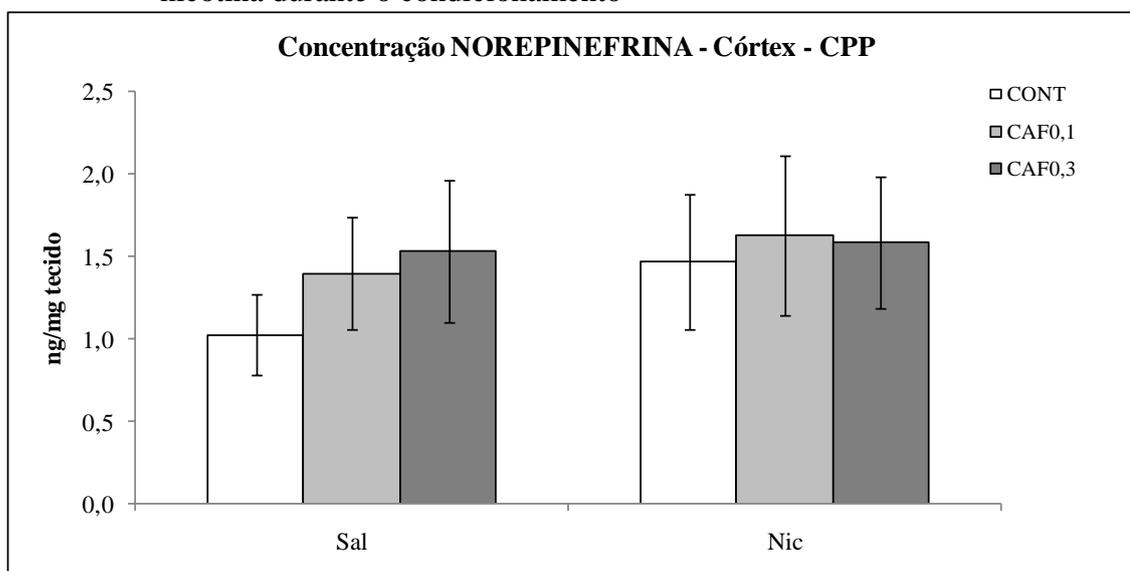
Figura 33 - *Turnover* de dopamina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento



Legenda: *Turnover* de dopamina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CONT-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,1-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) e que durante os dias de condicionamento receberam injeções de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 34 - Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais expostos, ou não, à cafeína durante o desenvolvimento e que receberam, ou não, nicotina durante o condicionamento



Legenda: Concentração de norepinefrina no córtex cerebral dos animais que não foram expostos à cafeína durante o desenvolvimento (CONT-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CONT-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou que foram expostos cronicamente à cafeína na concentração 0,1g/mL (CAF0,1-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,1-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) ou 0,3g/mL (CAF0,3-SAL, ♀ = 7 + ♂ = 7; CAF0,3-NIC, ♀ = 8 + ♂ = 8) e que durante os dias de condicionamento receberam injeções de nicotina ou salina. Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

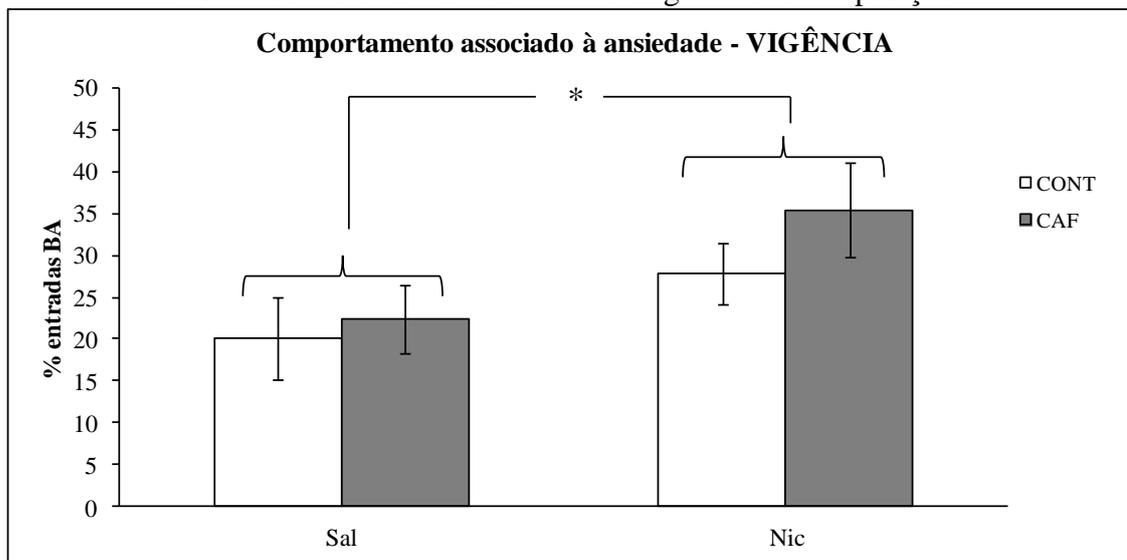
4.3 Testes comportamentais para avaliação dos efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência - Subprojeto 2

4.3.1 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Para avaliação de comportamento associado à ansiedade, analisamos o percentual de entradas e também o tempo de permanência nos braços abertos.

Durante a vigência da coexposição, a nicotina produziu um aumento, em torno de 48%, no percentual de entradas nos braços abertos em relação aos grupos que receberam minibombas osmóticas preenchidas com salina (EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,75}=4,4$; $p \leq 0,05$) (Figura 35).

Figura 35 - Percentual de entradas nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição

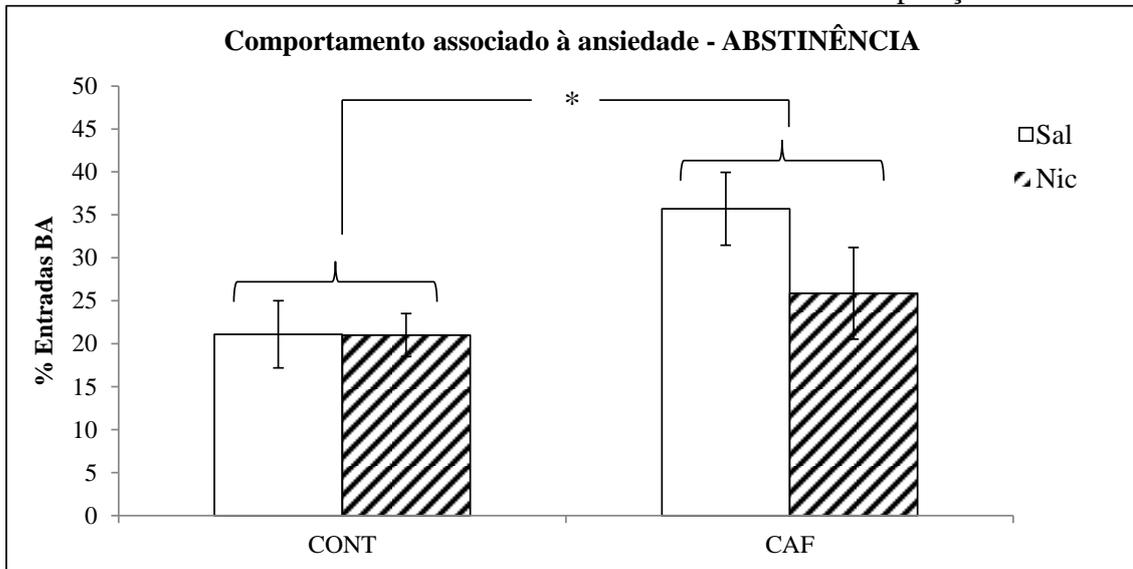


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 8). Valores representam média ±EPM. * $p > 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Durante a retirada da coexposição, as alterações no percentual de entradas nos braços abertos foram distintas daquela identificadas na vigência da coexposição a cafeína e nicotina (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,79}=5,6$; $p \leq 0,05$). A exposição crônica à cafeína produziu efeito ansiolítico, demonstrado por um aumento de 46% no percentual de entradas nos braços abertos quando comparado aos grupos que não foram expostos a essa droga. Este efeito de redução do comportamento associado à ansiedade foi mais evidente no grupo CAF-SAL do que no CAF-NIC, mas não houve diferença significativa entre estes grupos (Figura 36).

Figura 36 - Percentual de entradas nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição

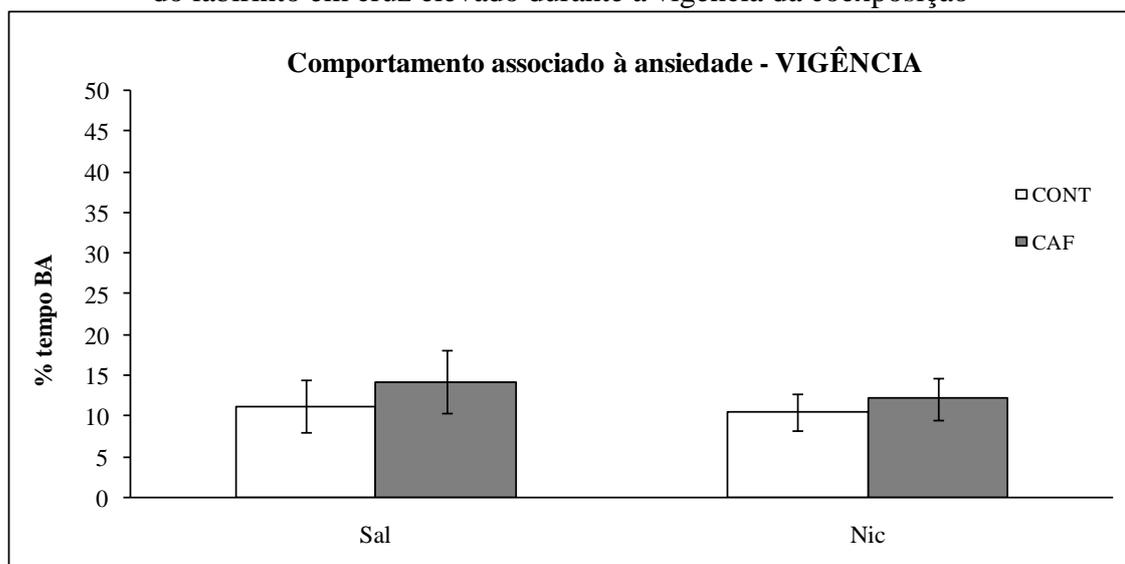


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 9; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. * $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Em relação ao tempo de permanência nos braços abertos, durante a vigência da coexposição não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Figura 37).

Figura 37 - Percentual de tempo despendido nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição

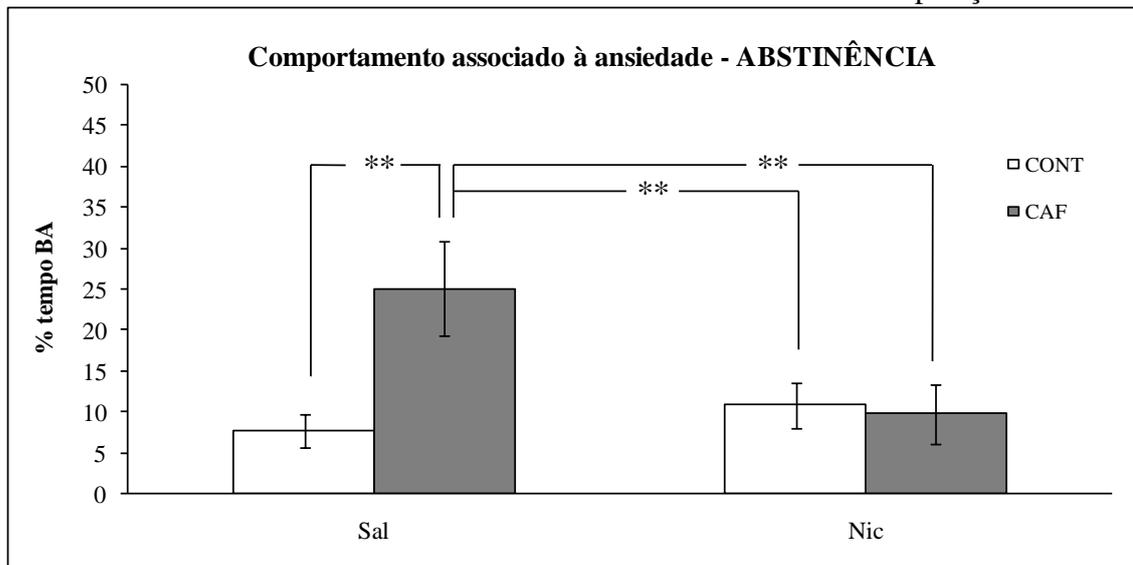


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 8). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Durante a retirada da coexposição, foi identificada diferença no percentual de tempo nos BAs (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA x EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,79}=6,1$; $p \leq 0,05$), onde o grupo CAF-SAL apresentou despendeu mais tempo nos braços abertos quando comparados aos outros grupos (CAF-SAL x CONT-SAL, CAF-SAL x CONT-NIC, CAF-SAL x CAF-NIC, $p \leq 0,01$). A diferença do CAF-SAL em relação ao CONT-SAL foi de 230%, 130% em relação ao CONT-NIC e 160% em relação ao CAF-NIC. Aqui identificamos uma interação entre essas drogas, sendo o efeito ansiolítico causado pela exposição crônica à cafeína revertido pela retirada da nicotina nesses animais (Figura 38).

Figura 38 - Percentual de tempo despendido nos braços abertos em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição

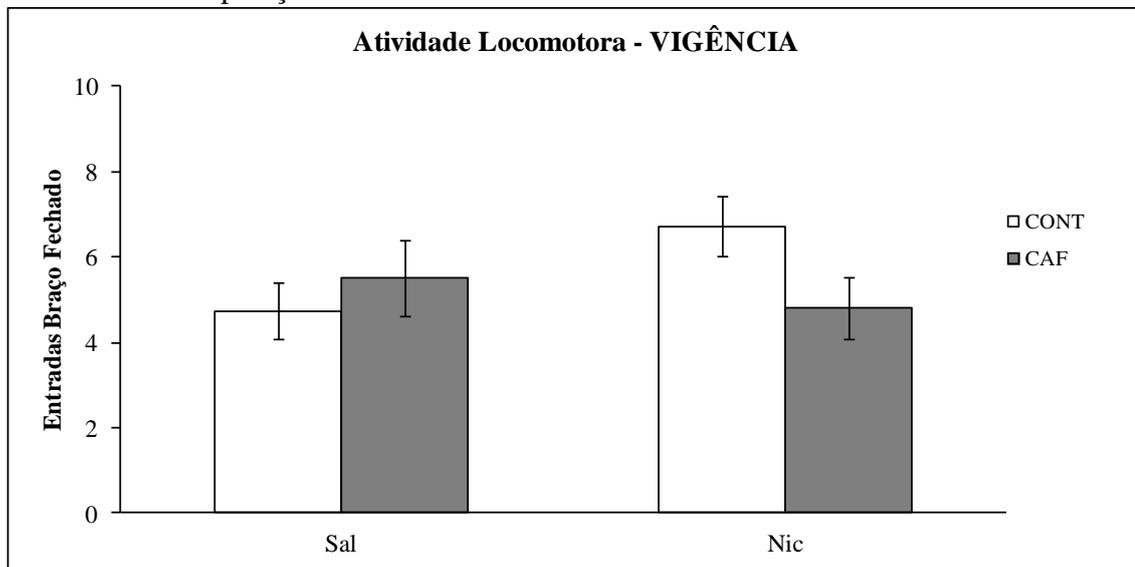


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 9; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. ** p<0,01.

Fonte: A autora, 2016.

No que diz respeito à atividade locomotora, durante a vigência da coexposição não foram encontradas diferenças significativas (Figura 39).

Figura 39 - Atividade locomotora, dada através das entradas nos braços fechados, em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição

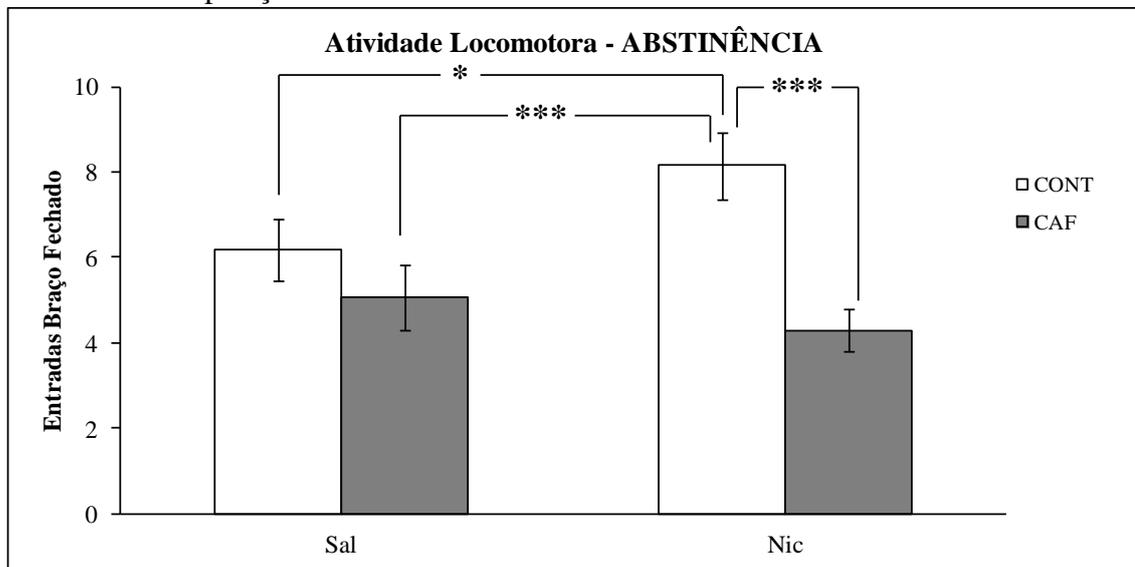


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 10; CONT-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 8 / CAF-SAL - ♀ = 6 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 2 + ♂ = 8). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

No entanto, a retirada da nicotina produziu aumento na atividade locomotora (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA x EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,79}=3,8$; $p \leq 0,05$). Especificamente, o grupo CONT-NIC foi hiperativo quando comparado aos grupos não-expostos à nicotina (CONT-NIC x CONT-SAL, $p \leq 0,05$; CONT-NIC x CAF-SAL, $p \leq 0,001$), adicionalmente, no grupo duplo-exposto, a exposição à cafeína reverteu o efeito de abstinência da nicotina (CONT-NIC x CAF-NIC, $p \leq 0,001$), como demonstrado pela menor atividade locomotora no grupo CAF-NIC quando comparado ao CONT-NIC (Figura 40). A atividade locomotora apresentada pelo grupo CONT-NIC foi 31% maior que a do CONT-SAL, 60% maior que a atividade do grupo CAF-SAL e 89% maior que o CAF-NIC.

Figura 40 - Atividade locomotora, dada através das entradas nos braços fechados, em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição

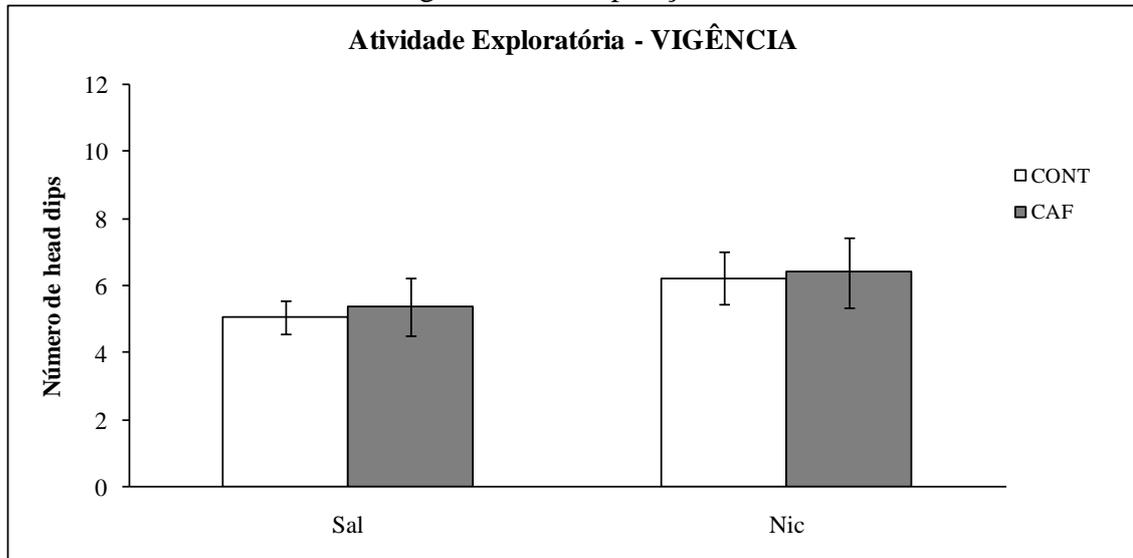


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 8; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 10). Valores representam média ±EPM. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Em relação ao número de *head dips* executados no LCE, durante a vigência não foram encontradas diferenças significativas (Figura 41).

Figura 41 - Número de *head dips* realizados em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a vigência da coexposição

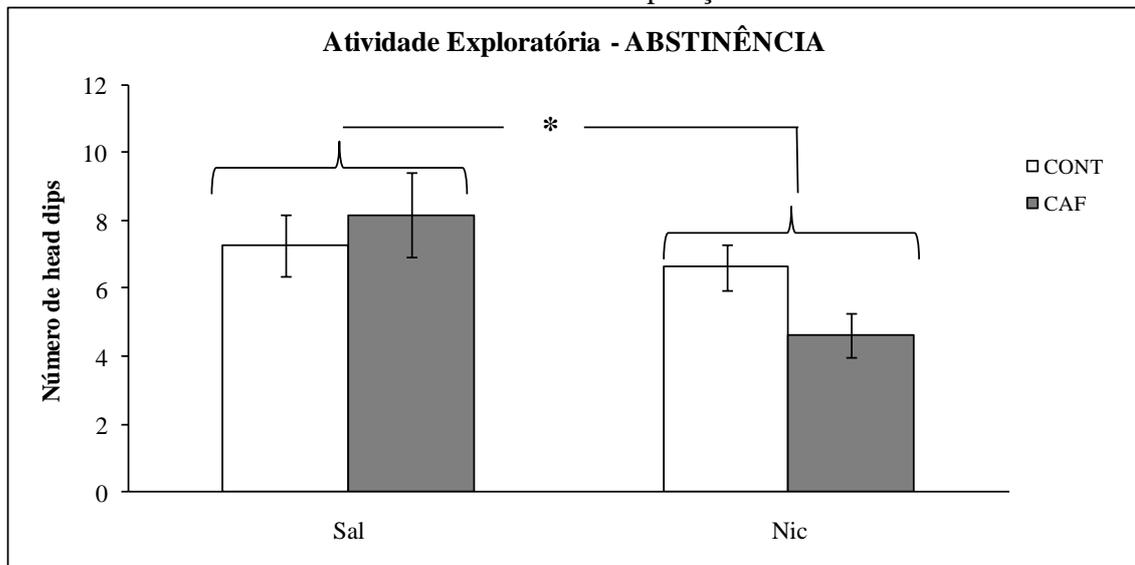


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 11; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 7 / CAF-SAL - ♀ = 6 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 6). Valores representam média \pm EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Foi identificada uma alteração no número de *head dips* durante o período de retirada da nicotina (EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,79}=4,1$; $p \leq 0,05$), sendo encontrada uma redução de 30% no número de *head dips* nos animais previamente expostos a nicotina quando comparado aos grupos que não minibombas preenchidas com salina (Figura 42).

Figura 42 - Número de *head dips* realizados em 5 minutos no teste do labirinto em cruz elevado durante a abstinência da coexposição



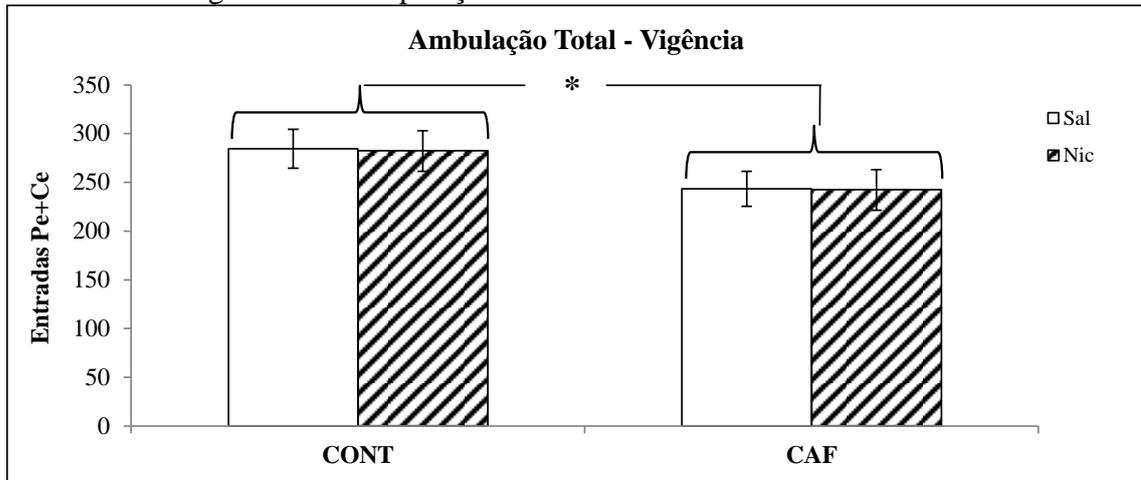
Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 8; CAF-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 10). * $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

4.3.2 Teste do campo aberto

A cafeína causou redução da atividade locomotora (Vigência – EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,80}=4,0$; $p \leq 0,05$; Abstinência – EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,82}=7,1$; $p \leq 0,01$). Durante a vigência da coexposição, os grupos CAF, independente de estarem sendo co-expostos à nicotina, apresentaram menor atividade locomotora em relação aos grupos CONT (CONT-SAL e CONT-NIC) (Figura 43). Este efeito também foi encontrado nos animais em abstinência da coexposição, isto é, mesmo após a retirada da nicotina, os animais CAF demonstraram hipoatividade quando comparados aos CONT (Figura 44). A exposição crônica à cafeína causou uma redução de 15% na atividade locomotora em relação aos animais dos grupos CONT, tanto na vigência como na abstinência.

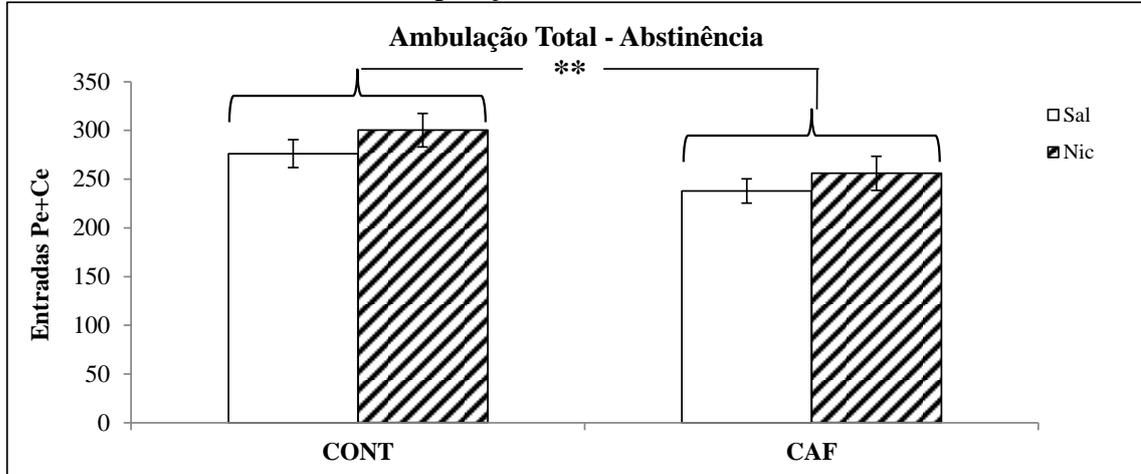
Figura 43 - Média da ambulação total em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 10). Valores representam média ±EPM. CE, centro da arena; PE, periferia da arena. * $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 44 - Média da ambulação total em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição



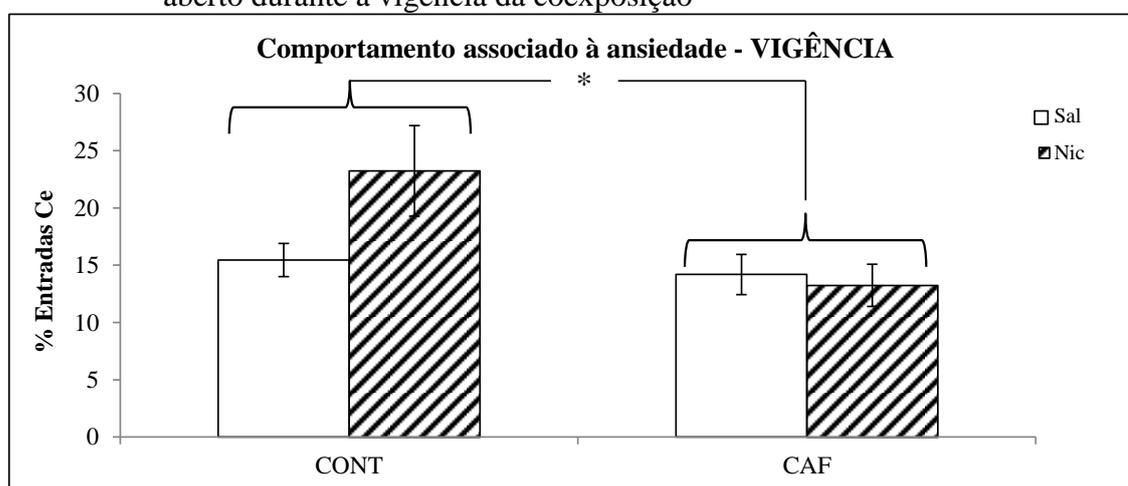
Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 9; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. CE, centro da arena; PE, periferia da arena. ** $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2016.

Para avaliar comportamento associado à ansiedade, medido secundariamente no teste do CA, utilizamos o percentual de entradas e o tempo de permanência no centro da arena.

Durante a vigência da coexposição foi detectado um efeito de EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA ($F_{1,80}=4,9$; $p\leq 0,05$). Os animais expostos cronicamente à cafeína apresentaram menor percentual de entradas no centro da arena quando comparados aos grupos controle (não expostos à cafeína). Considerando a média dos grupos, essa redução foi de 30%. No entanto, apesar de a análise estatística não ter identificado interações entre as drogas ou mesmo um efeito da nicotina, como mostra a figura, há um aumento robusto no percentual de entradas no centro apresentado pelo grupo CONT-NIC. Nesse sentido, este grupo apresentou percentual de entrada no centro 50% maior que o CONT-SAL e de 60 a 75% maior que os grupos CAF. (Figura 45).

Figura 45 - Percentual de entradas no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição

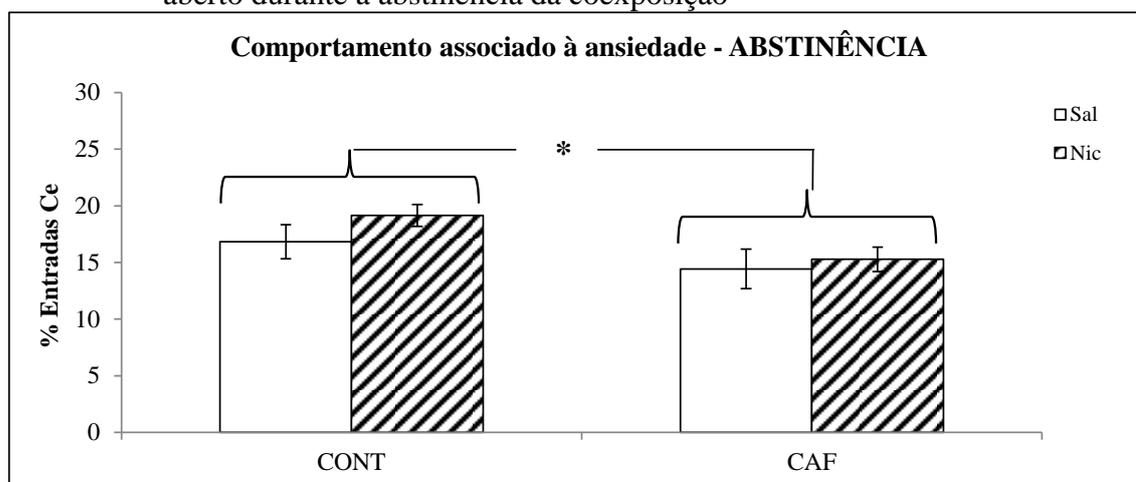


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 10). Valores representam média ±EPM. * $p\leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Durante a abstinência, também foi encontrado um efeito de EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA ($F_{1,82}=6,0$; $p\leq 0,05$). Enquanto a retirada da nicotina não interferiu no comportamento, os grupos CAF apresentaram uma pequena redução (-18%) no percentual de entradas no centro quando comparados aos grupos CONT, indicando efeito ansiogênico da cafeína (Figura 46).

Figura 46 - Percentual de entradas no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição



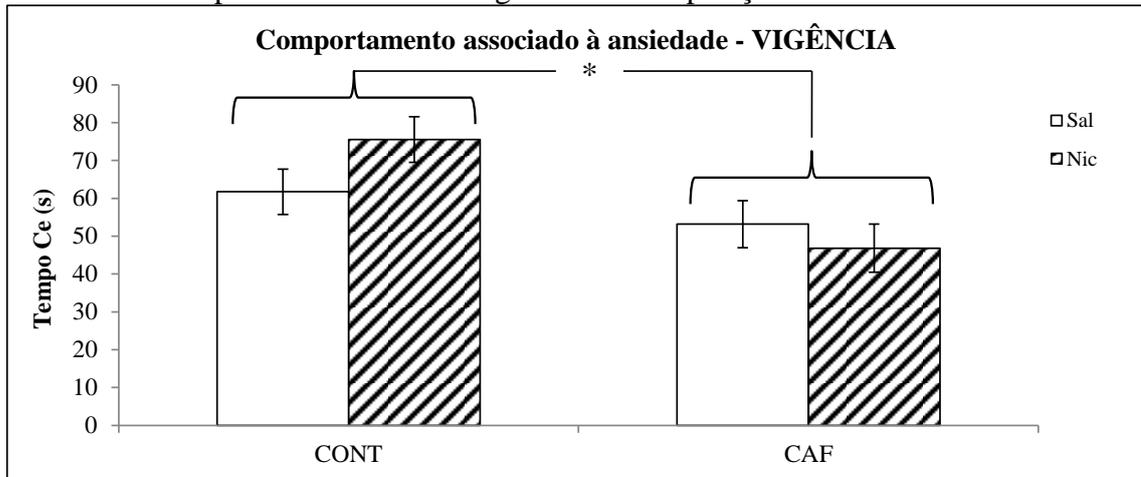
Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 9; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. * $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Em relação ao tempo no centro, durante a vigência da coexposição (Figura 47), os resultados foram semelhantes aqueles identificados para o percentual entradas no centro (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,72}=4,4$; $p \leq 0,05$), representado por uma redução de 27% no tempo de permanência no centro da arena nos grupos expostos a cafeína quando comparados aos grupos controle.

Durante a abstinência da exposição à nicotina (Figura 48), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

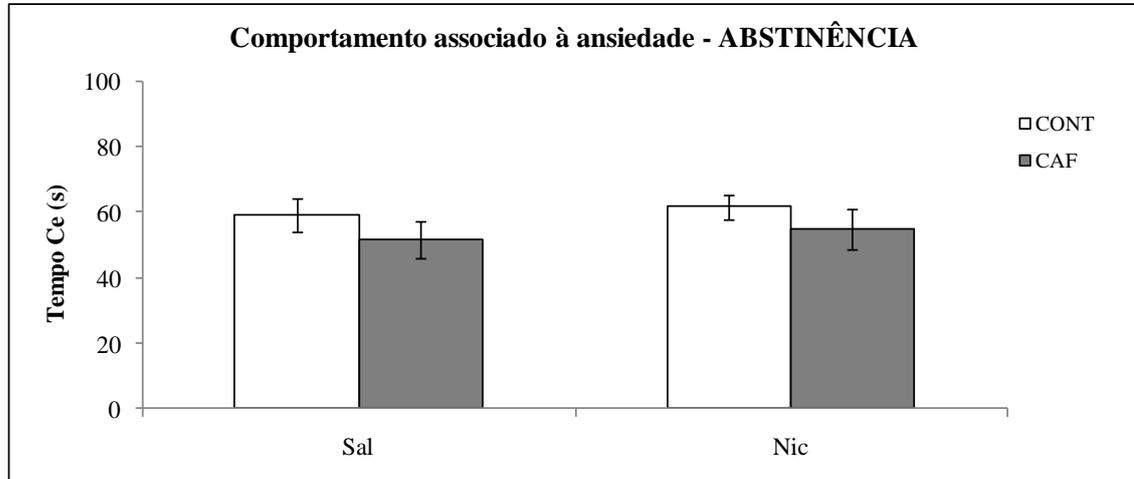
Figura 47 - Tempo de permanência no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a vigência da coexposição



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN44), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 11; CONT-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 8 + ♂ = 9). Valores representam média ±EPM. PS, $p = 0,08$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 48 - Tempo de permanência no centro da arena em 10 minutos no teste do campo aberto durante a abstinência da coexposição



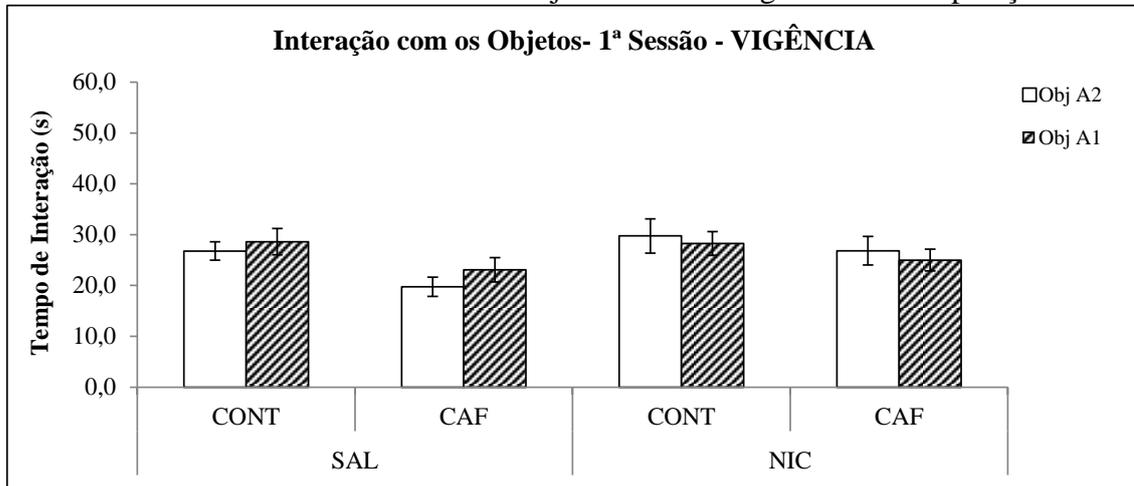
Lembrete: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 8; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 8 / CAF-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 8; CAF-NIC - ♀ = 9 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.3.3 Teste do reconhecimento de objeto

Em relação a 1ª sessão, a fim de descartar fatores que, *a priori*, pudessem influenciar na avaliação do aprendizado e memória, analisamos o tempo de interação com cada um dos 2 objetos e o percentual de tempo de exploração dos 2 objetos durante o treinamento. Tanto na vigência como na abstinência, a ANOVA não identificou diferenças no tempo de exploração dos objetos A1 e A2 (Figuras 49 e 50). Considerando que nesta sessão os objetos eram iguais, isto significa que não houve preferência dos animais por uma das posições da arena.

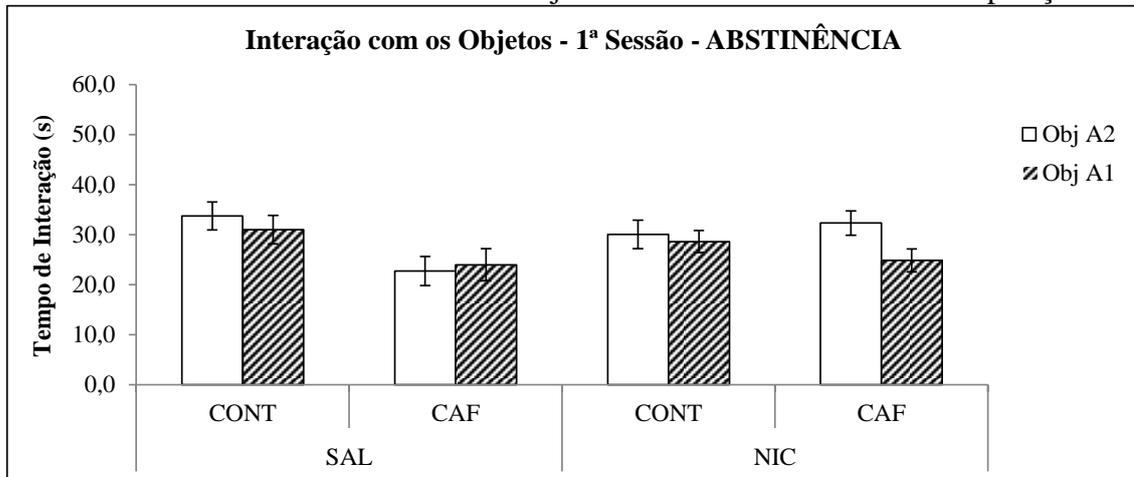
Figura 49 - Tempo de interação com os objetos na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN45), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 50 - Tempo de interação com os objetos na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição

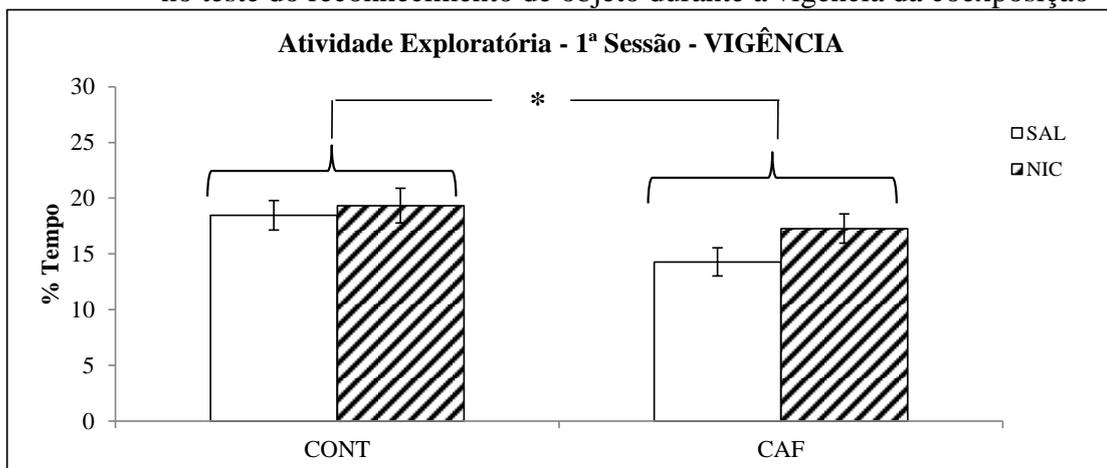


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

No que diz respeito ao índice de exploração, na vigência, a exposição crônica a cafeína interferiu na atividade exploratória (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,85}=5,2$; $p \leq 0,05$). Os grupos CAF (CAF-SAL e CAF-NIC) apresentaram redução de 15% no tempo de exploração quando comparados aos grupos controle (CONT-SAL e CONT-NIC) (Figura 51).

Figura 51 - Percentual do tempo de exploração na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição

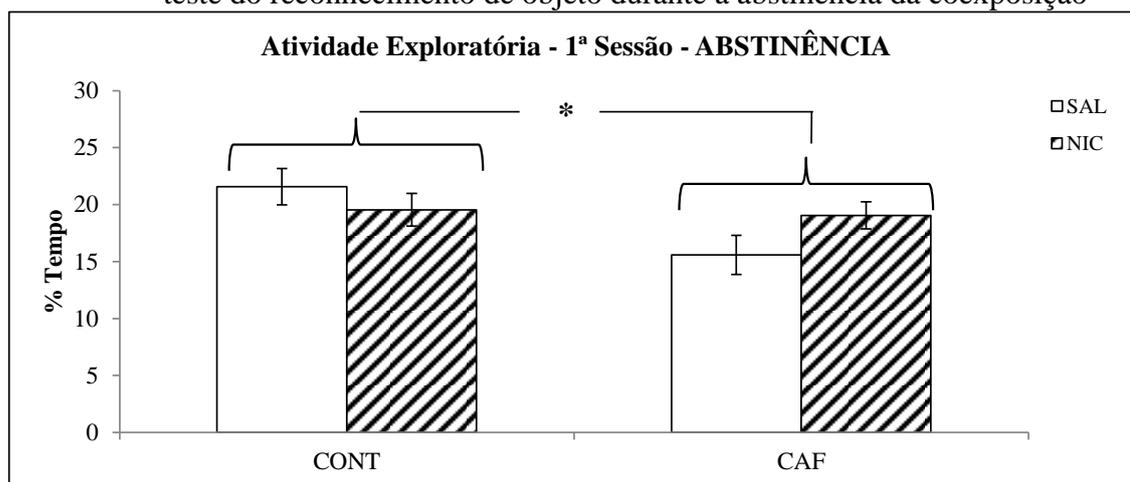


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN45), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM.
* $p \leq 0,05$.

Fonte: A autora, 2016.

Na abstinência, esse efeito de menor atividade nos animais CAF em relação aos CONT também foi encontrado (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,81}=4,5$; $p<0,05$) (Figura 52). A redução do percentual de tempo de exploração do grupo CAF em relação ao CONT-SAL foi de 15%.

Figura 52 - Percentual do tempo de exploração na 1ª sessão ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. * $p\leq 0,05$.

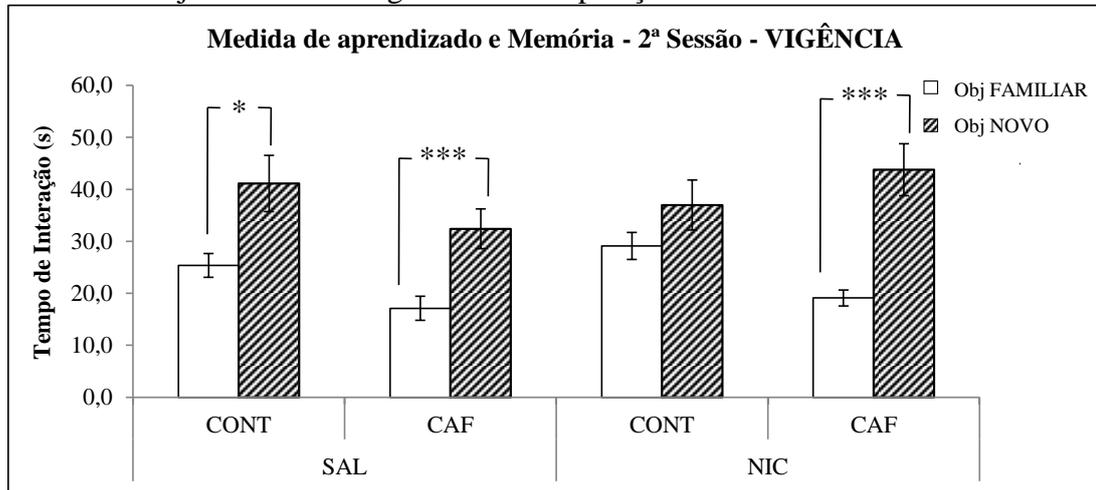
Fonte: A autora, 2016.

Na 2ª sessão, durante a vigência, a ANOVA identificou alterações na memória/aprendizado em decorrência da exposição dos animais a nicotina e cafeína (OBJETO x EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA x EXPOSIÇÃO À NICOTINA: $F_{1,78}=3,5$; $p=0,06$). Todos os grupos, exceto o CONT-NIC, despenderam mais tempo explorando o objeto B (novo) em comparação ao objeto A2 (familiar) (CONT-SAL, $p\leq 0,01$; CONT-NIC, NS; CAF-SAL $p\leq 0,001$, CAF-NIC, $p\leq 0,001$), o que demonstra um déficit cognitivo produzido pela exposição à nicotina (Figura 53). O grupo CONT-SAL despendeu 62% mais tempo explorando o objeto novo em detrimento do familiar, para o CAF-SAL esse aumento foi de 89% e para o CAF-NIC foi de 130%. Já para o grupo CONT-NIC foi de 27%, não alcançando diferença significativa.

Durante a abstinência da nicotina, não foi encontrada interação com a EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA ou EXPOSIÇÃO À NICOTINA, (OBJETO: $F_{1,74}=111,6$; $p\leq 0,001$), todos os grupos experimentais apresentaram maior tempo de interação com o objeto B (novo) em relação ao objeto A2 (familiar) (Figura 54). Nesta idade, o grupo CONT-SAL e CAF-NIC

despenderam 100% mais tempo explorando o objeto novo em detrimento do familiar, para o CAF-SAL esse aumento foi de 179% e para o CONT-NIC foi de 89%.

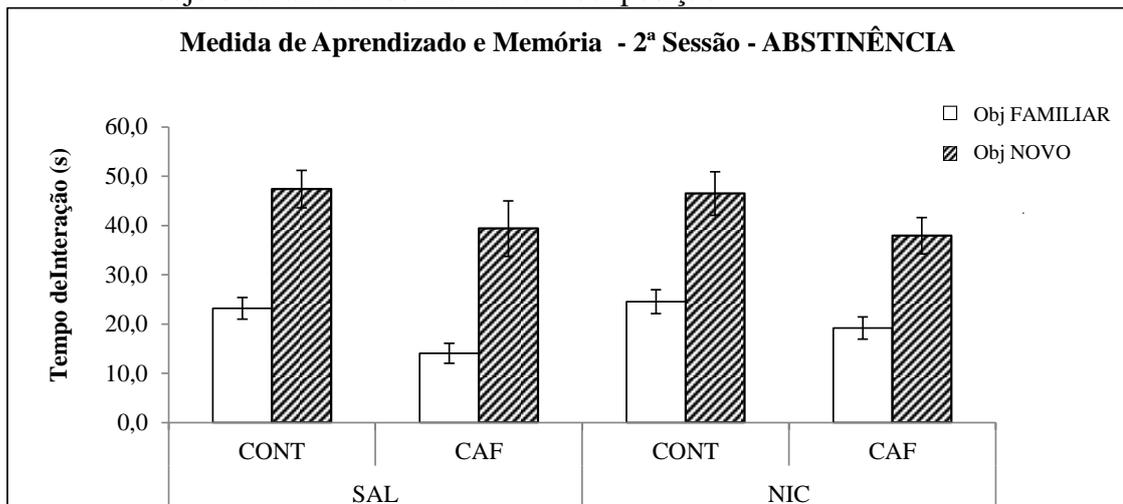
Figura 53 - Tempo, em segundos, despendido explorando o objeto A2 (familiar) ou o objeto B (novo) ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a vigência da coexposição



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN45), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 12; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 9 + ♂ = 11; CAF-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM. * p<0,05; *** p<0,001 .

Fonte: A autora, 2016.

Figura 54 - Tempo, em segundos, despendido explorando o objeto A2 (familiar) ou o objeto B (novo) ao longo de 5 minutos no teste do reconhecimento de objeto durante a abstinência da coexposição



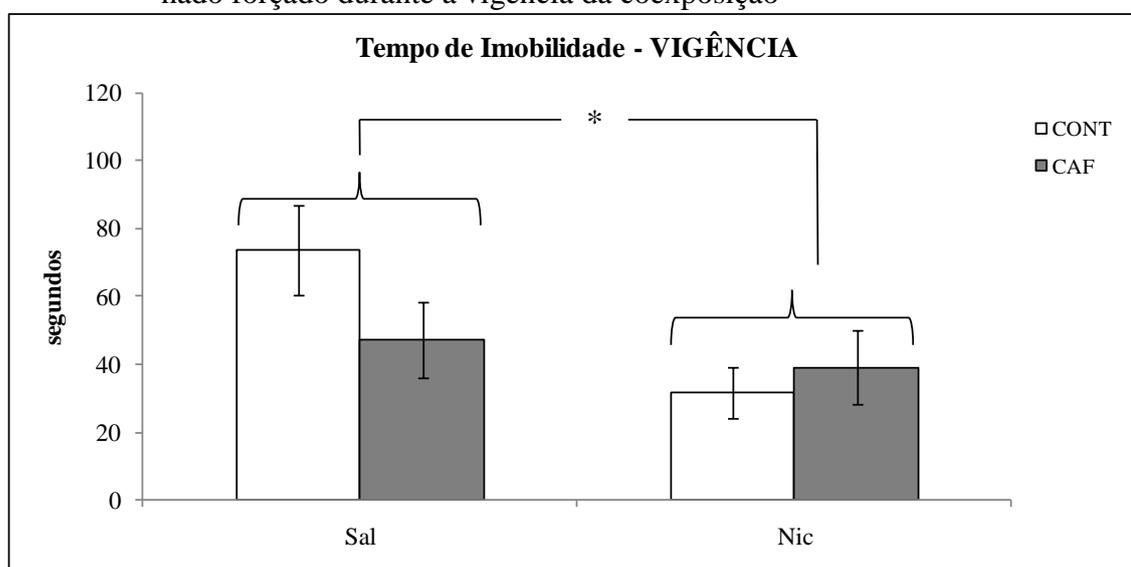
Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 11 + ♂ = 9; CONT-NIC - ♀ = 12 + ♂ = 10 / CAF-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 11). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

4.3.4 Teste do nado forçado

Como podemos observar na Figura 55, durante a coexposição foi encontrado um efeito de EXPOSIÇÃO À NICOTINA ($F_{1,76}=4,8$; $p\leq 0,05$). Os animais expostos a essa droga apresentaram uma redução no tempo de imobilidade, de 40%, demonstrando efeito antidepressivo.

Figura 55 - Tempo de imobilidade, em segundos, ao longo de 6 minutos no teste do nado forçado durante a vigência da coexposição

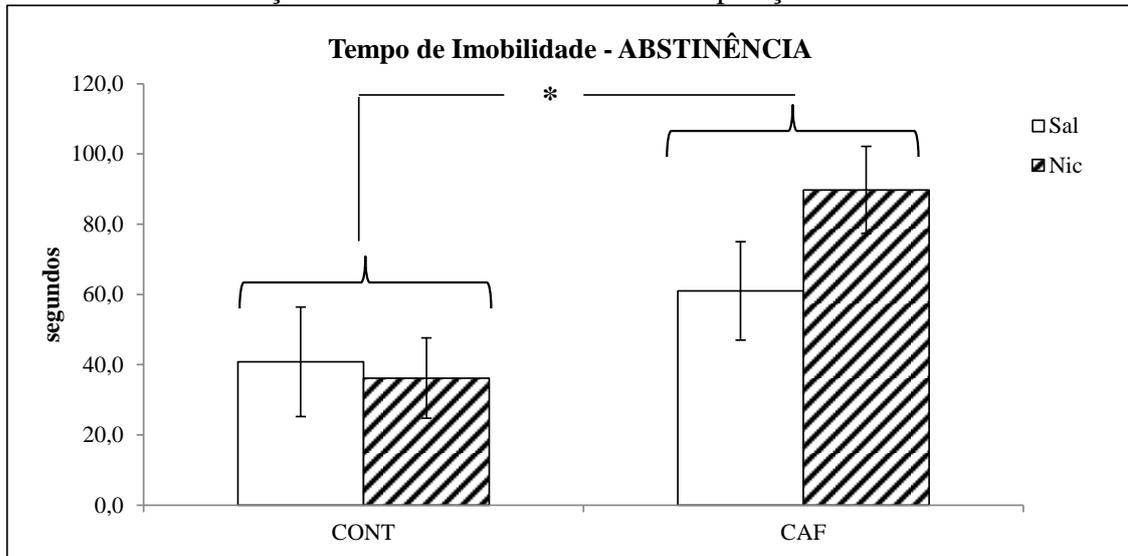


Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN45), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-SAL - ♀ = 10 + ♂ = 11; CONT-NIC - ♀ = 11 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 8 + ♂ = 10; CAF-NIC - ♀ = 8 + ♂ = 10). Valores representam média \pm EPM. PS, $p=0,09$, * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2016.

No entanto, na abstinência de nicotina o resultado foi distinto (EXPOSIÇÃO À CAFEÍNA: $F_{1,64}=6,4$; $p\leq 0,01$). Os grupos expostos à cafeína apresentaram maior tempo de imobilidade, sendo este efeito mais robusto nos animais CAF-NIC, no entanto, a análise estatística não detectou efeito de EXPOSIÇÃO À NICOTINA nem interação entre as drogas (Figura 56). Na média, os animais CAF apresentaram um aumento de 23% no tempo de imobilidade em relação aos CONT. Quando comparado aos CONT-SAL e CONT-NIC, o CAF-NIC apresentou aumento de 120% e 150% respectivamente. Já o grupo CAF-SAL apresentou aumento de 49 e 68% quando comparado aos grupos CONT-SAL e CONT-NIC respectivamente.

Figura 56 - Tempo de imobilidade, em segundos, ao longo de 6 minutos no teste do nado forçado durante a abstinência da coexposição



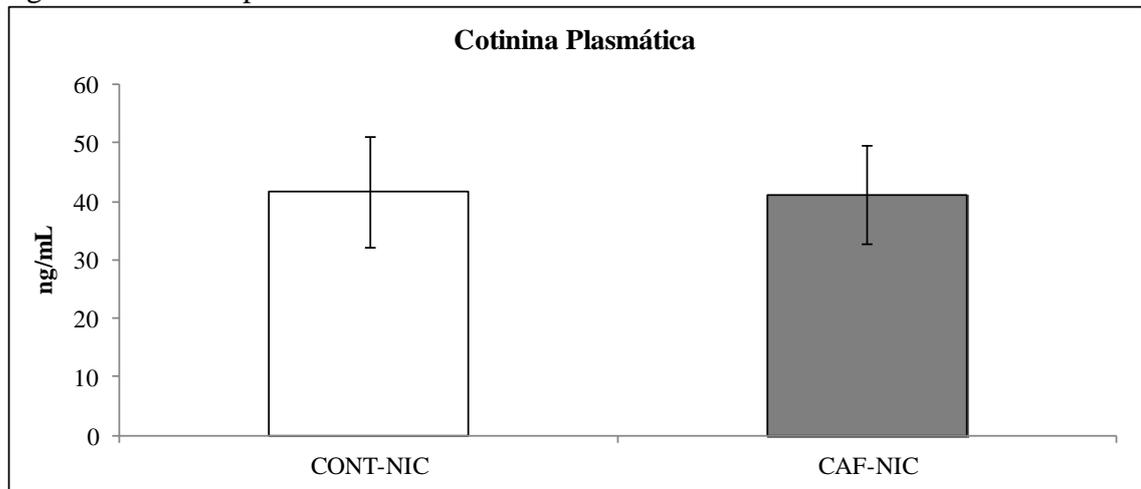
Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de teste (PN49), na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina, estando em abstinência da exposição à nicotina desde PN45 (CONT-SAL - ♀ = 7 + ♂ = 5; CONT-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 9 / CAF-SAL - ♀ = 5 + ♂ = 9; CAF-NIC - ♀ = 10 + ♂ = 10). Valores representam média ±EPM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Fonte: A autora, 2016.

4.3.5 Cotina em sangue

Como descrito na metodologia, o n para a quantificação dos níveis séricos de cotinina não está completo. Os dados obtidos servem apenas para uma noção da concentração plasmática deste metabólito da nicotina. Dessa forma, ainda não foi realizada análise estatística desse parâmetro. Os valores obtidos para os grupos CONT-NIC e CAF-NIC foram semelhantes (44 ng/ml). Quanto aos animais CONT-SAL e CAF-SAL, a quantificação demonstrou níveis abaixo do limite de detecção da técnica, o que já era esperado.

Figura 57 - Níveis plasmáticos de cotinina



Legenda: Proles que não foram expostas à cafeína (CONT) ou que foram expostas cronicamente à cafeína (CAF), desde a gestação até a idade de PN45, na concentração de 0,3g/mL e que, ao completarem PN30, receberam minibombas osmóticas contendo nicotina (na dose de 12mg/kg/dia) ou salina (CONT-NIC - ♀ = 1 + ♂ = 2 / CAF-NIC - ♂ = 2). Valores representam média ±EPM.

Fonte: A autora, 2016.

5 DISCUSSÃO

5.1 Vias de administração, doses e idades

Em humanos, a exposição à cafeína por via oral e ao longo de toda a vida do indivíduo são dois fatores importantes que caracterizam o perfil de exposição a essa droga. A cafeína está contida em bebidas cafeinadas, medicamentos e em comidas, como bolos e barras de chocolate, sendo por isto, majoritariamente auto-administrada por via oral. Diferente de outras drogas, como a nicotina e o álcool, a exposição à cafeína ocorre inclusive durante períodos críticos para o desenvolvimento humano, como a gestação e amamentação, isto porque as agências regulatórias não impõem restrição ao seu uso. É importante notar que, justamente durante fases críticas do desenvolvimento, alterações no metabolismo materno e do feto geram uma maior biodisponibilidade fetal da cafeína (GRESSENS et al., 2001), o que potencialmente gera consequências mais graves. Adicionalmente, a exposição não cessa após o fim do aleitamento; crianças também são expostas à cafeína ao consumirem chocolates, refrigerantes e chás, além disso, foi descrito aumento no consumo bebidas energéticas contendo cafeína nas últimas duas décadas em adolescentes entre 12-19 anos (AHLUWALIA; HENDRICK, 2014).

No presente trabalho, a cafeína foi administrada por via oral, sendo diluída em água potável e desde o primeiro dia de cruzamento das progenitoras até o último dia de avaliação comportamental da prole, de forma a melhor simular a exposição continuada, característica de humanos. Além disso, a avaliação comportamental foi realizada durante a adolescência e sob exposição à cafeína. Esse padrão de exposição não é normalmente encontrado na literatura científica, que, em sua maioria, utiliza exposições que se estendem no máximo até o desmame da prole ou que são restritas a um dos períodos críticos, gestação ou lactação. Sendo assim, as avaliações comportamentais ou neuroquímicas, são conduzidas em condição de retirada da cafeína, geralmente durante a idade adulta (BJORKLUND et al., 2008; FISHER; GUILLET, 1997; PAN; CHEN, 2007; SERAPIAO-MORAES et al., 2013; SILVA et al., 2013; SOELLNER; GRANDYS; NUÑEZ, 2009; ZIMMERBERG et al., 1991).

As concentrações de cafeína utilizadas foram de 0,1 ou 0,3g/L. Segundo Bjorklund e colaboradores (2008), estas doses equivalem a 1-2 ou 3-4 xícaras de café por dia, respectivamente. Adén e colaboradores (2000), tal como Silva e colaboradores (2013),

mostraram que a concentração de 0,3g/L levou a concentrações plasmáticas em ratos fêmeas que são similares às aquelas encontradas em gestantes que consumiram de 3 a 4 copos de café por dia. Além disso, em ratos filhotes com 7 dias de vida, essa concentração de cafeína levou a um nível plasmático comparável ao encontrado no cordão umbilical de recém-nascidos gerados por mães consideradas consumidoras moderadas de café (acima de 3 copos por dia) (BONA et al., 1995; BJORKLUND et al., 2008). Estas são concentrações extensamente utilizadas na literatura em trabalhos que procuram mimetizar exposições em humanos (CAVALCANTE et al., 2014; EL YACOUBI et al., 2000; LAUREANO-MELO et al., 2016; SERAPIAO-MORAES et al., 2013).

Cabe mencionar que ao fazer uma simples conversão da média ingerida pelos animais para estimar a dose em humanos, dados prévios do nosso laboratório (ainda não publicados) mostraram que a concentração de 0,3g/L, resultava em doses de cafeína muito acima do esperado e que não seriam comumente encontradas em humanos. Porém, ao extrapolar os dados obtidos em um modelo experimental para humanos, devemos levar em consideração que há diferenças nas taxas metabólicas entre as espécies que influenciam diferentes processos biológicos, entre eles a farmacocinética de uma droga. Não há um consenso sobre o método mais indicado para realizar essa extrapolação, mas o fato é que se deve levar em conta as diferenças metabólicas inter-espécies (NEHLIG; DEBRY, 1994; SHARMA; MCNEILL, 2009). Uma das formas encontradas na literatura é utilizar uma tabela criada pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (USFDA) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2005) para calcular a Dose Equivalente em Humanos (DEH). Segundo tal tabela, para atingirmos a DEH devemos dividir o valor obtido em mg/dia, considerando a massa corporal de um humano, por um fator específico para cada espécie, que no caso de camundongos é de 12,3 (= *dose obtida no modelo animal [mg/Kg] * 60Kg / 12,3*).

Através da correção apresentada pelo USFDA, os valores obtidos neste estudo se transformam no equivalente a 5 (± 7 mg/Kg/dia) e 13 xícaras (± 20 mg/Kg/dia) de café por dia para as progenitoras. Seguindo o mesmo padrão de cálculos, chegamos a aproximadamente 3 e 8 xícaras de café para as proles dos grupos CAF0,1 e CAF0,3, respectivamente. Dessa forma, levando-se em consideração que a cafeína não está presente somente no café, mas em uma grande diversidade de bebidas e em comidas, como barras e bolos de chocolate, a menor dose poderia ser encontrada em consumidores moderados e a maior dose em consumidores pesados.

A nicotina está contida no tabaco, sendo considerada fundamental no estabelecimento e manutenção da dependência ao tabagismo. Em modelos animais, diversas vias e formas de

administração são utilizadas para realizar exposição à nicotina: via oral através da água de beber, via intraperitoneal ou subcutânea através de injeções únicas ou repetidas ou implantação de minibombas osmóticas e via inalatória através de máquinas de queima de cigarros para pesquisa, cada uma apresentando vantagens e desvantagens (DICKSON et al., 2014; MATTA et al., 2007). No subprojeto 1, esta droga foi administrada através de injeção intraperitoneal, isto porque o objetivo foi avaliar os efeitos agudos da nicotina e esta via permite o controle da dose de exposição além de apresentar rápida absorção. Para realizar uma exposição mais prolongada, no subprojeto 2, a administração subcrônica foi feita através de minibombas osmóticas. Tal via foi escolhida, pois, a) permite o controle da dose de exposição à nicotina, b) envolve níveis menores de estresse, quando comparada a injeções repetidas e c) garante um fluxo constante de infusão da nicotina, mantendo os níveis plasmáticos estáveis (ABREU-VILLAÇA et al., 2003a, 2003b, 2004; NUNES-FREITAS et al., 2011).

Estudos mostram que adolescentes são mais susceptíveis ao tabaco do que adultos, reportando dependência após o uso de poucos cigarros por dia (KANDEL; CHEN, 2000) ou até mesmo sem o uso diário (DI FRANZA et al., 2000). Uma vez estabelecido o uso, indivíduos que iniciaram o hábito durante a adolescência apresentam maior dificuldade em parar de fumar (CHEN; MILLAR, 1998; KLEIN et al., 2004; NELSON et al., 1995; PIERCE; GILPIN, 1996). Dessa forma, observa-se que este é um período crítico para o desenvolvimento da dependência ao tabaco (ABREU-VILLAÇA et al., 2016; ADRIANI et al., 2002; DI FRANZA, 2008) e, por isso, avaliamos os efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante o período equivalente à adolescência em humanos.

A dose utilizada foi de 12 mg/kg/dia, que produziu níveis séricos de cotinina de aproximadamente 41 ng/mL. Como mencionado anteriormente, a quantificação de cotinina sérica está com o *n* incompleto e, posteriormente, novos animais serão acrescentados. Assim, este é um dado prévio, apenas para que tivéssemos noção do padrão de exposição utilizado no presente trabalho. Dickson e colaboradores (2014) reportaram níveis de cotinina de 62 ng/mL após exposição a 24 mg nicotina /Kg/dia em camundongos C57BL/6J, enquanto que dados prévios do nosso laboratório reportam que a exposição à fumaça gerada a partir de cigarros, contendo 1,7 mg nicotina, em camundongos suíços produziu níveis de 109 ng/mL (ABREU-VILLAÇA et al., 2014). Em humanos adolescentes, Caraballo, Giovino e Pechacek (2004) relatam níveis de cotinina plasmáticos de 11,4 ng/mL. Rubinstein e colaboradores (2007) entrevistaram adolescentes fumantes de escolas públicas na Califórnia. Nesse estudo, a idade média dos usuários foi de 15 anos com consumo médio de 3,5 cigarros por dia. A média do

nível sérico de cotinina foi de 44,1 ng/mL, sendo encontrados valores de 1,03 a 162,68 ng/mL, indicando que nesta idade a exposição pode variar muito de indivíduo para indivíduo. Estes dados mostram que nossa dose produziu níveis plasmáticos de cotinina encontrados em adolescentes fumantes que fumam menos de 5 cigarros por dia (RUBINSTEIN et al., 2007).

5.2 Efeitos da cafeína sobre a massa corporal e consumos de ração e solução

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na avaliação de massa corporal e de ingestão de solução e de ração das progenitoras durante o período da lactação. Nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos da literatura (SERAPIAO-MORAES et al., 2013; SILVA et al., 2013) e demonstram que ambas as doses utilizadas não produziram efeitos adversos capazes de refletir no ganho de massa corporal ou na saciedade.

Em relação à prole, até PN30 a massa corporal dos três grupos experimentais aumentou de maneira proporcional, demonstrando que a cafeína, até esta idade, não afetou o ganho de massa. Contudo, a partir de PN30, os animais CAF apresentaram menor massa corporal em relação ao grupo CONT, não sendo detectados efeitos relacionados à exposição à nicotina. O efeito da exposição à cafeína sobre a massa corporal também foi encontrado em outros estudos (CAVALCANTE et al., 2014; SERAPIAO-MORAES et al., 2013; SILVA et al., 2013). Já foram demonstrados efeitos de aumento de gasto energético provocados pela cafeína, onde animais expostos apresentaram aumento do consumo máximo de oxigênio e maior frequência cardíaca no repouso quando comparados aos controles (SERAPIAO-MORAES et al., 2013), efeitos que estão associados à ativação simpática. Consoante a isto, Zhao e colaboradores (2016), demonstraram que a cafeína aumenta atividade de enzimas que regulam o metabolismo lipídico, como a acil-CoA oxidase, carnitina acil-transferase e lipase hormônio-sensível, influenciando os níveis de RNAm e de expressão destas proteínas, resultando em perda de massa corporal. Além disso, conforme descrito em outros trabalhos da literatura, neste trabalho, não houve diferença entre os grupos em relação ao consumo de ração e solução, desde o desmame até PN50 (BONA et al., 1995; CAVALCANTE et al., 2014; SILVA et al., 2013), o que reforça a teoria de que a cafeína teria atuado no ganho de massa corpórea através dos mecanismos de aumento no gasto energético e na lipólise.

5.3 Efeitos da exposição crônica à cafeína na susceptibilidade à nicotina – comportamento e neuroquímica

No subprojeto 1 realizamos dois testes comportamentais para avaliar os efeitos da exposição crônica à cafeína na susceptibilidade à nicotina. Assim, em PN30, os animais foram designados para o CA ou CPP, nos quais foram expostos à nicotina de forma aguda.

No CA o objetivo foi avaliar se a cafeína alteraria a resposta a um efeito já conhecido da nicotina neste teste, que é a indução de aumento da atividade locomotora para a dose utilizada e, dessa forma, verificar a influência da exposição crônica à cafeína sobre a susceptibilidade aos efeitos agudos da nicotina. A indução de hiperatividade locomotora pela nicotina foi observada, no entanto, os animais CAF0,1-NIC e CAF0,3-NIC apresentaram aumento na ambulação em resposta à nicotina proporcional ao CONT-NIC, ou seja, a exposição crônica à cafeína não foi capaz de alterar a resposta à esta dose de nicotina, demonstrando que não houve aumento da susceptibilidade à nicotina.

O CPP é um teste utilizado para estudar propriedades de recompensa de drogas de abuso em roedores, no qual o objetivo é que o animal associe os efeitos da droga ao ambiente em que ela é administrada. Neste trabalho a nicotina foi pareada com o lado em que o animal permaneceu menos tempo no seu primeiro contato com o equipamento, que chamamos de pré-teste. Dessa forma, se após o condicionamento o animal inverte a preferência estabelecida previamente, assume-se então que houve associação dos efeitos da droga com o ambiente no qual ela foi administrada. Foi observado que os 3 grupos expostos a nicotina realizaram esta associação, no entanto, conforme visto para o CA, os animais expostos cronicamente à cafeína responderam à nicotina de forma similar ao grupo controle (somente exposto a nicotina). Assim, os parâmetros utilizados para verificação da susceptibilidade à nicotina demonstram que a exposição crônica à cafeína não foi capaz de alterar os efeitos da nicotina. Os nAChRs, alvos primários da nicotina, são expressos em todo o SNC e podem atuar na modulação da transmissão sináptica de outros neurotransmissores, como a dopamina por exemplo (DAJAS-BAILADOR; WONNACOTT, 2004). Em particular, no estriado, a interação entre a sinalização colinérgica e dopaminérgica está envolvida nos processos cognitivos, nas respostas motoras e nas informações relacionadas à recompensa de drogas (CALABRESI et al., 2006; FERRE, 2016). Esta estrutura é composta por uma região dorsal, a qual é um dos componentes da “via dopaminérgica mesoestriatal”, e uma região ventral que está associada a processos límbicos, sendo esta região conhecida como núcleo acumbente, que

é um dos componentes da “via dopaminérgica mesolímbica”. A via mesoestriatal está envolvida na geração de movimentos e no aprendizado, enquanto a mesolímbica desempenha papel crucial nos efeitos motivacionais e de recompensa de inúmeras drogas de abuso, incluindo a nicotina (LAVIOLETTE; VAN DER KOOY, 2004). Esta é a base de uma teoria bem conhecida, a Teoria da Estimulação Psicomotora da Adição (FERRE, 2016; WISE; BOZARTH, 1987), na qual a ativação psicomotora e os efeitos de recompensa são resultantes do mesmo mecanismo, que é o aumento da transmissão dopaminérgica. A nicotina pode ativar neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo e em terminais dopaminérgicos pré-sinápticos no estriado, levando a liberação de DA e desta forma modulando o controle dopaminérgico sobre a atividade locomotora e sobre os processos de recompensa (CALABRESI; LACEY; NORTH 1989; KLOET; MANSVELDER; DE VRIES, 2015; PICCIOTTO, 1998; PIDOPLICHKO et al., 1997), assim, um aumento na atividade locomotora estaria refletindo um aumento na propriedade de recompensa da nicotina.

Em relação à cafeína, seu mecanismo de ação primário é o antagonismo não-seletivo de receptores A_1 e A_{2A} . Dentre os diversos efeitos desta droga, encontram-se os efeitos psicoestimulantes, associados principalmente com os receptores A_{2A} . Este subtipo é amplamente expresso no corpo estriado e, em níveis menores, também no hipocampo e no córtex cerebral. Interessantemente, receptores A_{2A} se colocizam com receptores D_2 e interagem com eles, formando complexos heteroméricos e convergindo na mesma via de transdução de sinal. Estes receptores possuem ações opostas, assim, o antagonismo de receptores adenosinérgicos leva a ativação da transmissão dopaminérgica (BJORKLUND et al., 2008; KANDA, 2014; LÓPEZ-CRUZ et al., 2014; MAXIMINO et al., 2011; YAMADA; KOBAYASHI), o que explica o envolvimento da cafeína nas propriedades de recompensa de outras drogas, sendo esses complexos A_{2A} - D_2 também envolvidos na ativação psicomotora provocada pela cafeína (FERRE, 2016).

Curiosamente, além de evidências na literatura científica de interação entre os sistemas colinérgico e adenosinérgico (JUSTINOVA et al., 2009; LIU; JERNIGAN, 2012; METAXAS et al., 2013), como descrito acima, ambas, a nicotina e a cafeína, atuando respectivamente em receptores colinérgicos e adenosinérgicos, modulam a atividade de diversos outros sistemas de neurotransmissores, como o sistema dopaminérgico (SLOTKIN; SEIDLER, 2009; XIAO et al., 2009; ZHAO; CHEN; SHARP, 2007), o que levanta a possibilidade de interações neuroquímicas que reflitam em alterações na locomoção e nos sistemas de recompensa, o que é consistente com dados da literatura que descrevem interações positivas entre essas duas

drogas (GASIOR et al., 2000; JUSTINOVA et al., 2009; METAXAS et al., 2013; NIKODIJEVIĆ; JACOBSON; DALY, 1993; SHOAIB et al., 1999; SWEENEY et al., 2016).

Em contraste com estes dados prévios, aqui, verificamos que a exposição crônica a cafeína durante toda a vida do animal, não interferiu com a resposta da nicotina, tanto na avaliação comportamental como na neuroquímica. Resultados divergentes entre estudos prévios e nossos dados podem ser explicados por diferenças nas metodologias empregadas: i) a exposição à cafeína; nos estudos citados esta ocorria pontualmente durante o período de testes ou ainda que ocorresse previamente, não se estendia desde o período embrionário e até o período de teste; ii) a idade de avaliação; os trabalhos, em sua maioria, avaliam tais efeitos durante a idade adulta, sendo este um dos primeiros trabalhos a avaliar tais efeitos durante o período equivalente à adolescência; iii) os testes comportamentais empregados; os trabalhos citados incluem auto-administração e *discriminative-stimulus*, enquanto neste utilizamos o CA e o CPP para avaliar a susceptibilidade à nicotina.

Particularmente, levando-se em consideração o nosso modelo de exposição, uma possível explicação para os resultados obtidos é que a exposição crônica à cafeína tenha conduzido ao desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos (DALY, 1993; SHI et al., 1994). Considerando esta hipótese, o antagonismo dos receptores A_{2A} estaria comprometido e, sabendo da interação existente entre estes receptores e os receptores D_2 , podemos sugerir que o aumento na transmissão dopaminérgica induzido pelo antagonismo adenosinérgico não estaria ocorrendo, assim, não haveria aumento na resposta à nicotina. De fato, temos que os efeitos estimulantes da cafeína decorrem do antagonismo do A_{2A} no estriado (FERRE, 2016; JUSTINOVA et al., 2009), e, no modelo utilizado neste trabalho a cafeína não produziu efeitos estimulantes no CA, o que reforça a ideia de que não houve aumento na transmissão dopaminérgica em resposta a cafeína, indicando que esta não interferiu nas propriedades de recompensa da nicotina.

Corroborando esta hipótese, sabe-se que os efeitos da cafeína sobre a atividade locomotora apresentam caráter bifásico, sendo estimulante em baixas doses e depressora em altas doses. A administração de 0,3g/L de cafeína durante a gestação e lactação produz menor atividade locomotora em PN14 (SOUZA et al., 2015), assim como na administração de 1g/L (NIKODIJEVIĆ; JACOBSON; DALY, 1993). Além disso, há descrição de tolerância aos efeitos estimulantes da cafeína sobre a ambulação após a exposição crônica (LORENZO et al., 2000; NIKODIJEVIĆ; JACOBSON; DALY, 1993; TANDA; GOLDBERG, 2000) e discute-se que esta tolerância pode ser decorrente da suprarregulação e dessensibilização dos

receptores de adenosina, provocado pela exposição crônica a esta droga (GREEN; STILES, 1986; HAWKINS et al., 1988).

Considerando a importância do sistema dopaminérgico nos processos de recompensa de drogas (CALABRESI et al., 2006; FERRE, 2016), e que estudos têm mostrado que sistemas cerebrais ligados ao estresse desempenham papel fundamental na iniciação, manutenção e recaída do uso de tabaco (BRUIJNZEEL, 2012), neste trabalho quantificamos as concentrações das monoaminas dopamina, DOPAC (metabólito da dopamina), o turnover ($[DOPAC] / [dopamina]$) e norepinefrina. A região escolhida foi o córtex cerebral, pois, em relação à dopamina, este neurotransmissor é encontrado em grandes quantidades nas regiões dos gânglios basais, especialmente no núcleo acumbente, caudado e tubérculo olfatório, além áreas do córtex frontal e da amígdala.

No que tange a avaliação neuroquímica, os dados obtidos fortalecem a hipótese de tolerância aos efeitos da cafeína, uma vez que a exposição crônica a esta droga, por si só, não alterou a concentração de dopamina no córtex cerebral em ambos os testes. Também não foram encontradas interações entre as drogas, o que igualmente corrobora os dados comportamentais, onde a exposição crônica à cafeína não alterou a susceptibilidade à nicotina. A exposição aguda à nicotina, apesar de ter provocado alterações comportamentais, não provocou aumento de dopamina no córtex cerebral.

5.4 Efeitos da coexposição à cafeína e nicotina durante a adolescência

5.4.1 Sobre o comportamento associado à ansiedade

A ansiedade tem sido descrita como um traço comportamental importante no desenvolvimento do uso e abuso de drogas (FALCO; BEVINS, 2015). Neste trabalho, este comportamento foi avaliado em 2 momentos, sob condições diferentes: a) em PN30, após injeção de nicotina ou salina no teste do CA e b) em PN45 ou PN50, durante a coexposição ou sob a retirada de nicotina, através do teste do LCE e também no CA. No CA, em PN30, foi observado efeito ansiogênico da exposição crônica a cafeína, ocorrendo interação entre as duas drogas, uma vez que o grupo CAF-NIC não apresentou alteração no comportamento. Em PN45, encontramos efeitos ansiolíticos associados a exposição prolongada à nicotina no

LCE, enquanto que no CA foi identificado efeito ansiogênico da cafeína. Em PN50, a cafeína apresentou efeitos ansiolíticos em ambos os testes.

Em modelo de exposição que se assemelha ao utilizado neste trabalho, Laureano-Melo e colaboradores (2016) também encontraram efeito ansiogênico para CAF (0,3g/L) no CA. Nesse sentido, tanto em animais como em humanos, efeitos ansiogênicos estão associados a administração de antagonistas não-seletivos de receptores adenosinérgicos, como a cafeína, e em doses altas (LÓPEZ-CRUZ et al., 2014; SWEENEY et al., 2016; YAMADA; KOBAYASHI; KANDA, 2014). Curiosamente, em PN50, a cafeína apresentou efeitos ansiolíticos no LCE. Neste momento, é importante que duas observações sejam feitas: a) no LCE, em PN45 não houve qualquer alteração nos níveis de ansiedade dos animais CAF; e b) deve-se levar em consideração que os animais avaliados em PN50 haviam sido submetidos a uma segunda cirurgia para retirada das minibombas osmóticas em PN45, portanto, não há como excluir a influência desta manipulação no resultado obtido no LCE. Nesse contexto, Meyer e Caston (2004, 2005) mostraram que o estresse altera efeitos da cafeína. Pierard e colaboradores (2015) também demonstraram que o estresse agudo bloqueia os efeitos da cafeína sobre a recuperação da memória. Interessantemente, Pechlivanova e colaboradores (2012), obtiveram resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho. No artigo citado, a cafeína *per se*, produziu efeitos ansiogênicos no LCE, no entanto, em animais expostos a CAF e também submetidos a estresse imprevisível, a cafeína produziu efeitos ansiolíticos. Além disso, no CA não foram encontradas diferenças entre os animais expostos somente à cafeína e aqueles submetidos ao estresse também. Estes dados mostram que o estresse pode alterar o padrão de resposta à cafeína e que o teste do LCE é mais sensível a estas alterações, sendo estas possíveis explicações para os resultados encontrados neste trabalho no comportamento associado à ansiedade.

A nicotina aguda, *per se*, não alterou os parâmetros de comportamento associado à ansiedade, contudo após 15 dias de exposição contínua, a nicotina gerou efeitos ansiolíticos em PN45 no LCE e no CA. Em humanos, o ato de fumar está relacionado a redução da ansiedade (KASSEL; UNROD, 2000), em roedores, a exposição à nicotina também está associada a efeitos ansiolíticos (ADRIANI et al., 2004; ELLIOTT et al., 2004).

Interações entre a cafeína e a nicotina são bem relatadas na literatura (NIKODIJEVIĆ; JACOBSON; DALY, 1993; SHOAIIB et al., 1999; GASIOR et al., 2000; WHITE, 1988). Um exemplo é o trabalho realizado por Rose (1987), que descreve prevenção do aumento do estado de alerta provocado pelo uso prévio de cafeína em decorrência do uso de cigarros, similarmente ao encontrado neste trabalho, onde a exposição às duas drogas resultou em

alteração de um comportamento estabelecido pela exposição exclusiva a uma das drogas. No que diz respeito ao comportamento associado à ansiedade, estas interações também foram identificadas. No nosso estudo, em PN30 a cafeína apresentou efeito ansiogênico no CA, efeito este que foi impedido pela exposição aguda à nicotina. Este dado sugere uma interação funcional entre essas drogas, atuando na regulação do comportamento associado à ansiedade.

5.4.2 Sobre a atividade locomotora

Assim como o comportamento associado à ansiedade, a atividade locomotora foi avaliada em PN30, PN45 e PN50, sob as mesmas condições mencionadas acima. Em PN30, no CA, a administração aguda de nicotina induziu aumento na locomoção enquanto que a cafeína, isolada ou em associação à nicotina, não foi capaz de promover alterações na atividade ambulatoria; já em PN45, foi observada uma redução da atividade locomotora provocada pela cafeína. Em PN50, no LCE, a retirada de nicotina promoveu aumento na ambulação, sendo este efeito impedido pela exposição prévia à cafeína; no CA foi identificado efeito de redução na atividade locomotora em resposta à exposição crônica à cafeína. Além disso, também foi observado um menor número *head dips* em resposta à retirada da nicotina no LCE, este comportamento está associado à atividade exploratória (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; DALVI, 1997). Adicionalmente, também foi avaliado o percentual de exploração dos objetos durante a 1ª sessão no teste do RO, como um indicador de atividade exploratória. Tanto em PN45 como em PN50, foi encontrada uma menor exploração dos objetos para os animais expostos à cafeína, apontando para um efeito de redução de atividade gerado por esta droga, que também foi encontrado no teste do CA.

Os efeitos da nicotina aguda e da cafeína sobre a atividade locomotora obtidos foram detalhadamente abordados na seção 5.3, que trata da susceptibilidade aos efeitos agudos da nicotina após exposição crônica à cafeína. Resumidamente, a exposição continuada a cafeína não interferiu no efeito de aumento da atividade locomotora induzido pela exposição aguda a nicotina.

5.4.3 Sobre o aprendizado e memória

A literatura científica aponta papel relevante dos receptores de adenosina, principalmente dos A_{2a}, sobre os processos de memória (CHEN, 2014; DALL'IGNA et al., 2003; 2007; ESPINOSA et al., 2013), além disso, a adenosina é neuromodulador que exerce influência sobre a liberação de vários neurotransmissores, incluindo a acetilcolina (ACh) (ACQUAS; TANDA; DI CHIARA, 2002; SOUZA et al., 2015), que por sua vez também possui reconhecido papel sobre o aprendizado e memória (MCQUISTON, 2014). Assim, os processos cognitivos são um potencial alvo das interações entre essas drogas.

Este comportamento foi avaliado através do teste do reconhecimento de objetos, durante a vigência e retirada da coexposição. Durante a 1ª sessão, não foram encontradas diferenças em relação ao tempo de exploração entre os objetos A1 e A2. Estes dados indicam que não houve preferência dos animais por uma das posições da caixa, o que poderia ter influenciado nos resultados obtidos na 2ª sessão, uma vez que a substituição pelo objeto novo ocorria sempre na mesma posição.

Para a 2ª sessão, em vigência da coexposição, os animais CONT-NIC apresentaram déficit cognitivo, no entanto, nos animais CAF-NIC este efeito foi não encontrado, o que demonstra que a exposição à cafeína foi capaz de impedir os efeitos negativos gerados pela nicotina sobre o aprendizado e memória. Aqui cabe lembrar que, a cafeína promoveu uma menor exploração dos objetos já na 1ª sessão, porém, isto não influenciou o reconhecimento do objeto novo e, conseqüentemente, o comportamento de memória e aprendizado. Após 5 dias de retirada, a nicotina não mais exerceu efeitos sobre este comportamento e todos os grupos apresentaram desempenho semelhante, de maior exploração do objeto novo. A exposição aguda à nicotina é conhecida por produzir melhora no aprendizado e memória. Contudo a exposição crônica, particularmente durante a adolescência que é um período mais sensível aos efeitos neurotóxicos da nicotina, tem sido associada a déficits cognitivos, tanto em modelos animais como em humanos (JACOBSEN et al., 2005; KUTLU; GOULD, 2015; SLOTKIN, 2002; TRAUTH et al., 2000). Em consistência com esses achados, dados prévios do nosso grupo demonstraram efeitos negativos sobre o aprendizado e memória após exposição crônica em período equivalente à adolescência em humanos (ABREU-VILLAÇA et al., 2007, 2013). Cinco dias após a retirada de nicotina não foram mais encontrados efeitos desta droga sobre o aprendizado e memória o que indica que os efeitos são transitórios.

Diversos trabalhos vêm demonstrando os efeitos benéficos da administração de cafeína sobre o aprendizado e memória, tanto em modelos animais como em humanos (COSTA et al., 2008a, 2008b; JOHNSON-KOZLOW et al., 2002; PREDIGER; BATISTA; TAKAHASHI, 2005), contudo, no presente trabalho, a cafeína, por si só, não promoveu melhoras quando comparada ao CONT. Considerando que a exposição prolongada à nicotina promoveu danos cognitivos e a exposição crônica à cafeína foi capaz de impedir este efeito nos animais co-expostos, podemos, mais uma vez, apontar uma interação entre os efeitos das duas drogas, onde a cafeína apresentou um efeito neuroprotetor. Da mesma forma, estudos epidemiológicos mostram que o consumo habitual de cafeína está associado à menor risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (CAPPELLETTI et al., 2015; DALL'IGNA et al., 2003) e de déficit cognitivo causado pela idade em idosos (COSTA et al., 2008a, 2008b). Estes trabalhos indicam diante de condições que produzem alteração da homeostase cerebral, que por sua vez, podem acarretar diversas consequências, entre elas, prejuízos cognitivos, a exposição prévia e crônica à cafeína atua na prevenção ou na atenuação desses desfechos.

5.4.4 Sobre o comportamento associado à depressão

O teste do nado forçado foi utilizado para avaliar o comportamento associado à depressão durante a vigência e a retirada da coexposição. Em PN45, os animais CONT-NIC e CAF-NIC apresentaram redução no tempo de imobilidade em relação aos grupos CONT-SAL e CAF-SAL. Já em PN50, a retirada de nicotina não afetou este parâmetro, porém, os animais CAF (CAF-SAL e CAF-NIC) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade em relação aos animais controle (CONT-NIC e CONT-SAL).

Uma observação importante a ser feita é que, após a cirurgia de implantação das minibombas osmóticas, foi mantido apenas um animal por caixa e, sabe-se que o isolamento social é um fator que está envolvido no comportamento associado à depressão (FONE; PORKESS, 2008). Assim, considerando que todos os animais foram mantidos sob a mesma condição de isolamento e que durante a vigência encontramos menor tempo de imobilidade nos animais expostos à nicotina (CONT-NIC e CAF-NIC), isto reforça o efeito do tipo anti-depressivo dessa droga.

Os efeitos positivos da nicotina sobre o comportamento associado à depressão são bem conhecidos (MANNUCCI et al., 2006; SALIN-PASCUAL et al., 1996), corroborando os nossos achados de diminuição do tempo de imobilidade nos animais CONT-NIC e CAF-NIC. Contudo, a retirada de nicotina é conhecida por induzir aumento no comportamento associado à depressão (INIGUEZ et al., 2009; MANNUCCI et al., 2006; ZANIEWSKA et al., 2010), o que não foi observado em nossos resultados.

Quanto aos efeitos da cafeína, a literatura mostra que a exposição a esta droga está associada a efeitos anti-depressivos (EL YACOUBI et al., 2003; PECHLIVANOVA et al.; 2012; TURGEON et al., 2016), contudo, obtivemos resultados opostos. Tem sido descrito papel relevante dos receptores A_{2A} no comportamento associado à depressão, apontando efeitos anti-depressivos decorrentes do antagonismo desse receptor (EL YACOUBI et al., 2001, 2003, 2013). Como discutido acima, os efeitos estimulantes da cafeína estão relacionados a este subtipo de receptor adenosinérgico, e neste trabalho, encontramos efeito de redução da atividade locomotora, que é um indicador do desenvolvimento de tolerância aos efeitos estimulantes da cafeína. Adicionalmente, o agonismo não seletivo de receptores adenosinérgicos têm sido associados a efeitos associados à depressão (KULKARNI; MEHTA, 1985; WOODSON et al., 1998). Juntas essas informações reforçam o desenvolvimento de tolerância à cafeína, conforme abordado em itens anteriores.

CONCLUSÕES

Nossos resultados do subprojeto 1 mostraram que no início da adolescência (PN30), a exposição crônica à cafeína por toda a vida do animal, não interferiu na susceptibilidade aos efeitos agudos da nicotina. Ainda nesta fase, a cafeína gerou efeito ansiogênico que foi revertido pela exposição aguda à nicotina. Como indicado pelos resultados do subprojeto 2, em fases mais tardias da adolescência, a cafeína provocou uma diminuição na atividade, aumento no comportamento associado à ansiedade e, mais tardiamente, efeitos ansiolíticos, sendo estes revertidos pela retirada de nicotina. A exposição à nicotina provocou efeito ansiolítico, déficit cognitivo, que foi revertido pela exposição à cafeína, e efeito anti-depressivo. Foram identificadas interações entre as drogas no comportamento associado à ansiedade e aprendizado e memória. Juntos, esses dados indicam que apesar de não alterar a susceptibilidade aos efeitos agudos da nicotina, após exposição prolongada à nicotina e/ou sua retirada, essas drogas interagem, sendo necessários estudos posteriores para melhor entender os mecanismos envolvidos nessas interações.

REFERÊNCIAS

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. A ten fold reduction of nicotine yield in tobacco smoke does not spare the central cholinergic system in adolescent mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 52, p. 93-103, 2016.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behavioural brain research*, v. 181, n. 1, p. 136-146, 2007.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short-and long-term modulation of anxiety-like behavior. *Drug & Alcohol Dependence*, v. 133, n. 1, p. 52-60, 2013.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 12, n. 7, p. 776-780, 2010.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behavioural Brain Research*, v. 167, p. 175-182, 2006.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Research*, v. 979, n. 1-2, p. 114-128, 2003a.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 879-890, 2004.

ABREU-VILLAÇA, Y. et al. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, p. 1935-1949, 2003b.

ABREU-VILLAÇA Y. et al. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 232, n. 10, p. 1693-1703, 2015.

ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural Brain Research*, v. 221, n. 2, p. 367-378, 2011.

ABREU-VILLAÇA, Y.; SEIDLER, F.; SLOTKIN, T. A. Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology*, v. 29, p. 1440-1450, 2004.

ABREU-VILLAÇA, Y.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Impact of adolescent nicotine exposure on adenylyl cyclase-mediated cell signaling: enzyme induction, neurotransmitter-

specific effects, regional selectivities, and the role of withdrawal. *Brain Research*, v. 988, n. 1-2, p. 164-172, 2003.

ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 27, n. 2, p. 182, 2002.

ADRIANI, W.; CHIAROTTI, F.; LAVIOLA, G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, p. 1152-1166, 1998.

ADRIANI, W. et al. Behavioral and neurochemical vulnerability during adolescence in mice: studies with nicotine. *Neuropsychopharmacology*, v. 29, n. 5, p. 869–878, 2004.

ADRIANI, W. et al. Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology*, v. 27, p. 212-224, 2002.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*, v. 39, n. 2, p. 334-346, 2000.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behavioral Neuroscience*, v. 117, p. 695-703, 2003.

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology*, v. 15, p. 341-352, 2004.

ÁDÉN, U. et al. Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatric research*, v. 48, n. 2, p. 177, 2000.

AHLUWALIA, N.; HERRICK, K. Caffeine Intake from Food and Beverage Sources and Trends among Children and Adolescents in the United States: Review of National Quantitative Studies from 1999 to 2011–5. *Advances in Nutrition*, v. 6, n. 1, p. 102-111, 2015.

ALTIMARI, L. R. et al. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 17-27, 2006.

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, p. 3-18, 2003.

ARAMAKIS, V. B.; METHERATE, R. Nicotine selectively enhances NMDA receptor-mediated synaptic transmission during postnatal development in sensory neocortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society for Neuroscience*, v. 18, p. 8485-8495, 1998.

ARAÚJO, D. M. et al. Characterization of N- [3H] Methylcarbamylcholine Binding Sites and Effect of N- Methylcarbamylcholine on Acetylcholine Release in Rat Brain. *Journal of neurochemistry*, v. 51, n. 1, p. 292-299, 1988.

ARNAUD, M. J. Comparative metabolic disposition of [1-Me14C] caffeine in rats, mice, and Chinese hamsters. *Drug metabolism and disposition*, v. 13, n. 4, p. 471-478, 1985.

ARNETT, J. J. Adolescent storm and stress, reconsidered. *The American Psychologist*, v. 54, p. 317-326, 1999.

ARRAZOLA, R. A. et al. Tobacco use among middle and high school students-United States, 2000-2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 59, n. 33, p. 1063-1068, 2010.

BALFOUR, D. J. et al. Sensitization of the mesoaccumbens dopamine response to nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 59, p. 1021-1030, 1998.

BARDO, M. T.; BEVINS, R. A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, v. 153, n. 1, p. 31-43, 2000.

BENES, F. M. Myelination of cortical-hippocampal relays during late adolescence. *Schizophrenia Bulletin*, v. 15, p. 585-593, 1989.

BENOWITZ, N. L. *Nicotine safety and toxicity*. New York: Oxford University Press, 1998.

BENOWITZ, N. L. et al. Influence of smoking fewer cigarettes on exposure to tar, nicotine, and carbon monoxide. *New England Journal of Medicine*, v. 315, n. 21, p. 1310-1313, 1986.

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 192, p. 29-60, 2009.

BENOWITZ, N. L.; ZEVIN, S.; JACOB, P. Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 287, n. 3, p. 958-962, 1998.

BERTHOU, F. et al. Interspecies variations in caffeine metabolism related to cytochrome P4501A enzymes. *Xenobiotica*, v. 22, p. 671-680, 1992.

BICKFORD, P. C. et al. Inhibition of Purkinje cell firing by systematic administration of phenylisopropyl adenosine: Effect of central noradrenaline depletion by DSP. *Life sciences*, v. 37, n. 3, p. 289-297, 1985.

BJÖRKLUND, O. et al. Perinatal caffeine, acting on maternal adenosine A1 receptors, causes long-lasting behavioral changes in mouse offspring. *PLoS One*, v. 3, n. 12, p. e3977, 2008.

BOGDANOVA, O. V. et al. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & behavior*, v. 118, p. 227-239, 2013.

BONA, Elsa et al. The effect of long term caffeine treatment on hypoxic-ischemic brain damage in the neonate. *Pediatric research*, v. 38, n. 3, p. 312, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Tabaco e pobreza, um círculo vicioso - a Convenção Quadro de Controle do Tabaco: uma resposta. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

BRIELMAIER, J. M.; MCDONALD, C. G.; SMITH, R. F. Immediate and long-term behavioral effects of a single nicotine injection in adolescent and adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 29, p. 74-80, 2007.

BRODY, A. L. et al. Nicotinic acetylcholine receptor availability in cigarette smokers: effect of heavy caffeine or marijuana use. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 233, n. 17, p. 3249-3257, 2016.

BROWN, Christopher R.; BENOWITZ, Neal L. Caffeine and cigarette smoking: behavioral, cardiovascular, and metabolic interactions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 34, n. 3, p. 565-570, 1989.

BRUIJNZEEL, A. W. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 36, n. 5, p. 1418-1441, 2012.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 1819-1829, 2001.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, p. 130-136, 2002.

CALABRESI, P. et al. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine–acetylcholine synaptic balance. *The Lancet Neurology*, v. 5, n. 11, p. 974-983, 2006.

CALABRESI, P.; LACEY, M. G.; NORTH, R. A. Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. *British Journal of Pharmacology*, v. 98, n. 1, p. 135-140, 1989.

CAPPELLETTI, S. et al. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug?. *Current neuropharmacology*, v. 13, n. 1, p. 71-88, 2015.

CARABALLO, R. S.; GIOVINO, G. A.; PECHACEK, T. F. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among US adolescents. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 6, n. 1, p. 19-25, 2004.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CAVALCANTE, F. S. et al. The testis of the mice C57/BL6 offspring in adulthood have alterations due to maternal caffeine consumption. *Acta cirurgica brasileira*, v. 29, n. 1, p. 16-23, 2014.

CAYETANOT, F.; LARNICOL, N.; PEYRONNET, J. Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control, experimental data. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 168, n. 1-2, p. 92-100, 2009.

- CELIK, E.; UZBAY, I. T.; KARAKAS, S. Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 30, n. 1, p. 50-55, 2006.
- CHAMBERS, R. A.; KRYSTAL, J. H.; SELF, D. W. A neurobiological basis for substance abuse comorbidity in schizophrenia. *Biological psychiatry*, v. 50, n. 2, p. 71-83, 2001.
- CHEETA, S. et al. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology*, v. 25, p. 601-607, 2001.
- CHEN, J.; MILLAR, W. J. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Reports*, v. 9, p. 39-46, 1998.
- CHEN, D.; PATRICK, J. W. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 38, p. 24024-24029, 1997.
- CHEN, J. F. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *International review of neurobiology*, v. 119, p. 257-307, 2014.
- CHIU, Y. N. et al. Demographic and perinatal factors for behavioral problems among children aged 4–9 in Taiwan. *Psychiatry and clinical neurosciences*, v. 63, n. 4, p. 569-576, 2009.
- CHUGANI, H. T. Neuroimaging of developmental nonlinearity and developmental pathologies. In: THATCHER, R. W.; LYON, G. R.; RUMSEY, J.; KRASNEGOR, N. (Eds.) *Developmental Neuroimaging: mapping the development of brain and behavior*. San Diego: Academic Press, 1996. p. 187-195.
- CLARK, P. B. S. Recent progress in identifying nicotine cholinergic receptors in mammalian brain. *Psychopharmacology*, v. 92, p. 135, 1987.
- COHEN, C.; WELZL, H.; BÄTTIG, K. Effects of nicotine, caffeine, and their combination on locomotor activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 40, n. 1, p. 121-123, 1991.
- CORSETTI, G. et al. Acute caffeine administration decreased NOS and Bcl2 expression in rat skeletal muscles. *Pharmacological research*, v. 55, n. 2, p. 96-103, 2007.
- COSTA, M. S. et al. Caffeine improves adult mice performance in the object recognition task and increases BDNF and TrkB independent on phospho-CREB immunoreactivity in the hippocampus. *Neurochemistry international*, v. 53, n. 3-4, p. 89-94, 2008a.
- COSTA, M. S. et al. Caffeine prevents age-associated recognition memory decline and changes brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor (TrkB) content in mice. *Neuroscience*, v. 153, n. 4, p. 1071-1078, 2008b.
- CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

DAJAS-BAILADOR, F.; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in pharmacological sciences*, v. 25, n. 6, p. 317-324, 2004.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Experimental neurology*, v. 203, n. 1, p. 241-245, 2007.

DALL'IGNA O. P. et al. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 166, n. 3, p. 258-263, 2003.

DALY, J. W.; BRUNS, R. F.; SNYDER, S. H. Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines. *Life sciences*, v. 28, n. 19, p. 2083-2097, 1981.

DALY, J. W. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cellular and molecular life sciences*, v. 64, n. 16, p. 2153-2169, 2007.

DALY, J. W. Mechanism of action of caffeine. In: GARATTINI, S. (Ed.). *Caffeine, Coffee and Health*. New York: Raven Press, 1993. p. 97-150.

DANI, J. A.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 47, p. 699-729, 2007.

DANI, J. A.; DE BIASI, M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 70, p. 439-46, 2001.

DANI, J. A.; RADCLIFFE, K. A.; PIDOPLICHKO, V. I. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 31-38, 2000.

DAVIS, R. A. et al. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Food and Chemical Toxicology*, v. 29, n. 12, p. 821-827, 1991

DI CHIARA, G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 295-314, 2000.

DIFRANZA, J. R. Hooked from the first cigarette. *Scientific American*, v. 298, n. 5, p. 82-87, 2008.

DIFRANZA, J. R. et al. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco control*, v. 9, n. 3, p. 313-319, 2000.

DICKSON, P. E. et al. Effects of adolescent nicotine exposure and withdrawal on intravenous cocaine self-administration during adulthood in male C57BL/6J mice. *Addiction biology*, v. 19, n. 1, p. 37-48, 2014.

DIAMOND, A. Guidelines for the study of brain-behavior relationships during development. In: LEVIN, H. S.; EISENBERG, H. M.; BENTON, A. L. (Eds.). *Frontal lobe function and dysfunction*. New York: Oxford University Press, 1991. p. 339-378.

DOREMUS, T. L. et al. Age-related differences in elevated plus maze behavior between adolescent and adult rats. *Annals of the New York Academy Science*, v. 1021, p. 427-430, 2004.

DOREMUS, T. L. et al. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*, v. 75, p. 411-418, 2003.

D'SOUZA, M. S.; MARKOU, A. The "stop" and "go" of nicotine dependence: role of GABA and glutamate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 3, n. 6, p. a012146, 2013.

DUMAS, T. C.; FOSTER, T. C. Late developmental changes in the ability of adenosine A1 receptors to regulate synaptic transmission in the hippocampus. *Brain Research Developmental Brain Research*, v. 105, p. 137-139, 1998.

ELGOYHEN, A. B. et al. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, v. 79, p. 705-715, 1994.

ELGOYHEN, A. B. et al. Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proceedings of the National Academy Science U S A*, v. 98, p. 3501-3506, 2001.

ELLIOTT, B. M. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 80, p. 567-575, 2005.

ELLIOTT, B. M. et al. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 77, n. 1, p. 21-28, 2004.

EL YACOUBI, M.; COSTENTIN, J.; VAUGEOIS, J. M. Adenosine A2A receptors and depression. *Neurology*, v. 61, n. 11, p. S82-S87, 2003. Suplemento 6.

EL YACOUBI, M. et al. Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *British journal of pharmacology*, v. 134, n. 1, p. 68, 2001.

EL YACOUBI, M. et al. Reduced appetite for caffeine in adenosine A 2A receptor knockout mice. *European journal of pharmacology*, v. 519, n. 3, p. 290-291, 2005.

EL YACOUBI, Malika et al. The H/Rouen mouse model displays depression-like and anxiety-like behaviors. *Behavioural brain research*, v. 256, p. 43-50, 2013.

EL YACOUBI, M. et al. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British journal of pharmacology*, v. 129, n. 7, p. 1465-1473, 2000.

EMURIAN, H. H. et al. Event time-series relationship between cigarette smoking and coffee drinking. *Addictive Behaviors*, v. 7, n. 4, p. 441-444, 1982.

ESPINOSA, J. et al. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A_{2A} receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 34, n. 2, p. 509-518, 2013.

FALCO, A. M.; BEVINS, R. A. Individual differences in the behavioral effects of nicotine: A review of the preclinical animal literature. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 138, p. 80-90, 2015.

FENSTER, C. P. et al. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, p. 4804-4814, 1999.

FERNANDES, O. et al. Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reproductive Toxicology*, v. 12, n. 4, p. 435-444, 1998.

FERNSTROM, M. H.; BAZIL, C. W.; FERNSTROM, J. D. Caffeine injection raises brain tryptophan level, but does not stimulate the rate of serotonin synthesis in rat brain. *Life sciences*, v. 35, n. 12, p. 1241-1247, 1984.

FERRE, S. Mechanism of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 233, n. 10, p. 1963-1979, 2016.

FILE, S. E.; CHEETA, S.; KENNY, P. J. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *European Journal of Pharmacology*, v. 393, p. 231-236, 2000.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research*, v. 125, n. 1-2, p. 151-157, 2001.

FILGUEIRAS, C. C. et al. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behavioural brain research*, v. 172, n. 1, p. 33-38, 2006.

FISHER, S.; GUILLET, R. Neonatal caffeine alters passive avoidance retention in rats in an age-and gender-related manner. *Developmental brain research*, v. 98, n. 1, p. 145-149, 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry: estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, p. 7, 2005.

FONE, K. C. F; PORKESS, M. Veronica. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 32, n. 6, p. 1087-1102, 2008.

FRARY, C. D.; JOHNSON, R. K.; WANG, M. Q. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 105, n. 1, p. 110-113, 2005.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological reviews*, v. 51, n. 1, p. 83-133, 1999.

GARRIDO, R. et al. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry*, v. 76, p. 1395-1403, 2001.

GASIOR, M. et al. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 295, n. 3, p. 1101-1111, 2000.

GENN, R. F. et al. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Review*, v. 27, p. 155-161, 2003.

GOPALAKRISHNAM, M.; MOLINARI, E. J.; SULLIVAN, J. P. Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Molecular Pharmacology*, v. 52, p. 524-534, 1997.

GOVIND, A. P.; VEZINA, P.; GREEN, W. N. Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochemical pharmacology*, v. 78, n. 7, p. 756-765, 2009.

GRADY, S. R. et al. Characterization of nicotinic agonist-induced [3H] dopamine release from synaptosomes prepared from four mouse brain regions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 301, n. 2, p. 651-660, 2002.

GRANT, B. F.; HARFORD, T. C.; GRIGSON, M. B. Stability of alcohol consumption among youth: A national longitudinal study. *Journal of Studies on Alcohol*, v. 49, p. 253-260, 1987.

GREEN, R. M.; STILES, G. L. Chronic caffeine ingestion sensitizes the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 77, n. 1, p. 222-227, 1986.

GRESSENS, P. et al. Environmental factors and disturbances of brain development. *Seminars in neonatology*. v.6, p. 185-194, 2001.

GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P. Reinforcing effects of caffeine in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 246, n. 1, p. 21-29, 1988.

GUILLET, R. Neonatal caffeine exposure alters adenosine receptor control of locomotor activity in the developing rat. *Developmental pharmacology and therapeutics*, v. 15, p. 94-100, 1990.

GUILLET, R.; KELLOGG, C. K. Neonatal caffeine exposure alters developmental sensitivity to adenosine receptor ligands. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 40, n. 4, p. 811-817, 1991.

HADFIELD, M. G.; MILIO, C. Caffeine and regional brain monoamine utilization in mice. *Life sciences*, v. 45, n. 26, p. 2637-2644, 1989.

HAWKINS, M. et al. Effects of chronic administration of caffeine on adenosine A1 and A2 receptors in rat brain. *Brain research bulletin*, v. 21, n. 3, p. 479-482, 1988.

HOLMGREN, P.; NORDÉN-PETTERSSON, L.; AHLNER, J. Caffeine fatalities—four case reports. *Forensic science international*, v. 139, n. 1, p. 71-73, 2004.

HOSLI, E.; HOSLI, L. Autoradiographic studies on the uptake of adenosine and on binding of adenosine analogues in neurons and astrocytes of cultured rat cerebellum and spinal cord. *Neuroscience*, v. 24, p. 621-628, 1988.

HUANG, L. Z.; ABBOTT, L. C.; WINZER-SERHAN, U. H. Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience*, v. 146, p. 1854-1868, 2007.

HUGHES, R. N.; BEVERIDGE, I. J. Sex-and age-dependent effects of prenatal exposure to caffeine on open-field behavior, emergence latency and adrenal weights in rats. *Life sciences*, v. 47, n. 22, p. 2075-2088, 1990.

HUGHES, R. N.; BEVERIDGE, I. J. Behavioral effects of exposure to caffeine during gestation, lactation or both. *Neurotoxicology and teratology*, v. 13, n. 6, p. 641-647, 1991.

HUKKANEN, J.; JACOB, P.; BENOWITZ, N. L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological reviews*, v. 57, n. 1, p. 79-115, 2005.

IMHOF, J. T. et al. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural Brain Research*, v. 56, p. 177-180, 1993.

INIGUEZ, S. D. et al. Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, p. 1609-1624, 2009.

JACOBSEN, L. K. et al. Effects of smoking and smoking abstinence on cognition in adolescent tobacco smokers. *Biological psychiatry*, v. 57, n. 1, p. 56-66, 2005.

JAMES, J. E.; GREGG, M. Elizabeth. Hemodynamic effects of dietary caffeine, sleep restriction, and laboratory stress. *Psychophysiology*, v. 41, n. 6, p. 914-923, 2004.

JANG, M. H. et al. Nicotine administration decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of food-deprived rats. *Neuroscience Letters*, v. 322, p. 29-32, 2002.

JANHUNEN, S.; AHTEE, L. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 31, n. 3, p. 287-314, 2007.

JAROSZ, M.; WIERZEJSKA, R.; SIUBA, M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 160, n. 2, p. 156-160, 2012.

JOHNSON-KOZLOW, M. al. Coffee consumption and cognitive function among older adults. *American journal of epidemiology*, v. 156, n. 9, p. 842-850, 2002.

JUSTINOVA, Z. et al. Effects of chronic caffeine exposure on adenosinergic modulation of the discriminative-stimulus effects of nicotine, methamphetamine, and cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 203, n. 2, p. 355-367, 2009.

KALSBECK, A. et al. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 269, p. 58-72, 1988.

KANDEL, D. B.; CHEN, K. Extent of smoking and nicotine dependence in the United States: 1991–1993. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 2, n. 3, p. 263-274, 2000.

KANDEL, D. B. et al. Developmental patterns of the use of legal, illegal, and medically prescribed psychotropic drugs from adolescence to young adulthood. *Etiology of drug abuse: Implications for prevention*, v. 56, p. 193-235, 1985.

KANG, S. H. et al. Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Neuroreport*, v. 13, n. 15, p. 1945-1950, 2002.

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 3, n. 2, p. 102-114, 2002.

KASSEL, J. D.; UNROD, M. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiolysis. *Journal of abnormal psychology*, v. 109, n. 1, p. 161, 2000.

KENDLER, K. S.; MYERS, J.; PRESCOTT, C. A. Specificity of genetic and environmental risk factors for symptoms of cannabis, cocaine, alcohol, caffeine, and nicotine dependence. *Archives of General Psychiatry*, v. 64, n. 11, p. 1313-1320, 2007.

KENNY, P. J.; MARKOU, A. Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 70, n. 4, p. 531-549, 2001.

KHANNA, N. N.; SOMANI, S. M. Maternal coffee drinking and unusually high concentrations of caffeine in the newborn. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 22, n. 5, p. 473-483, 1984.

KLEIN, L. C. et al. Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 78, p. 13-25, 2004.

KLOET, S. F.; MANSVELDER, H. D.; DE VRIES, T. J. Cholinergic modulation of dopamine pathways through nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, v. 97, n. 4, p. 425-438, 2015.

KOOB, G. F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 13, p. 177-184, 1992.

KOTA, et al. Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 322, n. 1, p. 399-407, 2007.

KULKARNI, S. K.; MEHTA, A. K. Purine nucleoside-mediated immobility in mice: Reversal by antidepressants. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 4, p. 460-463, 1985.

KUTLU, M. G.; GOULD, T. J. Nicotinic receptors, memory, and hippocampus. *Currents Topics in Behavioral Neurosciences*. v. 23, p. 137-163, 2015.

KYEREMATEN, G. A.; VESELL, E. S. Metabolism of nicotine. *Drug metabolism reviews*, v. 23, n. 1-2, p. 3-41, 1991.

LAUREANO-MELO, R. et al. Behavioral profile assessment in offspring of Swiss mice treated during pregnancy and lactation with caffeine. *Metabolic brain disease*, v. 31, n. 5, p. 1071-1080, 2016.

LAVIOLA, G. et al. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, p. 9-31, 2003.

LAVIOLETTE, S. R.; VAN DER KOOY, D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature reviews neuroscience*, v. 5, n. 1, p. 55, 2004.

LE FOLL, B.; GOLDBERG, S. R. Control of the reinforcing effects of nicotine by associated environmental stimuli in animals and humans. *Trends in pharmacological sciences*, v. 26, n. 6, p. 287-293, 2005a.

LE FOLL, B.; GOLDBERG, S. R. Nicotine as a typical drug of abuse in experimental animals and humans. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 184, n. 3-4, p. 367-381, 2006.

LE FOLL, B.; GOLDBERG, S. R. Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology*, v. 178, n. 4, p. 481-492, 2005b.

LEONARD, S. et al. Smoking and mental illness. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 70, p. 561-570, 2001.

LEVIN, E. D.; SIMON, B. B. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology*, v. 138, p. 217-230, 1998.

LINDSTROM, J. et al. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Progress in Brain Research*, v. 109, p. 125-137, 1996.

LITTLE, H. J. Behavioral mechanisms underlying the link between smoking and drinking. *Alcohol Research & Health: The journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, v. 24, p. 215-224, 2000.

- LIU, X.; JERNIGAN, C. Effects of caffeine on persistence and reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats: interaction with nicotine-associated cues. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 220, n. 3, p. 541-550, 2012.
- LOOMANS, E. M. et al. Caffeine intake during pregnancy and risk of problem behavior in 5- to 6-year-old children. *Pediatrics*, v. 130, n. 2, p. e305-e313, 2012.
- LOPES, L. V.; SEBASTIAO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 11, n. 8, p. 1087-1101, 2011.
- LÓPEZ-CRUZ, L. et al. Differences between the nonselective adenosine receptor antagonists caffeine and theophylline in motor and mood effects: Studies using medium to high doses in animal models. *Behavioural brain research*, v. 270, p. 213-222, 2014.
- LORENZO, A. M. et al. Maternal caffeine intake during gestation and lactation down-regulates adenosine A1 receptor in rat brain from mothers and neonates. *Journal of neuroscience research*, v. 88, n. 6, p. 1252-1261, 2010.
- MCGEHEE, D. S.; ROLE, L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual review of physiology*, v. 57, n. 1, p. 521-546, 1995.
- MACRÌ, S. et al. Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behavior*, v. 64, n. 4, p. 541-546, 2002.
- MANNUCCI, C. et al. Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. *Neurochemistry international*, v. 49, n. 5, p. 481-486, 2006.
- MCQUISTON, A. R. Acetylcholine release and inhibitory interneuron activity in hippocampal CA1. *Frontiers in synaptic neuroscience*, v. 6, p. 20, 2014.
- MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, n. 9, p. 1231-1234, 2002.
- MANHÃES, A. C. et al. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behavioural brain research*, v. 193, n. 2, p. 216-224, 2008.
- MARUBIO, L. M. et al. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*, v. 398, p. 805-810, 1999.
- MARTIN, C. A. Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *Journal of the American Academy Child Adolescent Psychiatry*, v. 41, p. 1495-1502, 2002.
- MARTIN, C. A. et al. Caffeine use: association with nicotine use, aggression, and other psychopathology in psychiatric and pediatric outpatient adolescents. *The Scientific World Journal*, v. 8, p. 512-516, 2008.

MATTA, S. G. et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology* (Berl), v. 190, n. 3, p. 269-319, 2007.

MAXIMINO, C. et al. Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety and arousal in zebrafish. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 109, n. 3, p. 203-207, 2011.

MCNEILL, A. D. The development of dependence on smoking in children. *British Journal of Addiction*, v. 86, n. 5, p. 589-592, 1991.

METAXAS, A. et al. Genetic deletion of the adenosine A2A receptor prevents nicotine-induced upregulation of $\alpha 7$, but not $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptor binding in the brain. *Neuropharmacology*, v. 71, n. 2013, p. 228-236, 2013.

MEYER, L.; CASTON, J. Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57Bl6/J male mice. *Brain research*, v. 1039, n. 1-2, p. 171-176, 2005.

MEYER, L.; CASTON, J. Stress alters caffeine action on investigatory behaviour and behavioural inhibition in the mouse. *Behavioural brain research*, v. 149, n. 1, p. 87-93, 2004.

MIAO, H. et al. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 70, p. 752-762, 1998.

MITCHELL, S. H. Measures of impulsivity in cigarette smokers and non-smokers. *Psychopharmacology* (Berl), v. 146, p. 455-464, 1999.

NAKAMOTO, T. et al. Chronic caffeine intake by rat dams during gestation and lactation affects various parts of the neonatal brain. *Biology of the Neonate*, v. 49, n. 5, p. 277-283, 1986.

NAKAMOTO, T. et al. Effects of different levels of caffeine supplemented to the maternal diet on the brains of newborn rats and their dams. *Toxicology letters*, v. 44, n. 1-2, p. 167-175, 1988.

NAKAMOTO, T. et al. Lasting effects of early chronic caffeine feeding on rats' behavior and brain in later life. *Physiology & behavior*, v. 49, n. 4, p. 721-727, 1991.

NEHLIG, A.; DEBRY, G. Consequences on the newborn of chronic maternal consumption of coffee during gestation and lactation: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 13, n. 1, p. 6-21, 1994.

NEL, M. R.; MORGAN, M. Smoking and anaesthesia revisited. *Anaesthesia*, v. 51, p. 309-311, 1996.

NELSON, D. A. et al. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health*, v. 85, p. 34-40, 1995.

NIKODIJEVIĆ, O.; JACOBSON, K. A.; DALY, John W. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 44, n. 1, p. 199-216, 1993.

NOLLEY, E. P.; KELLEY, B. M. Adolescent reward system perseveration due to nicotine: studies with methylphenidate. *Neurotoxicology and teratology*, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2007.

NUNES-FREITAS, A. L. et al. Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: time course of effects on the central cholinergic system of rats. *Toxicological Sciences*, v. 123, n. 1, p. 144-154, 2011.

OHKURA, Y.; KAI, M.; NOHTA, H. Fluorogenic reactions for biomedical chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 659, n. 1-2, p. 85-107, 1994.

OLIVEIRA-DA-SILVA, A. et al. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 27, n. 6, p. 539-548, 2009.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE - BANCO MUNDIAL. *La epidemia del tabaquismo*. Publicación científica, n. 577, 2000.

ORR-URTREGER, A. et al. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *The Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 23, p. 9165-9171, 1997.

PAN, H. Z.; CHEN, H. H. Hyperalgesia, low-anxiety, and impairment of avoidance learning in neonatal caffeine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 191, p. 119-125, 2007.

PARSONS, W. D., NELMS, A. H. Effects of smoking on caffeine clearance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 24, n. 1, p. 40-45. 1978.

PECHLIVANOVA, D. M. et al. Effect of long-term caffeine administration on depressive-like behavior in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Behavioural pharmacology*, v. 23, n. 4, p. 339-347, 2012.

PHILLIS, J. W.; EDSTROM, J. P. Effects of adenosine analogs on rat cerebral cortical neurons. *Life sciences*, v. 19, n. 7, p. 1041-1053, 1976.

PICCIOTTO, M. R. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug & Alcohol Dependence*, v. 51, n. 1, p. 165-172, 1998.

PICCIOTTO M. R. et al. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, v. 374, p. 65-67, 1995.

PIDOPLICHKO, V. I. et al. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*, v. 390, n. 6658, p. 401, 1997.

PIERARD, C. et al. Acute stress blocks the caffeine-induced enhancement of contextual memory retrieval in mice. *European journal of pharmacology*, v. 761, p. 70-78, 2015.

PIERCE, J. P.; GILPIN, E. How long will today's new adolescent smoker be addicted to cigarettes? *American Journal of Public Health*, v. 86, p. 253-256, 1996.

PINHEIRO, C. R. et al. Developmental plasticity in adrenal function and leptin production primed by nicotine exposure during lactation: gender differences in rats. *Hormone and metabolic research*, v. 43, n. 10, p. 693-701, 2011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

POULOS, C. X.; PARKER, J. L.; LÊ, D. A. Increased impulsivity after injected alcohol predicts later alcohol consumption in rats: Evidence for "loss-of-control drinking" and marked individual differences. *Behavioral neuroscience*, v. 112, n. 5, p. 1247, 1998.

POWELL, K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work? *Nature*, v. 442, p. 865-867, 2006.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; TAKAHASHI, R. N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiology of Aging*, v. 26, n. 6, p. 957-964, 2005.

PRIMUS, R. J.; KELLOGG, C. K. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Developmental Psychobiology*, v. 22, p. 633-643, 1989.

QUICK, M. W.; LESTER, R. A. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, v. 53, p. 457-478, 2002.

RAKIC, P.; BOURGEOIS, J. P.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Progress in brain research*, v. 102, p. 227-243, 1994.

RAPIER, C.; LUNT, G. G.; WONNACOTT, S. Stereoselective Nicotine- Induced Release of Dopamine from Striatal Synaptosomes: Concentration Dependence and Repetitive Stimulation. *Journal of neurochemistry*, v. 50, n. 4, p. 1123-1130, 1988.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M.; DE MENDONCA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in neurobiology*, v. 68, n. 6, p. 377-392, 2002.

RIBEIRO-CARVALHO, A. Nicotine and ethanol interact during adolescence: Effects on the central cholinergic systems. *Brain Research*, v. 1232, p. 48-60, 2008.

RIBEIRO-CARVALHO A. et al. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience*, v. 162, p. 1174-1186, 2009.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

ROSA, R. M. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neuroscience letters*, v. 341, n. 3, p. 217-220, 2003.

ROSE, J. E. Cigarette smoking blocks caffeine-induced arousal. *Alcohol & Drug Research*, v. 7, n. 1, p. 49-55, 1987.

ROSE, J. E.; BEHM, F. M. Psychophysiological interactions between caffeine and nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 38, n. 2, p. 333-337, 1991.

ROSEMBERG, J. Nicotina. Comisión Nacional Permanente de lucha Antitabáquica. *Colegio Médico del Perú*, p. 53-55, 1999.

ROSIN, D. L. et al. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, v. 401, n. 2, p. 163-186, 1998.

ROSS, S. A. et al. Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the society for neuroscience*, v. 20, p. 6431-6441, 2000.

RUBINSTEIN, M. L. et al. Cotinine levels in relation to smoking behavior and addiction in young adolescent smokers. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 9, n. 1, p. 129-135, 2007.

RUSSELL, V. A.; SAGVOLDEN, T.; JOHANSEN, E. B. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain functions*, v. 1, n. 1, p. 9, 2005.

SAGVOLDEN, T. et al. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1239-1247, 2005.

SALAMONE, Frank; ZHOU, Ming. Aberrations in nicotinic acetylcholine receptor structure, function, and expression: implications in disease. *McGill Journal of Medicine*, v. 5, n. 2, p. 90-97, 2000.

SALA-ROCA, J. et al. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 72, n. 3, p. 643-650, 2002.

SALÍN-PASCUAL, R. J. et al. Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *The Journal of clinical psychiatry*, v. 57, n. 9, p. 387-389, 1996.

SANTOS, I. S.; MATIJASEVICH, A.; DOMINGUES, M. R. Maternal caffeine consumption and infant nighttime waking: prospective cohort study. *Pediatrics*, v. 129, n. 5, p. 860-868, 2012.

SARGENT, P. B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, v. 16, p. 403-443, 1993.

SERAPIAO-MORAES, D. F. et al. Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring. *European journal of nutrition*, v. 52, n. 8, p. 1891-1900, 2013.

SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British journal of pharmacology*, v. 157, n. 6, p. 907-921, 2009.

SHI, D.; PADGETT, W. L.; DALY, J. W. Caffeine analogs: effects on ryanodine-sensitive calcium-release channels and GABA A receptors. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 23, n. 3, p. 331-347, 2003.

SHI, D. et al. Effects of chronic caffeine on adenosine, dopamine and acetylcholine systems in mice. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, v. 328, n. 3, p. 261, 1994.

SCHMIDT, R. J. et al. Maternal caffeine consumption and risk of neural tube defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, v. 85, n. 11, p. 879-889, 2009.

SHOAIB, M. et al. Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 142, n. 4, p. 327-333, 1999.

SCHUBERT, P. et al. Modulation of nerve and glial function by adenosine—role in the development of ischemic damage. *International journal of biochemistry*, v. 26, n. 10-11, p. 1227-1236, 1994.

SILVA, C. G. et al. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Science translational medicine*, v. 5, n. 197, p. 197ra104, 2013.

SLAWECKI, C. J. Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 19, p. 1477-1483, 2005.

SLAWECKI, C. J.; EHLERS, C. L. Lasting effects of adolescent nicotine exposure on the electroencephalogram, event related potentials, and locomotor activity in the rat. *Developmental brain research*, v. 138, n. 1, p. 15-25, 2002.

SLAWECKI, C. J. et al. Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*, v. 75, p. 355-361, 2003.

SLAWECKI, C. J.; ROTH, J. Comparison of the onset of hypoactivity and anxiety-like behavior during alcohol withdrawal in adolescent and adult rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, v. 28, p. 598-607, 2004.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Nicotine exposure in adolescence alters the response of serotonin systems to nicotine administered subsequently in adulthood. *Developmental neuroscience*, v. 31, n. 1-2, p. 58-70, 2009.

SLOTKIN, T. A. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. *Neurotoxicology and teratology*, v. 24, n. 3, p. 369-384, 2002.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *In Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 1243-1255, 2002.

SOARES, A. I. S. M.; FONSECA, B. M. R. *Caféina: A caféina é uma das substâncias mais estudadas, será que realmente a conhece? E os seus malefícios, sabe quais são? Terá ela efeitos benéficos?.* 2005. 55 p. Trabalho apresentado à disciplina de Toxicologia I e Análises Toxicológicas - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2005.

SOELLNER, D. E.; GRANDYS, T.; NUÑEZ, J. L. Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats. *Behavioural brain research*, v. 205, n. 1, p. 191-199, 2009.

SOMANI, S. M.; KHANNA, N. N.; BADA, H. S. Caffeine and theophylline: Serum/CSF correlation in premature infants. *Journal of pediatrics*, 1980.

SOUZA, A. C. et al. Maternal caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring. *Brain research*, v. 1595, p. 10-18, 2015.

SVENNINGSSON, P. et al. Cellular distribution of adenosine A2A receptor mRNA in the primate striatum. *Journal of Comparative Neurology*, v. 399, n. 2, p. 229-240, 1998.

SVENNINGSSON, P. et al. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse*, v. 27, n. 4, p. 322-335, 1997.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, p. 417-463, 2000.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Study Alcohol Supplement*, v. 14, p. 71-81, 2002.

STAMFORD, J. A. Development and ageing of the rat nigrostriatal dopamine system studied with fast cyclic voltammetry. *Journal of Neurochemistry*, v. 52, p. 1582-1589, 1989.

STOLERMAN, I. P.; SHOAIB, M. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends in pharmacological science*, v. 12, p. 467-473, 1991.

STREISSGUTH, A. P. et al. Effects of maternal alcohol, nicotine, and caffeine use during pregnancy on infant mental and motor development at eight months. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 4, n. 2, p. 152-164, 1980.

STRUEWING, J. P. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*, v. 336, n. 20, p. 1401-1408, 1997.

SWANSON, J. A.; LEE, J. W.; HOPP, J. W. Caffeine and nicotine: a review of their joint use and possible interactive effects in tobacco withdrawal. *Addictive behaviors*, v. 19, n. 3, p. 229-256, 1994.

SWEENEY, P. et al. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite*, v. 101, p. 171-177, 2016.

TANAKA, H. et al. Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain and Development*, v. 6, n. 4, p. 355-361, 1984.

TANAKA, H.; NAKAZAWA, K.; ARIMA, M. Effects of maternal caffeine ingestion on the perinatal cerebrum. *Biology of the Neonate*, v. 51, n. 6, p. 332-339, 1987.

TANDA, G.; GOLDBERG, S. R. Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 66, n. 1, p. 47-64, 2000.

TASSONYI, E. et al. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the mechanisms of anesthesia. *Brain Research Bulletin*, v. 57, p. 133-150, 2002.

TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; HOSTETTER JR, J. C. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Developmental Brain Research*, v. 89, n. 2, p. 167-172, 1995.

TEICHER, M. H. et al. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 27, p. 33-44, 2003.

TRAUTH, J. A. et al. Modeling adolescent nicotine exposure: effects on cholinergic systems in rat brain regions. *Brain Research*, v. 873, p. 18-25, 2000.

TRAUTH, J. A. et al. Adolescent nicotine exposure causes persistent upregulation of nicotinic cholinergic receptors in rat brain regions. *Brain research*, v. 851, p. 9-19, 1999.

TRIBOLLET, E. et al. Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience*, v. 124, p. 405-420, 2004.

TURGEON, S. M. et al. Chronic caffeine produces sexually dimorphic effects on amphetamine-induced behavior, anxiety and depressive-like behavior in adolescent rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 143, p. 26-33, 2016.

TURMEN, T.; LOURIDAS, T. A.; ARANDA, J. V. Relationship of plasma and CSF concentrations of caffeine in neonates with apnea. *The Journal of pediatrics*, v. 95, n. 4, p. 644-646, 1979.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Blockade of morphine- and amphetamine-induced conditioned place preference in the rat by riluzole. *Neuroscience letters*, v. 242, n. 2, p. 114-116, 1998.

URAKAWA, N. et al. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *International journal of legal medicine*, v. 106, n. 5, p. 232-236, 1994.

VOLKOW, N. D.; LI, T. K. Drugs and alcohol: treating and preventive abuse, addiction and their medical consequences. *Pharmacology and therapeutics*, v. 108, p. 3-17, 2005.

WALKER, F. R.; MARCH, J.; HODGSON, D. M. Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat. *Behavioural brain research*, v. 154, n. 1, p. 63-69, 2004.

WALLACE, J. M. et al. Gender and ethnic differences in smoking, drinking and illicit drug use among American 8th, 10th and 12th grade students, 1976–2000. *Addiction*, v. 98, n. 2, p. 225-234, 2003.

WATKINSON, B.; FRIED, P. A. Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring. *Neurobehavioral Toxicology & Teratology*, 1985.

WEBSTER, R. A., HUNTER, M., KEATS, J. A. Peer and parental influences on adolescents' substance use: a path analysis. *The International Journal of the Addictions*, v. 29, p. 647-657, 1994.

WHITE, J. M. Behavioral interactions between nicotine and caffeine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 29, n. 1, p. 63-66, 1988.

WILMOUTH, C. E.; SPEAR, L. P. Withdrawal from chronic nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 85, p. 648-657, 1994.

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review*, v. 94, n. 4, p. 469, 1987.

WOLFER, D. P.; LIPP, H. P. Evidence for physiological growth of hippocampal mossy fiber collaterals in the guinea pig during puberty and adulthood. *Hippocampus*, v. 5, n. 4, p. 329-340, 1995.

WONNACOTT, S. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends in pharmacological sciences*, v. 11, n. 6, p. 216-219, 1990.

WOODSON, J. C.; MINOR, T. R.; JOB, R.F. Inhibition of adenosine deaminase by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine (EHNA) mimics the effect of inescapable shock on escape learning in rats. *Behavioral Neuroscience*, v. 112, n. 2, 399-409, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO global report: mortality attributable to tobacco*. Geneva: WHO; 2012. 396 p. Report.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO report on the global tobacco epidemic: Raising taxes on tobacco*. Luxemburg: WHO; 2015. 198 p. Report.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. *El Convenio Marco sobre la Lucha Antitabáquica*. WHO/NCD/TFI/99.8, 1999.

XIAO, C. et al. Nicotine modulates GABAergic transmission to dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta. *Acta pharmacologica Sinica*, v. 30, n. 6, p. 851, 2009.

YAMADA, K.; KOBAYASHI, M.; KANDA, T. Involvement of adenosine A2A receptors in depression and anxiety. *International review of neurobiology*, v. 119, p. 373-393, 2014.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny. *Food and chemical toxicology*, v. 58, p. 158-168, 2013.

YOSHITAKE, T. et al. High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. *Journal of neuroscience methods*, v. 140, n. 1-2, p. 163-168, 2004.

YOSHITAKE, T. et al. Derivatization chemistries for determination of serotonin, norepinephrine and dopamine in brain microdialysis samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, v. 20, n. 3, p. 267-281, 2006.

ZHAO, R.; CHEN, H.; SHARP, B. M. Nicotine-induced norepinephrine release in hypothalamic paraventricular nucleus and amygdala is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the nucleus tractus solitarius. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 320, n. 2, p. 837-844, 2007.

ZHAO, Y. et al. Synergistic effects of caffeine and catechins on lipid metabolism in chronically fed mice via the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *European journal of nutrition*, v. 56, n. 7, p. 2309-2318, 2017.

ZANIEWSKA, M. et al. Effects of serotonin (5-HT)₂ receptor ligands on depression-like behavior during nicotine withdrawal. *Neuropharmacology*, v. 58, p. 1140-1146, 2010.

ZIMMERBERG, B. et al. The effects of postnatal caffeine exposure on growth, activity and learning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 39, n. 4, p. 883-888, 1991.

ZUCKERMAN, M. Smoking, drinking, drugs and eating. In: _____. *Behavioral Expressions and Biosocial Basis of Sensation Seeking*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 225-257.