



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Bruno da Silva Gonçalves

**Curso temporal dos efeitos da co-exposição a fumaça do cigarro e cafeína:
efeitos sobre a reposta emocional em camundongos adolescentes.**

Rio de Janeiro

2015

Bruno da Silva Gonçalves

Curso temporal dos efeitos da co-exposição a fumaça do cigarro e cafeína: efeitos sobre a reposta emocional em camundongos adolescentes.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho

Coorientador (a): Prof.^a Dra. Yael Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2015

Bruno da Silva Gonçalves

Curso temporal dos efeitos da co-exposição a fumaça do cigarro e cafeína: efeitos sobre a reposta emocional em camundongos adolescentes.

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Coorientador a: Prof.^a Dra. Yael Villaça Abreu
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Izabela Mocaiber Freire
Universidade Federal Fluminense – UFF

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco e Elenira, que sempre estiveram comigo e sempre pude contar com este “porto seguro”. Com eles, aprendi que a vida é feita de conquistas, mas não é fácil, é preciso muito trabalho.

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página, é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. Como diria um antigo provérbio africano: “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada...”

Ao Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho, orientador desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de agradecer por sua competência, participação com discussões, correções, revisões, sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho. Sua presença, seu incentivo e apoio mesmo nos momentos mais difíceis desse processo foi muito do que me fez chegar até aqui.

À CNPq, agradeço pelo período de bolsa concedida, sem a qual a conclusão deste estudo teria sido muito mais árdua.

À contribuição essencial dos professores Yael Abreu Villaça, Cláudio Carneiro Filgueiras e, Alex Christian Manhães.

À equipe do laboratório de Neurofisiologia pelo apoio e amizade: Victor, Ulisses, Sylvio, Jemima, Renata, Ana Cristina, Juliana(s) e todos os demais, que fizeram meus momentos por aqui serem muito agradáveis, momentos os quais eu sempre lembrarei. Agradeço em especial Pedro Henrique, André, Ana Carolina, Karla e Anna Keylla, que colaboraram comigo na árdua experiência que foi a máquina de fumaça.

À minha família, primeiramente ao meu pai, Francisco, minha mãe, Elenira, e meu irmão, Vitor, com quem compartilho riquezas que o dinheiro nunca poderá comprar e que estiveram sempre presentes me apoiando para que eu continuasse durante essa etapa da minha vida. Sempre me senti seguro para continuar.

À minha namorada, Raline Queiroz, que compartilhou comigo esse momento, foi sempre muito paciente em minhas ausências e me ajudou me dando apoio moral.

Aos meus amigos, em especial Eloá, Mayck, Anayá, Sabrina, Diogo, Pedro, Stella e Hugo, que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer de minha vida acadêmica.

Aos camundongos utilizados, que desempenharam o papel mais importante, doando suas vidas involuntariamente ao projeto. À vocês, pequeninos, minhas sinceras desculpas. Estou em eterna dívida com vocês e farei para honrar o sacrifício de vocês.

À Deus, que agradeço por mais essa vitória.

Enfim, um muito obrigado a todos que me apoiaram em mais esta jornada!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e viver com ousadia.
Pois o triunfo pertence a quem se atreve,
e a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

GONÇALVES, Bruno da Silva. *Curso temporal dos efeitos da co-exposição a fumaça do cigarro e cafeína: efeitos sobre a reposta emocional em camundongos adolescentes*. 2015. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Cafeína e tabaco estão entre as drogas psicoativas lícitas mais frequentemente usadas do mundo. Além disso, uma série de estudos epidemiológicos tem demonstrado uma correlação positiva entre o consumo de cafeína e de cigarro de tabaco. No entanto, pouco se sabe sobre a neurobiologia básica da exposição combinada no cérebro adolescente, idade em que geralmente se inicia o uso de tabaco. Aqui, nós investigamos os efeitos de curto e longo prazo da exposição de cafeína ao longo da vida e/ou fumaça de tabaco na adolescência nos níveis de ansiedade e no comportamento associado à depressão em camundongos. A cafeína foi administrada na água de beber (0,1 g/l) em um modelo de exposição ao longo de toda a vida (CAF). A partir do dia pós-natal 30 (PN30) até PN45, camundongos Suíços foram expostos à fumaça de cigarro (SMK - exposição de corpo inteiro, 8 h/dia) gerados a partir da queima de cigarros de pesquisa tipo 3R4F (nicotina = 0.73 mg/por cigarro). Quatro grupos foram avaliados: (1) co-exposição CAF + SMK; (2) exposição SMK; (3) exposição CAF; (4) controle. Os níveis de ansiedade foram avaliados com o labirinto em cruz elevado (LCE) e comportamento associado à depressão foram avaliados com o teste de nado forçado (TNF). A análise comportamental foi avaliada ao final da exposição à fumaça (PN45), bem como na abstinência durante a adolescência (PN55) e na abstinência de longo prazo (PN75). No presente trabalho, a exposição de cafeína gerou redução no tempo de tomada de decisão (tempo no centro do labirinto) no EPM durante a adolescência (PN45 e PN55). A abstinência de longo prazo à fumaça do tabaco aumentou tempo de tomada de decisão que foi revertida pela cafeína. Além disso, a exposição de cafeína foi capaz de provocar aumento da ansiedade em animais com abstinência de longo prazo à fumaça do cigarro. Exposição de cafeína durante a abstinência do tabaco durante a adolescência induziu um aumento no comportamento de escalada no TNF. Na idade adulta, tanto a exposição de cafeína quanto a abstinência de longo prazo de fumaça de tabaco provocou redução do tempo de imobilidade no FST, um efeito antidepressivo que foi mitigado pela co-exposição. O presente estudo fornece evidência experimental de que a cafeína e fumaça de cigarro durante a adolescência interagem resultando em desregulação emocional durante a exposição e abstinência da fumaça de tabaco. Em particular, os níveis de ansiedade não parecem ser relevantes durante curto prazo de privação de SMK, no entanto, o aumento da ansiedade durante abstinência de longo prazo à fumaça de cigarro em animais CAF + SMK indicam efeitos tardios. Neste sentido, nossos dados sugerem que a exposição de cafeína ao longo da vida pode ser um fator importante na manutenção do tabagismo.

Palavras-chave: Cafeína. Fumaça de cigarro. Co-exposição. Ansiedade. Comportamento associado à depressão.

ABSTRACT

GONÇALVES, Bruno da Silva. *Temporal course of the effects of co-exposure to tobacco smoke and caffeine: effects on emotional response in adolescents mice*. 2015. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Caffeine and tobacco smoke are among the most frequently selfadministered licit psychoactive drugs in the world. In addition, a number of epidemiologic studies have documented a positive correlation between caffeine consumption and tobacco smoke. However, little is known about the basic neurobiology of the combined exposure in the adolescent brain, age which usually begin the use of tobacco smoke. Here, we investigated the short- and long-term effects of long life exposure of caffeine and/or adolescent tobacco smoke on anxiety levels and depression-like behavior. Caffeine was administrated in a lifelong model (0.1 g/l to drink). From postnatal day 30-45, Swiss mice were exposed to tobacco smoke (SMK--whole body exposure, 8 h/day) generated from research cigarettes type 3R4F (nicotine = 0.73 mg/per cigarette). Four groups were analyzed: (1) CAF+SMK exposure; (2) SMK exposure; (3) CAF exposure; (4) Control. Anxiety levels were assessed with the elevated plus maze (EPM) and depressive-like behavior were assessed with the forced swimming test (FST). The behavioral analysis was assessed by the end of smoke exposure (PN45) as well as during adolescence (PN55) and long-term (PN75) withdrawal. In the present work, caffeine exposure generated reduction in the decision making time (time in center of maze) in EPM during adolescence (PN45 and PN55). The long-term withdrawal of tobacco smoke increase decision making time which was reversed by caffeine. In addition, the exposure of caffeine was able to elicit increase anxiety in animals with long-term tobacco smoke withdrawal. Caffeine exposure during tobacco withdrawal during adolescence induced a increase climbing behavior in FST. At adulthood, both long life exposure of caffeine and long-term tobacco exposure withdrawal induced reduction of immobility time in FST, an antidepressant effect which was mitigated by co-exposure. The present study provides experimental evidence that caffeine and tobacco smoke during adolescence interact resulting in emotional dysregulation during both exposure and smoke withdrawal. Particularly, anxiety levels do not seem to be relevant during a short-term SMK deprivation, however, increased anxiety during long-term tobacco withdrawal in CAF+SMK animals demonstrate late-emergent effects. In these sense, our data suggest that longlife caffeine exposure may be an important factor in maintaining tobacco smoking.

Keywords: Caffeine. Tobacco smoke. Combined exposure. Anxiety. Depressive-like behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Máquina de fumaça de cigarro (Teague Enterprises, Davis, CA)	32
Figura 2 –	Foto em vista superior do labirinto em cruz elevado	34
Figura 3 –	Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado	35
Figura 4 –	(A) Curso temporal da massa corporal das progenitoras durante o período de lactação. (B) Curso temporal da ingestão de líquidos das progenitoras durante a lactação	39
Figura 5 –	(A) Curso temporal da massa corporal dos animais experimentais até o início da exposição a fumaça de cigarro. (B) Massa corporal dos animais experimentais nas idades de avaliação comportamental	40
Figura 6 –	(A) Percentual de tempo de permanência no braço aberto no LCE em PN45; (B) Percentual do número de entradas no braço aberto no TCE em PN45	41
Figura 7 –	Percentual de tempo de permanência no centro do labirinto no LCE em PN45	42
Figura 8 –	Número de entradas no braço fechado do LCE em PN45	42
Figura 9 –	Número de alongamentos corporais para o braço aberto (<i>stretching</i>) em PN45	43
Figura 10 –	(A) Percentual de tempo de permanência no braço aberto no LCE em PN55; (B) Percentual do número de entradas no braço aberto no TCE em PN55; (C) Percentual de tempo de permanência no braço aberto no LCE em PN75; (D) Percentual do número de entradas no braço aberto no TCE em PN75	44
Figura 11 –	Percentual de tempo de permanência no centro do labirinto no LCE.....	45
Figura 12 –	Número de de alongamentos corporais para o braço aberto (<i>stretching</i>) durante período de retirada da exposição a fumaça de cigarro, (A) em PN55; (B) em PN75 machos; (C) em PN75 fêmeas	46
Figura 13 –	Número de entradas no braço fechado do LCE durante período de retirada da exposição a fumaça de cigarro, (A) em PN55 e (B) em PN75	46

Figura 14 – Percentual de tempo de atividade no TNF em PN45. (A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade	47
Figura 15 – Número de mudanças de comportamento no TNF em PN45	49
Figura 16 – Percentual de tempo de atividade no TNF em PN55. (A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade	50
Figura 17 – Número de mudanças de comportamento no TNF em PN55	51
Figura 18 – Percentual de tempo de atividade no TNF em PN75. (A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade	52
Figura 19 – Número de mudanças de comportamento no TNF em PN75	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono (CO) em cigarros industrializados	31
Tabela 2 –	Ingestão de líquidos pelos animais experimentais (ml/g)	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BA	Braço aberto
BF	Braço fechado
CEUA	Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
CN	Centro
CO	Monóxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	<i>Elevated Plus-Maze</i>
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FST	<i>Forced Swimming Test</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission</i>
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
nAChRs	Receptores nicotínicos da acetilcolina neuronais
OMS	Organização Mundial da Saúde
TNF	Teste de Nado Forçado
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
mg	Miligrama
μg	Micrograma
ng	Nanograma
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Animais	30
2.2	Formação dos grupos experimentais	30
2.2.1	<u>Exposição à cafeína</u>	30
2.2.2	<u>Exposição à fumaça de cigarro</u>	31
2.3	Testes comportamentais	33
2.3.1	<u>Labirinto em Cruz Elevado (EPM)</u>	33
2.3.2	<u>Teste de Nado Forçado (FST)</u>	34
2.4	Avaliação dos níveis de exposição ao tabaco	35
2.4.1	<u>Cotina</u>	36
2.4.2	<u>Partículas totais em suspensão no ar</u>	36
2.5	Análises estatísticas	36
3	RESULTADOS	38
3.1	Perfil de exposição ao tabaco	38
3.1.1	<u>Partículas totais em suspensão no ar</u>	38
3.1.2	<u>Cotina</u>	38
3.2	Avaliação de massa corporal e ingestão de líquido	38
3.2.1	Avaliação das progenitoras	38
3.2.2	Avaliação dos animais experimentais	39
3.3	Avaliação comportamental	41
3.3.1	<u>Labirinto em cruz elevado</u>	41
3.3.1.1	Ao final do período de exposição à fumaça de cigarro	41
3.3.1.2	Após período de retirada	43
3.3.2	<u>Comportamento associado à depressão</u>	47
3.3.2.1	Ao final do período de exposição à fumaça de cigarro	47
3.3.2.2	Após período de retirada	49
4	DISCUSSÃO	54
4.1	Resumo dos resultados	54

4.2	Questões metodológicas	55
4.2.1	<u>Nível de exposição à fumaça de cigarro</u>	55
4.2.2	<u>Nível de exposição à cafeína</u>	57
4.3	Efeitos sobre a massa corporal	57
4.4	Alterações comportamentais promovidas pela exposição à cafeína por toda a vida	58
4.5	Alterações comportamentais promovidas pela exposição à fumaça de cigarro durante a adolescência	60
4.6	Interações comportamentais entre exposição à cafeína e fumaça de cigarro.	62
	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

INTRODUÇÃO

A cafeína e a nicotina são substâncias amplamente consumidas na sociedade de hoje (Crocq, 2003; Robinson e Pritchard, 1992). A cafeína é considerada a substância psicoativa mais consumida no mundo (Fredholm *et al.*, 1999), enquanto a nicotina é o principal componente psicoativo do tabaco e é reconhecida como fundamental no estabelecimento e manutenção do hábito de fumar (Benowitz, 1988). Além de se situarem no topo da lista de drogas mais consumidas, estudos recentes apontam relação entre o consumo de altas doses de cafeína e o consumo diário de nicotina (Martin *et al.*, 2008), bem como muitas evidências epidemiológicas apontam para uma forte associação do uso destas drogas (Robinson e Pritchard, 1992; Sturm, 2002). Apesar disso, a interação entre elas tem recebido pouca atenção em estudos experimentais.

Tabagismo e Nicotina

A nicotina ou 3-(1-metil-2-pirrolidinil)piridina é um alcalóide que ocorre naturalmente e é um dos psicoestimulantes mais utilizados no mundo (Boutrel e Koob, 2004). Os cigarros são a fonte mais comum de nicotina e, com isso, estudos indicam que ações da nicotina são responsáveis pelas bases farmacológicas de dependência ao cigarro e a outras formas de exposição ao tabaco (U.S. Department of Health and Human Services, 1988; Stolerman e Shoaib, 1991; Di Chiara, 2000; Royal College of Physicians, 2000).

O tabaco, além da nicotina, contém componentes nocivos adicionais e produtos químicos, que têm efeitos prejudiciais sobre o sistema respiratório (Amann, 2012). Anualmente a nível mundial, são fumados aproximadamente 7 trilhões e 300 bilhões de cigarros por mais de 1 bilhão de fumantes, dos quais 80% desses vivem nos países em desenvolvimento (OPS-BM, 2000; OMS, 2004). No mundo, 12% de todas as mortes em adultos com 30 anos ou mais estão associadas ao tabaco (OMS, 2012). Segundo a OMS, nos próximos 30 anos o tabagismo será responsável por 10 milhões de mortes a cada ano e 70% delas ocorrerão em países em desenvolvimento (OMS, 1999; 2012).

Devido a repercussão do tabagismo como um problema de saúde pública, as restrições ao fumo aumentaram em escala mundial, fato que induziu a indústria do tabaco a desenvolver

alternativas sem fumaça, muitas vezes contendo concentrações de nicotina muito mais elevadas do que os cigarros normais.

Tabagismo durante a adolescência

Um fato importante a ser considerado é que o tabagismo é um hábito que se inicia cada vez mais cedo. Mais de 4500 adolescentes iniciam o hábito de fumar todos os dias somente nos Estados Unidos (American Lung Association, 2002; Gilpin *et al.*, 1999). Aproximadamente um terço da população mundial é constituída por fumantes e a maioria iniciou o hábito de fumar durante a adolescência (Mansvellder e McGehee, 2002). Uma pesquisa realizada no Brasil em 1989, mostrou que, entre um total de 30 milhões de adolescentes, entre 10 a 19 anos, 2,7 milhões eram fumantes (INAN, 1989). Ainda no Brasil, dados do Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas informaram que, 28% fizeram uso do tabaco pelo menos uma vez na vida e 5,3% faziam uso freqüente em 1993, entre estudantes do ensino fundamental e médio de 10 capitais brasileiras,

O início do consumo do cigarro durante a adolescência está associado à dependência química que se estende por longos períodos (Chen e Millar, 1998; National Institute on Drug Abuse, 1998; Nelson *et al.*, 1995) e, mais importante, parte dos fumantes adolescentes apresentam sintomas de dependência antes mesmo de se tornarem fumantes diários, frequentemente com poucos dias de fumo ocasional (Di Franza *et al.*, 2000, 2002a, 2002b; O'Loughlin *et al.*, 2002). Isto sugere que o cérebro do adolescente é mais suscetível a dependência ao tabaco, em particular a substância nicotina, o que está de acordo com estudos que indicam que respostas a substâncias psicoativas são intrinsecamente diferentes durante este período do desenvolvimento (Leslie *et al.*, 2004; Spear, 2000; Spear e Brake, 1983). Desta forma, adolescentes apresentam grande probabilidade de experimentar drogas de abuso, incluindo tabaco e etanol (Grant *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1994), e desenvolver dependência quando comparados a indivíduos adultos (Maggs *et al.*, 2008).

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 e Li, 2005; Wallace *et al.*, 2003). Estudos recentes com roedores mostram que adolescentes exibem

diferenças quando comparados com adultos em relação a medidas de ansiedade, depressão e reatividade ao stress (Adriani e 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 e Kellog, 1989; Slawecki, 2005; Walker *et al.*, 2004), apresentam elevados níveis de busca pela novidade (Adriani *et al.*, 1998), impulsividade (Adriani e Laviola, 2003) e comportamento de risco (Macri's *et al.*, 2002), assim como redução de resposta ao estresse (Adriani e Laviola, 2000). A intensa busca pela novidade 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 (Zuckerman, 1994), além disso, a dependência à nicotina tem sido associada a altos níveis de impulsividade (Mitchell, 1999; Poulos *et al.*, 1998). De fato, adolescentes são mais propensos a comportamentos de risco, como o uso de drogas (Martin *et al.*, 2002).

O cérebro é o órgão com maior tempo de formação e a adolescência é a etapa final de transformação do cérebro na sua forma adulta. Assim, o cérebro passa por um notável desenvolvimento ao longo da adolescência (Sowell *et al.*, 1999; Galván *et al.*, 2006; Eiland e Romeo, 2013). Na adolescência ainda há proliferação de neurônios, apoptose e rearranjo sináptico (Altman e Bayer, 1990; Bayer 1983; Bayer *et al.*, 1982; Huttenlocher, 1990; McWilliams e Lynch, 1983). A remodelação estrutural se ocorre principalmente em estruturas límbicas e no córtex pré-frontal o que explica, ao menos em parte, as alterações comportamentais da adolescência relativas ao caráter emocional, motivação, controle de impulsos, tomada de decisões e comportamento de risco/busca por novidades (Spear 2000; De Bellis *et al.* 2001; Powell 2006). As mudanças no desenvolvimento dos circuitos neurais envolvidos no controle de impulsos têm implicações significativas para entender o comportamento adolescente (Chambers *et al.*, 2003). Embora essas alterações estruturais e funcionais sejam essenciais para o amadurecimento até a fase adulta, tornam essa etapa do desenvolvimento particularmente vulnerável à prejuízos a longo prazo induzido por insultos, como drogas de abuso (Andersen, 2003; Dahl 2004; Konrad *et al.*, 2013).

Estudos utilizando roedores adolescentes expostos à nicotina proporcionam suporte neuroquímico e comportamental para a hipótese da adolescência como período crítico (Abreu-Villaça *et al.*, 2010; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2009; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008; Abreu-Villaça *et al.*, 2003; Adriani *et al.*, 2002; Laviola *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 1998). Com efeito, vários estudos têm mostrado diferenças de respostas comportamentais entre roedores adultos e

adolescentes (Brielmaier *et al.*, 2007; Doremus *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2005; Kota *et al.*, 2007; Wilmouth e Spear, 2006). Por exemplo, camundongos adolescentes que apresentam alta busca pela novidade, com base em seu comportamento no teste do campo vazado, consomem mais nicotina do que aqueles que apresentam baixa busca pela novidade (Abreu-Villaça *et al.*, 2006), sugerindo que altos níveis de busca por novos estímulos podem contribuir significativamente para o abuso de drogas durante a adolescência.

Farmacocinética da nicotina

A nicotina é rapidamente absorvida pelos pulmões devido a extensa superfície alveolar e a fácil dissolução da nicotina no fluido pulmonar (Hukkanen e Jacob, 2005). A absorção da nicotina pode ser influenciada por sua concentração presente no tabaco, pela frequência e pela profundidade das tragadas. A rápida taxa de absorção da nicotina e as grandes quantidades de nicotina que chegam ao cérebro pelo tabagismo são dois fatores cruciais na promoção e manutenção da dependência. A absorção da nicotina pelo organismo é de cerca de 1,0 mg por cigarro, variando de 0,34 mg a 1,56 mg (Benowitz *et al.*, 2009).

Uma vez no sangue, a nicotina se distribui rapidamente por todo o organismo. As regiões corporais com maior afinidade pela nicotina são o fígado, os rins, o baço e, em especial, o sistema nervoso (Urakawa *et al.*, 1994). A nicotina alcança o cérebro aproximadamente 10 a 20 segundos após a absorção (Benowitz *et al.*, 1998), propagando-se das regiões mais internas até o córtex (Rosemberg, 1999). O pico de concentração no sangue ocorre após 5 a 10 minutos do início do consumo em uso regular e sua meia-vida é de aproximadamente duas horas em humanos (Hukkanen e Jacob, 2005). A nicotina é metabolizada principalmente no fígado (80% a 90%) e em menor proporção nos pulmões e rins (Hukkanen e Jacob, 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 e Morgan, 1996), tendo meia-vida longa, cerca de 20 horas em humanos (Taylor, 1996) e de 5,2 horas em roedores (Kyerematen e Vesell, 1991). Estas propriedades da cotinina permitem que ela seja frequentemente utilizada para estimar a quantidade de nicotina ao qual o indivíduo se expôs (Davis *et al.*, 1991).

Em geral, a nicotina tem um efeito psicostimulante sobre o SNC, em doses baixas, através das ações de reforço da norepinefrina e dopamina no cérebro (Clark *et al.*, 2008). Em

doses mais elevadas, no entanto, a nicotina aumenta o efeito da serotonina e atividade opiácea ao inibir a atividade do sistema GABAérgico e a liberação de dopamina, exercendo um efeito calmante (Silvette *et al.*, 1962). A estimulação do sistema nervoso simpático induzida pela nicotina acarreta no aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Narkiewicz *et al.*, 1998), do volume de ejeção cardíaco (Irving e Yamamoto, 1963) e no fluxo coronariano (Barger *et al.*, 1957).

A nicotina interage com os receptores nicotínicos da acetilcolina neuronais (nAChRs). Após a ligação da nicotina sobre estes receptores, o canal iônico é aberto e provoca um influxo de sódio e de cálcio (Ca²⁺). Este aumento local do Ca²⁺ intracelular pode alterar as funções celulares (Barik e Wonnacott, 2009). Em numerosas vias, Ca²⁺ age como um mensageiro intracelular, preparando o palco para nAChRs como potentes candidatos para influenciar uma variedade de processos neuronais Ca²⁺ dependentes, como a liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica ou transcrição de genes.

Apesar de a nicotina ser considerada a principal substância responsável pela dependência ao tabaco, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos. Em particular, tem sido sugerido que tanto a dessensibilização quanto a suprarregulação de nAChRs têm papel nos mecanismos de dependência (Buisson e Bertrand, 2001; Buisson e Bertrand, 2002; Dani e De Biasi, 2001; Quick e Lester, 2002). A dessensibilização pode ser definida como uma diminuição ou perda de resposta biológica destes canais em resposta a uma estimulação repetitiva ou prolongada. Para nAChRs, a dessensibilização pode ser descrita como um declínio na resposta à nicotina após uma exposição repetitiva à nicotina. O início da dessensibilização é dependente de tempo e concentração (Garrido *et al.*, 2001; Karlin, 2002). Acredita-se ainda que mecanismos de suprarregulação e dessensibilização estejam envolvidos na regulação de monoaminas do cérebro. Neste sentido, a exposição crônica a nicotina pode gerar alterações nas vias de recompensa, no circuito límbico e nas respostas emocionais.

Alterações emocionais provocadas pelo tabagismo

O período da adolescência é reconhecido como período de alto risco no desenvolvimento de desordens de humor, como desordens depressivas e de ansiedade (Kessler *et al.*, 2001). Interessantemente, estudos indicam que existe uma alta prevalência de

desordens de humor entre adolescentes com histórico de uso de drogas de abuso, como o tabagismo (Kandel *et al.*, 1999). Esta associação pode ser explicada de duas diferentes maneiras. Primeiramente, a associação é explicada pela existência de um mesmo substrato genético e/ou ambiental. Por outro lado, pode ser explicada por uma relação causal, onde consumo de drogas pode levar a desordens de humo e vice-versa. Neste sentido, e de particular interesse para o presente estudo, tem sido demonstrado que o uso de tabaco durante a adolescência promove aumento dos níveis de ansiedade, como também, a ansiedade parece ser um sintoma relevante da abstinência pela nicotina (Hughes *et al.*, 2000; Parrot, 2003). Além disso, estudos indicam que a interrupção do tabagismo pode gerar sintomas de depressão que podem ser revertidos com o retorno do hábito de fumar (Stage *et al.*, 1996), bem como tem sido descrito um efeito anti-depressivo no uso de adesivo contendo nicotina em indivíduos não fumantes (Salin-Pascual *et al.*, 1995).

Modelos animais tem ajudado a esclarecer essa associação entre a exposição ao tabaco, em especial a nicotina, e desordens de humor. Estudos sobre ansiedade tem demonstrado que a exposição nicotina pode ter efeitos tanto ansiolíticos (Brioni *et al.*, 1993) como ansiogênico (Ouagazzal *et al.*, 1999), dependendo da idade e modelo de administração. Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a abstinência da nicotina durante a adolescência promoveu um efeito ansiogênico em camundongos fêmeas (Abreu-Villaça *et al.*, 2008), corroborando a idéia que fêmeas são mais susceptíveis aos efeitos da nicotina e que a ansiedade pode ser fator de fundamental importancia na manutenção do hábito de fumar. Estudos animais também corroboram o efeito antidepressivo da nicotina (Suemaru *et al.*, 2006), como também, que a abstinência de nicotina promove aumento do comportamento associado a depressão (Mannucci *et al.*, 2006). Da mesma forma, em um estudo do nosso grupo, a abstinência pela nicotina promoveu aumento do comportamento tipo depressivo em fêmeas (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011). Poucos trabalhos em biologia experimental tem se dedicado a descrever as alterações emocionais provocadas pela exposição a fumaça de cigarro e não somente a exposição a nicotina. Nosso grupo, interessadamente, observou em um estudo recente que a exposição a cigarros com altos níveis de nicotina promoveram aumento de comportamento associado a ansiedade, enquanto que o aumento de comportamento associado a ansiedade só foram abservados na abstinência de cigarros com insignificantes níveis de nicotina (Abreu-Villaça *et al.*, 2014). Este resultado indica que outros componentes, além da nicotina, tenham papel relevante nos efeitos do tabaco na geração de alterações emocionais.

Cafeína

Chá e café estão entre as bebidas mais populares em todo o mundo. A principal substância farmacologicamente ativa em ambos é o alcalóide da classe das xantinas, 1,3,7,-trimetilxantina ou cafeína. A cafeína é encontrada naturalmente nas bebidas acima citadas e em diversos produtos como o cacau e o guaraná. Além disso, ela é adicionada artificialmente em medicamentos, bebidas energéticas e refrigerantes, especialmente nos com composição a base de cola. Nestes casos, a cafeína é utilizada apenas por seus efeitos psicoativos estimulantes.

No que diz respeito ao café, os hábitos de consumo e a quantidade ingerida variam de acordo com a localidade. Vale destacar que existem várias formas de preparação do café, fato que faz com que a quantidade extraída de cafeína seja diferente, sem falar na composição genética do grão, que também interfere na quantidade de cafeína a ser extraída. Assim sendo, o conteúdo de cafeína em cada xícara de café pode variar consideravelmente, indo de 40 a 180 mg/150 mL de café (0,4 a 2,5 mg/kg de cafeína). Entretanto, a cafeína, como dito anteriormente, está presente numa grande variedade de produtos e a concentração de cafeína nestes também pode variar bastante. Assim, como exemplo, temos: chá, 24 a 50 mg/150 ml, 15 a 29 mg/180 ml 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).

Farmacocinética da cafeína

A absorção da cafeína ocorre de maneira rápida no trato gastrointestinal, chegando a 98% de absorção em seres humanos após cerca de 45 minutos de ingestão (Arnaud 1976; Yesair *et al.* 1984; Fredholm *et al.*, 1999), com os 2% restantes sendo excretado na urina de forma inalterada (Arnaud, 1987; Gorodischer *et al.*, 1986; Somani e Gupta, 1988). Como a cafeína possui grande solubilidade lipídica e baixa ligação às proteínas plasmáticas, estas

características permitem a rápida passagem pelas membranas celulares, além da travessia da barreira hematoencefálica, o que permite que ela afete no sistema nervoso central (Fredholm *et al.*, 1999). Da mesma forma, a cafeína possui rápida distribuição no leite, onde normalmente são encontrados cerca de 75% da concentração plasmática. A meia-vida plasmática da cafeína para os adultos é entre duas e quatro horas (Benowitz, 1998), não tendo diferença no tempo de meia-vida entre jovens e idosos. Durante alguns períodos específicos, como o terceiro trimestre de gestação e durante o período neonatal, a meia-vida pode estar aumentada, devido à menor atividade das enzimas do citocromo P-450 e à imaturidade nas vias de desmetilação e acetilação hepáticas (Carrier *et al.*, 1988; Nehlig e Debry, 1994; Fredholm *et al.*, 1999). A saturação do metabolismo da cafeína deve-se, em grande parte, ao metabolismo da paraxantina, pois a paraxantina acumula-se no plasma, levando a uma redução do clearance da cafeína (Mandel, 2002). Com isso, um consumo a longo prazo e em altas doses favorece a atividade da paraxantina, contribuindo para a ação farmacológica da cafeína.

Em roedores, é observado algumas diferenças farmacocinéticas da cafeína quando comparada 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 (Bonati *et al.*, 1984–1985; Fredholm *et al.*, 1999). O tempo de meia-vida em roedores tende ser mais rápida do que em humanos, variando entre 40-70 minutos. Durante o desenvolvimento, tanto em humanos como em roedores, o tempo de meia-vida está aumentado (Nehlig e Debry, 1994).

A cafeína exerce seu desempenho aumentando o efeito sobre o corpo humano, principalmente por cinco mecanismos:

- A. Antagonismo da adenosina (Holtzman *et al.*, 1991). Devido à sua semelhança química com a adenosina, a cafeína bloqueia os receptores de adenosina (principalmente subtipos de receptores A1 e A2A), inibindo assim competitivamente sua ação (Ribeiro e Sebastião, 2010). A cafeína pode diminuir o fluxo sanguíneo cerebral (Cameron *et al.*, 1990), bem como antagonizar A1, receptores A2A e A2B de adenosina nos vasos sanguíneos, reduzindo assim a vasodilatação mediada por adenosina e, conseqüentemente, diminuir o fluxo sanguíneo do miocárdio (Namdar *et al.*, 2009).
- B. Aumento da oxidação de ácidos: o aumento da lipólise leva à diminuição da dependência da utilização de glicogênio (Spriet *et al.*, 1992). A cafeína

- aumentando atividade da lipase e inibe a atividade da glicogênio fosforilase sensível a hormônio (Rush e Spriet, 2001).
- C. Cafeína atua como um inibidor competitivo não seletivo das enzimas fosfodiesterase (Umenura *et al.*, 2006). Esta inibição leva ao aumento dos níveis celulares de AMPc.
- D. Mobilização de cálcio intracelular: Demonstrou-se que a cafeína pode melhorar a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (Supinski *et al.*, 1984) e pode também inibir a recaptção (Endo, 1977). Através deste mecanismo, a cafeína pode aumentar a força contrátil durante contrações submáximas em consumidores de cafeína habituais e não habituais (Tamopolsky e Cupido, 2000). O cálcio intracelular favorece a ativação do óxido nítrico sintetase endotelial, o que aumenta o óxido nítrico (Echeverri *et al.*, 2010). Alguns dos efeitos ergogênicos da cafeína, por conseguinte, pode muito bem ser mediada, em parte, efetuando o sistema neuromuscular e aumentando a força contrátil (Tamopolsky, 2008).
- E. Aumento da taxa de renovação de monoaminas, como a serotonina, dopamina e noradrenalina (Fernström *et al.*, 1984; Bickford *et al.*, 1985; Hadfield e Milio, 1989; Herlenius e Lagercrantz, 2004).

Nos seres humanos os efeitos estimulantes da cafeína traduzem-se por uma redução da fadiga, insônia, melhora da concentração e do desempenho de atividades motoras. Segundo estudos, apesar de provocar aumento na velocidade de realização de cálculos, parece não melhorar sua precisão (Bennett *et al.*, 2006). Entretanto, estes benefícios só são perceptíveis até um limite de 200 mg de cafeína que, ao ser ultrapassado, pode inibir estas capacidades (IFIC, 2008). As metilxantinas possuem efeitos semelhantes às anfetaminas em relação à diminuição do cansaço e melhora da função mental, porém produzem menor estimulação locomotora, não induzem euforia, comportamentos estereotipados e estados psicóticos (Swerdlow *et al.*, 1986). Altas doses de cafeína na dieta (>200 mg), aumentam os níveis de ansiedade e podem induzir ataques de pânico. Indivíduos com problemas de ansiedade e pânico são especialmente susceptíveis aos efeitos da cafeína (Smith, 2002).

A ingestão de cafeína pode ser considerada como a forma mais recorrente de auto-administração de drogas em humanos (Griffiths e Woodson, 1988). O consumo agudo ou crônico da cafeína parece não ter consequências negativas alarmantes, como podemos observar no DSM-IV, onde este fármaco não é classificado como uma droga que causa

dependência (Tanda e Goldberg, 2000). Além disso, por ser considerada uma droga segura e as agências regulatórias não impõem restrições a sua utilização, seu consumo é tão amplo que cerca de 95% das mulheres grávidas ingerem algum produto com cafeína (Jarosz *et al.*, 2012; Watkinson e Fried, 1985) e seu uso continua por toda a vida, ocorrendo inclusive durante a amamentação e ao longo da 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, principalmente derivada de refrigerantes (Fredholm *et al.*, 1999). Além disso, pelo menos 77% das crianças ingerem cafeína na dieta, com tendência de aumento nos últimos anos (Tanda e Goldberg, 2000).

Cafeína durante o desenvolvimento

A exposição a fatores ambientais diversos como drogas terapêuticas e recreacionais, radiações ionizantes, solventes orgânicos durante o período intrauterino pode interferir no desenvolvimento cerebral do feto. A mãe não é apenas uma proteção contra o meio externo para o feto, mas também uma fonte para a exposição a fatores ambientais que, se capazes de atravessar a placenta, poderão afetar o desenvolvimento cerebral do feto (Gressens *et al.*, 2001; Streissguth *et al.*, 1980). Vale citar que estudos demonstram que fetos que são expostos a cafeína são mais susceptíveis à obesidade e hipertensão (Cayetanot *et al.*, 2009; James *et al.*, 2004).

Aproximadamente 70% das mulheres consomem cafeína diariamente durante a gestação (Frary *et al.*, 2005). Durante o terceiro trimestre gestacional, o tempo de meia-vida da cafeína é maior, além disso, como dito anteriormente, a cafeína possui alta solubilidade lipídica e baixa ligação às proteínas plasmáticas, permitindo que esta droga atravesse livremente as membranas celulares, incluindo a placenta. Níveis elevados de cafeína foram relatados em crianças prematuras nascidas de mulheres que foram consumidoras pesadas de cafeína (Khanna e Somani, 1984), e em recém-nascidos, a concentração de cafeína no plasma e no fluido cerebrospinal é similar (Turmen *et al.*, 1979; Somani *et al.*, 1980). Durante os 7-9 primeiros meses de vida pós-natal existe deficiência das enzimas necessárias para realizar a desmetilação da cafeína, assim, a meia-vida plasmática pode variar entre 32-149 horas (Tanda e 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 de 1,4 a 7,2 µg/ml no leite materno. Estas concentrações no leite materno levam a estimar que a criança irá ingerir diariamente entre 1,3 a 3,1 mg de cafeína (Soares e Fonseca, 2004).

De modo geral, o consumo moderado de cafeína é considerado seguro durante a gestação e lactação (Tanda e 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; Bakker *et al.*, 2010). Em um estudo em humanos, foram relatados efeitos negativos do consumo da cafeína, como o aumento no risco de restrição no crescimento fetal em mães que consumiram essa substância ao longo da gravidez (Nehlig e Debry, 1994). 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, como por exemplo a espinha bífida, (Schmidt *et al.*, 2009) e problemas sociais durante a infância (Chiu *et al.*, 2009).

Estudos em roedores confirmam o baixo potencial teratogênico da administração de cafeína em doses baixas. O limiar de concentração plasmática o qual a cafeína induz malformação fetal é acima de 60-80 µg/mL (Purves, 1993). Contudo, quando administrada acima de 7 copos de café por dia pela gestante, a cafeína tem sido associada com redução do crescimento (Nehlig e Debry, 1994), da massa cerebral dos fetos (Tanaka *et al.*, 1987) e uma série de distúrbios neurocomportamentais. Sabe-se também que, em comparação aos controles, os animais expostos à cafeína apresentam menores níveis de DNA, RNA, colesterol e proteínas no cérebro (Nakamoto *et al.*, 1986; Nakamoto *et al.*, 1988; Nakamoto *et al.*, 1991). Altas doses de cafeína quando administradas durante o período pós-natal recente de roedores também produziu efeitos negativos sobre o cérebro. A administração intraperitoneal de cafeína (50 mg/kg, 3 vezes ao dia) em filhotes de ratos de 7 dias de idade produziu morte neuronal no córtex parietal, córtex temporal, núcleo estriado, células granulares do giro denteado, tálamo e hipotálamo (Kang *et al.*, 2002).

Como citado acima, um dos efeitos primários da cafeína é o bloqueio dos receptores de adenosina A1 e A2A, fato corroborado com o 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. No entanto, estudos em roedores têm mostrado que existem efeitos secundários em diversas classes de neurotransmissores, como a noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, glutamato e GABA, que influenciam diferentes funções fisiológicas (Daly *et al.*, 1981). Também neste sentido, outro estudo

demonstrou que a exposição pré-natal a cafeína induziu mudanças bioquímicas, como as modificações nos níveis cerebrais de catecolaminas, tirosina, triptofano, serotonina e nucleotídeos cíclicos nos cérebros de 1 a 35 dias em ratos (Nehlig *et al.*, 1992).

Estas alterações neuroquímicas produzidas pela exposição à cafeína durante o desenvolvimento podem acarretar em alterações no padrão comportamental tardiamente. Em ratos, a exposição à cafeína em doses moderadas (10mg/Kg/dia, equivalente a 2-3 copos de café por dia) durante toda a gestação interferiu negativamente com o reconhecimento de objetos e o comportamento no labirinto radial (Soellner *et al.*, 2009), o que sugere influência sobre o aprendizado e memória. A exposição de cafeína na água de beber contendo 0,2 ou 0,3 mg/mL (equivalente a 28 e 36mg/kg de dose) durante o período gestacional resulta no aumento da locomoção e de rearing em ratos adolescentes testados no teste do campo aberto (Hughes e Beveridge, 1990). Contudo, outro estudo realizado em machos cujas mães foram expostas à cafeína durante a gestação e lactação a doses de 26 ou 45 mg/kg, mostrou que houve diminuição da locomoção e aumento de defecação no teste do campo aberto (Hughes e Beveridge, 1991).

Interações entre cafeína e nicotina

Muitas evidências epidemiológicas apontam para uma forte associação do uso destas substâncias (Kendler *et al.*, 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 (Rose e Behm, 1991; Brown e Benowitz, 1989; Swanson *et al.*, 1994). Neste sentido, estudos apontam 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.

Em modelos animais, estudos também apontam os efeitos do co-uso dessas drogas sobre diferentes comportamentos como atividade locomotora e auto-administração (Tanda e Goldberg, 2000). Celik 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). O aumento de locomoção induzido pela nicotina foi maior no grupo

que recebeu desafio com cafeína. Cohen e colaboradores (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, enquanto que em camundongos tratados também cronicamente com cafeína esse efeito foi abolido (Nikodijevic *et al.*, 1993).

No entanto, poucos desses estudos mimetizam com precisão 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. Além disso, de especial relevância para este estudo, 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 (0,25 mg/mL, resultando em 0,37 µg/mL de concentração plasmática) potencializou os efeitos estimulatórios da nicotina sobre a atividade locomotora e que a exposição a altas concentrações de cafeína (1mg/mL; 5.95 µg/mL) não alterou os efeitos da nicotina. Em estudo realizado por Rossi *et al.* (2008) foi visto que a exposição crônica à cafeína resultou em sensibilização das sinapses gabaérgicas aos efeitos de estimulação pré-sináptica por canabinóides, porém a cafeína não alterou a sensibilidade da transmissão glutamatérgica. Estes estudos demonstram que, a cafeína pode influenciar nos efeitos de outras drogas, atuando assim, na susceptibilidade aos efeitos destas.

Assim, considerando que: 1º) a cafeína possui consumo tão amplo que de 95% das mulheres grávidas ingerem alguma cafeína e que este consumo se dá ao longo de toda a vida, principalmente tendo em vista que a cafeína está presente em diversos produtos; 2º) muitas evidências epidemiológicas apontam para uma forte associação do uso da cafeína e do tabaco; 3º) o tabaco é uma das drogas mais consumidas no mundo; 4º) mais de 90% dos fumantes iniciam o hábito durante a adolescência; e que 5º) os adolescentes apresentam maior dificuldade de abandonar tabagismo e apresentam alterações emocionais mais intensas em comparação aos adultos tabagistas, avaliaremos os efeitos da co-exposição de cafeína e do tabaco durante a adolescência sobre a resposta emocional em camundongos.

1 OBJETIVOS

Identificar alterações comportamentais em animais expostos a fumaça do cigarro e/ou cafeína durante a adolescência.

Considerando que alterações emocionais são consequências importantes do tabagismo e que, parecem estar envolvidas nos processos de dependência e recaída, no presente estudo investigaremos os efeitos da co-exposição no comportamento associado a ansiedade e sobre o comportamento associado a depressão. O comportamento associado à ansiedade será avaliado utilizando-se o teste do labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze*). O comportamento tipo depressivo será avaliado utilizando o teste do nado forçado (*forced swimming test*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para este estudo, foram utilizados camundongos Suíços, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro num ciclo diário de 12 horas claro/escuro (onde o período escuro inicia a partir de 13 h), com temperatura controlada e mantida em torno de 21° C, e livre acesso à água e comida. Os experimentos descritos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/014/2011) 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.

2.2. Formação dos grupos experimentais

Os animais progenitores foram agrupados em caixas com um macho e duas (no máximo, três) fêmeas. Assim que a gravidez era verificada, a fêmea grávida era individualizada e acompanhada diariamente para determinação do dia do nascimento, que é considerado o primeiro dia pós natal (PN1). Ao completarem 21 dias de vida pós-natal (PN21), os animais foram desmamados e separados por sexo, estes permaneceram juntos até PN30. Foram utilizadas um total de 456 animais oriundos de 60 ninhadas sendo os animais divididos entre os grupos experimentais (4 grupos) e por idade de estudo (3 idades).

2.2.1 Exposição à cafeína

O período de exposição se estendeu desde o primeiro dia de cruzamento (C1) até o último dia de teste comportamental.

A cafeína (cafeína anidra 1,3,7 trimetilxantina, Proquimios, BR) foi diluída em água destilada. A concentração de 0,1 g/L foi escolhida por simular a exposição equivalente ao consumo diário de 1-2 xícaras de café (Bjorklund e colaboradores, 2008). O grupo controle recebeu água potável durante todo o período de exposição.

Para estimar a quantidade de cafeína consumida, a massa corporal dos animais e o volume de líquido nas garrafas foram aferidos a cada três dias (onde houve a renovação do conteúdo das garrafas) ao longo de todo o período de exposição.

2.2.2 Exposição à fumaça de cigarro

Utilizamos cigarros específicos de pesquisa (Slotkin *et al.* 2001) para gerar a fumaça a partir de uma máquina de queima de cigarros (Figura 1 - foto da máquina com descrição) (Teague Enterprises, Davis, CA). Os animais são expostos ao cigarro do tipo 3R4F (Universidade de Kentucky) contendo 0,73 mg de nicotina por cigarro. Este cigarro apresenta valores próximos aos cigarros industrializados (Tabela 1). Animais controle foram expostos ao ar.

TABELA 1. Concentração de alcatrão, nicotina e monóxido de carbono (CO) em cigarros industrializados. Cig = cigarro

Cigarros	Alcatrão	Nicotina	CO
Cigarro 3R4F	9,4 mg/cig	0,73 mg/cig	12 mg/cig
MALBORO (vermelho)	10 mg/cig	0,8 mg/cig	10 mg/cig
L&M (azul)	7 mg/cig	0,6 mg/cig	9 mg/cig
Derby (azul)	8 mg/cig	0,7 mg/cig	9 mg/cig

Figura 1 - Máquina de fumaça de cigarro (Teague Enterprises, Davis, CA).



Legenda: O cigarro é empurrado pelo pistão, entrando em contato com a resistência que provoca seu acendimento. A fumaça formada é direcionada para a câmara de mistura e desta, por tubos dispostos na parte posterior da máquina (não mostrados nesta figura) para as câmaras de exposição, nas quais os animais se encontram.

Fonte: O Autor, 2014.

Fumantes regulares tendem a manter níveis constantes de nicotina plasmática durante o dia, por isso possibilitamos aos animais ter livre acesso à fumaça de cigarro durante seu período de atividade.

Desta forma, um estudo completo do impacto da co-exposição à cafeína e ao tabaco necessitou de 4 grupos experimentais:

Grupo exposto ao tabaco (SMK+CAF): Neste grupo, os animais tiveram a solução de cafeína de 0,1g/L como única fonte de líquido. Após PN30, foram expostos a fumaça de cigarros para pesquisa 3R4F com concentração moderada de nicotina, durante 8 horas por dia.

Grupo exposto ao tabaco (SMK): Neste grupo, os animais receberam livre acesso a água potável como única fonte de líquido. Após PN30, foram expostos a fumaça de cigarros para pesquisa 3R4F com concentração moderada de nicotina, durante 8 horas por dia.

Grupo exposto à cafeína (CAF): Neste grupo, os animais tiveram livre acesso a solução de cafeína de 0,1g/L como única fonte de líquido. Os animais foram ambientados na mesma sala, em uma câmara separada com ventilação própria, durante 8 horas por dia.

Grupo Controle (VEH): Neste grupo, os animais receberam livre acesso a água potável como única fonte de líquido. Os animais foram ambientados na mesma sala, em uma câmara separada com ventilação própria, durante 8 horas por dia.

2.3. Testes comportamentais

Cada animal foi submetido ao teste de *Labirinto em cruz elevado* e do *nado forçado* ao final do período de exposição PN44/45), após curto (PN49/50) e longo período de retirada (PN74/75). O horário para a realização do teste comportamental, bem como o local de realização destes, foram os mesmos utilizados em todas as idades estudadas. Além disso, os animais foram ambientados na sala de testes por dez minutos antes de iniciada a análise comportamental. Para os animais testados ao final do período de exposição (PN44 e PN45), a sessão de teste comportamental era realizada após três horas de exposição a fumaça de cigarro, estes eram retirados da câmara de exposição e ambientados por 10 min como descrito acima.

2.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE (Figura 2) é um dos testes comportamentais mais utilizados para se quantificar os níveis de ansiedade em animais experimentais (Carobrez e Bertoglio, 2005). O LCE foi validado para uso em espécies de roedores, como camundongos (Lister, 1987) e ratos (Pellow e cols., 1985). As expressões comportamentais demonstradas no teste LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquiva, bem como de atividade geral (Carobrez e Bertoglio, 2005).

O LCE utilizado é um aparelho de acrílico de cor cinza, com formato em cruz e consiste em 2 braços abertos (sem paredes, 28.5 x 5 cm) e dois braços fechados (com paredes 28.5 x 5

x 14 cm) perpendiculares entre si e elevados 50 cm acima do chão.

FIGURA 2: Foto em vista superior do labirinto em cruz elevado.



Antes do início de cada teste, as gaiolas dos animais eram transportadas para a sala de teste, onde os animais eram ambientados por 10 minutos. Os camundongos foram colocados individualmente no centro do equipamento, e foi permitido que explorassem o labirinto por 10 minutos. Os testes foram realizados entre 08:00 e 13:00 horas. Após o término de cada teste, o labirinto é higienizado com um pano umedecido com água com o intuito de eliminar as excretas e minimizar odores que podem interferir no comportamento dos animais seguintes a serem testados.

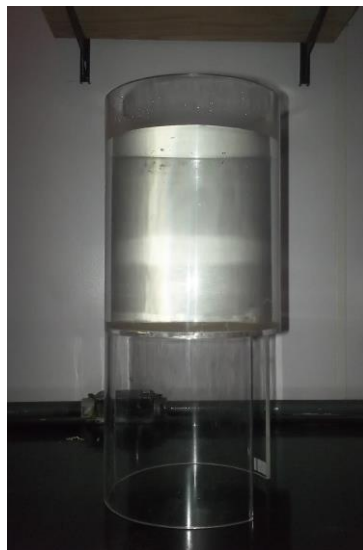
Todos os testes foram gravados por uma câmera digital de vídeo posicionada a 1 m acima do labirinto para análise posterior, sendo o percentual de tempo de permanência nos braços abertos, e o percentual de entradas nos braços abertos, usados como medidas de ansiedade (Elliott e cols., 2004; Ferandes e File, 1996; Hogg, 1996; Rodgers e Dalvi, 1997). Considerando que os efeitos de estimulantes ou depressores das drogas podem afetar a atividade locomotora, o que pode confundir a interpretação dos resultados, esta atividade foi avaliada pela quantificação do número de entradas nos braços fechados. Em adição, o percentual de tempo gasto no centro do labirinto foi usado como uma medida independente de tomada de decisão (Rodgers e Dalvi, 1997) e o número de alongamentos corporais para o braço aberto (*stretching*) usado como medida de avaliação de risco.

2.3.2 Teste do Nado Forçado (FST)

O FST (Figura 3) é o teste mais utilizado para se avaliar comportamento tipo depressivo em roedores (Bogdanova *et al.*, 2013). Utilizamos um teste modificado do original, onde cada animal foi submetido a uma sessão de 6 minutos. O procedimento do teste é descrito em detalhes em Filgueiras *et al.* (2006). Neste teste, cada camundongo foi colocado em um recipiente de acrílico (diâmetro = 19 cm, altura = 25 cm) preenchido com água (altura da coluna d'água = 20 cm) a uma temperatura de aproximadamente 25°C. O comportamento do animal foi continuamente registrado ao longo da sessão através de uma câmera digital de vídeo.

Foi avaliado no teste do nado forçado o tempo de imobilidade, representado pelo tempo que os animais permaneciam flutuando com a cauda e as patas imóveis com a exceção de pequenos movimentos posturais necessários à manutenção da cabeça do animal fora da água. A medida de imobilidade foi usada como medida de comportamento associado à depressão. Além disso, foram avaliados: o percentual de tempo de escalada, representado pelo movimento vigoroso de tentativa de saída do recipiente; o percentual de tempo de natação, representado pelo deslocamento ativo do animal pelas dimensões do recipiente; e o número total de transições entre os comportamentos descritos acima.

FIGURA 3. Fotografia com visão lateral do recipiente preenchido com água utilizado para a realização do teste do nado forçado.



2.4 Avaliação dos níveis de exposição ao tabaco

Para avaliação dos níveis de exposição ao tabaco foram realizados a avaliação dos níveis séricos da cotinina (principal metabólito da nicotina) e do conteúdo particulado total do ar das câmaras de exposição a fumaça de cigarro.

2.4.1 Cotinina

A fim de traçar um paralelo com a exposição humana, após o período e exposição, em PN45, um grupo separado de animais (6 animais por grupo experimental por sexo) foram decapitados para a coleta de sangue para avaliação dos níveis plasmáticos de cotinina. Além disso, essa avaliação tem como objetivo descrever um possível efeito farmacocinético da exposição crônica de cafeína nos animais expostos a fumaça de cigarro que poderiam possivelmente influenciar os resultados comportamentais observados no presente estudo. Para esta análise, o sangue foi centrifugado por 10min a $3.000 \times g$ ($4^\circ C$), e o soro foi armazenado a $-20^\circ C$. Os níveis foram determinados utilizando um kit de ELISA para cotinina em soro (OraSure Technologies - Bethlehem, PA), em conformidade com as recomendações do fabricante.

2.4.2 Partículas totais em suspensão no ar

Através de um método de filtração do ar corrente da câmara de exposição a fumaça de cigarro (filtro pallflex tipo TX40HI20-WW) com o controle do fluxo de ar da filtração seguindo as recomendações do fabricante (Teague Enterprises, Davis, CA), obtemos através da diferença do peso do filtro, antes e após a filtração, a quantificação das partículas totais em suspensão no ar (mg/m^3).

2.5 Análise estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média. A análise de resultados foi realizado através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM, USA). Para análise de massa corporal e ingestão de líquidos foi utilizado inicialmente análises de variancia com medidas repetidas (rANOVAs), considerando DIA como fator de repetição e TRATAMENTO (VEH ou CAF quando avaliado até PN30 e VEH, CAF, SMK e CAF+SMK quando avaliado nos animais experimentais após PN30) e SEXO como fatores. Caso houve interações significativas entre DIA×TRATAMENTO foram realizadas comparações através do teste *post-hoc* Fisher's Protected Least Significant Difference (FPLSD).

Para a análise comportamental, ANOVAs foram realizadas para cada uma das idades estudadas, considerando como fatores TRATAMENTO (VEH, CAF, SMK e CAF+SMK) e SEXO. ANOVAs de menor ordem foram utilizadas toda vez que interações de TRATAMENTO com SEXO foram detectadas. Diferenças entre grupos individuais foram analisadas utilizando FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) como teste *post-hoc*. Entretanto, toda vez que não há interação entre TRATAMENTO e outros fatores, apenas o efeito do TRATAMENTO é considerado.

O desenho do estudo requereu duas formas diferentes de análise do efeito do tratamento com nicotina e/ou etanol. Para comparar os quatro grupos tratados (VEH, CAF, SMK, CAF+SMK) entre si, uma análise unidimensional com o fator TRATAMENTO foi utilizada. Para determinar se cafeína interfere com os efeitos da fumaça de cigarro ou vice versa, ou seja, se há interação entre os efeitos da exposição à cafeína e fumaça de cigarro, uma análise bidimensional foi utilizada com um fator correspondendo ao tratamento com fumaça de cigarro (SMK) e o outro correspondendo ao tratamento com cafeína (CAF). Neste formato, efeitos mais-que-aditivos (sinergistas) e menos-que-aditivos aparecem como interações significativas entre as duas dimensões de tratamento (FUMAÇA×CAFEINA), enquanto que efeitos aditivos não apresentam interações significativas (Abreu-Villaça *et al.*, 2007; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008; 2009; 2011).

3. RESULTADOS

3.1. Perfil de exposição ao tabaco

3.1.1. Partículas totais em suspensão no ar

No presente trabalho observamos uma média de $31,6 \pm 2,4$ mg/m³ de partículas em suspensão no ar das câmeras durante o período de exposição a fumaça de cigarro. Estes valores encontrados são maiores aos que comumente seriam observados na condição de fumo passivo (EPA, 1993).

3.1.2. Cotina

Os camundongos expostos somente a fumaça de cigarro apresentaram níveis séricos de cotina de $41,1 \pm 8,9$ ng/ml, enquanto que camundongos co-expostos a cafeína e fumaça de cigarro apresentaram $36,4 \pm 6,0$ ng/ml. Não foram observados efeitos significativos do tratamento, sexo ou interações significativas entre estes fatores.

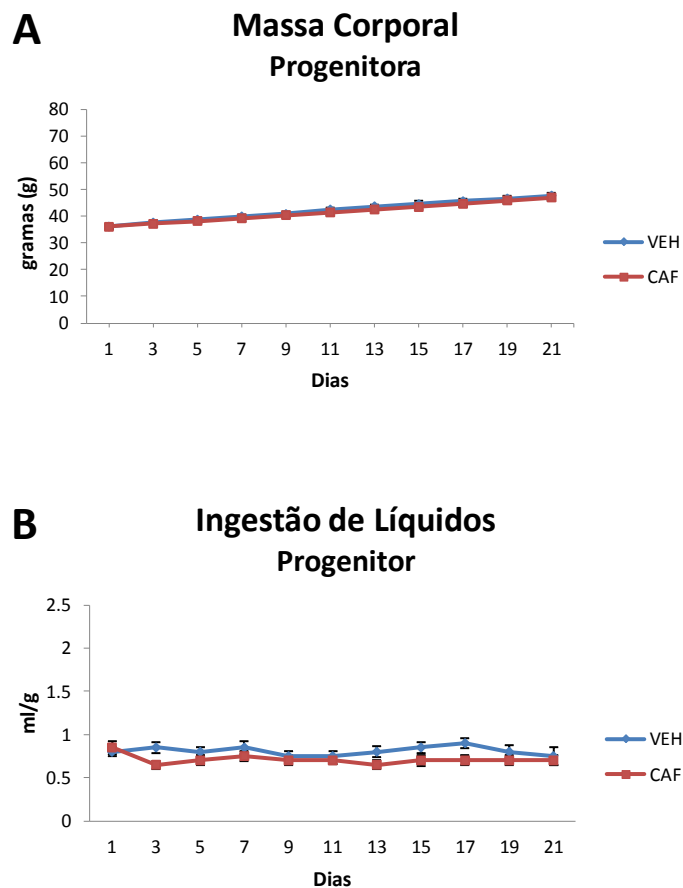
3.2. Avaliação de massa corporal e ingestão de líquido

3.2.1. Avaliação das progenitoras

Nossos resultados indicam um aumento da massa corporal das progenitoras durante o período de lactação (ANOVA, efeito do DIA: $F_{(1,6;96,7)} = 230,2$; $P < 0,001$), porém o ganho de peso não foi diferentes entre as progenitoras que bebiam água ou solução de cafeína (FIGURA 4A).

Em relação a ingestão de líquidos, não observamos qualquer efeito ou interação significativa (FIGURA 4B). O consumo médio por fêmea lactante foi de 70mg/kg de cafeína.

FIGURA 4 - Curso temporal das progenitoras durante o período de lactação.



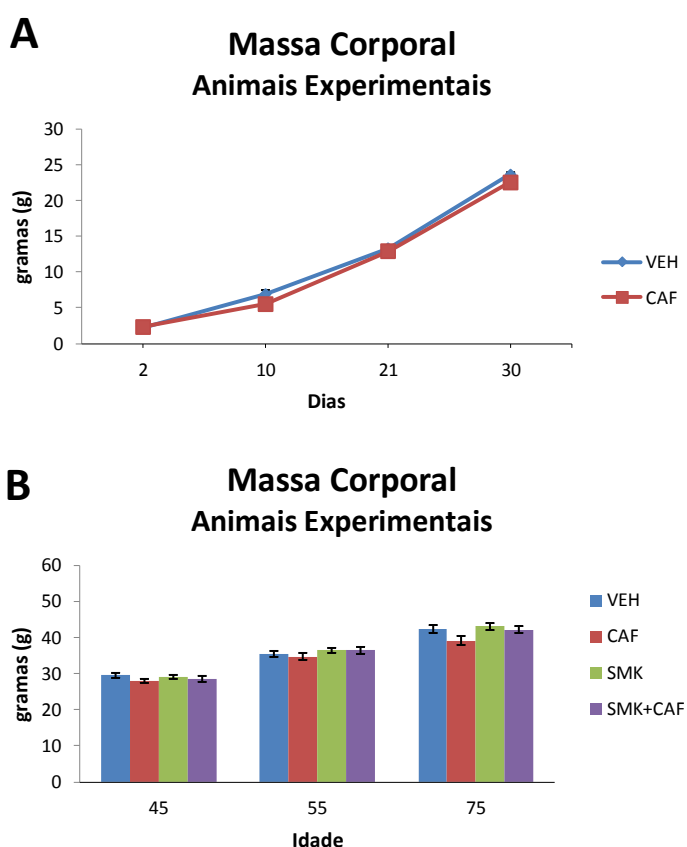
(A) Massa corporal. (B) Ingestão de líquidos. Valores representam médias \pm erro padrão da média.

3.2.2 Avaliação dos animais experimentais

A avaliação da massa corporal dos animais experimentais indicou um aumento da massa corporal (ANOVA, efeito do DIA: $F_{(2,2; 304,2)} = 1614,2$; $P < 0,001$). A ANOVA não indicou quaisquer interações significativas (DIA \times TRATAMENTO; DIA \times SEXO e DIA \times TRATAMENTO \times SEXO). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos ao final do período de exposição a fumaça de cigarro (PN45) ou em seu período de retirada (PN55 e 75, FIGURA 5).

Em relação a ingestão de líquidos pelos animais experimentais, não observamos qualquer efeito ou interação significativa (TABELA 2). O consumo médio ao longo do tempo por animal foi de 23mg/kg de cafeína para o grupo CAF e de 24mg/kg para o grupo CAF+SMK.

FIGURA 5 - Curso temporal da dos animais experimentais.



(A) Massa corporal até o início da exposição a fumaça de cigarro. (B) Massa corporal nas idades de avaliação comportamental. Valores representam médias \pm erro padrão da média.

TABELA 2 - Ingestão de líquidos pelos animais experimentais (ml/g)

	VEH	CAF	SMK	SMK+CAF
PN30	0,31 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02	0,29 \pm 0,03	0,33 \pm 0,03
PN45	0,26 \pm 0,02	0,22 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02
PN55	0,22 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02
PN75	0,26 \pm 0,03	0,25 \pm 0,07	0,30 \pm 0,06	0,21 \pm 0,03

Valores apresentados como média \pm erro padrão da média.

3.3. Avaliação comportamental

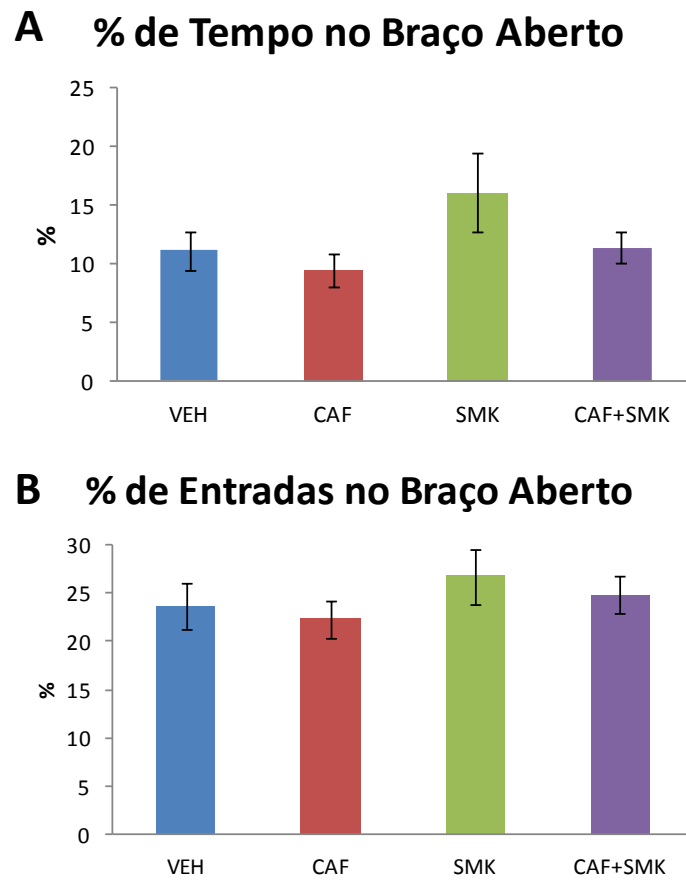
3.3.1. Labirinto em cruz elevado

3.3.1.1. Ao final do período de exposição à fumaça de cigarro

A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para as variáveis associadas a ansiedade (percentual de tempo de permanência no braço aberto e percentual de entradas no braço aberto; FIGURA 6).

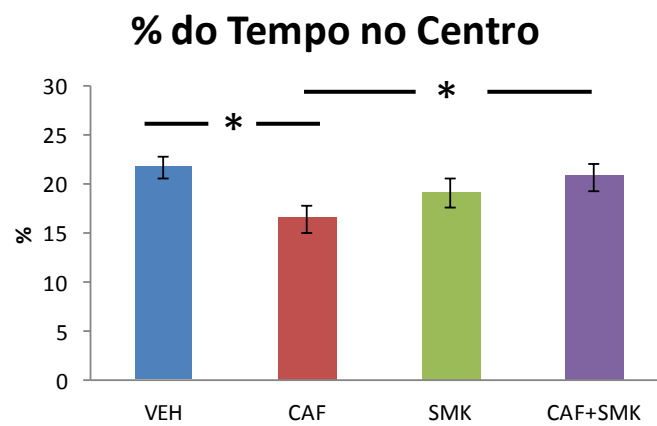
Para percentual de tempo no centro, a ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO ($F_{(3,125)} = 2,7$; $P < 0,05$). Este efeito pode ser explicado pelo fato de que animais do grupo que foram expostos à cafeína apresentaram menor percentual de tempo no centro quando comparado aos animais do grupo controle ($P < 0,01$, FIGURA 7). A co-exposição da cafeína com a fumaça de cigarro reverteu este efeito, como indicado pela interação entre os fatores exposição à cafeína e a fumaça de cigarro na ANOVA bidimensional ($F_{(1, 125)} = 6,3$, $P = 0,01$), desta forma, verificamos no caso um efeito menos que aditivo.

FIGURA 6 – Medidas no LCE em PN45.



(A) Percentual de tempo de permanência no braço aberto; (B) Percentual do número de entradas no braço aberto. Valores representam médias \pm erro padrão da média.

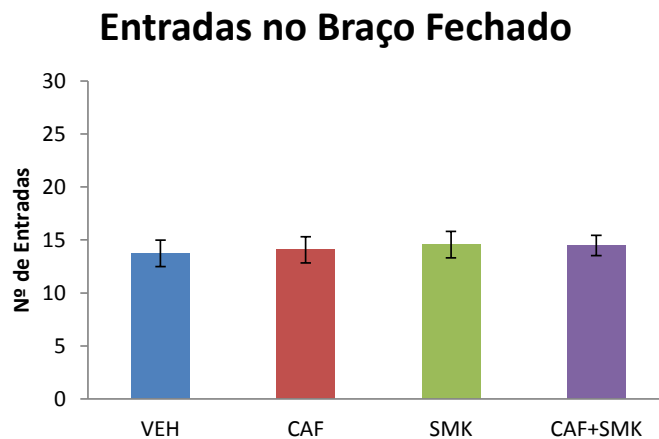
FIGURA 7 - Percentual de tempo de permanência no centro do labirinto no LCE em PN45.



Valores representam médias \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$

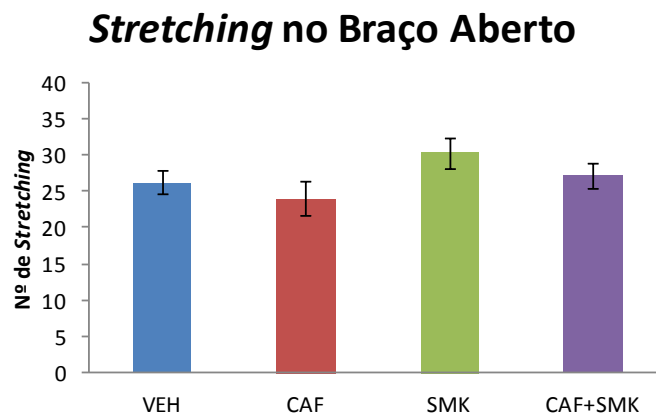
Para a medida de atividade motora e para a medida de avaliação de risco (número de alongamentos corporais para o braço aberto - *stretching*), não observamos diferenças significativas entre os grupos expostos quando comparados ao controle (FIGURA 8 e FIGURA 9, respectivamente).

FIGURA 8 - Número de entradas no braço fechado do LCE em PN45.



Valores representam médias \pm erro padrão da média.

FIGURA 9 - Número de alongamentos corporais para o braço aberto (*stretching*) em PN45.

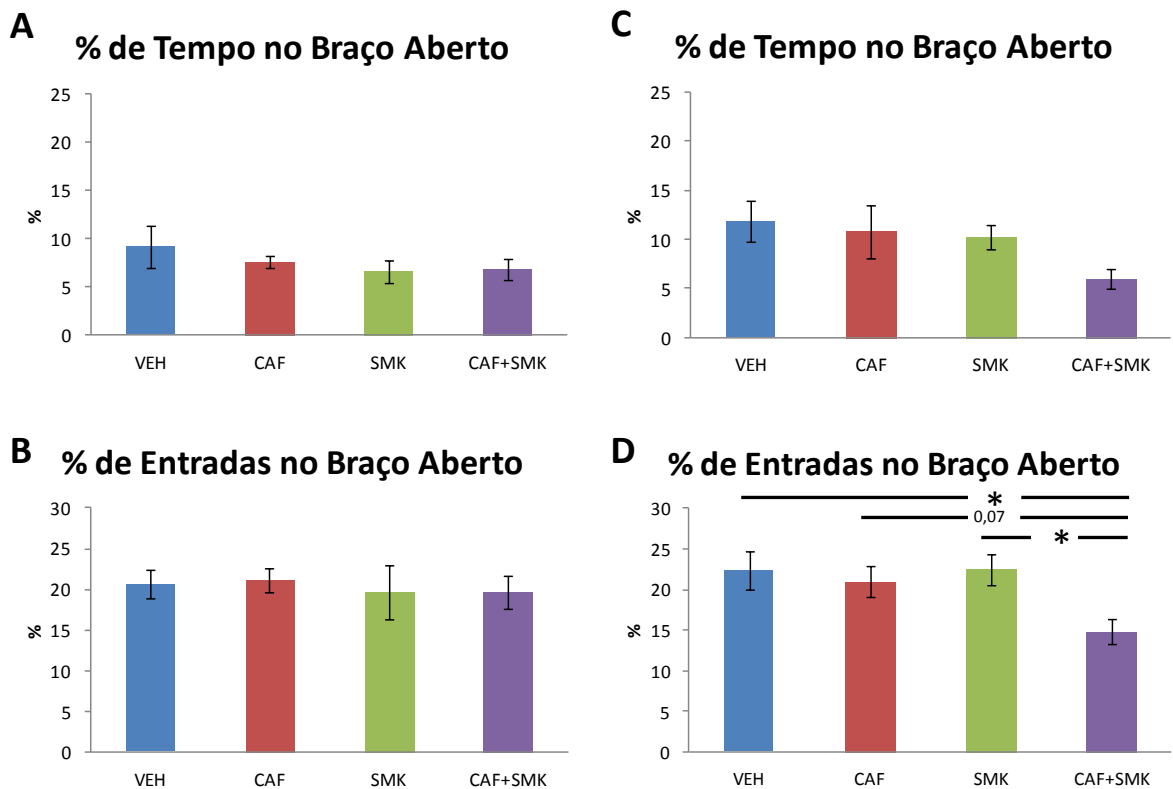


Valores representam médias \pm erro padrão da média.

3.3.1.2. Após período de retirada

A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para as variáveis associadas à ansiedade após o período de retirada da fumaça de cigarro durante a adolescência (Figura 10 A e B). No entanto, após longo período de retirada (PN75), foi observado efeito significativo do TRATAMENTO para o percentual de entradas no braço aberto ($F_{(3,162)} = 2,6$; $P=0,05$). Observamos que animais expostos à combinação de cafeína e fumaça de cigarro apresentaram redução do percentual de entradas no braço aberto (CAF+SMK < VEH, $P=0,01$; CAF+SMK<SMK, $P =0,01$; CAF+SMK<CAF, $P<0,07$; FIGURA 10D). A análise bidimensional não indicou interações significativas da exposição à cafeína com exposição à fumaça de cigarro, conotando o fato de que as alterações no percentual de entradas nos braços abertos refletem um efeito aditivo de ambas as exposições.

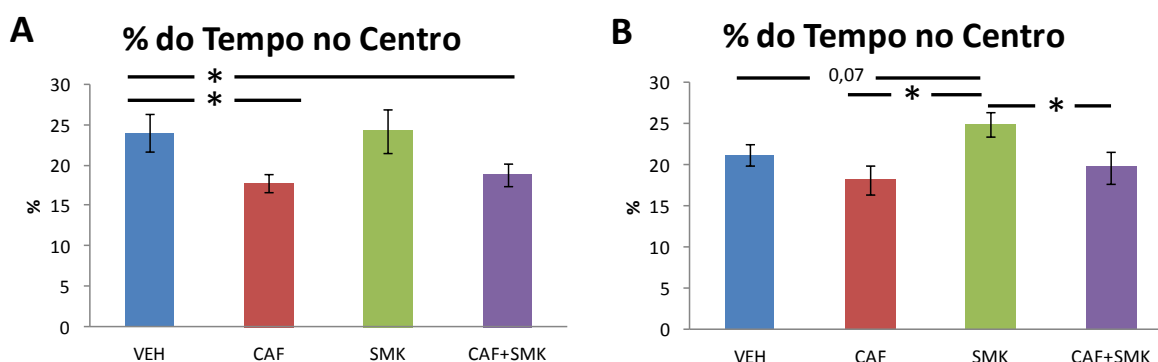
FIGURA 10 – Medidas no LCE em PN55 e PN75.



(A) Percentual de tempo de permanência no braço aberto no LCE em PN55; (B) Percentual do número de entradas no braço aberto no TCE em PN55. (C) Percentual de tempo de permanência no braço aberto no LCE em PN75; (D) Percentual do número de entradas no braço aberto no TCE em PN75. Valores representam médias \pm erro padrão da média. * $P<0,05$

A ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO em ambos os períodos de retirada estudados, PN55 ($F_{(3,166)} = 3,5$; $P=0,01$) e PN75 ($F_{(1,162)} = 3,2$; $P<0,05$), para o percentual de tempo no centro. Ambos os grupos que são expostos à cafeína apresentaram redução do percentual de tempo no centro durante o período mais curto de retirada (PN55) da fumaça de cigarro (CAF<VEH, $P<0,01$; CAF+SMK<VEH, $P=0,01$; FIGURA 11A). A análise bidimensional não indicou interações significativas da exposição à cafeína com exposição à fumaça de cigarro, refletindo um efeito aditivo. Já em PN75 (FIGURA 11B), os animais que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência apresentaram uma tendência ao aumento no percentual de tempo no centro quando comparados aos animais controles ($P=0,07$), sendo esse aumento significativo quando comparado aos demais grupos experimentais (SMK>CAF, $P<0,01$; SMK>CAF+SMK, $P<0,05$). A análise bidimensional indica, através de um efeito aditivo, a reversão pela exposição à cafeína do aumento do percentual de tempo no centro gerado pela abstinência da fumaça de cigarro.

FIGURA 11 - Percentual de tempo de permanência no centro do labirinto no LCE

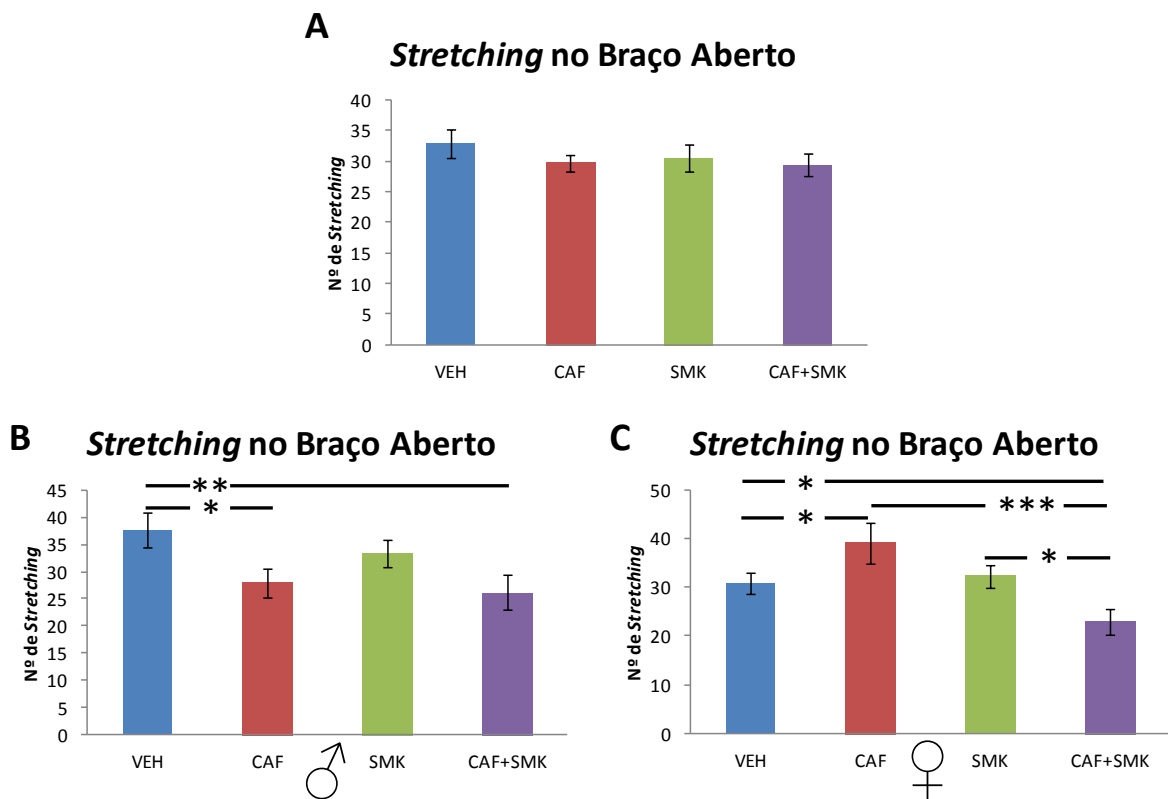


(A) em PN55; (B) em PN75. Valores representam médias \pm erro padrão da média. * $P<0,05$

Para a medida de avaliação de risco (*stretching*) a ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO ($F_{(3,162)} = 4,0$; $P<0,01$) somente em PN75, porém os efeitos foram diferentes entre os sexos (interação entre TRATAMENTO \times SEXO, $F_{(3,162)} = 3,0$; $P<0,05$). Em machos ($F_{(3,78)} = 2,7$; $P=0,05$), observamos uma redução do número de *stretching* para o braço aberto nos grupos expostos a cafeína quando comparados com o grupo controle (CAF<VEH, $P<0,05$; CAF+SMK<VEH, $P=0,01$, FIGURA 12B). A análise bidimensional indicou um efeito aditivo. Em fêmeas ($F_{(3,83)} = 4,8$; $P<0,01$), enquanto os animais que receberam a

exposição combinada durante a adolescência apresentaram redução do número de *stretching* para o braço aberto (CAF+SMK<VEH, $P<0,05$; CAF+SMK<SMK, $P<0,05$; CAF+SMK<CAF, $P<0,001$), as fêmeas expostas somente a cafeína apresentaram aumento significativo (CAF>VEH, $P<0,05$; FIGURA 12C). Neste caso, a análise bidimensional indicou interação entre os fatores exposição à cafeína e a fumaça de cigarro ($F_{(1, 83)} = 9,8$, $P=0,01$), desta forma, verificamos que a exposição combinada gerou um efeito menos que aditivo.

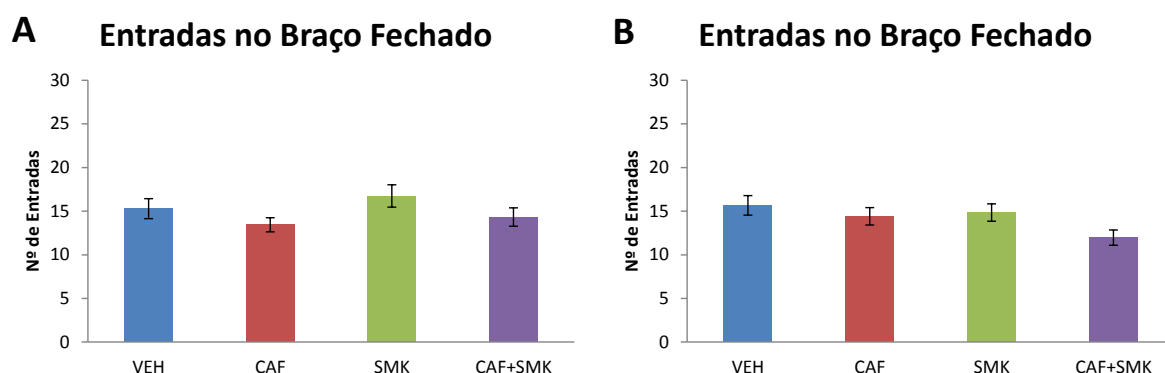
FIGURA 12 - Número de de alongamentos corporais para o braço aberto (*stretching*) durante período de retirada da exposição a fumaça de cigarro.



(A) em PN55; (B) em PN75 machos; (C) em PN75 fêmeas. Valores representam médias \pm erro padrão da média. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Para a medida de atividade motora, não observamos diferenças significativas entre os grupos expostos quando comparados ao controle em ambas as idades após a retirada da exposição à fumaça de cigarro. (FIGURA 13A e B).

FIGURA 13 - Número de entradas no braço fechado do LCE durante período de retirada da exposição a fumaça de cigarro



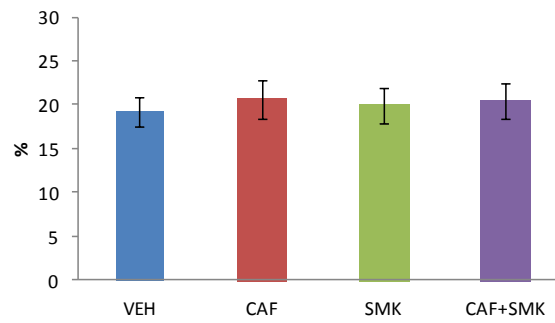
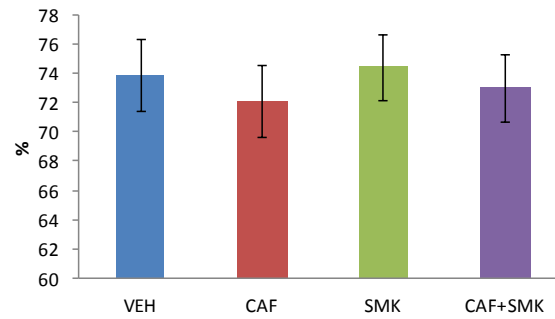
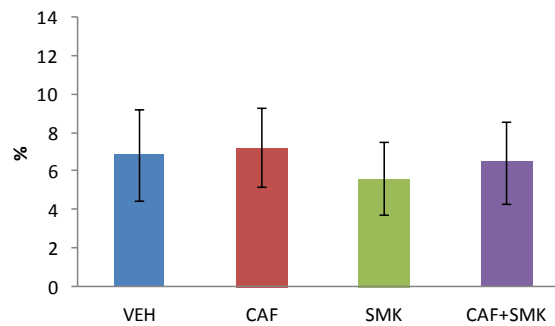
(A) em PN55 e (B) em PN75. Valores representam médias \pm erro padrão da média.

3.3.2 Comportamento associado a depressão

3.3.2.1. Ao final do período de exposição a fumaça de cigarro

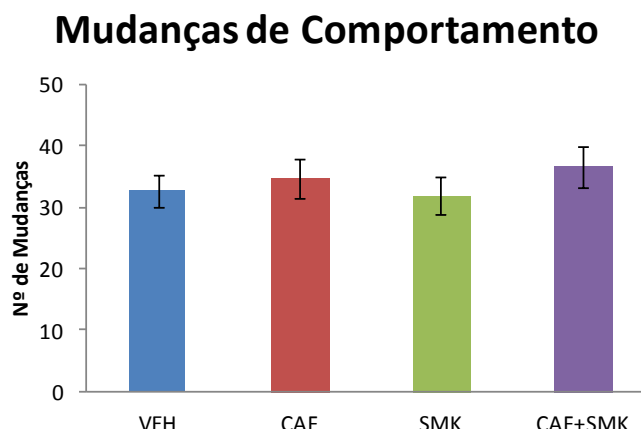
A ANOVA não indicou efeito do TRATAMENTO, como também não foi verificada interação entre TRATAMENTO e SEXO para nenhuma das variáveis estudadas no teste do nado forçado (FIGURAS 14 e 15).

FIGURA 14 - Percentual de tempo de atividade no TNF em PN45.

A % do Tempo de Escalada**B % do Tempo de Natação****C % do Tempo de Imobilidade**

(A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade.

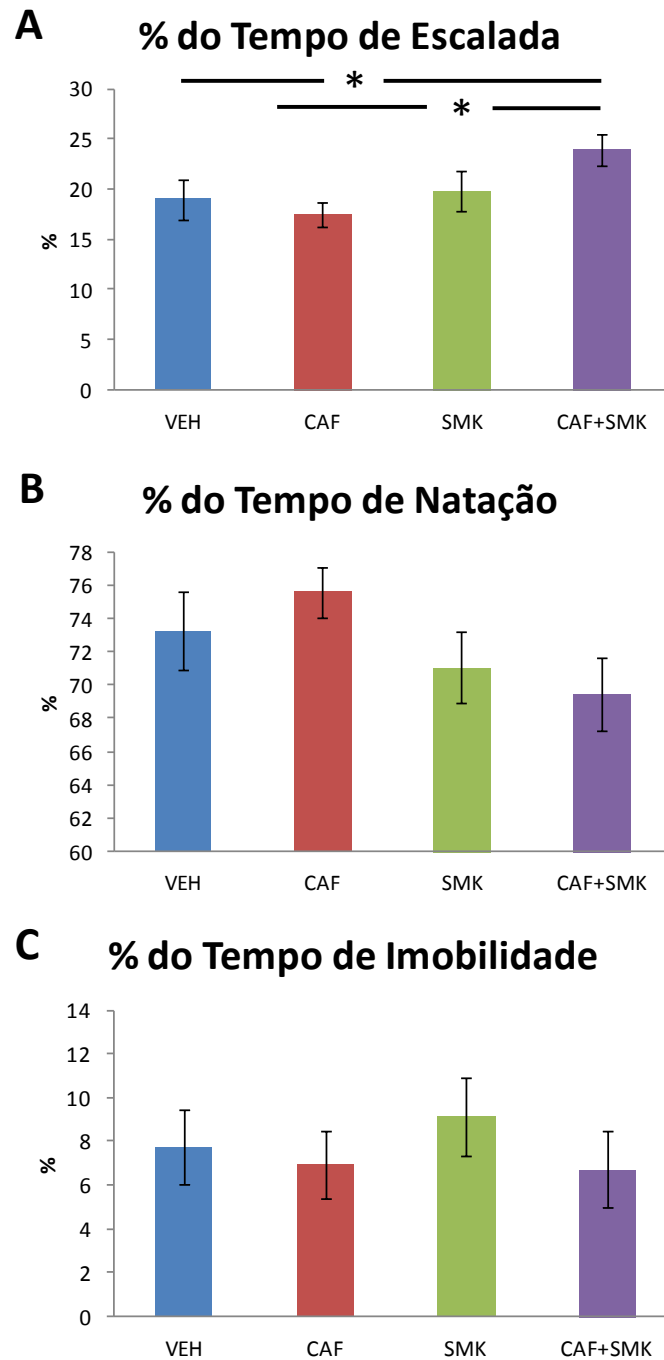
FIGURA 15 - Número de mudanças de comportamento no TNF em PN45.



3.3.2.2 Após período de retirada

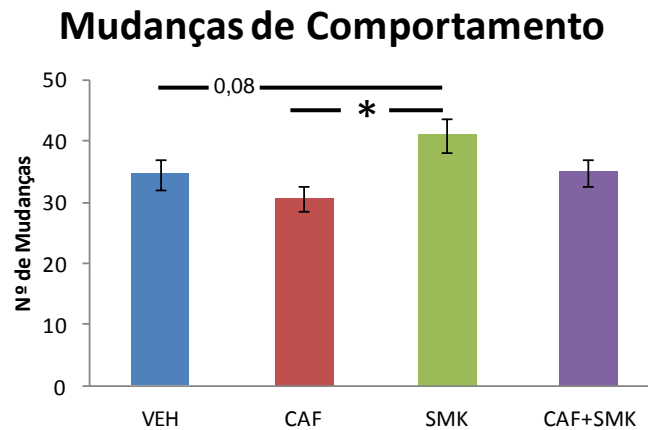
Em PN55, a ANOVA indicou efeito do TRATAMENTO para percentual de tempo de escalada ($F_{(3,168)} = 4,1$, $P < 0,01$) e número de mudanças de comportamento ($F_{(3,168)} = 3,2$, $P < 0,05$). Animais expostos de forma combinada a cafeína e fumaça de cigarro apresentaram aumento do percentual de tempo de escalada quando comparados aos grupos controle (CAF+SMK > VEH, $P < 0,01$) e CAF (CAF+SMK > CAF, $P < 0,01$; FIGURA 16A). Além disso, animais expostos a fumaça de cigarro apresentam tendência a possuir maior número de mudanças de comportamento quando comparados com os controles ($P = 0,08$), sendo significativa a diferença quando comparados com os animais expostos à cafeína (SMK > CAF, $P < 0,05$; FIGURA 17). Em ambos os casos a análise bidimensional indicou um efeito aditivo entre os fatores exposição a cafeína e fumaça de cigarro.

FIGURA 16 - Percentual de tempo de atividade no TNF em PN55.



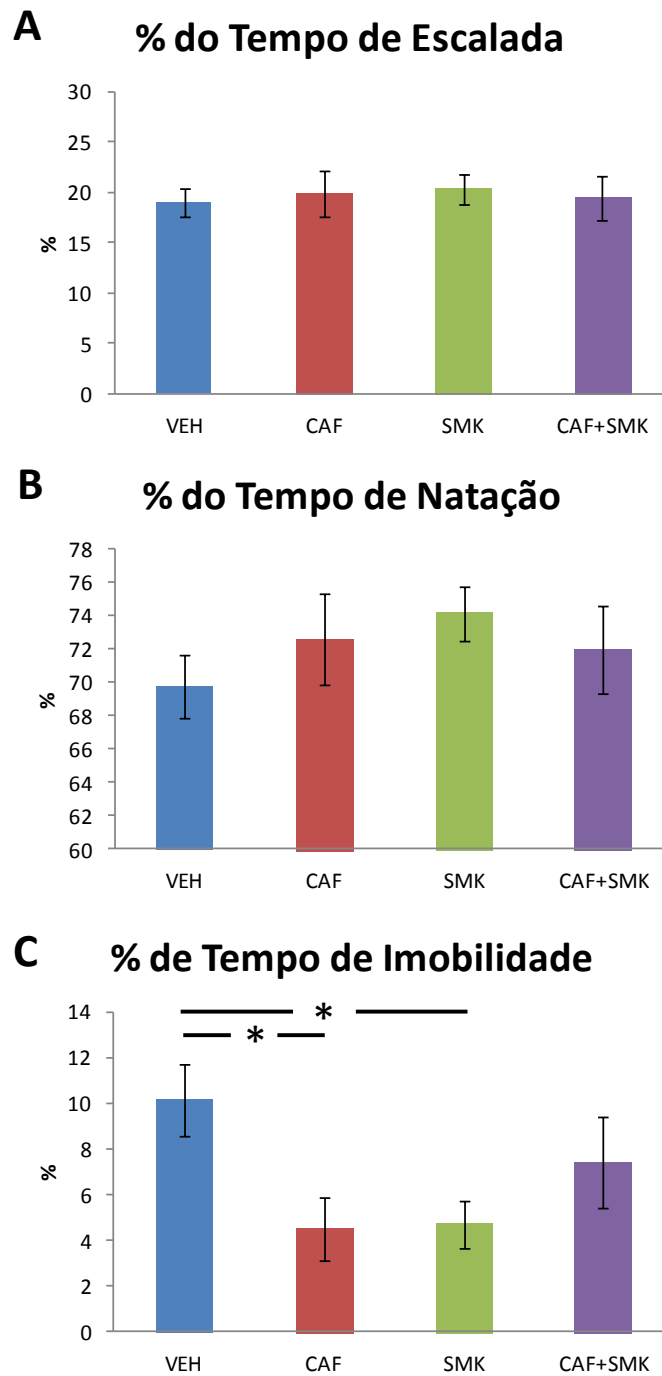
(A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade. * $p < 0,05$

FIGURA 17 - Número de mudanças de comportamento no TNF em PN55. *p<0,05



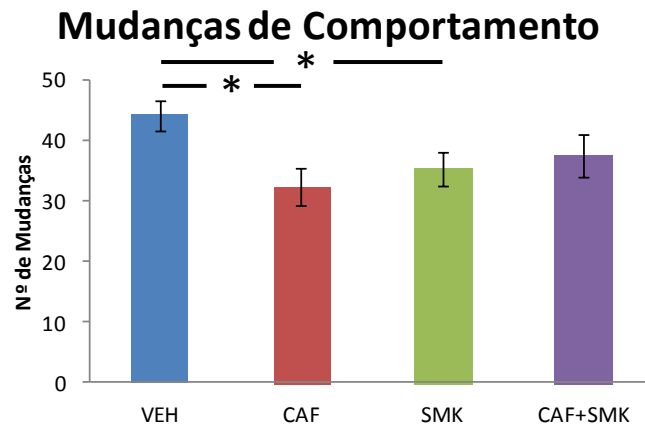
Após longo período de retirada da exposição a fumaça de cigarro em PN75 , a ANOVA indicou efeito significativo para o percentual de tempo de imobilidade ($F_{(3,142)} = 3,2$, $P < 0,05$) e para o número de mudanças de comportamento ($F_{(3,142)} = 3,6$, $P = 0,01$). Tantos os animais expostos somente a cafeína como os animais em abstinência da fumaça do cigarro apresentaram redução do tempo de imobilidade ($CAF < VEH$, $P < 0,05$; $SMK < VEH$, $P < 0,01$; FIGURA 18C). A exposição combinada reverteu este efeito, como indicado pela interação menos que aditiva avaliada pela análise bidimensional ($F_{(1,142)} = 6,0$, $P < 0,05$). Neste mesmo sentido, animais expostos somente a cafeína como os animais em abstinência da fumaça do cigarro apresentaram redução do número de mudanças de comportamento ($CAF < VEH$, $P < 0,01$; $SMK < VEH$, $P = 0,01$; FIGURA 19). A análise bidimensional também indicou um efeito menos que aditivo da exposição combinada ($F_{(1,142)} = 5,3$, $P < 0,05$)

FIGURA 18 - Percentual de tempo de atividade no TNF em PN75.



(A) percentual do tempo de escalada; (B) percentual do tempo de natação; (C) percentual do tempo de imobilidade. * $p < 0,05$

FIGURA 19 - Número de mudanças de comportamento no TNF em PN75. *p<0,05



4. DISCUSSÃO

Estudos indicam que existe uma alta prevalência de desordens de humor entre adolescentes com histórico de uso de drogas de abuso, como o tabaco (Hughes *et al.*, 2000). Esta associação pode ser explicada de duas maneiras diferentes. Na primeira, a associação é explicada pela existência de um mesmo substrato genético e/ou ambiental. Por outro lado, também pode ser explicada por uma relação causal, onde consumo de drogas pode levar a desordens de humor e vice-versa. Neste sentido, e de particular interesse para o presente estudo, tem sido demonstrado que o uso de tabaco durante a adolescência promove aumento dos níveis de ansiedade, como também, a ansiedade parece ser um sintoma relevante da abstinência pela nicotina (Abreu-Villaça *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2000; Stage *et al.*, 1996). Além disso, tem sido descrito que a interrupção do tabagismo pode gerar sintomas de depressão que podem ser revertidos com o retorno do hábito de fumar (Stage *et al.*, 1996). Apesar do uso de modelos animais estarem ajudando a esclarecer essa associação entre a exposição da nicotina e desordens de humor, a literatura carece de estudos que investiguem os efeitos da fumaça de cigarro, em especial durante a adolescência (período de início do tabagismo). Além disso, apesar da associação epidemiológica entre o uso do tabaco e o consumo de cafeína, e de que alguns estudos sugerirem que a cafeína pode ampliar alguns aspectos importantes da ação da nicotina no sistema nervoso central, nenhum estudo explorou a possível interação entre o tabaco e a cafeína durante este período. Neste sentido, no presente trabalho tivemos como objetivo identificar alterações comportamentais relacionadas à resposta emocional em animais expostos a fumaça do cigarro e/ou cafeína durante a adolescência.

4.1. Resumo dos resultados

No presente trabalho, observamos que a exposição durante toda a vida à cafeína gerou diminuição no tempo de tomada de decisão durante o período da adolescência (PN45 e 55), como indicado pela redução do percentual de tempo no centro no teste em labirinto em cruz elevado (LCE), sendo este efeito revertido pela fumaça de cigarro durante o período em que houve a exposição combinada (PN45). A exposição à fumaça de cigarro durante a

adolescência promoveu durante o início da idade adulta (PN75) aumento no tempo de tomada de decisão, sendo este revertido pela exposição à cafeína. Interessantemente, a exposição à cafeína foi capaz de promover aumento de ansiedade após longo período de abstinência da fumaça de cigarro, como evidenciado pela redução do percentual de entradas nos braços abertos do LCE em PN75. Avaliação do comportamento no teste do nado forçado (TNF) indicou que a cafeína induz aumento no percentual de tempo de escalada nos animais adolescentes em abstinência à fumaça de cigarro, enquanto que somente a abstinência pela fumaça de cigarro promove aumento no número de mudanças nas estratégias comportamentais. Além disso, nossos resultados indicaram que tanto a exposição à cafeína durante toda a vida como a exposição à fumaça de cigarro durante a adolescência induziram nos animais adultos redução do tempo de imobilidade e do número de mudanças de comportamento no TNF.

4.2. Questões metodológicas

4.2.1. Nível de exposição à fumaça de cigarro

Para a utilização de modelos animais de exposição à fumaça de cigarro durante o desenvolvimento, é importante considerar a dose, data de início e a duração da exposição. Nos parágrafos seguintes abordaremos estas questões sob a ótica do modelo utilizado no presente trabalho.

A adolescência inclui todo processo de transição da infância para a idade adulta. O limite temporal da adolescência não é de fácil definição. Em algumas espécies é difícil caracterizar quando a transição para adolescência começa a acontecer e quando o indivíduo passa de adolescente a adulto. Em roedores como ratos e camundongos, as primeiras alterações associadas à adolescência podem ocorrer já a partir do vigésimo dia de vida pós-natal (PN20) e as últimas mudanças podem ocorrer até PN55 (Spear, 2000). Neste sentido, afim de estudar o efeito da fumaça de cigarro durante essa fase do desenvolvimento (período no qual comumente se inicia o consumo de tabaco em humanos) decidimos em nosso modelo estabelecer como período de exposição de PN30 ao dia PN45. Desta forma, conseguimos abranger a maior parte do período da adolescência, como também, evitar os períodos de

transição que podem variar de acordo com o estabelecimento da maturidade sexual de cada animal. Além disso, afim de estudar as consequências da retirada da exposição ao tabaco, também realizamos o estudo comportamental em mais dois momentos, ao final da adolescência (em um período mais curto de retirada, PN55) e em adultos jovens (PN75).

A dose de nicotina gerada pela exposição ao tabaco é um importante fator que deve ser levado em consideração nos estudos em modelos animais. Altas doses resultam em hipóxia e diminuição do ganho de massa corporal durante o desenvolvimento (Slotkin, 1998). Níveis de exposição devem ser adequados de forma a serem reproduzidos, e assim extrapolados, dados encontrados na população humana. No presente estudo foram utilizados cigarros para pesquisa produzidos pela Universidade de Kentucky, do tipo 3R4F contendo 0,73 mg de nicotina por cigarro. Foi realizado um regime de exposição de 8hs, onde a fonte da fumaça se dá pela queima de apenas 1 cigarro por vez (tempo médio de 9 minutos). A queima do cigarro se dá na proporção de 89% da fumaça gerada é resultante da queima da ponta (*sidestream*) e 11% da fumaça gerada passa pelo filtro (*mainstream*). Esse regime gerou um conteúdo de partículas em suspensão equivalente ao perfil de ar presente ao fumo ativo (USEPA, 1992). Além disso, os níveis de cotinina encontrados estão em acordo com estudos anteriores (Abreu-Villaça *et al.*, 2013b), sendo estes comparáveis aos encontrados em adolescentes fumantes (Caraballo *et al.*, 2004). Interações farmacocinéticas entre a cafeína e a nicotina poderiam afetar os resultados encontrados devido à exposição combinada no presente trabalho. Entretanto, não observamos diferenças nos níveis de cotinina plasmáticas entre animais expostos a fumaça de cigarro e expostos de forma combinada fumaça de cigarro e cafeína. Desta forma, nossos resultados indicam que interações farmacocinéticas entre cafeína e a nicotina contida na fumaça de cigarro não são capazes de explicar os resultados encontrados sobre o comportamento dos camundongos.

Apesar do modelo de exposição à fumaça de cigarro de corpo inteiro usada no presente estudo minimizar o estresse físico que ocorre em outros modelos de exposição à fumaça (com contenção física do animal em tubos para a administração por máscaras de focinho), não podemos descartar a possibilidade da existência de estresse do ambiente de exposição e, desta forma, afetar nossos resultados. Entretanto, um trabalho prévio em colaboração com nosso grupo de pesquisa encontrou que a exposição de mães ratas à fumaça de cigarro durante a lactação não promoveu alterações nos níveis de corticosterona (Santos-Silva *et al.*, 2011), sugerindo que nosso modelo de exposição não gera estresse de forma significativa.

4.2.2 Nível de exposição à cafeína

No presente estudo utilizamos um modelo de exposição à cafeína através da água de beber de forma a simular o que ocorre com humanos, onde a exposição à cafeína ocorre por todo o período de desenvolvimento cerebral. Foi utilizado uma dose em solução de 0,1 g/l que gerou um consumo médio diário de 70 mg/kg nas mães durante a lactação e de 24 mg/kg nos animais experimentais. Considerando que o consumo diário estimado no mundo é de 70 a 76 mg/pessoa/dia, sendo no Brasil estimado uma média de consumo de 40 mg/pessoa/dia (Fredholm *et al.*, 1999), a dose utilizada no presente estudo é equivalente ao consumo humano. Como observado, a ingestão das fêmeas lactantes foi maior do que a encontrada nos animais experimentais, mas vale lembrar que durante a lactação a dose materna será transmitida através do leite e dividida entre os animais da sua prole. Estudos em humanos 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 de 1,4 a 7,2 µg/ml no leite materno. Estas concentrações no leite materno levam a estimar que a criança irá ingerir diariamente entre 1,3 a 3,1 mg de cafeína (Soares e Fonseca, 2004). Outro aspecto importante é que não houve diferenças na ingestão de cafeína entre os grupos CAF e CAF+SMK, desta forma, os resultados comportamentais encontrados entre estes grupos não pode ser explicado por uma diferença na administração de cafeína.

4.3 **Efeitos sobre massa corporal**

Nossos dados estão de acordo com a ideia de que a cafeína em baixas doses, como a utilizada no presente estudo, não gera alterações da massa corporal, mesmo durante o desenvolvimento (Tanda e Goldberg, 2000). No entanto, tem sido demonstrado que a exposição à fumaça de cigarro promove redução da massa corporal, sendo este efeito mediado principalmente pela nicotina (Audrain-McGovern e Benowitz, 2011). Os seus efeitos incluem aumento de gasto energético (através de ações simpaticomiméticas), aumento de ações de leptina no hipotálamo (gerando supressão da ingestão alimentar) e aumento dos níveis de norepinefrina e dopamina no sistema nervoso central, que influenciam na ingestão energética

e na taxa metabólica (Audrain-McGovern e Benowitz, 2011). Em nosso estudo, porém, não observamos nenhuma diferença significativa na massa corporal entre animais que foram expostos a fumaça de cigarro durante a adolescência. De fato, não encontramos consenso em modelo experimental. Em um estudo recente do nosso grupo usando a mesma cepa, porém com tipos de cigarro para pesquisa diferentes, contendo baixa (0,14 mg/cigarro) e alta (1,74 mg/cigarro) nicotina, foi observada que a exposição a fumaça de ambos cigarros foi capaz de diminuir o ganho de massa corporal durante a adolescência, sugerindo que outros componentes, além da nicotina, poderiam mediar o efeito de redução da massa corporal (Abreu-Villaça *et al.*, 2014). Vale ressaltar que apesar de significativas, as diferenças entre os grupos foram de pequena magnitude. Diferenças entre os animais controle e que foram expostos a fumaça de cigarro de baixa nicotina variaram o máximo de 6,4% no último dia de exposição, enquanto diferenças entre o grupo controle e o grupo exposto a fumaça de cigarro de alta nicotina chegou a 7,4%. Em outro estudo recente, usando o mesmo tipo de cigarro que o nosso, não foi observado redução da massa corporal (Abreu-Villaça *et al.*, 2013b). Considerando que a massa corporal é um indicador dos efeitos sistêmicos da exposição à fumaça de cigarro, este conjunto de resultados sugere que modelo de exposição utilizado no presente estudo gera um baixo poder de toxicidade sistêmica, sugerindo que as alterações comportamentais são geradas fundamentalmente pela ação dos componentes presentes na fumaça sobre o sistema nervoso central.

4.4 Alterações comportamentais promovidas pela exposição à cafeína por toda a vida

A cafeína é a droga psicoativa mais consumida em todo o mundo e por isso o estudo dos seus efeitos em humanos tem sido sistematicamente realizado desde a década de 1960 (Goldstein *et al.*, 1965). Em relação aos efeitos do uso crônico da cafeína sobre a função emocional não tem se observado consenso. Enquanto alguns estudos demonstram que a cafeína melhora o estado emocional em humanos (Goldstein *et al.*, 1965), como a redução da prevalência dos sintomas de depressão e redução do risco de suicídio (Pham *et al.*, 2014; Klatsky *et al.*, 1993), outros estudos tem relacionado o uso da cafeína e problemas de saúde mental, como desordens de ansiedade (Bergin e Kendler, 2012) e até mesmo depressão maior (Kendler *et al.*, 2006). Diferenças no perfil de uso, interação com outras drogas e a carga

genética podem ser determinantes nessa inconsistência. Neste sentido, a existência de modelos animais de estudo abre grande possibilidade para estudar estas relações.

Estudos em modelo animal têm indicado que a cafeína de forma aguda pode ter efeitos bifásicos, baixas doses aumentam a atividade locomotora e, nas mesmas doses, podem produzir preferência condicionada por lugar (Choi *et al.*, 1988; Nikodijevic *et al.*, 1993), enquanto que altas doses pode deprimir a atividade motora e gerar aversão condicionada (Choi *et al.*, 1988; Nikodijevic *et al.*, 1993). A exposição à cafeína durante o período perinatal tem sido associada a aumento da reatividade emocional (Hughes e Beveridge, 1986; 1987; 1991), exemplificado por aumento da defecação do teste do campo aberto, maior preferência por ambientes escuros e maior latência para sair de um ambiente escuro para um claro. No presente estudo a exposição durante toda a vida à cafeína gerou diminuição do percentual de tempo no centro do LCE somente durante o período da adolescência (PN45 e 55). Há muita discussão na literatura sobre qual seria o significado biológico mais adequado desta variável. Trullas e colaboradores (1991) mostraram que um ansiolítico benzodiazepínico, clordiazepóxido, diminui o tempo no centro da arena do LCE. Em contraste, um ligante de glicina associado com um agonista parcial do receptor de NMDA aumenta o tempo no centro apesar de possuir efeito ansiolítico no LCE. Além disso, foi demonstrado que benzodiazepínicos reduzem o comportamento de decisão em ratos. Tomados em conjunto estes resultados sugerem que o tempo no centro do LCE pode refletir a capacidade de resolução de conflitos (Wall e Messier, 2001). Neste sentido, nosso resultado sugere que animais expostos à cafeína apresentam redução na capacidade de tomada de decisão, que pode refletir impulsividade. De fato, em humanos o consumo de bebidas "cafeinadas" parece aumentar comportamento impulsivo (Heinz *et al.*, 2013). Nossos resultados ainda sugerem que este efeito é mais intenso durante a adolescência do que quando comparado com a idade adulta.

Interessantemente, a exposição à cafeína até a idade adulta resultou em diminuição do tempo de imobilidade no TNF, indicando um efeito antidepressivo na idade adulta. Considerando o aspecto estressante envolvendo o TNF, esses dados podem sugerir que a exposição à cafeína sobre toda a vida pode aumentar a capacidade de resiliência. Estudos recentes têm indicado que cafeína promove a melhora do humor, reduzindo sintomas de depressão e a taxa de suicídio em humanos (Lucas *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2014). Recentemente, Yin e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento prévio crônico de cafeína durante exposição a um modelo de estresse crônico imprevisível reverteu as alterações

de comportamento social e comportamento de anedonia em camundongos. Neste sentido, nossos dados corroboram este efeito positivo da exposição à cafeína.

4.5 Alterações comportamentais promovidas pela exposição à fumaça de cigarro durante a adolescência

Por causa da considerável quantidade de constituintes químicos existentes no tabaco, cerca de 4500 outros componentes além da nicotina, muitos dos quais provavelmente exercem os seus próprios efeitos sobre o cérebro (Rose, 2006), gerando por si só recompensa (Rose, 2006) ou podendo inclusive aumentar os efeitos da nicotina (Clemens *et al.*, 2009), os efeitos do tabagismo podem em vários aspectos serem diferentes aos encontrados quando considerado somente a ação da nicotina sobre o sistema nervoso central. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa tem se dedicado nos últimos anos a descrever as alterações comportamentais e neuroquímicas provocadas pela exposição à fumaça de cigarro, na tentativa de melhor entender quais efeitos são decorrentes da exposição apenas da nicotina e quais efeitos são frutos da interação dos componentes da fumaça de cigarro (Abreu-Villaça *et al.*, 2014; 2013a; 2013b). Apesar dos outros potenciais componentes presentes na fumaça do cigarro, os modelos de exposição de nicotina isoladamente continuam a ser o mais utilizado no estudo em animais dos efeitos do tabagismo, sendo gerado pouca informação sobre os efeitos da fumaça de cigarro, e em especial, da associação do tabagismo com outras drogas de abuso.

Estudos em humanos têm mostrado que uso do tabaco pode reduzir a ansiedade durante a idade adulta, sendo este efeito normalmente atribuído à nicotina (Kassel e Unrod, 2000), sugerindo que fumantes continuam a fumar a fim de regular seu estado de ansiedade (Picciotto e cols., 2002). Já em adolescentes ocorre um aumento dos níveis de ansiedade durante o uso, além de ser sugerido que a ansiedade possa ser sintoma de retirada da nicotina (Parrot, 2003). De forma geral, estudos em modelo animal de exposição à nicotina sugerem que, sob determinadas condições, a nicotina pode atuar como ansiolítico e antidepressivo, mas que após a administração crônica, adaptações ocorrem acarretando um aumento da ansiedade e de comportamento associado à depressão após a retirada (Picciotto e cols., 2002; Brioni *et al.*, 1993; Abreu-Villaça *et al.*, 2008; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011), sendo normalmente fêmeas mais susceptíveis aos efeitos que machos. Por exemplo, em dois estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa

demonstrou que a abstinência da nicotina durante a adolescência promoveu um efeito ansiogênico (Abreu-Villaça *et al.*, 2008) e aumento do comportamento tipo depressivo (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2011) somente em camundongos fêmeas. No entanto no presente estudo a exposição à fumaça de cigarro não foi capaz de gerar, em ambos os sexos, alterações nas variáveis associadas a ansiedade no LCE e no tempo de imobilidade no TNF. Em um estudo anterior (Abreu-Villaça *et al.*, 2014), usando uma exposição a fumaça de cigarro com cigarro contendo altos níveis de nicotina que geram aproximadamente níveis de cotinina plasmáticos 3x mais elevados que no presente estudo, também não foi observado qualquer alteração nas variáveis tipicamente associadas a ansiedade no LCE. Uma possibilidade de explicação para esta ausência de efeito pode ser devido aos outros componentes da fumaça de cigarro estarem interagindo com a nicotina de forma a reduzir seus efeitos. Para o nosso conhecimento, apenas estes dois estudos (o atual e Abreu-Villaça *et al.*, 2014) investigaram os efeitos da exposição à fumaça de cigarro em modelo animal durante a adolescência sobre a ansiedade, como também, não há estudos anteriores em modelo animal de avaliação de comportamento associado à depressão. Devido a escassez de estudos, outras possibilidades podem ser levantadas, como o estresse do modelo, tempo de exposição e diferenças entre cepas. Por exemplo, tem sido reportado que cepas diferentes podem apresentar diferentes sensibilidades a efeitos ansiogênicos/ansiolíticos no LCE (Hogg, 1996). De fato, nos estudos anteriores do nosso grupo, mencionado anteriormente, foram utilizados camundongos da cepa C57BL/6. Da mesma forma, em um trabalho de dissertação de mestrado defendida recentemente por Victor Naiff (2014), usando o mesmo modelo de exposição à nicotina durante a adolescência de camundongos Suíços, também não foi observado alterações significativas nas variáveis associadas à ansiedade no LCE em todas as idades avaliadas.

No presente estudo, a abstinência à fumaça de cigarro durante a adolescência promoveu diminuição do número de mudanças de comportamento, apesar desta medida não ser tradicionalmente usada no TNF, acreditamos que pode ser um interessante preditor em modelo animal de labilidade emocional. Neste sentido, a redução do número de mudanças de comportamento após curto período de abstinência pode indicar prejuízo na resposta emocional em função do estresse do teste. Interessantemente, observamos que longo período de abstinência à fumaça de cigarro inverteu o efeito sobre o número de mudanças de comportamento no TNF. Neste caso, observamos um efeito de perseveração na estratégia comportamental adotada, que pode indicar alteração na elaboração de estratégias de resposta ao estresse (*coping*). Além disso, de forma oposta ao esperado, longo período de abstinência à fumaça de cigarro gerou diminuição do tempo de imobilidade no TNF, indicando um efeito antidepressivo. Este resultado, também encontrado para os animais expostos somente a cafeína, pode indicar um efeito de redução da

resposta ao estresse durante longo período de abstinência à fumaça de tabaco. Considerando que este é o primeiro trabalho na literatura que utilizou um modelo de exposição à fumaça de cigarro durante a adolescência sobre comportamento associado a depressão, outros estudos utilizando outros testes validados, como o teste de suspensão pela cauda e o teste de preferência por sacarose, são necessário para corroborar esse achado e indicar que de fato a exposição a todos os componentes da fumaça de cigarro possui efeitos tardios diferentes ao esperado quando considerado somente a exposição à nicotina.

4.6 Interações comportamentais entre exposição à cafeína e fumaça de cigarro

Apesar das evidências epidemiológicas do co-uso de tabaco e cafeína, a interação entre elas tem recebido pouca atenção em estudos experimentais. A maioria dos estudos avaliam e comparam o efeito da exposição crônica de uma droga sobre a resposta aguda da outra (Tanda e Goldberg, 2000; Nikodijevic *et al.*, 2011). Estudos apontam que cafeína é capaz de ampliar alguns aspectos importantes da ação da nicotina no sistema nervoso central, como no caso de auto-administração ou na liberação de dopamina no núcleo acumbente (Tanda e Goldberg, 2000). Recentemente, Liu e Jernigan (2012), usando um modelo de auto-administração em ratos adultos, demonstraram que a exposição à cafeína retardou a extinção do comportamento de busca pela nicotina e que a readministração da cafeína promoveu retorno do comportamento de auto-administração de nicotina. O estudo das interações agudas entre nicotina e cafeína não é a melhor maneira de estudar os efeitos de uma droga sobre a outra. Como já discutido, humanos são expostos regularmente à cafeína em doses farmacologicamente ativas durante toda a vida, da mesma forma que o uso do tabaco normalmente gera alterações negativas a saúde se usado cronicamente. Além disso, o uso crônico da cafeína gera modificações da neuroquímica cerebral que induzem inclusive tolerância de alguns dos seus efeitos, como por exemplo, o efeito de indução do aumento da atividade locomotora (Tanda e Goldberg, 2000). Desta forma, no estudo das alterações geradas pelo tabagismo deve ser levado em consideração essas modificações cerebrais geradas pela exposição crônica a cafeína. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avaliou o efeito a interação comportamental entre a exposição à cafeína durante toda a vida e a fumaça de cigarro durante o período da adolescência. Nossos resultados indicam que

esta associação pode gerar, dependendo das condições, diminuição dos efeitos de cada uma das drogas ou potencialização.

No presente trabalho, os dados indicam que a exposição à cafeína reverteu os efeitos da abstinência da fumaça de cigarro, como observamos nos efeitos de aumento de mudanças de estratégia comportamental no TNF durante a adolescência e no aumento do tempo de tomada de decisão no LCE durante o início da vida adulta. Considerando que essas alterações provocadas pela exposição à fumaça do cigarro podem indicar alterações na função cognitiva, nossos dados sugerem que a exposição a cafeína possui um efeito positivo sobre os danos causados pela exposição ao tabaco. De fato, a cafeína tem sido considerada uma droga que gera melhora da função cognitiva (Nehlig, 2010). A cafeína facilita a aprendizagem em tarefas onde a informação é apresentada de forma passiva em humanos e em tarefas envolvendo pouco uso da memória de trabalho, parecendo melhorar bastante o desempenho da memória em condições de estresse (Nehlig, 2010). Em modelo animal da doença de Alzheimer, a exposição a doses moderadas de cafeína obteve efeitos positivos sobre os danos cognitivos gerados (Arendash e Cao, 2010). Nikodijevic e colaboradores (1993), estudando o efeito da exposição crônica a cafeína sobre a atividade locomotora em camundongos, sugeriram que a exposição crônica a cafeína pode levar a alterações na função colinérgica. Neste estudo, a administração de escopolamina (antagonista muscarínico) gerou menor aumento da atividade locomotora em camundongos expostos à cafeína quando comparados aos controles (Nikodijevic *et al.*, 1993). Considerando que o sistema colinérgico central é o alvo primário da ação da nicotina e que este possui papel fundamental nos processos cognitivos (Nordberg, 2001; Abreu-Villaça *et al.*, 2007), acreditamos que o sistema colinérgico pode ser um denominador comum da interação da exposição crônica à cafeína e a nicotina na reversão dos efeitos cognitivos associados a exposição a fumaça de cigarro no presente estudo.

Nossos resultados também apontam que a exposição combinadas destas drogas pode trazer efeitos negativos para a função emocional. Em nosso estudo, a exposição combinada promoveu aumento significativo da ansiedade após longo período de retirada. Considerando que fumantes normalmente possuem alto consumo de cafeína, se um efeito similar ocorrer após adolescentes co-usarem tabaco e cafeína, nossos dados sugerem que o efeito aditivo sobre ansiedade pode ser um fator extremamente relevante em facilitar recaída ao uso de drogas durante um período de abstinência do tabaco. De fato, o aumento da ansiedade durante a abstinência de drogas tem sido considerado um dos fatores mais importantes na recaída (Kaplan *et al.*, 2011; Abreu-Villaça *et al.*, 2008). Além disso, a exposição combinada reverteu

o efeito antidepressivo de cada droga observado na idade adulta no teste do nado forçado, podendo indicar uma redução da resiliência, fazendo com que o indivíduo exposto às duas drogas sejam mais susceptíveis aos efeitos do estresse. Vale a pena ressaltar que atualmente há um grande número de evidências que apontam que áreas e sistemas associados à resposta ao estresse desempenham um papel crítico na iniciação e manutenção do fumo de cigarros, e relapso após o término do uso (Bruijnzeel, 2012). Nos animais adolescentes em abstinência da fumaça de cigarro (PN55) observamos que cafeína induziu aumento do tempo de escalada no teste do nada forçado. O aumento do tempo de escalada está associado há uma resposta mais intensa a situação de estresse, que normalmente é encontrado sob o efeito de drogas psicoestimulantes, como em doses altas de cafeína (Vieira *et al.*, 2008). Além disso, o tratamento com antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina aumentam o tempo de escalada no TNF (Detke *et al.*, 1997). Tomados em conjunto, podemos sugerir que a abstinência a fumaça de cigarro durante a adolescência pode gerar alterações noradrenérgicas que podem aumentar o efeito de drogas psicoestimulantes.

Os mecanismos neuroquímicos que regem os efeitos comportamentais da interação da cafeína e a exposição à fumaça de tabaco parecem ser complexos. Como mencionado anteriormente, os efeitos farmacológicos da cafeína são mediados pela capacidade de mobilização do cálcio intracelular, por inibição da fosfodiesterase (esperado em altas doses) e pelo seu efeito antagonista sobre os receptores de adenosina. No perfil de dose utilizado neste estudo, acreditamos que o principal candidato a geração dos efeitos seja o efeito antagônico sobre os receptores pré-sinápticos da adenosina A_1 e A_2 . Além das possíveis interações colinérgicas e noradrenérgicas sugeridas anteriormente, existe uma intensa relação entre adenosina e o sistema dopaminérgico. A administração aguda de cafeína pode facilitar a neurotransmissão dopaminérgica, afetando a responsividade da via mesolímbica (Tanda e Golberg, 2000). De fato, os receptores pré-sinápticos da adenosina A_1 e A_2 são co-localizados com os receptores de dopamina D_1 e D_2 (Ferre *et al.*, 1997). Em acordo, Shoaib e colaboradores (1999) indicaram que a exposição à cafeína na água de beber de ratos facilita a aquisição de comportamento de autoadministração de nicotina. No mesmo sentido, a exposição a cafeína aumenta a liberação de dopamina no núcleo acumbente induzida pela nicotina (Tanda e Golberg, 2000). Considerando que é indiscutível a relevância da participação dos sistemas dopaminérgicos nos mecanismos fisiológicos que regem os estados emocionais, como também, a participação deste sistema nas alterações de humor, como na depressão e nos distúrbio de ansiedade, é de fundamental interesse o estudo futuro das

alterações deste sistema neuroquímico no nosso modelo de exposição combinada de cafeína e fumaça de cigarro em animais adolescentes.

5. CONCLUSÕES

O estudo da interação entre cafeína e a fumaça de cigarro possui fundamental importância durante adolescência, período no qual mais frequentemente se inicia o co-uso destas drogas. Uma observação de aumento de efeito na exposição combinada sugere que existem vias neuroquímicas compartilhadas entre as duas drogas, podendo fornecer informações relevantes que corroboram a relação de epidemiológica de co-uso e alertar sobre efeitos adversos sobre a exposição da cafeína na aquisição de dependência a nicotina e seus efeitos na abstinência. O presente estudo fornece evidências experimentais de que há interação da exposição à cafeína e fumaça de cigarro durante a adolescência resultando em alterações da resposta emocional. Particularmente, alterações dos níveis de ansiedade não parecerem relevantes durante a exposição e curto período de retirada da fumaça de tabaco, entretanto, o aumento dos níveis de ansiedade na idade adulta de animais demonstram a existência de consequências tardias da co-exposição. Neste sentido, nossos dados sugerem que a exposição por toda a vida de cafeína pode ser um fator relevante na manutenção do fumo e nas consequências negativas sobre a resposta emocional durante a abstinência.

REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça, Y.; Seidler, F. J.; Qiao, D.; Tate, C. A.; Cousins, M. M.; Thillai, I.; Slotkin, T. A. Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology*. 2003; 28:1935-49.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; CAVINA, C. C.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; CORREA-SANTOS, M.; NAIFF, V. F.; FILGUEIRAS C. C.; MANHÃES, A. C. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol during adolescence leads to short- and long-term modulation of anxiety-like behavior. *Drug Alcohol Depend.* 2013a Nov 1;133(1):52-60.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; DE CARVALHO GRAÇA, A. C.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; NAIFF, V. F.; MANHÃES, A. C.; FILGUEIRAS, C. C. Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nicotine Tob Res.* 2013b Jul;15(7):1211-21.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C. C.; CORREA-SANTOS, M.; CAVINA, C. C.; NAIFF, V. F.; KRAHE, T. E.; MANHÃES, A. C.; RIBEIRO-CARVALHO, A. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015 May;232(10):1693-703.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; FILGUEIRAS, C. C.; GUTHIERREZ, M.; MEDEIROS, A. H.; MATTOS, M. A.; PEREIRA, M. DOS S.; MANHÃES, A. C.; KUBRUSLY, R. C. Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine Tob Res.* 2010; 12:776-80.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; MEDEIROS, A. H.; LIMA, C. S.; FARIA, F. P.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects memory and learning during exposure and withdrawal. *Behav. Brain Res.* 2007 Jul 19;181(1):136-46. Epub 2007 Apr 5.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; NUNES, F.; QUEIROZ-GOMES, F. DO E.; MANHÃES, A. C.; FILGUEIRAS, C. C. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33:599-610.
- ABREU-VILLAÇA, Y.; QUEIROZ-GOMES, F. DO E.; DAL MONTE, A. P.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 2006; 167:175-82.
- ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*. 2000; Jan 4;39(2):334-46.

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

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behavioural Pharmacology*, 2004; 15: 341-52.

ADRIANI, W.; SPIJKER, S.; DEROCHE-GAMONET, V.; LAVIOLA, G.; LE MOAL, M.; SMIT, A. B.; PIAZZA, P. V. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. *J. Neurosci.* 2003; Jun 1;23(11):4712-6.

ADRIANI, W.; CHIAROTTI, F.; LAVIOLA, G. Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience*, 1998; 112:1152-66.

ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.*, 301: 365-381. 1990.

AMANN, M. Pulmonary system limitations to endurance exercise performance in humans. *Exp. Physiol.* 2012, 97:311-318.

American Lung Association. Trends in tobacco use. *Epidemiology and Statistics Unit*. New York: American Lung Association; 2002; 1-32.

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

ARENDASH, G. W.; CAO, C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 1:S117-26. doi: 10.3233/JAD-2010-091249. Review.

ARNAUD, M. J. Identification, kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1- Me-¹⁴C] caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations. *Biochem. Med.* 16, 67-76. 1976.

ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. *Prog. Drug Res.* 31, 273-313. 1987.

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

AUDRAIN-MCGOVERN, J.; BENOWITZ, N. L. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 90, 164-168. 2011.

BAKKER, R.; STEEGERS, E. A.; OBRADOV, A.; RAAT, H.; HOFMAN, A.; JADDOE, V. W. Maternal caffeine intake from coffee and tea, fetal growth, and the risks of adverse birth outcomes: the Generation R Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1691-1698. 2010.

BARGERON, L. M. JR.; BING, R. J.; CASTELLANOS, A.; EHMKE, D.; GONLUBOL, F.; SIEGEL, A. Effect of cigarette smoking on coronary blood flow and myocardial metabolism. *Circulation* 1957, 15:251-257.

BARIK, J.; WONNACOTT, S. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009, 192:173-207.

BAYER, S. A.; YACKEL, J. W.; PURI, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890--892. 1982.

BAYER, S. A. [3H] Thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental Brain Research*, 1983. 50: 329-340.

BENNETT, J. M.; WHETZEL, C. A.; RITTER, F. E.; REIFERS, A.; KLEIN, L. C. Effects of caffeine and stress on cortisol and serial subtraction performance in young healthy men. *Psychosomatic Medicine* 68(1). A-62. 2006

BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. 3RD. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 192:29-60.

BENOWITZ, N. L.; ZEVIN, S.; JACOB, P. 3RD. Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; Dec;287(3):958-62.

BENOWITZ, N. L. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N. Engl. J. Med.* 1988 Nov 17;319(20):1318-30.

BERGIN, J. E.; KENDLER, K. S. Common psychiatric disorders and caffeine use, tolerance, and withdrawal: an examination of shared genetic and environmental effects. *Twin Res. Hum. Genet.* 2012 Aug;15(4):473-82.

BICKFORD, P. C.; FREDHOLM, B. B.; DUNWIDDIE, T. V.; FREEDMAN, R. Inhibition of Purkinje cell firing by systemic administration of phenylisopropyl adenosine: effect of central noradrenaline depletion by DSP4. *Life Sci.* 1985; Jul 22;37(3):289-97.

BJÖRKLUND, O.; KAHLSTRÖM, J.; SALMI, P.; FREDHOLM, B. B. PERINATAL Caffeine, Acting on Maternal Adenosine A1 Receptors, Causes Long-Lasting Behavioral Changes in Mouse Offspring. *PLoS ONE* 3(12): e3977. 2008.

BOGDANOVA, O. V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K. E.; RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol. Behav.* 2013 Jun 13;118:227-39.

BONATI, M.; LATINI, R.; TOGNONI, G.; YOUNG, J. F.; GARATTINI, S. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab. Rev.* 15, 1355-1383. 1984.

BOUTREL, B.; KOOB, G. F. What keeps us awake: the neuropharmacology of stimulants and wakefulness-promoting medications. *Sleep* 2004, 27:1181-1194.

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*, 2007; 29: 74-80.

BRIONI, J. D.; O'NEILL, A. B.; KIM, D. J.; DECKER, M. W. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.* 238: 108; 1993.

BROCKWELL, N. T.; EIKELBOOM, R.; BENINGER, R. J. Caffeine-induced place and taste conditioning: production of dose-dependent preference and aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38:513-517; 1991.

BRUIJNZEEL, A. W. Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci Biobehav. Rev.* 2012 May;36(5):1418-41. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.02.015. Epub 2012 Mar 3.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4(beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *The Journal of Neuroscience*, 2001; 21:1819-29.

BUISSON, B.; BERTRAND, D. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002; 23:130-6.

BROWN, C. R.; BENOWITZ, N. L. Caffeine and cigarette smoking: behavioral, cardiovascular, and metabolic interactions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989; 34, pp. 565-570.

CAMERON, O. G.; MODELL, J. G.; HARIHARAN, M. Caffeine and human cerebral blood flow: a positron emission tomography study. *Life Sci.* 1990, 47:1141-1146.

CARABALLO, R. S.; GIOVINO, G. A.; PECHACEK, T. F. Self-reported cigarette smoking vs. serum cotinine among U.S. adolescents. *Nicotine Tob. Res.* 2004 Feb;6(1):19-25.

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*, 2005

CARRIER, O.; PONS, G.; REY, E.; RICHARD, M. O.; MORAN, C.; BADOUAL, J.; OLIVE, G. Maturation of caffeine metabolic pathways in infancy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1988 Aug;44(2):145-51.

CAYETANOT, F.; LARNICOL, N.; PEYRONNET, J. Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control, experimental data. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2009; Aug 31;168(1-2):92-100.

CELIK, E.; UZBAY, I. T.; KARAKAS, S. Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2006; Jan;30(1):50-5.

CHAMBERS, R. A.; TAYLOR, J. R.; PONTEZA, M. N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *The American Journal Psychiatry*, 2003; 160: 1041-52.

CHEETA, S.; IRVINE, E. E.; TUCCI, S.; SANDHU, J.; FILE, S. E. In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology*, 2001; 25: 601-607.

CHEN, J.; MILLAR, W. J. Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health Reports*, 1998; 9:39-46.

CHIU, Y. N.; GAU, S. S.; TSAI, W. C.; SOONG, W. T.; SHANG, C. Y. Demographic and perinatal factors for behavioral problems among children aged 4-9 in Taiwan. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009; 63: 569-576.

CHOI, O. H.; SHAMIM, M. T.; PADGETT, W. L.; DALY, J. W. Caffeine and theophylline analogues: Correlation of behavioral effects with a activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. *Life Sci.* 43:387-398; 1988.

CLARK, M. A.; FINKEL, R.; REY, J. A.; WHALEN, K. *Farmacologia Ilustrada*. 5^a ed. RS, Artmed, 2013.

CLEMENS, K. J.; CAILLÉ, S.; STINUS, L.; CADOR, M. The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009 Nov;12(10):1355-66

COHEN, C.; WELZL, H.; BÄTTIG, K. Effects of nicotine, caffeine, and their combination on locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; Sep;40(1):121-3.

CROCQ, M. A. Alcohol, nicotine, caffeine, and mental disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2003, 5:175-185.

DAHL, R. E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. *Ann N Y Acad Sci.* Jun;1021:1-22. 2004.

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

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

DAVIS, R. A.; STILES, M. F.; DEBETHIZI, J. D.; REYNOLDS, J. H. Dietary nicotine: a source of urinary cotinine. *Fd. Chem. Toxic.* 1991; 29:821.

DE BELLIS, M. D.; KESHAVAN, M. S.; BEERS, S. R.; HALL, J.; FRUSTACI, K.; MASALEHDAN, A.; NOLL, J.; BORING, A. M. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb. Cortex.* Jun;11(6):552-7. 2001.

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 1997 May;5(2):107-12.

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

DI FRANZA J. R.; RIGOTTI, N. A.; MCNEILL, A. D.; OCKENE, J. K.; SAVAGEAU, J. A.; ST. CYR D.; COLEMAN, M. Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco Control* 9: 313-319. 2000.

DI FRANZA, J. R.; SAVAGEAU, J. A.; FLETCHER, K.; OCKENE, J. K.; RIGOTTI, N. A.; MCNEILL, A. D.; COLEMAN, M.; WOOD. C. Measuring the loss of autonomy over nicotine use in adolescents: the DANDY (development and assessment of nicotine dependence in youths) study. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 156: 397-403. 2002.

DI FRANZA, J. R.; SAVAGEAU, J. A.; RIGOTTI, N. A.; FLETCHER, K.; OCKENE, J. K.; MCNEILL, A. D.; COLEMAN, M.; WOOD, C. Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30-month follow-up data from the DANDY study. *Tobacco Control* 11: 228-235. 2002.

DOREMUS, T. L.; BRUNELL, S. C.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Age-related differences in elevated plus maze behavior between adolescent and adult rats. *Annals of the New York Academy Science*, 2004; 1021: 427-30.

DOREMUS, T. L.; BRUNELL, S. C.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavioral*, 2003; 75: 411-418.

ECHEVERRI, D.; MONTES, F. R.; CABRERA, M.; GALAN, A.; PRIETO, A. Caffeine's Vascular mechanisms of action. *Int. J. Vasc. Med.* 2010, 2010:834060.

EILAND, L.; ROMEO, R. D. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience.* Sep 26;249:162-71. 2013.

ELLIOTT B. M.; FARADAY, M. M.; PHILLIPS, J. M.; GRUNBERG, N. E. Adolescent and adult female rats differ in sensitivity to nicotine's activity effects. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2005; 80:567-75.

ELLIOTT B. M.; FARADAY, M. M.; PHILLIPS, J. M.; GRUNBERG, N. E. Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004 Jan;77(1):21-8.

ENDO, M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 1977, 57:71-108.

FERNANDES, C.; FILE, S. E. The influence of open-arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 31-40; 1996.

FERNANDES, O.; SABHARWAL, M.; SMILEY, T.; PASTUSZAK, A.; KOREN, G.; EINARSON, T. Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship

to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reprod. Toxicol.* 1998; 12: 435-444.

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 Sci.* 1984 Sep 17;35(12):1241-7.

FERRE, S.; FREDHOLM, B. B.; MORELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 20:482-487; 1997.

FILGUEIRAS, C. C.; ABREU-VILLAÇA, Y.; KRAHE, T. E.; MANHÃES, A. C. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behav. Brain Res.* 2006;172:33-8.

FRARY, C. D.; JOHNSON R. K.; WANG, M. Q. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J. Am. Diet. Assoc.* 2005; 105: 110-113.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K.; HOLMÉN, J.; NEHLIG, A.; ZVARTAU, E. E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; Mar, 51(1):83-133.

GALVÁN, A.; HARE, T.; PARRA, C.; PENN, J.; VOSS, H.; GLOVER, G.; CASEY, B. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. *J. Neurosci.*, 26, pp. 6885-6892. 2006.

GARRIDO, R.; MATTSON, M. P.; HENNING, B.; TOBOREK, M. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry*, 2001;76:1395-403.

GASIOR, M.; JASZYNA, M.; PETERS, J.; GOLDBERG, S. R. Changes in the ambulatory activity and discriminative stimulus effects of psychostimulant drugs in rats chronically exposed to caffeine: effect of caffeine dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; Dec;295(3):1101-11.

GENN, R. F.; TUCCI, A. S.; THOMAS, A.; EDWARDS, J. E.; FILE, A. S. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neuroscience Biobehavioral Review* 2003; 27:155-61.

GILPIN, E. A.; CHOI, W. S.; BERRY, C.; PIERCE, J. P. How many adolescents start smoking each day in the United States?. *The Journal of Adolescent Health*, 1999; 25:248-55.

GOLDSTEIN, A.; KAIZER, S.; WARREN, R. Psychotropic effects of caffeine in man. II. Alertness, psychomotor coordination, and mood. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1965, 150, 146-151.

GORODISCHER, R.; ZMORA, E.; BEN-ZVI, Z.; WARSZWASKI, D.; YAARI, A.; SOFER, S.; ARNAUD, M. J. Urinary metabolites of caffeine in the premature infant. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31, 497-499. 1986.

- GRANT, B. F.; HARFORD, T. C.; GRIGSON, M. B. Stability of alcohol consumption among youth: A national longitudinal study. *Journal of Studies on Alcohol*, 49: 253-260. 1987.
- GRESSENS, P.; MESPLES, B.; SAHIR, N.; MARRET, S.; SOLA, A. Environmental factors and disturbances of brain development. *Semin. Neonatol.* 2001; 6: 185-194.
- GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P. Reinforcing effects of caffeine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; Jul;246(1):21-9. 1988.
- GUILLET, R.; KELLOGG, C. Neonatal caffeine exposure alters developmental sensitivity to adenosine receptor ligands. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; 40:811-7.
- HADFIELD, M. G.; MILIO, C. Caffeine and regional brain monoamine utilization in mice. *Life Sci.* 1989;45(26):2637-44.
- HEINZ, A. J.; DE WIT, H.; LILJE, T. C.; KASSEL, J. D. The combined effects of alcohol, caffeine, and expectancies on subjective experience, impulsivity, and risk-taking. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 2013 Jun;21(3):222-34.
- HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp. Neurol.* 2004 Nov;190 Suppl 1:S8-21.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996 May;54(1):21-30.
- HOLTZMAN, S. G.; MANTE, S.; MINNEMAN, K. P. Role of adenosine receptors in caffeine tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 256:62-68.
- HUGHES, J. R.; STEAD, L. F.; LANCASTER, T. Anxiolytics for smoking cessation. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4: CD002849. 2000.
- HUGHES, R. N.; BEVERIDGE, I. J. Behavioral effects of prenatal exposure to caffeine in rats. *Life Sci.* 1986 Mar 10;38(10):861-8.
- HUGHES, R. N.; BEVERIDGE, I. J. Effects of prenatal exposure to chronic caffeine on locomotor and emotional behavior. *Psychobiology* 1987 ; 15 : 179-185.
- HUGHES, R. N.; BEVERIDGE, I. J. Behavioral effects of exposure to caffeine during gestation, lactation or both. *Neurotoxicol. Teratol.* 1991; 13:641-647.
- HUKKANEN, J.; JACOB, P. 3RD, BENOWITZ, N. L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57:79-115.
- HUTTENLOCHER, P. R. Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia*; 28: 517-527. 1990.
- IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behavioural Brain Research* 1993; 56: 177-80.

Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN). PNSN: estatísticas sobre hábitos de fumo no Brasil. Brasília (DF); 1989.

International Food Information Council Foundation (IFIC); Caffeine & Health: Clarifying the controversies. 2008.

IRVING, D. W.; YAMAMOTO, T. Cigarette smoking and cardiac output. *Br. Heart. J.* 1963, 25:126-132.

HENRY, J. P.; STEPHENS, P. M. Caffeine as an intensifier of stress-induced hormonal and pathophysiologic changes in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 719-727.

JAMES, J. E.; GREGG, M. E. Hemodynamic effects of dietary caffeine, sleep restriction, and laboratory stress. *Psychophysiology.* 2004; Nov;41(6):914-23.

JAROSZ, M.; WIERZEJSKA, R.; SIUBA, M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2012; Feb;160(2):156-60.

KANDEL, D. B.; JOHNSON, J. G.; BIRD, H. R.; WEISSMAN, M. M.; GOODMAN, S. H.; LAHEY, B. B.; REGIER, D. A.; SCHWAB-STONE, M. E. Psychiatric comorbidity among adolescents with substance use disorders: findings from the MECA Study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 1999;38:693-9.

KANG, S. H.; LEE, Y. A.; WON S. J.; RHEE, K. H.; GWAG, B. J. Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Neuroreport* 2002; 13: 1945-1950.

KAPLAN, G. B.; HEINRICHS, S.; CAREY, R. C. Treatment of addiction and anxiety using extinction approaches: neural mechanisms and their treatment implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 97:619-625, 2011

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002; 3:102-14.

KASSEL, J. D.; UNROD, M. J. Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiety. *Abnorm Psychol.* 2000 Feb; 109(1):161-6.

KENDLER, K. S.; MYERS, J.; O'GARDNER, C. Caffeine intake, toxicity and dependence and lifetime risk for psychiatric and substance use disorders: an epidemiologic and co-twin control analysis. *Psychol. Med.* 2006;36:1717-1725.

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. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2007; Nov;64(11):1313-20.

KESSLER, R. C.; AVENEVOLI, S.; RIES, M. K. Mood disorders in children and adolescents: an epidemiologic perspective. *Biol. Psychiatry* 2001;49:1002-14.

KHANNA, N. N.; SOMANI, S. M. Maternal coffee drinking and unusually high concentrations of caffeine in the newborn. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1984; 22: 473-483.

KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A.; FRIEDMAN, G. D. Coffee, tea, and mortality. *Ann. Epidemiol.*, 1993, 3, 375-381.

KONRAD, K.; FIRK, C.; UHLHAAS, P. J. Brain development during adolescence: neuroscientific insights into this developmental period. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2013 Jun;110(25):425-31.

KOTA, D.; MARTIN, B. R.; ROBINSON, S. E.; DAMAJ, M. I. Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007. Jul;322(1):399-407.

KYEREMATEN, G. A.; VESELL, E. S. Metabolism of nicotine. *Drug Metab. Rev.* 1991; 23:3-41.

LAVIOLA, G.; MACRI, S.; MORLEY-FLETCHER, S.; ADRIANI, W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003; 27: 9-31.

LESLIE, F. M.; LOUGHLIN, S. E.; WANG, R.; PEREZ, L.; LOTFIPOUR, S.; BELLUZZIA, J. D. Adolescent development of forebrain stimulant responsiveness: insights from animal studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1021. 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180-5.

LIU, X.; JERNIGAN, C. Effects of caffeine on persistence and reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats: interaction with nicotine-associated cues. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Apr; 220(3): 541-550.

LOOMANS, E. M.; HOFLAND, L.; VAN DER STELT, O.; VAN DER WAL, M. F.; KOOT, H. M.; VAN DEN BERGH, B. R.; VRIJKOTTE, T. G. Caffeine intake during pregnancy and risk of problem behavior in 5- to 6-year-old children. *Pediatrics* 2012; 130: e305-e313.

LUCAS, M; MIRZAEI, F.; PAN, A.; OKEREKE, O. I.; WILLETT, W. I. COFFEE, caffeine, and risk of depression among women, *Arch. Intern. Med.*, 2011, 171, 1571-1578.

MACRI, S.; ADRIANI, W.; CHIAROTTI, F.; LAVIOLA, G. Risk-taking during exploration of a plus-maze is greater in adolescent than in juvenile or adult mice. *Animal Behavior*, 2002; 64: 541-46.

MAGGS, J. L.; PATRICK, M. E.; FEINSTEIN, L. Childhood and adolescent predictors of alcohol use and problems in adolescence and adulthood in the National Child Development Study. *Addiction* 103 (Suppl. 1), 7-22 (2008). 2008.

MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. In *Food and Chemical Toxicology*. 2002. 1231-1234.

MANNUCCI, C.; TEDESCO, M.; BELLOMO, M.; CAPUTI, A. P.; CALAPAI, G. Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. *Neurochem. Int.* 2006;49:481-6.

MANSVELDER, H. D.; MCGEHEE, D. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*, 2002; 53: 606-17.

MARTIN, C. A.; COOK, C.; WOODRING, J. H.; BURKHARDT, G.; GUENTHNER, G.; OMAR, H. A.; KELLY, T. H. Caffeine use: association with nicotine use, aggression, and other psychopathology in psychiatric and pediatric outpatient adolescents. *Scientific World Journal*. 2008 May 22;8:512-6.

MARTIN, C. A.; KELLY, T. H.; RAYNES, M. K.; BROGLI, B. R.; BRENZEL, A.; SMITH, W. J.; OMAR, H. A. Sensation seeking, puberty, and nicotine, alcohol, and marijuana use in adolescence. *Journal of the American Academy Child Adolescent Psychiatry*, 2002; 41:1495-502.

MCWILLIAMS, J. R.; LYNCH, G. Rate of synaptic replacement in denervated rat hippocampus declines precipitously from the juvenile period to adulthood. *Science*; 221: 572-574. 1983.

MIAO, H.; LIU, C.; BISHOP, K.; GONG, Z. H.; NORDBERG, A.; ZHANG, X. Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 1998; 70:752-62.

MITCHELL, S. H. Measures of impulsivity in cigarette smokers and non-smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999; 146: 455-64.

NAKAMOTO, T.; HARTMAN, A. D.; MILLER, H. I.; TEMPLES, T. E.; QUINBY, G. E. JR. Chronic caffeine intake by rat dams during gestation and lactation affects various parts of the neonatal brain. *Biol. Neonate* 1986; 49:277-283.

NAKAMOTO, T.; JOSEPH, F. JR.; YAZDANI, M.; HARTMAN, A. D. EFFECTS of different levels of caffeine supplemented to the maternal diet on the brains of newborn rats and their dams. *Toxicol. Lett.* 1988; 44:167-175.

NAKAMOTO, T.; ROY, G.; GOTTSCHALK, S. B.; YAZDANI, M.; ROSSOWSKA, M. Lasting effects of early chronic caffeine feeding on rats' behavior and brain in later life. *Physiol. Behav.* 1991; 49:721- 727.

NAMDAR, M.; SCHEPIS, T.; KOEPFLI, P.; GAEMPERLI, O.; SIEGRIST, P. T.; GRATHWOHL, R.; VALENTA, I.; DELALOYE, R.; KLAINGUTI, M.; WYSS, C. A.; LÜSCHER, T. F.; KAUFMANN, P. A. Caffeine impairs myocardial blood flow response to physical exercise in patients with coronary artery disease as well as in age-matched controls. *PLoS One* 2009, 4:e5665.

NARKIEWICZ, K.; VAN DE BORNE, P. J.; HAUSBERG, M.; COOLEY, R. L.; WINNIFORD, M. D.; DAVISON, D. E.; SOMERS, V. K. Cigarette smoking increases sympathetic outflow in humans. *Circulation* 1998, 98:528-534.

National Institute on Drug Abuse. NIDA Research Report Series: Nicotine Addiction (NIH Publication No. 98-4342). 1998. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services.

NEHLIG, A.; DAVAL, J. L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res. Rev.* 1992; 17: 139-170.

NEHLIG, A. Is caffeine a cognitive enhancer? *J. Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 1:S85-94. doi: 10.3233/JAD-2010-091315.

NEHLIG, A.; DEBRY, G. Consequences on the newborn of chronic maternal consumption of coffee during gestation and lactation: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 1994; Feb;13(1):6-21.

NEL, M. R.; MORGAN, M. Smoking and anaesthesia revisited. *Anaesthesia.* 1996; 51:309-11.

NELSON, D. E.; GIOVINO, G. A.; SHOPLAND, D. R.; MOWERY, P. D.; MILLS, S. L.; ERIKSEN, M. P. Trends in cigarette smoking among US adolescents, 1974 through 1991. *American Journal of Public Health,* 85:34-40. 1995.

NIKODIJEVIC, O.; JACOBSON, K. A.; DALY, J. W. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993; Jan;44(1):199-216.

NORDBERG, A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol. Psychiatry.* 2001 Feb 1;49(3):200-10.

OLIVEIRA-DA-SILVA, A.; VIEIRA, F. B.; CRISTINA-RODRIGUES, F.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Increased apoptosis and reduced neuronal and glial densities in the hippocampus due to nicotine and ethanol exposure in adolescent mice. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27:539-48.

O'LOUGHLIN, J.; KISHCHUK, N.; DI FRANZA, J.; TREMBLAY, M.; PARADIS, G. The hardest thing is the habit: a qualitative investigation of adolescent smokers' experience of nicotine dependence. *Nicotine Tobacco Res.* 4: 201-209. 2002.

World Health Organization. Convenção quadro de controle do tabaco. Dia Mundial Sem Tabaco. 2004. Tabaco e Pobreza - Um Círculo Vicioso. 2004.

World Health Organization. International Consultation on Tobacco and Youth: what in the world works? Singapore; 1999.

World Health Organization. Mortality attributable to tobacco. Geneva: World Health Organization, 2012. 396p. (WHO Global Report). Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/fact-sheetmortalityreport.pdf>.

Organização Panamericana de Saúde - OPS. Banco mundial (BM) - La epidemia del tabaquismo. 2000. Publicación científica N° 577.

OUAGAZZAL, A. M.; KENNY, P. J.; FILE, S. E. Stimulation of nicotinic receptors in the lateral septal nucleus increases anxiety. *Eur. J. Neurosci.* 1999 Nov;11(11):3957-62.

PARROT, A. C. Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World J Biol Psychiatry* 4: 49-55. 2003

PARROTT, A. C.; MURPHY, R. S. Explaining the stress-inducing effects of nicotine to cigarette smokers. *Hum. Psychopharmacol.* 2012 Mar;27(2):150-5.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985 Aug;14(3):149-67.

PHAM, N. M.; NANRI, A.; KUROTANI, K.; KUWAHARA, K.; KUME, A.; SATO, M.; HAYABUCHI, H.; MIZOUE, T. Green tea and coffee consumption is inversely associated with depressive symptoms in a Japanese working population. *Public Health Nutr.*, 2014, 17, 625-633.

PICCIOTTO, M. R.; BRUNZELL, D. H.; CALDARONE, B. J. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 2002; 13: 1097-1106.

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*, 1998; 112: 1247-57.

POWELL, K. Neurodevelopment: how does the teenage brain work?. *Nature.* Aug 24;442(7105):865-7. 2006.

PRIMUS, R. J.; KELLOGG, C. K. Pubertal-related changes influence the development of environment-related social interaction in the male rat. *Developmental Psychobiology*, 1989; 22: 633-43.

PURVES, D.; SULLIVAN, F. M. Reproductive effects of caffeine. Experimental studies in animals. In: Garattini, S., ed. *Caffeine, coffee, and health*. New York: Raven Press; 1993; 317-342.

QUICK, M. W.; LESTER, R. A. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 2002; 53: 457-78.

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis.* 2010, 20(Suppl 1):S3-S15.

RIBEIRO-CARVALHO, A.; LIMA, C. S.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Nicotine and ethanol interact during adolescence: Effects on the central cholinergic systems. *Brain Research.* 2008; 1232:48-60.

RIBEIRO-CARVALHO, A.; LIMA, C. S.; NUNES-FREITAS, A. L.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C.; ABREU-VILLAÇA, Y. Exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: effects on depressive-like behavior during exposure and withdrawal. *Behav. Brain Res.* 2011 Aug 1;221(1):282-9.

ROBINSON, J. H.; PRITCHARD, W. S. The role of nicotine in tobacco use. *Psychopharmacology* (Berl) 1992, 108:397-407.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Nov;21(6):801-10.

ROSE, J. E.; BEHM, F. M. Psychophysiological interactions between caffeine and nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991 Feb;38(2):333-7.

ROSE, J. E. Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology* (Berl). 2006 Mar;184(3-4):274-85.

ROSEMBERG, J. Nicotina 1 vol. Ed. Colégio Médico del Peru. Comisión de Lucha Antitabáquica. COLAT. Peru, 1999.

ROSSI, S.; DE CHIARA, V.; MUSELLA, A.; MATALUNI, G.; SACCHETTI, L.; SIRACUSANO, A.; BERNARDI, G.; USIELLO, A.; CENTONZE, D. Caffeine drinking potentiates cannabinoid transmission in the striatum: interaction with stress effects. *Neuropharmacology.* 2009; Mar;56(3):590-7.

Tobacco Advisory Group; Royal College of Physicians. Nicotine addiction in Britain. London: RCP; 2000.

RUSH, J. W.; SPRIET, L. L. Skeletal muscle glycogen phosphorylase a kinetics: effects of adenine nucleotides and caffeine. *J. Appl. Physiol.* 2001, 91:2071-2078.

SALIN-PASCUAL, R. J.; DE LA FUENTE, J. R.; GALICIA-POLO, L.; DRUCKER-COLIN, R. Effects of transderman nicotine on mood and sleep in nonsmoking major depressed patients. *Psychopharmacology* (Berl) 1995;121:476-9.

SANTOS-SILVA, A. P.; OLIVEIRA, E.; PINHEIRO, C. R.; NUNES-FREITAS, A. L.; ABREU-VILLAÇA, Y.; SANTANA, A. C.; NASCIMENTO-SABA, C. C.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; REIS, A. M.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Effects of tobacco smoke exposure during lactation on nutritional and hormonal profiles in mothers and offspring. *J. Endocrinol.* 2011 Apr;209(1):75-84.

SHOAIB, M.; SWANNER, L. S.; YASAR, S.; GOLDBERG, S. R. Chronic caffeine exposure potentiates nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* (Berl). 1999; Mar;142(4):327-33.

SILVETTE, H.; HOFF, E. C.; LARSON, P. S.; HAAG, H. B. The actions of nicotine on central nervous system functions. *Pharmacol. Rev.* 1962, 14:137-173.

SLAWECKI, C. J. Comparison of anxiety-like behavior in adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behavioral Neuroscience*, 2005; 119: 1477-83.

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

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

SOARES, A. I. S. M.; FONSECA, B. M. R. Cafeína: A cafeína é umas das substâncias mais estudadas, será que realmente a conhece? E os seus malefícios, sabe quais são? Terá ela efeitos benéficos? [Monografia]. Porto PT: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2004/05

SOELLNER, D. E.; GRANDYS, T.; NUNEZ, J. L. Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats. *Behav. Brain Res.* 2009; 205: 191-199.

SOMANI, S. M.; KHANNA, N. N.; BADA, H. S. Caffeine and theophylline: serum/CSF correlation in premature infants. *J Pediatr.* 1980; Jun; 96(6):1091-3.

SOMANI, S. M., GUPTA, P. Caffeine: a new look at an age-old drug. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 26, 521-533. 1988.

SOWELL, E.; THOMPSON, P.; HOLMES, C.; JERNIGAN, T.; TOGA, A. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat. Neurosci.*, 2, pp. 859-861. 1999.

SPEAR, L. *Modeling adolescent development and alcohol use in animals*. Alcohol Res Health. 2000;24(2):115-23.

SPEAR, L. P.; BRAKE, S. C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev. Psychobiol.* 16: 83-109. 1983.

Spear, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2000; 24: 417-63.

SPRIET, L. L.; MACLEAN, D. A.; DYCK, D. J.; HULTMAN, E.; CEDERBLAD, G.; GRAHAM, T. E. Caffeine ingestion and muscle metabolism during prolonged exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 1992, 262:E891-E898.

STAGE, K. B.; GLASSMAN, A. H.; COVEY, L. S. Depression after smoking cessation: case reports. *J. Clin. Psychiatry* 1996; 57:467-9.

STOLERMAN, I. P.; SHOAB, M. The neurobiology of tobacco addiction. *Trends in Pharmacological Science*. 1991; 12:467-73.

STREISSGUTH, A. P.; BARR, H. M.; MARTIN, D. C.; HERMAN, C. S. Effects of maternal alcohol, nicotine, and caffeine use during pregnancy on infant mental and motor development at eight months. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1980; 4: 152-164.

STURM, R. The effects of obesity, smoking, and drinking on medical problems and costs. *Health Aff (Millwood)* 2002, 21:245-253.

SUEMARU, K.; YASUDA, K.; CUI, R.; LI, B.; UMEDA, K.; AMANO, M.; MITSUHASHI, H.; TAKEUCHI, N.; INOUE, T.; GOMITA, Y.; ARAKI, H. Antidepressant-

like action of nicotine in forced swimming test and brain serotonin in mice. *Physiol. Behav.* 2006;88:545-9.

SUPINSKI, G. S.; DEAL, E. C. JR.; KELSEN, S. G. The effects of caffeine and theophylline on diaphragm contractility. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130:429-433.

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. *Addict Behav.* 1994; May-Jun;19(3):229-56.

SWERDLOW, N. R.; VACCARINO, F. J.; AMALRIC, M.; KOOB, G. F. The neural substances for the motoractivating properties of psychostimulants: a review of recent findings. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 233-248, 1986.

SLOTKIN, TA; PINKERTON, K. E.; GAROFOLO, M. C.; AUMAN, J. T.; MCCOOK, E. C.; SEIDLER, F. J. Perinatal exposure to environmental tobacco smoke induces adenylyl cyclase and alters receptor-mediated cell signaling in brain and heart of neonatal rats. *Brain Res.*, 898 (2001), pp. 73-81.

TANDA, G.; GOLDBERG, S. R. Alteration of the behavioral effects of nicotine by chronic caffeine exposure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000 May;66(1):47-64.

TARNOPOLSKY, M.; CUPIDO, C. Caffeine potentiates low frequency skeletal muscle force in habitual and nonhabitual caffeine consumers. *J. Appl. Physiol.* 2000, 89:1719-1724.

TARNOPOLSKY, M. A. Effect of caffeine on the neuromuscular system-potential as an ergogenic aid. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2008, 33:1284-1289.

TAYLOR, P. Agentes que Atuam na Junção Neuromuscular e nos Gânglios Autônomos, em: Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 9ª Ed, Rio de Janeiro, McGraw Hill, 1996; 9:131-45.

TEICHER, M. H.; ANDERSEN, S. L.; POLCARI, A.; ANDERSON, C. M.; NAVALTA, C. P.; KIM, D. M. *The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 2003; 27: 33-44.

TRULLAS, R.; FOLIO, T.; YOUNG, A.; MILLER, R.; BOJE, K.; SKOLNICK, P. 1-aminocyclopropanecarboxylates exhibit antidepressant and anxiolytic actions in animal models. *Eur. J. Pharmacol.* 1991 Oct 22;203(3):379-85

TURMEN, T.; LOURIDAS, T. A.; ARANDA, J. V. Relationship of plasma and CSF concentrations of caffeine in neonates with apnea. *J. Pediatr.* 1979; Oct;95(4):644-6.

U.S. Department of Health and Human Services (USDHHS), Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders, published in 1993. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), 1993. [online] Disponível na internet via <http://www.epa.gov/epahome/publications.htm> Arquivo capturado 25 de janeiro de 2015

UMEMURA, T.; UEDA, K.; NISHIOKA, K.; HIDAKA, T.; TAKEMOTO, H.; NAKAMURA, S.; JITSUIKI, D.; SOGA, J.; GOTO, C.; CHAYAMA, K.; YOSHIZUMI, M.;

HIGASHI, Y. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *Am. J. Cardiol.* 2006, 98:1538-1541.

U.S. EPA. Respiratory Health Effects of Passive Smoking (Also Known as Exposure to Secondhand Smoke or Environmental Tobacco Smoke ETS). U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC, EPA/600/6-90/006F, 1992.

URAKAWA, N.; NAGATA, T.; KUDO, K.; KIMURA, K.; IMAMURA, T. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Legal. Med.* 1994; 106:232-36.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: Nicotine Addiction. A Report of the Surgeon General, 1988. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Health Promotion and Education, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No. (CDC) 88-8406, 1988.

VIEIRA, H. D. Coffee: The plant and its cultivation. In: Plant-parasites nematodes of coffee. Souza R. (Ed.), Springer Science + Business Media B. V. Dordrecht, Netherlands, pp: 3-26 2008

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

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*, 2004; 23; 154: 63-9.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001 May;25(3):275-86

WALLACE, JR. J. M.; BACHMAN, J. G.; O' MARLLEY, P. M.; SCHULENBERG, J. E.; COOPER, S. M.; JOHNSTON, L. D. Gender and ethnic differences in smoking, drinking illicit drug use among American 8 th, 10th and 12 th grade students, 1976-2000. *Addiction*, 2003; 98: 225-34.

WATKINSON, B.; FRIED, P. A. Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1985; Jan-Feb;7(1):9-17.

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*, 29: 647-57. 1994.

WILMOUTH, C. E.; SPEAR, L. P. Withdrawal from chronic nicotine in adolescent and adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2006; 85: 648-57.

World Health Organization. Global Report: Mortality Attributable to Tobacco, World Health Organization, Geneva. 2012

YESAIR, D. W., BRANFMAN, A. R., CALLAHAN, M. M. Human disposition and some biochemical aspects of methylxanthines. *Prog. Clin. Biol. Res.* 158, 215-233. 1984.

YIN, Y. Q.; ZHANG, C.; WANG, J. X.; HOU, J.; YANG, X.; QIN, J. Chronic caffeine treatment enhances the resilience to social defeat stress in mice. *Food Funct.* 2015 Feb 11;6(2):479-91.

ZUCKERMAN, M. Smoking, drinking, drugs and eating. In: *Behavioral Expressions and Biosocial Basis of Sensation Seeking*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1994. pp. 225–257.