



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE



PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - ASSOCIAÇÃO

AMPLA UFSCAR/UNESP

ANA PAULA MARQUES POSSI

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS AGUDOS DA
CAFEÍNA EM RATOS ADOLESCENTES E ADULTOS**

SÃO CARLOS – SP

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE



PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - ASSOCIAÇÃO

AMPLA UFSCAR/UNESP

ANA PAULA MARQUES POSSI

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS AGUDOS DA
CAFEÍNA EM RATOS ADOLESCENTES E ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Associação Ampla UFSCar/UNESP, para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

***Orientadora:* Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**

SÃO CARLOS – SP

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P856e Possi, Ana Paula Marques
Efeitos comportamentais e neuroquímicos agudos da cafeína em ratos adolescentes e adultos. / Ana Paula Marques Possi. – Araraquara, 2010
62 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação ampla UFSCar / Unesp

Orientador: Cleópatra da Silva Planeta

1. Adolescente. 2. Adulto. 3. Cafeína. 4. Estimulação psicomotora. I. Planeta, Cleópatra da Silva, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Ana Paula Marques Possi

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta.....



Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza.....



Profa. Dra. Tatiana Lima Ferreira.....



Dedico meus esforços, que culminaram nesta dissertação, à base de apoio que guiou meus passos por esta longa e rica caminhada; àqueles que amo e tanto admiro:

Minha Família, amor infinito;

Minha Orientadora, mestra e exemplo, sensatez e sabedoria;

Meus Amigos do Laboratório, o melhor da amizade no duro da realidade;

Dedico, simplesmente, o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, a minha amada família, **Maria Lúcia Marques Possi** e **João Possi**, pais exemplares, heróis, minha vida e meu norte, por todo o sempre. E a meu doce irmão, **Maurício Marques Possi**, que me ensinou ser a sabedoria a verdadeira riqueza do mundo dos homens. Ao meu amor, meu grande amigo e companheiro, **Fúlvio de Freitas Oliveira**, sempre ouvidos e coração, o meu futuro para onde quer que ele aponte. À **Maria, Fabíola e Juninho**, minha nova e amada família, por todo carinho, e, em especial, ao querido e saudoso **Sebastião de Ademilson de Oliveira**, onde estiver no vasto universo, nos apoiando e inspirado... sempre!

Agradeço à **Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta**, aos incontáveis momentos de aprendizado e dedicação, somente através dos diligentes olhos do mestre que o mundo cresce! Obrigado por nos mostrar que o saber deve ser, sempre, para o benefício de toda sociedade. Agradeço, por fim, a grande pessoa e profissional que é e, a qual, busco me espelhar.

Agradeço a **Marcelo Tadeu Marin**, meu segundo “chefe”, grande amigo e mestre. Exemplo, inconstestável, do verdadeiro pesquisador; dedicação, saber e humildade. Este trabalho também é seu!

Em especial, agradeço à **Roberta Zancheta**, fiel companheira das horas de estudos e trabalho, seguimos juntas e nos apoiamos por estes anos.

Ao amigos do laboratório: **Fábio, Rodrigo, Tarciso, Egberto, Joyce, Karina, Yara, Vanessa, Alianda, Thiago, Diego, Liany, Bruna, Renata**. Todos me ensinaram muito.

Agradeço à **Rosana** e à **Elisabete** por trabalharem ao meu lado, no desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a realização desta dissertação. À dedicação e ajuda da **Tirene**, por sempre alegrar nosso ambiente de trabalho, meu muito obrigada à todas!

Aos professores: **Ricardo Luiz Nunes de Souza, Paulo José de Campos Nogueira, José Francisco Fracasso**, pela amizade e apoio.

À professora **Maria do Carmo Longo**, com quem dei meus primeiros passos nesta carreira acadêmica.

Agradeço à **Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP** e à **Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR**, por me oferecerem ótima estrutura, fundamentais ao desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas** e à **FAPESP** pelo suporte financeiro desta pesquisa e de tantas outras que enriquecem nosso país.

RESUMO

A cafeína é provavelmente a substância psicoativa mais consumida no mundo. Essa substância está presente em alimentos, bebidas e medicamentos, sendo esses comercializados para indivíduos de todas as idades. Apesar disto, os efeitos da cafeína sobre os adolescentes são pouco compreendidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos psicomotores e neuroquímicos da cafeína em ratos adolescentes e adultos. Para tanto, ratos Wistar adolescentes (dia pós-natal 37 - 40) ou adultos (dia pós-natal 70 - 74) tiveram sua atividade locomotora registrada após injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou cafeína (3, 10, 30, 60 ou 120 mg/kg). Em outro experimento ratos adolescentes e adultos receberam injeção i.p. de salina ou cafeína nas doses de 30 ou 100 mg/kg e as concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos foram determinadas no córtex pré-frontal medial (CPFm), núcleo acumbens (NAc), caudado putamem (CPu) e área tegmental ventral (ATV) por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a detector eletroquímico. Nossos resultados demonstraram que a cafeína nas doses de 10 e 30 mg/kg induziram estimulação da atividade locomotora em ambos as idades, enquanto as doses mais elevadas (60 e 120 mg/kg) somente estimulou a atividade locomotora nos animais adolescentes. A injeção aguda de cafeína na dose de 30 e 100 mg/kg aumentou as concentrações de dopamina no CPu e na ATV em ratos adolescentes, mas não em adultos, e no NAc em ambas as idades. Além disso, cafeína causou aumento das concentrações de serotonina no CPFm em ratos adultos, mas não em adolescentes; e na ATV em ambas as idades. Portanto, em ratos adolescentes a cafeína causa estimulação em uma faixa de doses mais ampla que nos adultos. A alteração causada pela cafeína sobre o sistema dopaminérgico é mais evidente em ratos adolescentes do que adultos, enquanto sobre o sistema serotoninérgico é mais evidente em ratos adultos.

Palavras-chave: Adolescentes. Adultos. Cafeína. Estimulação psicomotora. Dopamina. Serotonina.

ABSTRACT

Caffeine is the most consumed psychostimulant drug in the world. This drug is present in food, beverages and medicines marketed for individuals of all ages. Despite the great consumption of caffeine containing foods by children and adolescents, few studies investigated age related effects of caffeine. Thus, we investigated caffeine-induced locomotor activity, as well as the effects of caffeine on the dopaminergic and serotonergic neurotransmission in adolescents and adults rats in areas important for motor behavior. Adolescent (postnatal day 37-40) or adult (postnatal day 70-74) Wistar rats had their locomotor activity registered following intraperitoneal (i.p.) injection of vehicle or caffeine (3, 10, 30, 60 or 120 mg/kg). In other experiment adolescent or adult rats received acute i.p. injections of 30 or 100 mg/kg of caffeine or saline and had the tissue levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in the nucleus accumbens (NAc), medial pre-frontal cortex (mPFC), caudate putamen (CPu) and ventral tegmental area (VTA) quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). Our results showed that 10 and 30 mg/kg of caffeine induced increased locomotor activity in both adolescent and adult rats, while at the higher caffeine doses (60 and 120 mg/kg) only adolescents were stimulated. The acute injection of 30 or 100 mg/kg of caffeine increased dopamine levels in the CPu and VTA in adolescent but not in adult rats, and in NAc in both ages. Furthermore, caffeine caused an increase in the concentration of serotonin in mPCF in adult but not in adolescent rats, and in VTA in both ages. Thus, in adolescent rats caffeine causes stimulation in a wider range of doses than in adults. The changes caused by caffeine on dopaminergic system are most evident in adolescent than adult rats, while on the serotonergic system they are more evident in adult rats.

Keywords: Adolescent. Adult. Caffeine. Psychomotor stimulation. Dopamine. Serotonin.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Caixa para medida da atividade locomotora..... 28
- FIGURA 2.** Cromatograma representativo da análise de uma amostra de Núcleo Acumbens..... 30
- FIGURA 3.** Atividade locomotora em ratos adolescentes após a administração de salina ou cafeína 38
- FIGURA 4.** Atividade locomotora em ratos adultos após a administração de salina ou cafeína..... 39
- FIGURA 5.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, serotonina e 5-HIAA no córtex pré-frontal medial de ratos adolescentes..... 41
- FIGURA 6.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, serotonina e 5-HIAA no córtex pré-frontal medial de ratos adultos..... 42
- FIGURA 7.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA no caudado putamen de ratos adolescentes..... 44
- FIGURA 8.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA no caudado putamen de ratos adultos..... 46
- FIGURA 9.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA no núcleo acumbens de ratos adolescentes..... 48
- FIGURA 10.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA no núcleo acumbens de ratos adultos..... 50
- FIGURA 11.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, serotonina e 5-HIAA na área tegmental ventral de ratos adolescentes..... 52
- FIGURA 12.** Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina, serotonina e 5-HIAA na área tegmental ventral de ratos adultos..... 53

LISTA DE ABREVIÇÕES

ALD-D	aldeído desidrogenase
ATV	área tegmental ventral
COMT	catecol-o-metiltransferase
CPu	caudado putamen
CPF	córtex pré-frontal
DOPAC	ácido 3,4-diidroxifenilacético
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DPN	dias pós-natais
EPM	erro padrão da média
HVA	ácido homovanílico
i.p.	intraperitoneal
MAO	monoaminoxidase
CPFm	córtex pré-frontal medial
NAc	núcleo acumbens
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético

SUMÁRIO

1 Introdução.....	12
1.1 Cafeína e a história.....	12
1.2 Epidemiologia do uso da cafeína.....	14
1.3 Mecanismo de ação e efeitos da cafeína.....	15
1.4 A cafeína sobre a neurotransmissão.....	19
1.5 Ontogênese dos efeitos comportamentais e neuroquímicos de psicostimulantes.....	20
2 Objetivos.....	25
3 Materiais e métodos.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Avaliação da atividade locomotora.....	27
3.3 Fármaco.....	28
3.4 Dissecções das áreas encefálicas.....	28
3.5 Quantificações das concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector eletroquímico.....	29
4 Delineamento experimental.....	32
4.1 Efeito da cafeína na locomoção em animais adolescentes e adultos.....	32
4.2 Efeito da cafeína sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica e seus metabólitos em animais adolescentes e adultos.....	32
5 Análise estatística.....	35
6 Resultados.....	37
6.1 Efeito da cafeína na atividade locomotora em animais adolescentes e adultos.....	37
6.2 Efeito da cafeína sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica e seus metabólitos em animais adolescentes e adultos.....	40

6.2.1 Alterações no Córtex Pré-frontal Medial em ratos adolescentes.....	40
6.2.2 Alterações no Córtex Pré-frontal Medial em ratos adultos.....	41
6.2.3 Alterações no Caudado Putamen em ratos adolescentes.....	43
6.2.4 Alterações no Caudado Putamen em ratos adultos.....	45
6.2.5 Alterações no Núcleo Acumbens em ratos adolescentes.....	47
6.2.6 Alterações no Núcleo Acumbens em ratos adultos.....	49
6.2.7 Alterações na Área Tegmental Ventral em ratos adolescentes.....	51
6.2.8 Alterações na Área Tegmental Ventral em ratos adultos.....	52
7 Discussão.....	55
8 Conclusão.....	64
9 Referências bibliográficas.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cafeína e a história

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide purínico do grupo das metilxantinas, nessa classe também se encontram a teobromina e a teofilina. Essas substâncias são classificadas farmacologicamente como psicostimulantes, juntamente com a cocaína e a anfetamina (TARKA; HURST, 1998). Os fármacos psicostimulantes são substâncias que aumentam a atividade psíquica e motora (O'BRIEN, 2005), eles produzem euforia, elevação do humor, do estado de alerta, do foco e redução da fadiga e do apetite (PIERCE; KUMARESAN, 2006). Das três metilxantinas, a cafeína é o estimulante mais potente, seguida pela teofilina, enquanto a teobromina se mostra quase isenta de ação estimulante (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). A cafeína foi identificada em mais de 60 espécies de plantas e segundo a história muitas destas plantas vêm sendo consumida desde o período Paleolítico (BARONE; ROBERTS, 1996).

No caso dos chás, apenas os preparados a partir da planta *Camellia sinensis*, como exemplo o chá verde e o preto, apresentam substâncias da classe das xantinas, principalmente a cafeína. Historicamente esta planta é nativa da China, partes da Índia, Mianmar, Tailândia, Laos e Vietnam. O primeiro relato histórico do uso do chá como bebida foi na China no ano de 350 D.C. O chá foi descrito pela primeira vez como um artigo de comércio no século V, e foi introduzido na Europa por comerciantes holandeses que viajaram e trouxeram para a Holanda o chá da China e do Japão em 1610. Em 1657, o chá foi introduzido na Inglaterra, onde, gradualmente, alcançou popularidade nas casas de café, tornando-se, eventualmente, a bebida nacional. O consumo do chá espalhou-se por toda Europa no século XVII, sendo introduzido pelos holandeses na América em 1650 e posteriormente comercializado pelos britânicos. Na América do Sul, a Argentina tornou-se um grande produtor, após a introdução da cultura de chá em 1946. O Brasil, Equador e Peru têm indústrias de chá menores (BALENTINE; HARBOWY; GRAHAM, 1998).

O mate é a bebida preparada a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*, as folhas de uma série de outros membros do gênero *Ilex*, às vezes, são usadas juntamente com os de *paraguariensis*. Existem diversas variedades de espécie e,

como a *Camellia sinensis*, há divergência de opinião sobre a sua identidade e nomenclatura. O mate contém cafeína em sua composição sendo que na Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Chile constitui uma das principais fontes de metilxantinas na dieta. A *Ilex paraguariensis* é nativa da região da América do Sul entre o sul do Brasil e do Paraguai, essa planta foi usada como bebida pelas populações indígenas da área muito antes dos primeiros colonos espanhóis chegarem, no início do século XVI. Os níveis de cafeína variam de 0,9% a 2,2%, sendo que a idade da folha é um determinante importante da concentração de cafeína e a maneira tradicional de preparar a bebida é derramar água fervente sobre as folhas (GRAHAM, 1998).

Na semente do cacau a principal metilxantina é a teobromina, mas também ocorrem pequenas quantidades de cafeína. Acredita-se que a origem do cacau (*Theobroma cacao*) ocorreu a quatro mil anos atrás na floresta Amazônica, evidências históricas indicam o cultivo da árvore do cacau pelos Astecas e Maias na América Central por volta do século IV D.C. Em 1502, Cristóvão Colombo levou as primeiras sementes de cacau para a Espanha e, em 1519, durante a conquista espanhola do império asteca, Cortez descobriu que as sementes de cacau poderiam ser torradas, moídas e misturadas com milho ou especiarias para preparar uma bebida espessa e amarga chamada "chocolatl" (do Asteca a palavra "choco" significa quente e "atl" significa bebida). Percebendo as possibilidades comerciais para o desenvolvimento do cacau, Cortez estudou o cultivo e métodos de preparação dos astecas. Em 1528, Cortez retornou à Espanha introduzindo a "chocolatl", sendo que os espanhóis acharam a bebida muito amarga e adicionaram açúcar a ela. Logo o consumo de chocolate se espalhou pela Europa e em 1828, a empresa holandesa de Van Houten inventou a prensa de cacau, o que facilitou a produção de cacau em pó pela remoção parcial da manteiga de cacau das sementes (APGAR; TARKA, 1998).

No caso do café existem duas espécies; o *Coffea arabica* L. (arabica) e o *Coffea canephora* (robusta) que foram os primeiros tipos produzidos e comercializados no mundo. A espécie *Coffea arabica* foi introduzida na Arábia, no Yemen no século XV onde rapidamente se tornou a bebida preferida. Os Holandeses, Franceses e Ingêses introduziram essa espécie de café em suas colônias a partir do século XVII. No Brasil a *Coffea arabica* foi introduzida em 1723,

tornando-se o país, até hoje, um dos mais importantes fornecedores deste tipo de café. Já a espécie *Coffea canephora* não foi reconhecida até 1895, quando era vista como a espécie *Coffea* indígena no Congo Africano. Uma das diferenças mais significativas entre essas duas espécies de café está no teor de cafeína, onde a *Coffea canephora* contém quase o dobro da cafeína encontrada na espécie *Coffea arábico* (SPILLER, 1998).

1.2 Padrões de uso da cafeína

Atualmente a cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo que aproximadamente 90% da população consome regularmente alimentos que contêm essa substância (TEMPLE, 2009). As fontes naturais de cafeína incluem grãos de café, folhas de chá, nozes de cola, cacau, guaraná e mate, a cafeína pode ser ainda adicionada em alimentos, bebidas, suplementos fitoterápicos e medicamentos (FRARY; JOHNSON; WANG, 2005). O conteúdo de cafeína nesses produtos varia entre 40 a 180 mg/150 ml no café, 24 a 50 mg/150 ml no chá, 15 a 29 mg/180 ml nos refrigerantes de cola e 1 a 36 mg/28 g no chocolate (BARONE; ROBERTS, 1996).

O consumo médio de cafeína pelos seres humanos alcança valores de 80 a 400 mg por pessoa ao dia, resultando em níveis plasmáticos de 5 a 20 μ M dependendo das nações e culturas avaliadas (DALY; FREDHOLM, 1998). Segundo Fredholm et al. (1999) a quantidade de cafeína ingerida diariamente pelos brasileiros é de aproximadamente 41 mg, sendo que 26 mg da cafeína são provenientes do café (representando 63,4%), 1 mg do chá (2,4%), 10 mg do mate (24,4%) e 4 mg do cacau (9,8%). Esse consumo é relativamente baixo se comparado a de outros países, por exemplo, a Holanda onde o consumo diário de cafeína é de 413 mg (vindo 369 mg do café, 38 mg do chá e 6 mg do cacau) e os Estados Unidos onde o consumo diário de cafeína é de 167 mg (143 mg do café, 12 mg do chá e 12 mg do cacau).

Adolescentes e crianças são a população com maior crescimento do uso da cafeína, ocorrendo aumento de 70% nos últimos 30 anos nos Estados Unidos (HARNACK; STANG; STORY, 1999). Segundo Kendler et al. (2008) a cafeína é a substância psicoativa mais utilizada entre humanos de 9 a 40 anos nos

Estados Unidos, sendo que seu consumo começa mais cedo e alcança mais de 90% dos indivíduos adultos.

A fonte mais comum de cafeína para crianças e adolescentes é o refrigerante, e em menor quantidade o chocolate, chá e café. Com o surgimento das bebidas energéticas, os adolescentes passam a ter maiores opções de produtos cafeinados do que no passado (LUDDEN; WOLFSON, 2010). Vale destacar que algumas bebidas que contêm cafeína são comercializadas, especialmente, para crianças (BRAMSTEDT, 2007). Contudo a literatura é escassa em estudos do efeito da cafeína em jovens.

1.3 Mecanismo de ação e efeitos da cafeína

A cafeína é um psicostimulante que induz a estimulação do sistema nervoso central, além de afetar o sistema cardiovascular, renal e respiratório. Devido a esses efeitos a cafeína tem sido utilizada terapeuticamente para o tratamento da narcolepsia, asma e apnéia (DALY; FREDHOLM, 1998). Também está presente em suplementos para aumentar o desempenho desportivo e como um componente de medicamentos para o alívio dos sintomas de dor de cabeça (SHAPIRO, 2007; BURKE, 2008). Após a ingestão, a cafeína é eficientemente absorvida pelo trato gastrointestinal e é rapidamente distribuída no organismo (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004).

A cafeína é metabolizada pelo fígado para forma dimetil e monometilxantinas, ácidos dimetil e monometilúrico, trimetil e dimetilalantoína, e derivados uracil, sendo que os principais metabólitos da cafeína são a 1,3-metilxantina (teofilina) e a 1,7-dimetilxantina (paraxantina), a teofilina e a paraxantina apresentam atividade biológica e farmacológica. A maior diferença no metabolismo entre roedores e humanos é que, em ratos, 40% da cafeína metabolizada resulta em derivados trimetil, comparado aos 6% nos humanos. Em roedores a paraxantina é o metabolito predominante no plasma e a desmetilação da cafeína, para a formação desta substância, parece ser predominantemente catalisada pelo citocromo P-450. O tempo de meia-vida das metilxantinas varia sendo que em ratos é de 0,7 a 1,2 horas e em humanos de 2,5 a 4,5 horas, a cafeína é excretada pela urina e levando-se em consideração as taxas diferentes de metabolismo da cafeína entre roedores e

humanos, a dose de 10 mg/kg de cafeína em ratos corresponde a 250 mg de cafeína em uma pessoa pesando 70 kg (3,5 mg/kg), e isso representaria cerca de 2 a 3 xícaras de café (FREDHOLM, 1999).

Nas doses regularmente consumidas por seres humanos, o antagonismo dos receptores de adenosina representa o principal mecanismo de ação, os metabolitos teofilina e paraxantina também causam bloqueio desses receptores. Doses mais elevadas são necessárias para outras ações, tais como, a inibição das fosfodiesterases, bloqueio de receptores GABA_A e liberação de cálcio dos estoques intracelulares (DALY; FREDHOLM, 1998; FREDHOLM, 1999).

A adenosina não se encaixa no critério normalmente usado para definir um neurotransmissor clássico. Por exemplo, a adenosina não é estocada em vesículas e não é liberada pelos terminais nervosos de modo dependente de cálcio (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Segundo Fredholm et al. (2005) três mecanismos são responsáveis pela presença de adenosina extracelular. O primeiro é pela liberação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, após um aumento das concentrações intracelulares de adenosina ou a uma inversão do gradiente de sódio. O segundo mecanismo é a formação de adenosina extracelular pelo caminho das ectonucleotidases na liberação de nucleotídeos de adenina, especialmente o trifosfato de adenosina (ATP). Ao contrário da adenosina, o ATP está presente nas vesículas sinápticas, sendo liberada pelos terminais nervosos. E o terceiro mecanismo ocorre através da formação extracelular de adenosina após a liberação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC).

Entre os quatro receptores de adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃), a cafeína apresenta maior afinidade pelos receptores A₁ e A_{2A}, os quais são amplamente expressos no sistema nervoso central (HAN et al., 2009). O receptor A₁ é acoplado à proteína G_i (inibe a adenilil ciclase) ou G_o (ativa canais de potássio) (TRUSSEL; JACKSON, 1985; MACDONALD; SKERRITT; WERZ, 1986). Os receptores A_{2A} estão acoplados às proteínas G_s ou G_{olf} que ativam a adenilil ciclase (HERVÉ et al., 2001). Os receptores A₁ estão presentes em várias regiões do sistema nervoso central como, por exemplo, hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, amígdala, gânglios da base e vários núcleos hipotalâmicos (RIVKEES; PRICE; ZHOU, 1995). Menor número desses receptores é encontrado no caudado putamen (CPu) e núcleo acumbens (NAc) (MAHAN et al., 1991; REPERT et al., 1991). Entretanto, os

receptores A_{2A} apresentam alta densidade no estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfativo e amígdala, com pequena expressão no globo pálido e núcleo do trato solitário (TEMPLE, 2009). Os receptores A_1 encontram-se, principalmente, nos terminais pré-sinápticos, onde inibem a liberação de vários neurotransmissores incluindo a dopamina e a serotonina (OKADA; MIZUNO; KANEKO, 1996; OKADA et al., 1999; SOLINAS et al., 2002). Os receptores A_{2A} tem localização tanto pré quanto pós-sináptica (BROWN; SHORT, 2008). Contudo, os receptores estriais A_{2A} são predominantemente pós-sinápticos (XIE; RANKUMAR; TOTH, 2007).

O efeito da cafeína sobre o humor tem sido estudado em seres humanos, doses baixas dessa substância (20 a 200 mg) são associadas a efeitos considerados subjetivamente “positivos”, tais como sentimento de maior energia, aumento da capacidade imaginativa, da eficiência, da autoconfiança e do alerta. Além disso, os indivíduos que consumiram cafeína relataram melhor concentração, maior motivação para o trabalho e, ainda, o desejo de socialização. No entanto, doses mais elevadas (maiores que 400 mg) de cafeína causaram efeitos considerados desagradáveis (FREDHOLM et al., 1999), por exemplo, ansiedade, náuseas, agitação e nervosismo (TEMPLE, 2009). A maioria dos indivíduos ajusta, conforme sua necessidade, a ingestão de bebidas que contêm cafeína, de modo a minimizar os efeitos desagradáveis (DALY; FREDHOLM, 1998).

Em jovens, o consumo de cafeína, melhora o desempenho em tarefas de atenção, diminui a sensação subjetiva de “preguiça” e aumenta a sensação subjetiva de ansiedade (BERNSTEIN et al., 1994). Além disso, entre adolescentes, foi relatado aumento da atividade motora, da velocidade de fala, diminuição do tempo de reação, dificuldade de dormir, perda de apetite e desconforto estomacal (RAPOPORT et al., 1981; LUDDEN; WOLFSON, 2010). Foi observado que a dificuldade em adormecer é mais comum nos adolescentes que têm uma alta ingestão de cafeína (ORBETA et al., 2006).

A cafeína estimula o comportamento motor de modo semelhante aos psicostimulantes clássicos, como a cocaína e anfetamina. Além disso, seu efeito reforçador positivo é baixo, comparado aos psicostimulantes clássicos (FERRÉ, 2008). De modo semelhante aos humanos, o efeito comportamental da cafeína em roedores também depende da dose administrada, sendo considerado bifásico. O efeito estimulante motor máximo da cafeína é observado depois da administração de

doses entre 10 e 30 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.), enquanto doses mais elevadas (em torno de 100 mg/kg) não produzem efeito, ou diminuem a atividade locomotora (SOLINA et al., 2002; FISONE; BORGKVIT; USIELLO, 2004). A diminuição do comportamento locomotor em resposta a doses elevadas de cafeína pode estar relacionado com o efeito ansiogênico da substância (BHATTACHARYA; SATYAN; CHAKRABARTI, 1997; EI YACOUBI et al., 2000a). Do mesmo modo, doses baixas de cafeína (3 mg/kg), administradas a ratos, causam preferência condicionada por lugar, enquanto que, em altas doses (30 mg/kg) causam aversão condicionada por lugar (BROCKELL; EIKELBOOM; BENINGER, 1991).

As concentrações de cafeína utilizadas para observar o efeito na locomoção de roedores estão relacionadas ao bloqueio dos receptores de adenosina A_1 e A_{2A} (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Estudos de Ledent et al. (1997) observaram que camundongos *knock-out* do receptor de adenosina A_{2A} não apresentaram aumento da atividade exploratória em resposta à cafeína, pelo contrário, mostrando redução da atividade exploratória em resposta à essa substância. Outros estudos utilizando antagonistas seletivos de receptores A_{2A} demonstraram que esse receptor está claramente relacionado com as propriedades estimulantes da cafeína. Entretanto, ainda há debate sobre a modulação dos receptores A_1 na estimulação ou depressão da atividade locomotora induzida pela cafeína (SVENNINGSSON et al., 1997; KARCZ-KUBICHA et al., 2003).

Esse efeito dos receptores A_1 e A_{2A} foi investigado por El Yacoubi et al. (2000b), o qual reforçou resultados anteriores sobre a participação dos receptores A_{2A} no efeito estimulante da cafeína e demonstrou que antagonistas do receptor A_1 medeiam a depressão psicomotora induzida pela cafeína em altas doses ou inibem o efeito psicoestimulante causado pela cafeína nos receptores A_{2A} . Corroborando com esses resultados, um estudo em camundongos *knock-out* mostrou que os receptores de adenosina A_{2A} , mas não os receptores A_1 , são necessários para estimulação motora induzida pela cafeína e que o efeito estimulante da cafeína é facilitado nos ratos que não apresentam os receptores A_1 (HALLDNER et al., 2004).

1.4 A cafeína sobre a neurotransmissão

Em geral, as propriedades psicostimulantes da cafeína ocorrem devido a sua capacidade de interagir com a neurotransmissão em diferentes regiões do encéfalo, podendo alterar, por exemplo, a concentração e/ou síntese de diferentes neurotransmissores (HADFIELD; MILIO, 1989; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). O antagonismo dos receptores A_1/A_{2A} pela cafeína altera, de acordo com suas vias de transdução de sinal anteriormente descritas, a concentração intracelular de AMPc, atividade de enzimas cinases e concentração iônica intracelular (YOSHIMURA, 2005; XIE; RANKUMAR; TOTH, 2007). Essas alterações culminam por alterar a atividade neuronal e a liberação de neurotransmissores, como dopamina e serotonina (SOLINAS et al., 2002; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004).

A determinação da concentração tecidual de dopamina, serotonina e seus metabólitos é geralmente usada como indicador de atividade desses sistemas de neurotransmissão. O principal produto da dopamina no encéfalo de ratos é o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), que é formado pela ação da enzima monoaminoxidase (MAO), seguida da ação da enzima aldeído desidrogenase (ALD-D) na dopamina livre no citosol. Outro metabólito da dopamina, o ácido homovanílico (HVA), é formado pela ação da catecol-o-metiltransferase (COMT) na dopamina ou DOPAC livre no meio extracelular. A serotonina é catabolizada pela MAO e oxidada pela ALD-D para formar o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (ELSWORTH; ROTH, 1997; COOPER; BLOOM; ROTH, 2003).

Segundo Del Arco; Mora (2009) a região do NAc representa o papel central como interface entre a informação límbica e o comportamento motor. Existem evidências que a dopamina no NAc é essencial para o comportamento motor, motivação e recompensa. No córtex pré-frontal (CPF) a dopamina também desempenha um papel na aprendizagem e formação de memória (LUFT; SCHWARZ, 2009). Enquanto o CPu está relacionado com os movimentos motores estereotipados e em menor medida com a locomoção (CORTEZ et al., 2010). O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que é formado pela área tegmental ventral (ATV), NAc e CPF também é responsável pelo efeito reforçador das substâncias de abuso (KOOB; LE MOAL, 2001).

Assim os neurônios dopaminérgicos têm um papel chave na regulação da atividade motora e nos efeitos comportamentais dos psicostimulantes, como a anfetamina. Essa substância aumenta a atividade locomotora por elevar a dopamina extracelular, embora a serotonina também tem sido relacionada ao controle da atividade motora em resposta a psicostimulantes, contudo seu papel ainda não é bem compreendido (TILLEMANN et al., 2009). O sistema serotoninérgico, particularmente aquele que envolve a ativação dos receptores 5-HT_{1B} no NAc, também vem sendo implicado no efeito reforçador agudo dos psicostimulantes (KOOB; LE MOAL, 2008).

Alguns estudos demonstram que a ação da cafeína sobre as vias dopaminérgicas está envolvida com seu efeito motor (FERRÉ, 2008). Estudos com microdiálise demonstraram que a cafeína em doses de 10 e 30 mg/kg (i.p.) aumentou a concentração extracelular de dopamina no NAc (SOLINAS et al., 2002; QUARTA et al., 2004). No entanto, Acquas; Tanda; Di Chiara (2002) e De Luca et al. (2007) questionam a liberação de dopamina no NAc induzida pela cafeína, já que evidenciaram o aumento, por esta substância, da concentração de dopamina extracelular, principalmente no córtex pré-frontal medial (CPFm), mas não no NAc. Enquanto que, a injeção aguda de cafeína foi capaz de aumentar as concentrações teciduais de dopamina no estriado (HADFIELD; MILIO, 1989).

O sistema serotoninérgico também é afetado pela cafeína. Estudo medindo as concentrações teciduais de serotonina demonstrou que a cafeína nas doses de 100 mg ou 200 mg/kg aumentou a concentração de serotonina no estriado, bulbos olfativos, hipotálamo e hipocampo (HADFIELD; MILIO, 1989). No mesmo sentido, estudo com microdiálise observou que a cafeína aumentou as concentrações extracelulares de serotonina no hipocampo (OKADA et al., 1997).

1.5 Ontogênese dos efeitos comportamentais e neuroquímicos de psicostimulantes

A adolescência tem sido definida como um período importante para a aquisição de habilidades necessárias para a vida adulta e caracterizada por alterações em diferentes sistemas neurobiológicos (VIDAL et al., 2007). Assim como em humanos, é difícil caracterizar com precisão os eventos que desencadeiam e

cessam a adolescência. Em roedores, contudo, é possível estabelecer um período no qual os animais exibem os comportamentos típicos dessa fase. Spear; Brake (1983) definiram adolescência em ratos como o período ao redor da maturação sexual, ocorrendo aproximadamente entre os dias pós-natais (DPN) 28 e 42.

Enquanto certos atributos da adolescência humana são singulares, algumas características são expressas por adolescentes de diversas espécies. Por exemplo, de forma semelhante ao que ocorre em humanos, ratos no período da adolescência mostram aumento da investigação social, da interação com os pares, da busca por novidades e da exploração de áreas desconhecidas (SPEAR, 2000). Segundo Wahlstrom; White; Luciana (2010), a adolescência é caracterizada pela contínua maturação de uma grande variedade de comportamentos mediados pelo córtex pré-frontal, incluindo planejamento, memória de trabalho, controle inibitório e tomada de decisão motivada por tarefas. Estudos de neuroimagem encontraram diferença relacionada à idade na ativação do córtex orbito frontal e estriado ventral quando o indivíduo responde a recompensa, com um padrão geral de maior ativação durante a adolescência.

As diferenças da ativação neural entre adolescentes e adultos podem ser devidas a alterações na neurotransmissão central. Os receptores de dopamina no CPu, por exemplo, aumentam em número a partir da primeira semana de vida com o pico durante a adolescência e, em seguida, eles são reduzidos para os níveis da vida adulta (TEICHER; ANDERSEN; HOSTETTER, 1995; TARAZI; TOMASINI; BALDESSARINI, 1998a). Presume-se que a função dos autoreceptores de dopamina é transitoriamente diminuída, resultando em aumento da degradação da dopamina, aumento da síntese e liberação deste neurotransmissor (BOLANOS; GLATT; JACKSON, 1998). Foi observado também alterações nas densidades dos transportadores de dopamina, ocorrendo aumento progressivo deste no CPu do DPN 7 até níveis da vida adulta no DPN 60 (TARAZI; TOMASINI; BALDESSARINI, 1998b). Os transportadores de serotonina no córtex frontal também aumentam do DPN 25 até o DPN 90 (MOLL et al., 2000). Essas mudanças neurais podem ser responsáveis pelas respostas comportamentais características de animais adolescentes em comparação a adultos, e influenciar as diferentes respostas aos psicostimulantes.

Segundo Izenwasser; French (2002) os adolescentes são mais sensíveis aos efeitos reforçadores das substâncias psicoativas de abuso. Essa maior sensibilidade dos adolescentes pode torná-los mais suscetíveis ao desenvolvimento da dependência (SPEAR, 2000).

Vários estudos demonstraram que animais adolescentes respondem de modo diferente aos psicostimulantes que os animais adultos, no comportamento e na neuroquímica.

No comportamento, estudos demonstraram que ratos adolescentes podem auto-administrar quantidades maiores de anfetamina quando comparados a animais adultos (SHAHBAZI et al., 2008; MATHEWS; WATERS; MCCORMICK, 2009). Estudos demonstraram que a idade do animal influencia diferentemente a preferência condicionada por lugar induzida pela cocaína, de tal forma que os animais adolescentes foram mais sensíveis a cocaína na dose de 5 mg/kg, que os adultos (BADANICH; ALDER; KIRSTEIN, 2006).

Tem sido relatado que roedores adolescentes são hipossensíveis à estimulação psicomotora induzida por psicostimulantes, tais como anfetamina (BOLANOS, GLATT; JACKSON, 1998; ADRIANI; LAVIOLA, 2000) e cocaína quando comparados com os animais adultos (LAVIOLA et al., 1995). Contudo, estudos demonstraram que para a cocaína, a resposta da atividade locomotora em diferentes idades é dose-dependente. Foi observado que, ratos no início da adolescência (DPN 28) apresentam maior resposta locomotora para a dose aguda de cocaína 10 mg/kg do que os ratos adultos (DPN 65), porém, na doses de 40 mg/kg os animais com DPN 28 apresentaram menor atividade locomotora do que os animais com DPN 65 (CASTER; KUHN, 2009).

Na resposta neuroquímica dos psicostimulantes, estudos demonstraram diferenças na liberação de dopamina no sistema mesocorticolímbico, entre ratos adolescentes e adultos, após a injeção aguda de cocaína (WALKER; KUHN, 2008). Laviola; Pascucci; Pieretti (2001) demonstraram que ratos adolescentes apresentaram menor liberação de dopamina no NAc que ratos adultos, após administração aguda de anfetamina. Segundo Caster; Kuhn (2009) baixas doses de cocaína podem resultar em uma maior resposta do sistema dopaminérgico nas regiões subcorticais no começo da adolescência quando comparado com o final da adolescência ou com animais adultos.

Contudo, em relação à cafeína, poucos estudos investigam seu efeito sobre a atividade locomotora em diferentes idades e as alterações causadas por essa substância na neurotransmissão dopaminérgica e principalmente serotoninérgica na região mesolímbica em animais adolescentes e adultos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Investigar em ratos adolescentes e adultos:

- a) curva dose-efeito do efeito da cafeína sobre a atividade locomotora;
- b) as alterações na neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica após a administração de cafeína, no córtex pré-frontal medial (CPFm), caudado putamen (CPu), núcleo acumbens (NAc) e área tegmental ventral (ATV).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP (Botucatu-SP). Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Grupos de 3 a 4 animais foram mantidos em gaiolas moradia de 32 x 40 x16 cm (largura x comprimento x altura) em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h) com livre acesso a alimento e água.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP (CEP-08/2008) e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – (COBEA).

3.2 Avaliação da atividade locomotora

A atividade locomotora dos animais foi avaliada em uma caixa de atividade (Columbus Instruments-CA, EUA) construída em acrílico transparente com as seguintes dimensões: 44 (comprimento) X 44 (largura) X 20 (altura) cm (Figura 1). Os animais foram colocados individualmente na caixa de atividade e a locomoção foi registrada automaticamente por meio de fotocélulas localizadas a cada 2,5 cm nas paredes da caixa e distantes 4,5 cm do seu assoalho. Cada unidade da locomoção corresponde à interrupção consecutiva de dois feixes de raios infravermelhos emitidos pelas fotocélulas.



Figura 1- Caixa para medida da atividade locomotora (Columbus Instruments-EUA).

3.3 Fármaco

A cafeína anidra (Purifarma, São Paulo-SP, Brasil) foi diluída em NaCl 0,9% e injetada i.p. nas doses de 3, 10, 30, 60, 100 ou 120 mg/kg dependendo do experimento. Como a cafeína apresenta solubilidade de 20 mg/mL em água e temperatura ambiente, as soluções foram preparadas de acordo com a solubilidade e o volume da injeção foi padronizado em 5 mL/kg de solução de salina ou de cafeína nas diferentes doses.

3.4 Dissecações das áreas encefálicas

Os encéfalos foram dissecados em criostato sob temperatura de -15 a -20°C. Seguindo-se coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos; Watson (2005). Fatias coronais de cerca de 1mm foram selecionadas e as áreas de interesse foram retiradas por meio de agulhas de ponta chata de 13 ou 15 Gauge. As fatias coronais de interesse apresentaram as coordenadas a partir do bregma como segue: +3,7mm a +2,7mm para o CPFm; +2,0mm a +1,0mm para o NAc e CPu e -5,0 a -6,0mm para a ATV.

3.5 Quantificações das concentrações de dopamina, serotonina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector eletroquímico

A técnica para determinação destas substâncias foi recentemente padronizada em nosso laboratório e baseia-se naquelas descritas por Cannazza et al. (2005) e Patel et al. (2005). Para a determinação das concentrações de dopamina, serotonina, HVA, DOPAC e 5-HIAA, as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,1M, centrifugadas a 13.150 g, 20 min e 4°C. As diluições dos tecidos encefálicos foram padronizadas em experimentos preliminares para adequação da concentração das substâncias quantificadas dentro da faixa de linearidade do detector. Os volumes de homogeneização foram os seguintes: 80 µL para o CPFm e ATV; 150 µL para o NAc e 200 µL para o CPu.

Trinta microlitros do sobrenadante foi injetado automaticamente no sistema de cromatografia. O sistema CLAE consiste do cromatógrafo 2465 Waters® Alliance (Waters, Milford, MA-USA) com um detector eletroquímico 2465 de carbono vítreo e coluna de fase-reversa (Symmetry C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm and 100-Å de diâmetro de poro da partícula; Waters). A diferença de potencial foi ajustada para 800 mV versus um eletrodo de referência de Ag/AgCl. A fase móvel, em fluxo de 0,8 mL/minuto consistiu de ácido cítrico (50 mM), KCL (2 mM), EDTA (0,1 mM), 9,86% de metanol e 2,11% de acetonitrila, ajustada para pH 3,2. A fase móvel foi filtrada a vácuo e degaseificada por ultra-som antes da aplicação.

A curva de calibração foi construída com soluções padrões de 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 e 600 ng/mL de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA injetados no cromatógrafo em triplicata. O limite de detecção e quantificação foram, respectivamente, para a dopamina: 0,5 e 1,66; para o DOPAC: 0,7 e 2,4; para o HVA: 1,9 e 6,4; para a serotonina: 1,0 e 3,5 e para o 5-HIAA: 1,3 e 4,26 ng/mL. Quando as concentrações das amostras ficavam abaixo do limite de quantificação, as mesmas eram excluídas. Por fim, as concentrações das substâncias eram corrigidas pela massa das amostras de tecido dissecadas, sendo expressas em ng da substância por mg de tecido.

A Figura 2 mostra um cromatograma representativo da análise de uma amostra de NAc, destacando cada uma das substâncias mensuradas.

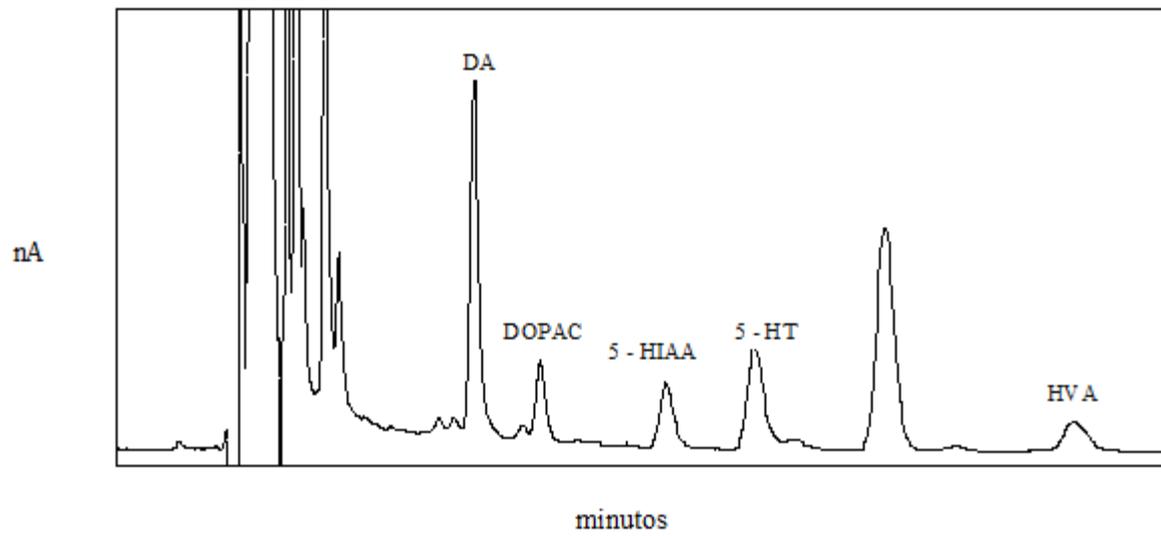


Figura 2 - Cromatograma representativo da análise de uma amostra de Núcleo Acumbens.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Efeito da cafeína na locomoção em animais adolescentes e adultos

No dia do experimento, ratos adolescentes (DPN 37-40, N= 7-12 por grupo) ou adultos (DPN 70-74, N= 7-12 por grupo) foram removidos de suas gaiolas moradia e colocados na caixa de atividade para habituação por 30 minutos. Em seguida, os ratos receberam injeções (i.p.) de salina (NaCl 0,9%) ou cafeína na dose de 3, 10, 30, 60 ou 120 mg/kg. Imediatamente após as injeções, os animais foram recolocados na caixa de atividade e tiveram a atividade locomotora registrada em intervalos de 10 minutos durante 60 minutos após as injeções. O período de análise foi selecionado de experimentos anteriores, que mostraram que a estimulação locomotora da cafeína ocorre, principalmente, no período de 60 minutos.

Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro, entre as 8:00 e 17:00 horas.

4.2 Efeito da cafeína sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica e seus metabólitos em animais adolescentes e adultos

Primeiramente, ratos adolescentes (DPN 37-40, N=6-7 por grupo) ou adultos (DPN 70-74, N=6-7 por grupo) foram retirados do biotério e habituados por 40 minutos na sala de experimento. Em seguida, os mesmos foram retirados das gaiolas moradia e receberam injeção (i.p.) de salina ou cafeína nas doses de 30 ou 100 mg/kg. Imediatamente após a injeção os ratos foram alocados em caixas individuais onde permaneceram por 30 minutos. Após esse período, os animais foram transferidos para uma sala ao lado e sacrificados por decapitação, sendo seus encéfalos retirados rapidamente do crânio (1 a 2 minutos) e congelados em isopentano resfriado sobre gelo seco. Em seguida, os encéfalos foram armazenados a -80 °C para posterior dissecação das áreas encefálicas de interesse (item 3.4) e quantificação das amostras por CLAE (item 3.5). Tanto a dissecação das áreas encefálicas, quanto quantificação por CLAE foi realizada com as amostras dos ratos adolescentes e adultos simultaneamente.

Optamos por analisar as alterações neuroquímicas da injeção aguda de cafeína após 30 minutos, pois, utilizamos como base os resultados obtidos em um experimento piloto. Assim, com base nos resultados da locomoção, realizamos um experimento piloto que determinou os efeitos neuroquímicos da cafeína 15, 30 e 60 minutos após a injeção desta substância. O efeito da cafeína, foi melhor evidenciado 30 minutos após a injeção, corroborando com o tempo mais utilizado em estudos da literatura, que observaram as alterações neuroquímicas da cafeína.

Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro, entre as 8:00 e 12:00 horas. As doses de cafeína selecionadas para esse experimento foram baseadas nos resultados do experimento anterior.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da atividade locomotora foram expressos com a locomoção acumulada nos 60 minutos de sessão.

Os dados foram analisados pelo programa Statistica (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) separadamente para animais adolescentes e adultos. O experimento da atividade locomotora (item 4.1) foi analisado pela ANOVA monofatorial comparando-se os animais que receberam salina ou cafeína (3, 10, 30, 60 ou 120 mg/kg).

No experimento para análise das alterações neuroquímicas induzidas pela cafeína (item 4.2) foi utilizada ANOVA monofatorial comparando-se os animais que receberam salina ou cafeína (30 ou 100 mg/kg). Em ambos os experimentos, nos casos em que ANOVA mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) os resultados foram submetidos ao teste post-hoc Newman-Keuls para verificação das diferenças entre os grupos de interesse.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da cafeína na atividade locomotora em animais adolescentes e adultos

Em ratos adolescentes (Fig. 3A), ANOVA monofatorial revelou diferença significativa na atividade locomotora entre os grupos [$F_{(5,47)} = 11,5$; $p < 0,001$]. O teste post hoc Newman-Keuls revelou aumento significativo na atividade locomotora induzida pelas injeções de cafeína nas doses de 10, 30, 60 e 120 mg/kg comparada ao grupo salina ($p < 0,05$) (Fig. 3B).

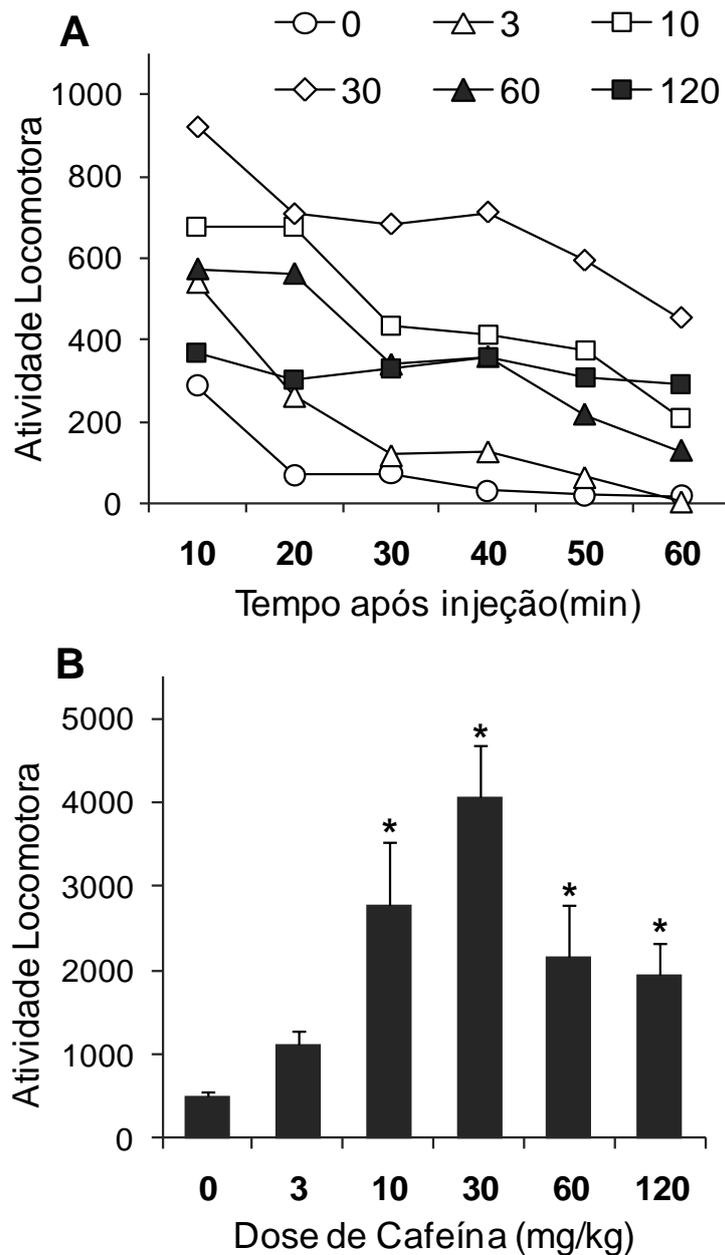


Figura 3 – Atividade locomotora em **ratos adolescentes** após a administração de salina (0) ou cafeína nas doses 3, 10, 30, 60 e 120 mg/kg. O gráfico superior (**A**) mostra o decurso temporal da atividade locomotora durante a sessão de 60 minutos. O gráfico inferior (**B**) representa o total da atividade locomotora durante a sessão de 60 minutos. Os dados são expressos como média + erro padrão da média (EPM) (N = 7 a 12 animais por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (teste Newman-Keuls).

Em ratos adultos (Fig. 4A), ANOVA monofatorial revelou diferença significativa na atividade locomotora entre os grupos [$F_{(5,40)} = 8,7$; $p < 0,001$]. O teste Newman-Keuls demonstrou aumento significativo na atividade locomotora induzida pelas injeções de cafeína nas doses de 10 e 30 mg/kg comparada ao grupo salina nesses animais adultos ($p < 0,05$) (Fig. 4B).

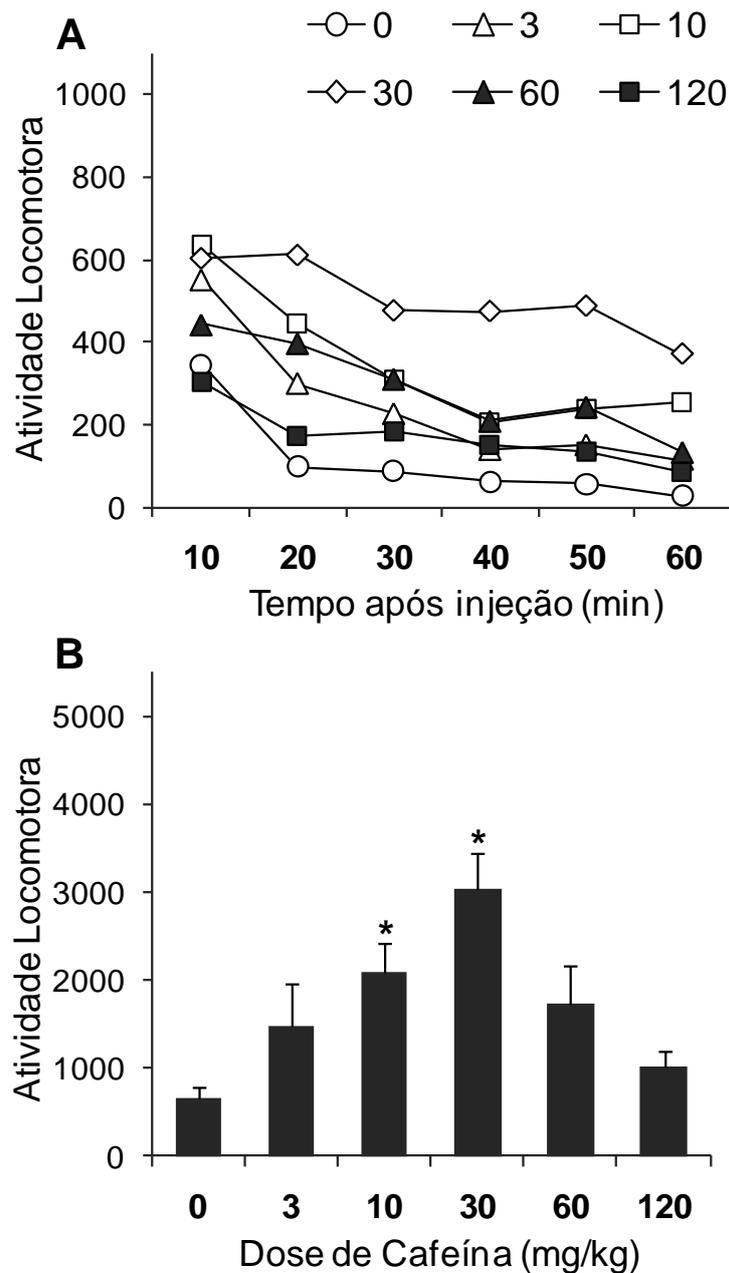


Figura 4 – Atividade locomotora em **ratos adultos** após a administração de salina (0) ou cafeína nas doses 3, 10, 30, 60 e 120 mg/kg. **(A)** mostra o decurso temporal da atividade locomotora durante a sessão de 60 minutos. **(B)** representa o total da atividade locomotora durante a sessão de 60 minutos. Os dados são expressos como média + EPM (N = 7 a 12 animais por grupo). * p < 0,05 comparado ao grupo salina (teste Newman-Keuls).

Assim, a cafeína nas doses de 10 a 120 mg/kg aumentou a atividade locomotora em ratos adolescentes, enquanto apenas as doses de cafeína de 10 e 30 mg/kg aumentaram a atividade locomotora em ratos adultos.

6.2 Efeito da cafeína sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica e seus metabólitos em animais adolescentes e adultos

Com base nos nossos resultados no item 6.1 optamos pela dose de 30 mg/kg na qual observamos o efeito máximo em adultos e adolescentes. A dose de 100 mg/kg baseou-se no fato de que no nosso estudo é uma dose intermediária, entre 60 e 120 mg/kg, que não causaram estimulação em ratos adultos, além disso a dose de 100 mg/kg é a mais utilizada na literatura que investiga os efeitos neuroquímicos da cafeína.

6.2.1 Alterações no Córtex Pré-frontal Medial em ratos adolescentes

A figura 5 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPFm em animais adolescentes.

A ANOVA monofatorial não revelou diferença significativa entre grupos nas concentrações de dopamina, DOPAC e serotonina [$F_{(2,17)} = 0,36$; $p = 0,71$; $F_{(2,17)} = 1,43$; $p = 0,26$ e $F_{(2,17)} = 1,35$; $p = 0,28$, respectivamente] (Fig. 5A, B e C). Não foi possível a determinação da concentração de HVA, pois suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação da técnica empregada.

Contudo para a concentração de 5-HIAA a ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre grupos [$F_{(2,17)} = 4,96$; $p < 0,05$]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 100 mg/kg aumentou a concentração de 5-HIAA no CPFm dos adolescentes comparado ao grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 5D).

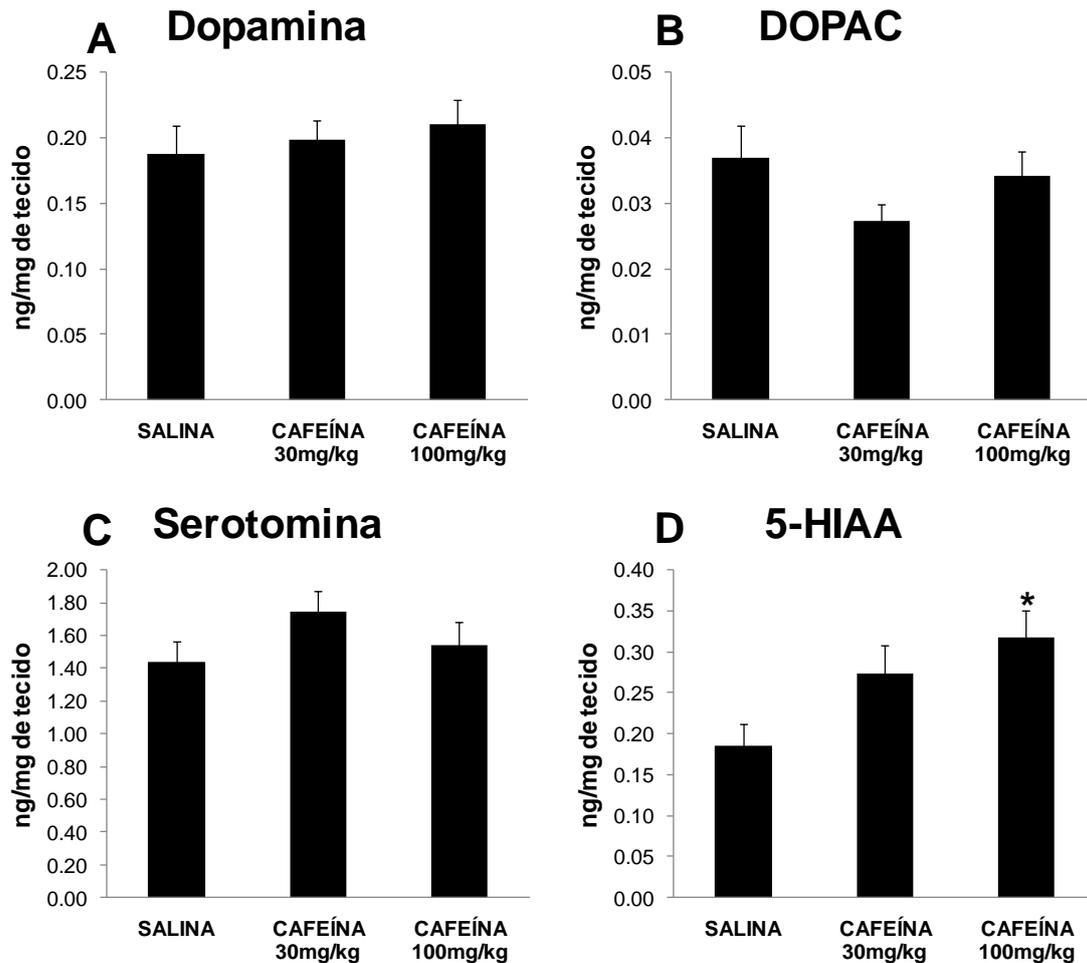


Figura 5 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), serotonina (C) e 5-HIAA (D) no córtex pré-frontal medial de **ratos adolescentes**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.2 Alterações no Córtex Pré-frontal Medial em ratos adultos

A figura 6 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPFm de animais adultos.

A ANOVA monofatorial não revelou diferença significativa entre os grupos nas concentrações de dopamina e DOPAC [$F_{(2,17)} = 3,12$; $p = 0,07$ e $F_{(2,17)} = 0,52$; $p = 0,60$, respectivamente] (Fig. 6A e B). Não foi possível a determinação da concentração de HVA, pois suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação da técnica empregada.

Contudo para a concentração de serotonina ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,17)} = 7,19$; $p < 0,01$]. O teste

Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 30 mg/kg aumentou a concentração tecidual de serotonina nos adultos comparado com o grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 6C). Para as concentração de 5-HIAA a ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,17)} = 5,05$; $p < 0,05$]. O teste Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 100 mg/kg aumentou a concentração de 5-HIAA no tecido nos adultos comparado com o grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 6D).

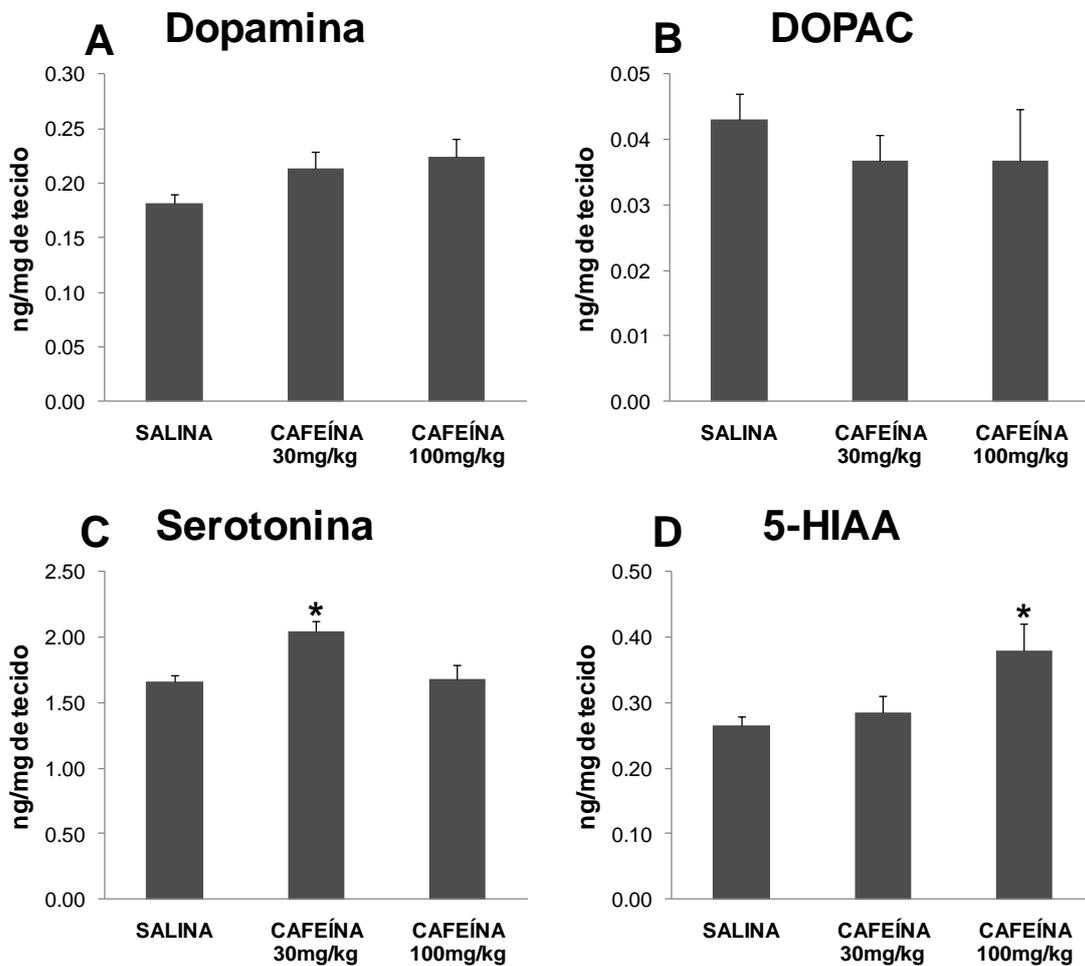


Figura 6 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), serotonina (C) e 5-HIAA (D) no córtex pré-frontal medial de **ratos adultos**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg ($n=6-7$ animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.3 Alterações no Caudado Putamen em ratos adolescentes

A figura 7 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPu de animais adolescentes.

Para as concentrações de dopamina e DOPAC, a ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,16)} = 6,29$; $p < 0,01$ e $F_{(2,17)} = 3,97$; $p < 0,05$, respectivamente]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg aumentou a concentração de dopamina, enquanto a dose de 100 mg/kg causou diminuição da concentração tecidual de DOPAC nos adolescentes comparado com os seus respectivos grupos salina ($p < 0,05$) (Figura 7A e B).

Contudo para a concentração de HVA, serotonina e 5-HIAA a ANOVA não revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,17)} = 0,81$; $p = 0,46$; $F_{(2,17)} = 3,30$; $p = 0,06$ e $F_{(2,17)} = 0,90$; $p = 0,42$, respectivamente] (Figura 7C, D e E).

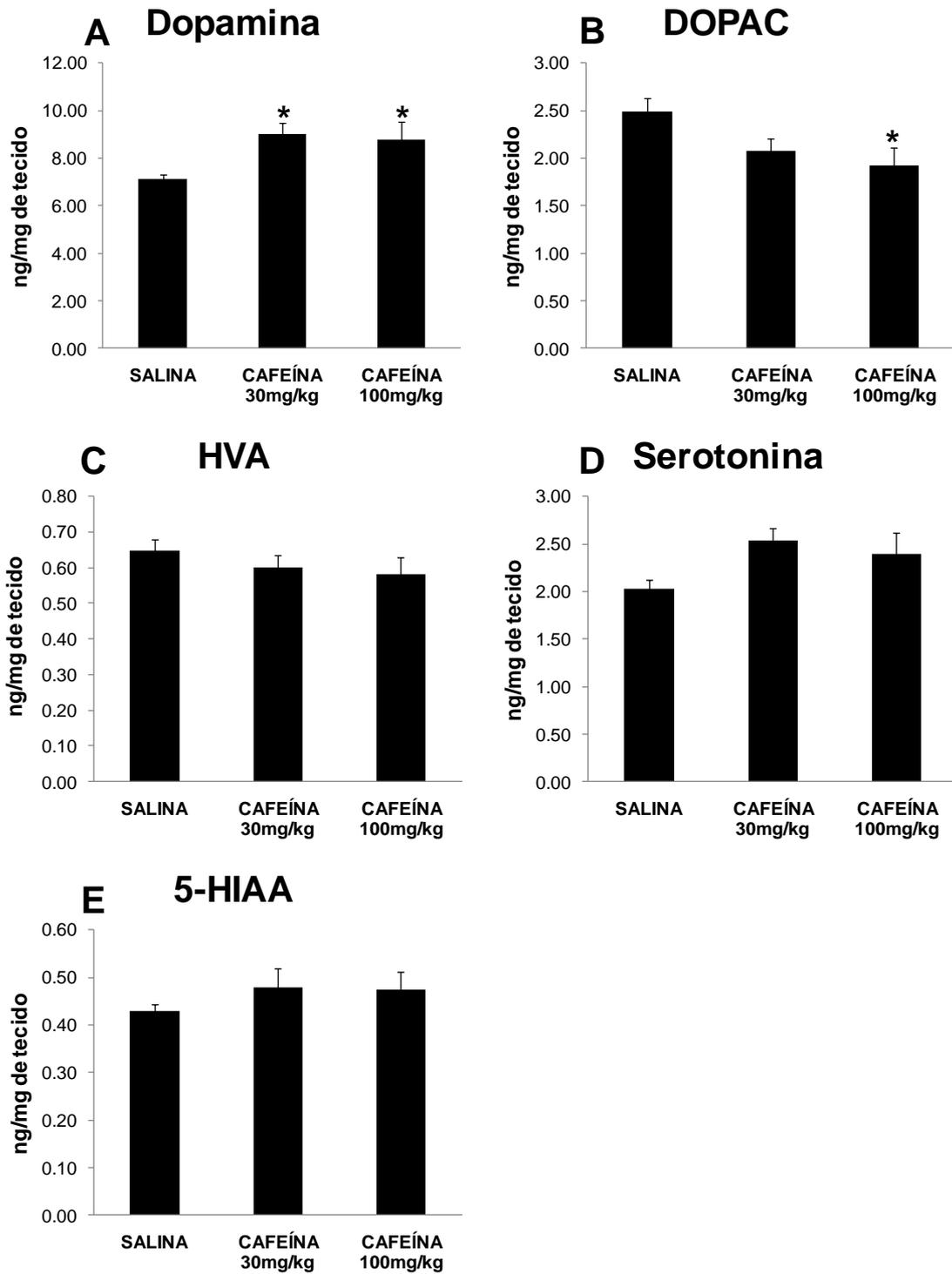


Figura 7 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), HVA (C), serotonina (D) e 5-HIAA (E) no caudado putamen de **ratos adolescentes**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (teste Newmam-Keuls).

6.2.4 Alterações no Caudado Putamen em ratos adultos

A figura 8 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no CPu de animais adultos.

A ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre os grupos na concentração de DOPAC [$F_{(2,17)} = 14,4$; $p < 0,01$]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg diminuiu a concentração tecidual de DOPAC nos adultos comparado com o grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 8B).

Contudo para a concentração de dopamina, HVA, serotonina e 5-HIAA a ANOVA não revelou diferença significativa [$F_{(2,17)} = 0,52$; $p = 0,61$; $F_{(2,17)} = 1,09$; $p = 0,36$; $F_{(2,17)} = 1,84$; $p = 0,19$ e $F_{(2,17)} = 0,77$; $p = 0,48$, respectivamente] (Figura 8A, C, D e E).

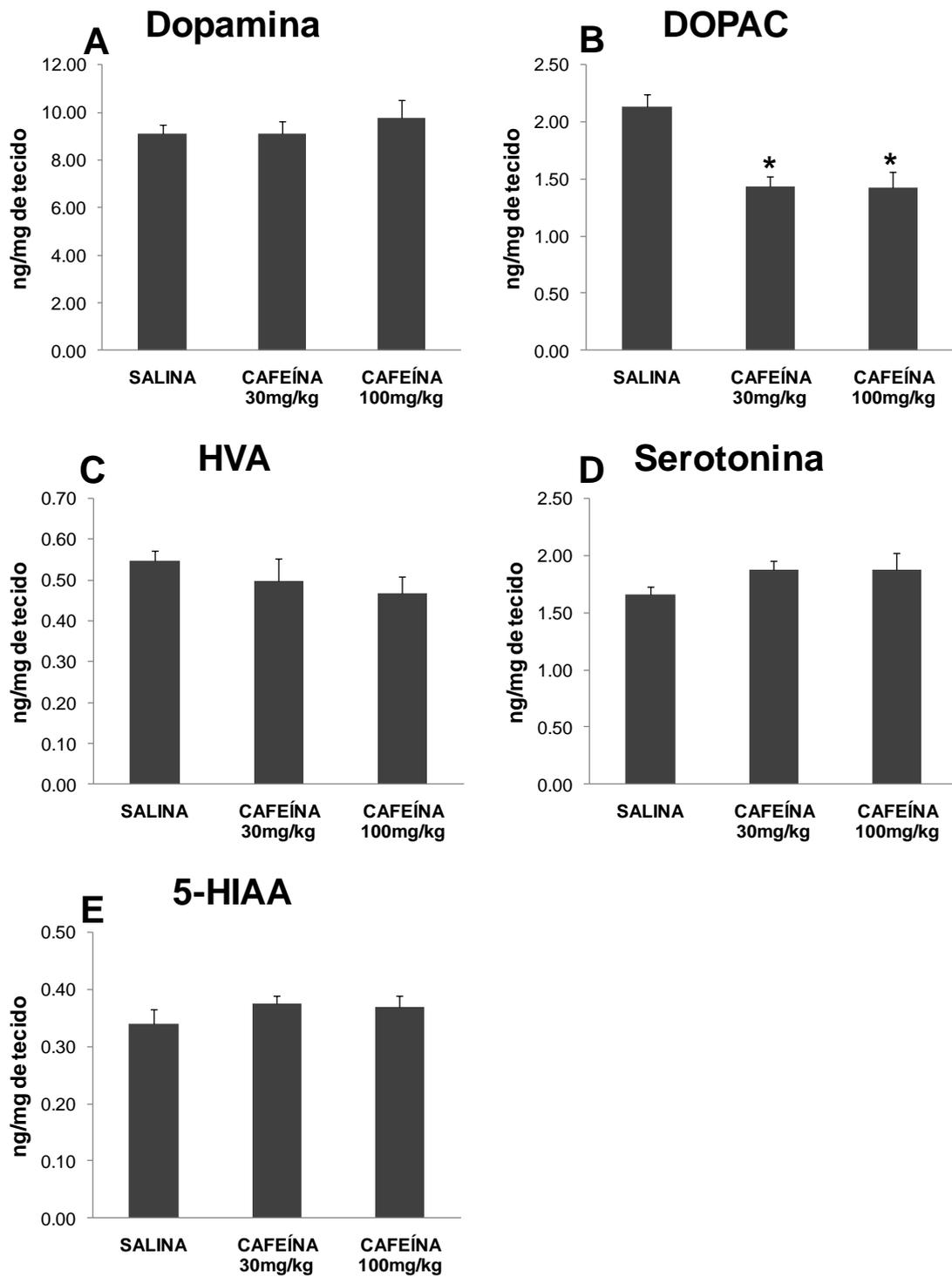


Figura 8 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), HVA (C), serotonina (D) e 5-HIAA (E) no caudado putamen de **ratos adultos**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.5 Alterações no Núcleo Acumbens em ratos adolescentes

A figura 9 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no NAc de animais adolescentes.

A ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre grupos na concentração de dopamina [$F_{(2,17)} = 4,25$; $p < 0,05$]. O teste Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 30 mg/kg aumentou a concentração tecidual de dopamina nos animais adolescentes comparado ao grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 9A).

Contudo para a concentração de DOPAC, HVA, serotonina e 5-HIAA a ANOVA não revelaram diferença significativa entre os grupos respectivamente [$F_{(2,17)} = 3,59$; $p = 0,05$, $F_{(2,17)} = 0,19$; $p = 0,83$; $F_{(2,17)} = 3,49$; $p = 0,05$ e $F_{(2,17)} = 1,31$; $p = 0,29$] (Figura 9 B, C, D e E).

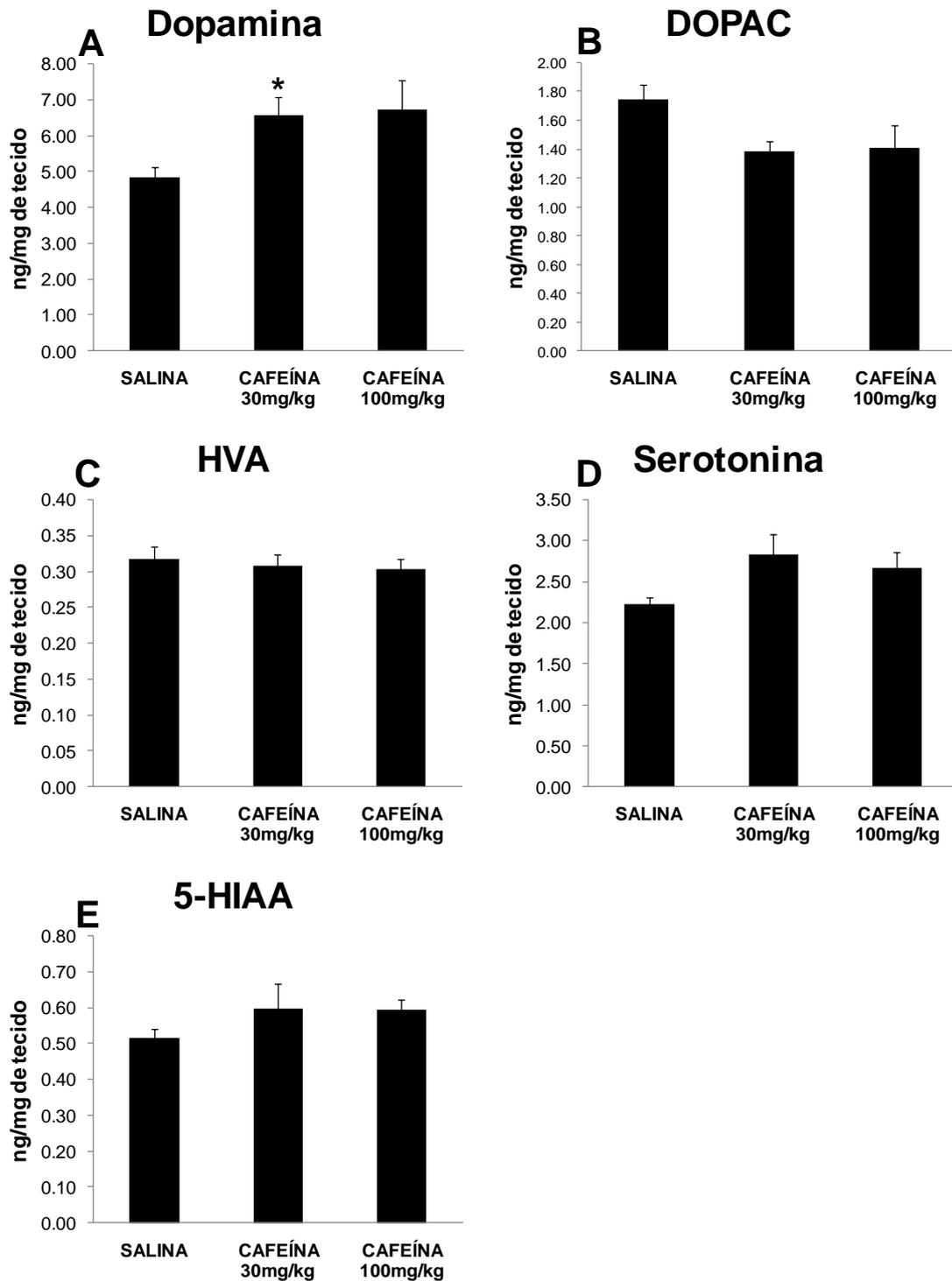


Figura 9 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), HVA (C), serotonina (D) e 5-HIAA (E) no núcleo acumbens de **ratos adolescentes**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.6 Alterações no Núcleo Acumbens em ratos adultos

A figura 10 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos no NAc de animais adultos.

A ANOVA monofatorial revelou, para as concentrações de dopamina e DOPAC, diferenças significativas entre grupos [$F_{(2,17)} = 8,91$; $p < 0,01$ e $F_{(2,17)} = 5,66$; $p < 0,05$, respectivamente]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 100 mg/kg aumentou a concentração de dopamina, enquanto as doses de 30 e 100 mg/kg diminuiu a concentração tecidual de DOPAC nos animais adultos comparado com os seus respectivos grupos salina ($p < 0,05$) (Figura 10A e B).

Contudo para a concentração de HVA, serotonina e 5-HIAA a ANOVA não revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,17)} = 0,44$; $p = 0,65$; $F_{(2,17)} = 3,15$; $p = 0,07$ e $F_{(2,17)} = 0,78$; $p = 0,47$, respectivamente] (Figura 10C, D e E).

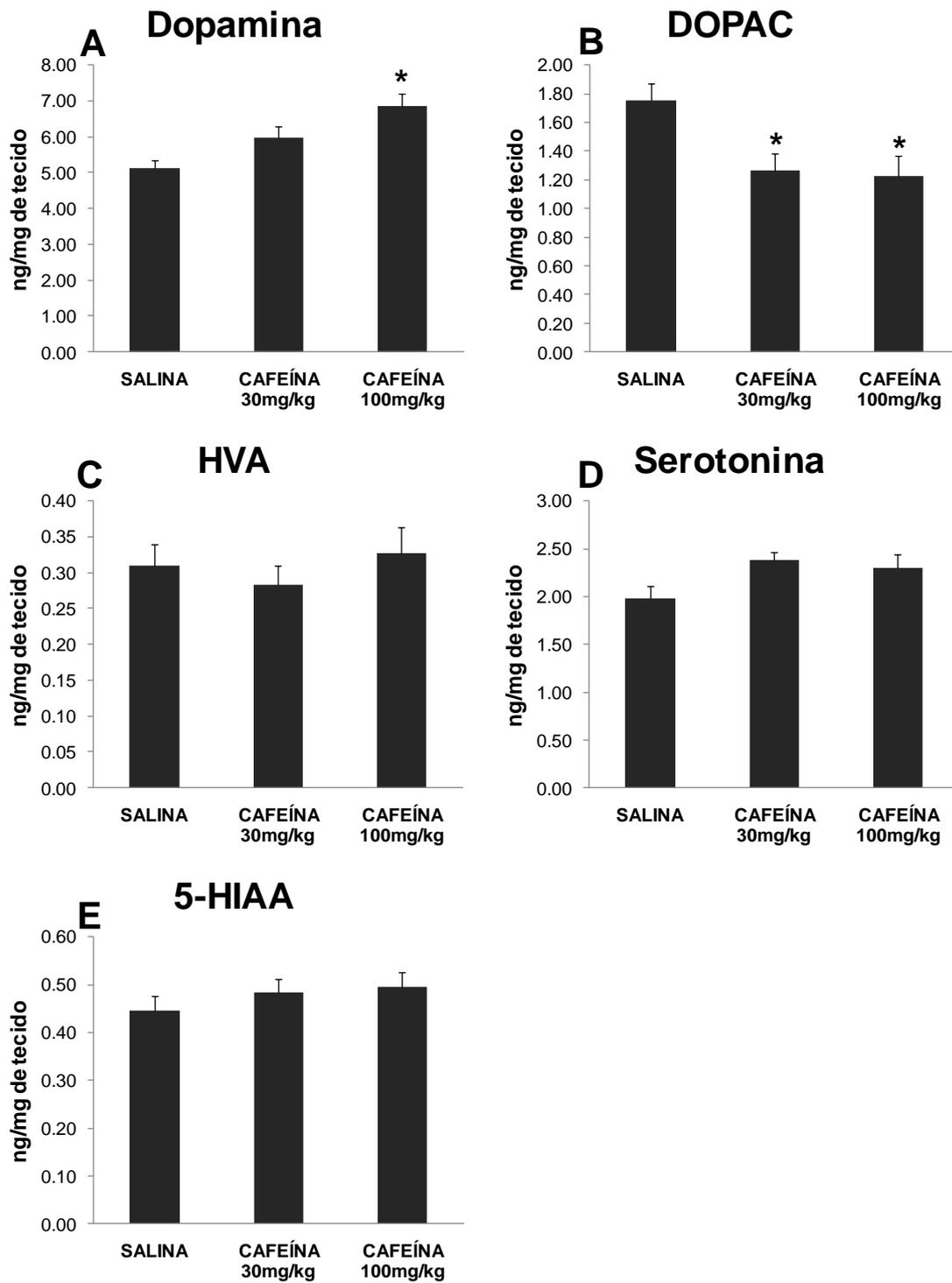


Figura 10 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), DOPAC (B), HVA (C), serotonina (D) e 5-HIAA (E) no núcleo acumbens de **ratos adultos**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.7 Alterações na Área Tegmental Ventral em ratos adolescentes

A figura 11 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos na ATV de animais adolescentes.

A ANOVA monofatorial revelou diferença significativa entre os grupos nas concentrações de dopamina e serotonina [$F_{(2,16)} = 4,19$; $p < 0,05$ e $F_{(2,16)} = 10,21$; $p < 0,01$, respectivamente]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína na dose de 100 mg/kg aumentou a concentração de dopamina, enquanto ambas as doses, 30 e 100 mg/kg, aumentaram a concentração de serotonina no tecido nos animais adolescentes comparado com os seus respectivos grupos salina ($p < 0,05$) (Figura 11A e B).

Não foi possível a determinação da concentração de DOPAC e HVA, pois suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação da técnica empregada. Contudo para a concentração de 5-HIAA a ANOVA monofatorial não revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,17)} = 3,08$; $p = 0,07$] (Figura 11C).

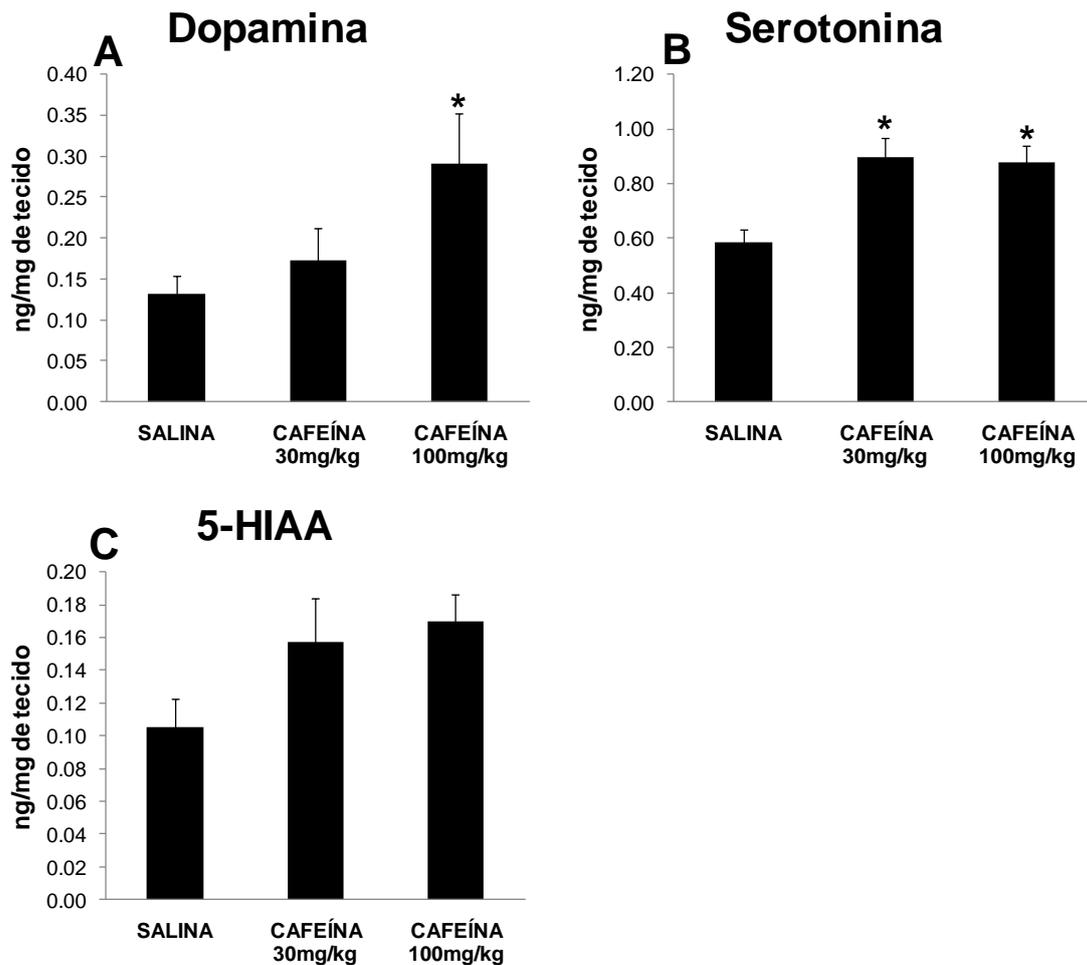


Figura 11 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), serotonina (B) e 5-HIAA (C) na área tegmental ventral de **ratos adolescentes**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

6.2.8 Alterações na Área Tegmental Ventral em ratos adultos

A figura 12 mostra os resultados do efeito da administração aguda de cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos na ATV de animais adultos.

A ANOVA monofatorial revelou diferenças significativas entre os grupos na concentração de serotonina [$F_{(2,16)} = 9,42$; $p < 0,01$]. O teste post-hoc Newman-Keuls demonstrou que a cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg aumentou a concentração tecidual de serotonina nos animais adultos comparado com o grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 12B).

Não foi possível a determinação da concentração de DOPAC e HVA, pois suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação da técnica

empregada. Contudo para as concentrações de dopamina e 5-HIAA a ANOVA monofatorial não revelou diferença significativa entre os grupos [$F_{(2,16)} = 2,34$; $p = 0,13$ e $F_{(2,17)} = 1,91$; $p = 0,18$, respectivamente] (Figura 12A e C).

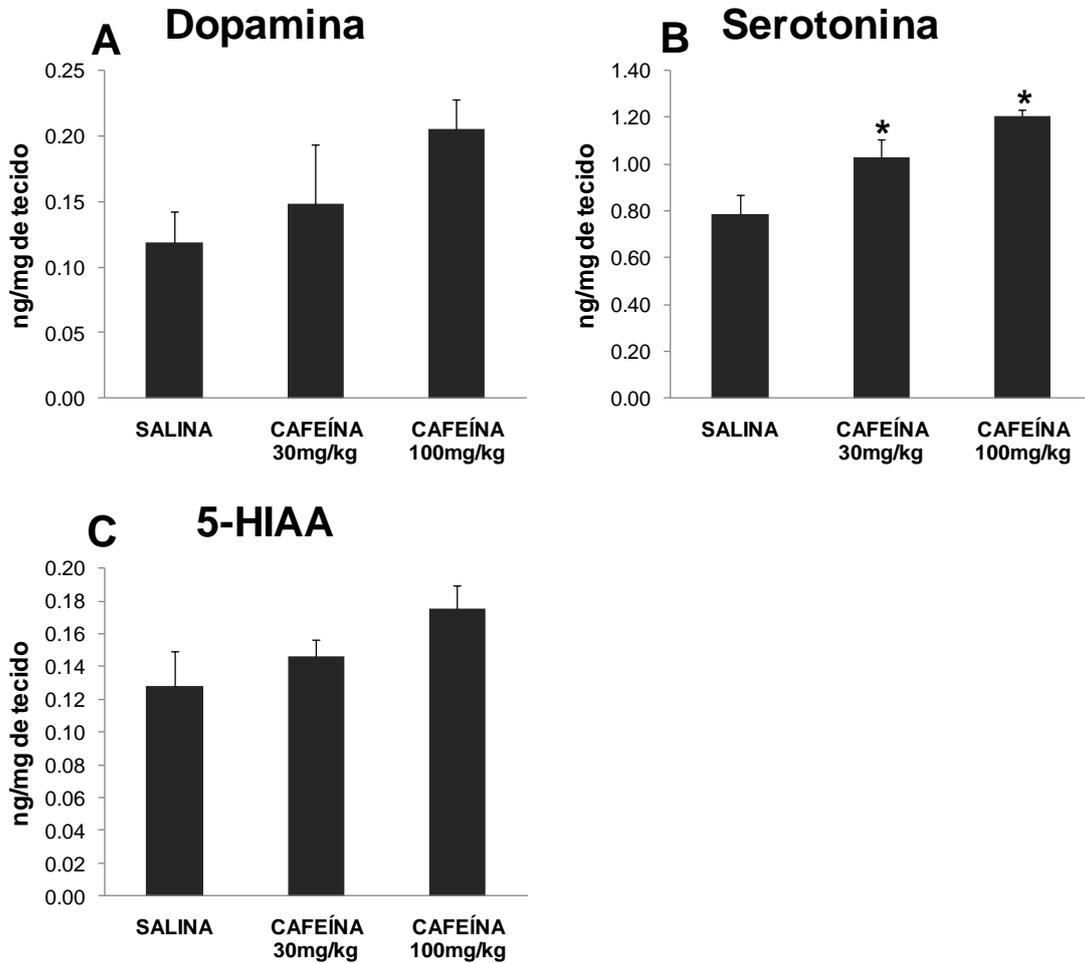


Figura 12 - Efeito da cafeína nas concentrações de dopamina (A), serotonina (B) e 5-HIAA (C) na área tegmental ventral de **ratos adultos**. As barras representam a média + EPM da concentração das substâncias em ng/mg de tecido nos grupos salina, cafeína 30 ou 100 mg/kg (n=6-7 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (teste Newman-Keuls).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Investigamos o efeito psicomotor da cafeína em ratos adolescentes e adultos. Nossos resultados mostraram que doses de 10 e 30 mg/kg de cafeína induziram estimulação da atividade locomotora em animais adolescentes e adultos. Contudo, nas doses mais elevadas de 60 e 120 mg/kg de cafeína, ocorreu estimulação locomotora apenas nos animais adolescentes.

Nossos resultados, em animais adultos, corroboram as observações da literatura que demonstram que doses baixas e moderadas de cafeína (entre 10 e 30 mg/kg) induzem aumento da atividade locomotora, enquanto doses mais elevadas (100 mg/kg) não alteram ou diminuem a atividade locomotora (GARRETT; HOLTZMAN, 1995; EL YACOUBI et al. 2000b; KARCZ-KUBICHA et al., 2003; HALLDNER et al., 2004).

No presente estudo ratos adolescentes e adultos, apresentaram curva dose-efeito em forma de U invertido. O efeito estimulante da cafeína foi significativo a partir da dose de 10 mg/kg e o pico ocorreu após a administração de 30 mg/kg. A diferença entre os animais adolescentes e adultos envolve as maiores doses de cafeína (60 e 120 mg/kg), essas doses causaram estimulação em ratos adolescentes mas não causaram estimulação significativa nos ratos adultos. Evidenciando assim, diferenças no efeito da cafeína entre os animais adolescentes e adultos, nas maiores doses dessa substância.

Esse efeito bifásico sobre a atividade locomotora também é observado em estudos com outros psicostimulantes, como anfetamina e cocaína. Essas substâncias também apresentam uma curva dose-efeito em forma de U invertido com a locomoção sendo substituída por comportamentos estereotipados em doses elevadas dessas substâncias (USHIJIMA; CARINO; HORITA, 1995; NORDQUIST et al., 2008). Contudo, diferente da resposta à anfetamina e cocaína, a administração de altas doses de cafeína não causa comportamentos estereotipados (ANTONIOU et al., 1998).

Porém, estudos demonstraram que a cafeína, administrada a roedores, pode gerar outras alterações comportamentais sem ser a estereotipia e que podem afetar a locomoção desses animais. Esses estudos observaram que a administração de doses de cafeína de 25 a 100 mg/kg, em ratos ou camundongos, induz

comportamentos relacionados à ansiedade em testes, como o labirinto em cruz elevado e caixa de claro/escuro (JAIN et al., 1995; BHATTACHARYA; SATYAN; CHAKRABARTI, 1997; EL YACOUBI et al., 2000b). Também, as doses de cafeína de 30 a 120 mg/kg estão relacionadas com o prejuízo da coordenação motora em camundongos no teste “holeboard” (MEYER; CASTON, 2005). Portanto, o aumento da ansiedade ou a falta de coordenação motora podem ser responsáveis pela diminuição da atividade observada após doses elevadas de cafeína em ratos adultos.

Em humanos os efeitos da cafeína também são dose-dependentes. Assim, baixas doses de cafeína produziram efeitos subjetivos mais favoráveis do que altas doses dessa substância, nas quais efeitos desagradáveis foram relatados (KAPLAN et al., 1997; FREDHOLM et al., 1999).

Foi observado, em nossos resultados, que em ratos adolescentes a cafeína causa estimulação em uma maior faixa de doses, que incluem doses que são consideradas elevadas para roedores. Contudo essas doses elevadas não causam estimulação locomotora em ratos adultos, demonstrando diferenças de sensibilidade às ações da cafeína ao longo do desenvolvimento.

Embora a literatura contrastando o efeito psicomotor da cafeína na ontogênese seja escassa, essa diferença está amplamente demonstrada para outras substâncias, como por exemplo, cocaína e anfetamina. Muitos estudos demonstraram que a cocaína afeta a atividade locomotora em animais adolescentes e adultos, de modo dose-dependente. A cocaína na dose de 10 mg/kg resulta em maior atividade locomotora em ratos no começo da adolescência quando comparados com os adultos (CASTER; WALKER; KUHN, 2005; CASTER; KUHN, 2009). Além disso, segundo Adriani; Laviola (2000) em animais adolescentes a anfetamina causa menor ativação da atividade locomotora quando comparados com animais adultos.

Nossas observações indicam a importância do aprofundamento dos estudos ontogênicos envolvendo os efeitos da cafeína. De fato, a segurança do uso da cafeína em crianças e adolescentes é pouco compreendida, entretanto muitas bebidas que contêm cafeína são comercializados diretamente para as crianças (BRAMSTEDT, 2007). Além disso, a população de adolescentes e crianças

apresenta o crescimento mais rápido do uso da cafeína (HARNACK; STANG; STORY, 1999).

As diferenças entre adultos e adolescentes na resposta comportamental à cafeína podem estar relacionadas à ontogênese dos circuitos neurais (CREWS; HE; HODGE, 2007; CASEY; JONES; HARE, 2008; STEVENS et al., 2009). As vias encefálicas relacionadas aos efeitos de recompensa e motores dos psicostimulantes sofrem alterações durante a adolescência, podendo resultar em diferenças na neurotransmissão entre animais adolescentes e adultos. Isso pode ser uma das causas da diferença na resposta locomotora à cafeína observada em nossos resultados.

Sabe-se que o efeito psicomotor da cafeína está relacionado com o bloqueio de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} , estudos baseados em agentes farmacológicos seletivos e marcação genética, indicaram claramente que o bloqueio do receptor A_{2A} , ao invés do A_1 , está relacionado com a propriedade estimulante da cafeína, e a ação das altas doses de cafeína, que são ineficazes ou induzem depressão locomotora, estão, provavelmente, relacionadas ao bloqueio do receptor de adenosina A_1 (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004). Baseado em nossos resultados, que demonstraram que altas doses de cafeína induziram menor atividade motora em ratos adultos do que em adolescentes, podemos supor que a ação da cafeína no receptor de adenosina A_1 aumenta da adolescência para a vida adulta, podendo, deste modo refletir sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica destes animais.

Assim, com base nos nossos resultados da atividade locomotora e dados da literatura investigamos o efeito da cafeína nas doses de 30 e 100 mg/kg, sobre a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, no NAc, no CPu, no CPFm e na ATV em animais adolescentes e adultos.

Escolhemos essas regiões, pois segundo Cortez et al. (2010) o NAc e o CPu são estruturas encefálicas responsáveis pela mediação da atividade locomotora. As áreas corticais estão relacionadas à execução de ações motoras (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004), e também a ATV, pois é o local onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos e suas projeções axonais para o NAc e CPF (HYMAN; MALENKA; NESTLER, 2006).

A análise e expressão dos resultados, quando se utilizam as concentrações teciduais de monoaminas e seus metabólitos, são bastante variados na literatura. Assim, alguns autores analisam isoladamente a concentração de dopamina, serotonina e seus metabólitos (OLAZÁBAL et al., 2004; SCHOLL et al., 2009). Enquanto outros autores calculam a razão entre os metabólitos e o neurotransmissor (“*turnover*”) (PAWLAK et al., 2000; FESTA et al., 2004). Alterações dos níveis teciduais destas moléculas são interpretadas como alterações na atividade destes sistemas de monoaminas, integrando a síntese, liberação, recaptção e/ou metabolismo (CLAUSTRE et al., 1986; BAILEY et al., 2000; DALLA, et al., 2008).

No presente estudo optou-se por analisar os resultados da concentração dos neurotransmissores e metabólitos isoladamente. Esta opção baseou-se na ausência de concentrações detectáveis de alguns metabólitos em algumas áreas do encéfalo pela técnica de CLAE empregada, o que inviabilizou o cálculo do “*turnover*”.

Em nossos resultados, podemos observar que a cafeína afetou o sistema dopaminérgico em animais adolescentes e adultos dependendo da região.

Na região do CPu, observamos que em animais adolescentes a administração de cafeína em ambas as doses aumentou a concentração tecidual de dopamina, enquanto apenas a dose de 100 mg/kg causou redução no DOPAC. Já em animais adultos, nossos resultados demonstraram que a cafeína, em ambas as doses, causou redução de DOPAC, sem alterar as concentrações de dopamina. No NAc, observamos que a cafeína, na dose de 30 mg/kg, aumentou a concentração de dopamina em animais adolescentes, enquanto em adultos, esse aumento ocorreu na dose mais elevada dessa substância, e diferente dos adolescentes, a cafeína causou redução do DOPAC. Na ATV, nossos resultados demonstraram que, a cafeína, na dose de 100 mg/kg, causou apenas o aumento na concentração tecidual de dopamina em animais adolescentes.

Assim, de modo geral, nossos resultados sugerem que ratos adolescentes são mais sensíveis as alterações da concentração tecidual de dopamina induzidas pela cafeína que os ratos adultos, pois foi nestes animais que ocorreram as principais alterações deste neurotransmissor no CPu, no NAc e ATV. Este aumento da concentração tecidual de dopamina nestas áreas do encéfalo pode

ser devido à maior síntese de dopamina, ou, devido à diminuição do metabolismo da mesma, uma vez que a concentração do metabólito DOPAC foi diminuída.

A literatura é escassa em estudos sobre as alterações causadas pela cafeína sobre o sistema dopaminérgico em animais adolescentes, a maior parte dos estudos foi realizado em animais adultos. O aumento da concentração de dopamina no tecido em resposta à injeção aguda de cafeína observado em nossos resultados é semelhante ao observado por Hadfield; Milio (1989). Esses autores demonstraram aumento da concentração tecidual desse neurotransmissor no corpo estriado de camundongos adultos após injeção de 100 mg/kg cafeína. Alterações similares na neurotransmissão dopaminérgica foram encontradas após o tratamento crônico com cafeína. Assim, Kirch et al (1990) demonstraram que administração de cafeína (50 mg/kg/dia) por 30 dias elevou a concentração de dopamina e diminuiu a de DOPAC no estriado de ratos adultos.

Entretanto, estudos de microdiálise utilizando ratos adultos produziram resultados contraditórios. Alguns estudos relataram que a cafeína em doses de 30 mg/kg (i.p.) aumentou a concentração extracelular de dopamina no NAc e a dose de 100mg/kg (i.p.) não alterou a concentração desse neurotransmissor (QUARTA et al., 2004; SOLINAS et al., 2002). Enquanto que, em outros estudos a dose de 30mg/kg (i.p.), não causou alteração das concentrações de dopamina no NAc e foi observado aumento das concentrações no CPFm de ratos adultos (ACQUAS; TANDA; DI CHIARA, 2002; DE LUCA et al., 2007).

É importante considerar que a interpretação de resultados de análise tecidual e microdiálise pode produzir conclusões diferentes devido à técnica. Isso, devido ao fato de que o neurotransmissor quantificado a partir da microdiálise encontra-se principalmente no compartimento extracelular, enquanto o nosso método de coleta leva para quantificação o neurotransmissor em ambos os compartimentos intra e extracelular.

Em relação ao sistema serotoninérgico observamos que este também foi afetado pela cafeína em animais adolescentes e adultos dependendo da região.

No CPFm a injeção aguda de cafeína na dose de 30 mg/kg resultou no aumento da concentração tecidual de serotonina em ratos adultos, enquanto a dose de 100 mg/kg aumentou a concentração de 5-HIAA em ambos, os adultos e adolescentes. Demonstramos também aumento da concentração tecidual de

serotonina na ATV, com ambas as doses de cafeína tanto em animais adultos quanto adolescentes.

Assim, de modo geral, nossos resultados indicam que o sistema serotoninérgico também foi afetado pela cafeína, mas diferente do sistema dopaminérgico, neste foram os ratos adultos que apresentaram maior sensibilidade às alterações da concentração tecidual de serotonina induzidas pela cafeína. O aumento da concentração tecidual de serotonina na ATV pode ser devido à maior síntese nessa região. No CPFm o aumento de serotonina observado na dose de 30 mg/kg sugere aumento de síntese, e o aumento do seu metabólito, que foi observado na dose de 100 mg/kg, sugere aumento de metabolização da serotonina.

Na análise tecidual modificações agudas nas concentrações de metabólitos facilitam a interpretação, por que, provavelmente elas refletem mudanças na liberação e metabolização de seus neurotransmissores.

Na literatura, poucos estudos investigaram os efeitos da cafeína na neurotransmissão serotoninérgica nestas regiões. Hadfield; Milio (1989) mostraram que agudamente a cafeína na dose de 100 mg/kg não alterou a concentração de serotonina no córtex pré-frontal, corroborando com nossos resultados, contudo, estes autores não investigaram os efeitos da cafeína em doses menores.

Estudos com outros psicostimulantes tiveram resultados semelhantes ao nosso com cafeína. Por exemplo, demonstrou-se que a administração aguda de metanfetamina em roedores aumentou a liberação de serotonina no CPF e a de anfetamina aumentou a liberação de serotonina na ATV (JONES; KAUER, 1999; AGO et al, 2006).

Dados da literatura correlacionam o efeito motor dos psicostimulante com o aumento da liberação de dopamina no estriado, especialmente em sua porção medial (FERRÉ, 2008). A interação entre atividade locomotora e alterações na neurotransmissão no sistema nervoso central foi observada em um estudo de microdiálise com a cocaína. Este estudo demonstrou, em ratos adultos, que na dose de 10 e 20 mg/kg a cocaína produziu aumento significativo da atividade locomotora e simultaneamente aumentou as concentrações extracelulares de dopamina no NAc nesses animais, quando comparados aos ratos controle (PANOS; BAKER, 2010).

Contudo a literatura é escassa em estudos relacionando as alterações causadas por diferentes doses de cafeína sobre a locomoção e o seu efeito sobre a neurotransmissão dopaminérgica.

Nossos resultados, demonstram que a cafeína, promoveu aumento da concentração tecidual de dopamina, nas regiões do NAc , ATV e CPu em ratos adolescentes. Essas regiões estão relacionadas à estimulação da atividade locomotora. Assim esse aumento de dopamina pode estar relacionado com o aumento na atividade locomotora, nas doses baixas e altas de cafeína, nos animais adolescentes. Contudo, nos animais adultos o aumento de dopamina no NAc não se relaciona às alterações comportamentais.

Sabe-se que o sistema serotoninérgico também pode afetar a atividade locomotora em animais. Um estudo com anfetamina observou que a transmissão serotoninérgica tem papel fundamental no aumento da atividade locomotora induzido por esta substância, pois, o pré-tratamento com antagonistas do receptor de serotonina, bloqueou o aumento da atividade locomotora induzida pela anfetamina (AUCLAIR et al., 2004).

Os estudos observando se a cafeína altera a concentração de serotonina na região mesolímbica e se isso afeta a locomoção em roedores são escassos. Em nosso estudo, observamos que a maior dose causou aumento da concentração tecidual de 5-HIAA na região do CPFm de ratos adultos, sugerindo que a serotonina foi liberada e metabolizada. Esse resultado sugere que o aumento da transmissão serotoninérgica em animais adultos induzido pela cafeína poderia mediar a ausência de estimulação observada em doses elevadas dessa substância. Entretanto, nos animais adolescentes observamos as mesmas alterações com aumento da atividade locomotora. Assim, podemos supor que este fato está relacionado a diferenças entre adultos e adolescentes ou limitações da metodologia utilizada.

Embora a determinação das concentrações teciduais de neurotransmissores e metabólitos seja amplamente utilizada na literatura (HADFIELD; MILIO, 1989; FESTA et al., 2004; OLAZÁBAL et al., 2004; DALLA, et al., 2008; SCHOLL et al., 2009; HSU; WANG; CHIU, 2010) a análise dos resultados são complexas uma vez que ela engloba as concentrações intra e extracelulares, isso afeta principalmente a interpretação referente ao neurotransmissor. A análise de

“turnover” poderia facilitar a discussão, entretanto não foi possível no presente estudo, pois, nossos resultados apresentaram ausência de níveis detectáveis de alguns metabólitos em algumas áreas do encéfalo, o que inviabilizou o cálculo do “turnover”. Outra alternativa seria a utilização da microdiálise, porém, não foi possível, pois esta técnica não é padronizada em nosso laboratório.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, ambos os ratos adolescentes e adultos demonstraram que a cafeína causou curva dose-efeito em forma de U invertido sobre a locomoção, apresentando aumento da atividade locomotora em doses baixas em ambas as idades. Contudo, animais adolescentes e adultos apresentaram diferenças na atividade locomotora em resposta às doses altas de cafeína, nas quais ratos adolescentes ainda são estimulados, enquanto os ratos adultos não apresentam esta estimulação.

Animais adolescentes passam por maturação do sistema dopaminérgico e serotoninérgico, o que lhes confere diferente sensibilidade a psicostimulantes, se comparados a animais adultos. A principal diferença observada neste estudo foi à maior sensibilidade nas alterações das concentrações teciduais de dopamina, e seus metabólitos induzidas pela cafeína durante a adolescência quando comparado com a vida adulta, enquanto os animais adultos apresentam maior sensibilidade às alterações das concentrações teciduais de serotonina, e seu metabólito induzidas pela cafeína do que os adolescentes.

As diferentes alterações dopaminérgicas e serotoninérgicas à cafeína em animais adolescentes e adultos podem estar relacionadas às diferenças do efeito psicomotor da cafeína entre esses grupos de animais. Embora o consumo de cafeína seja elevado em crianças e adolescentes, a maioria dos estudos que abordam os efeitos da cafeína é realizada em animais adultos. Os resultados deste estudo destacam que o período da adolescência deve ser levado em consideração ao se investigar os efeitos da cafeína, pois essa idade confere grandes diferenças na sensibilidade do sistema dopaminérgico e serotoninérgico e na atividade locomotora em resposta a esta substância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUA, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. **Neuropsychopharmacology**, v.27, p.182-193, 2002.
- ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**, v.39, p.334-346, 2000.
- AGO, Y. et al. Attenuation by the 5-HT_{1A} receptor agonist osetozotan of the behavioral effects of single and repeated methamphetamine in mice. **Neuropharmacology**, v.51, p.914-922, 2006.
- ANTONIOU, K. et al. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.23, p.189-196, 1998.
- APGAR, J.L.; TARKA, S.M.J. Methylxanthine Composition and Consumption Patterns of Cocoa and Chocolate Products. In: SPILLER, G.A. **Caffeine**. 1th ed. Florida:CRC Press LLC, 1998, p.163-192.
- AUCLAIR, A. et al. 5-HT_{2A} and α 1b-adrenergic receptors entirely mediate dopamine release, locomotor response and behavioral sensitization to opiates and psychostimulants. **Eur. J. Neurosci.**, v.20, p.3073-3084, 2004.
- BADANICH, K.A.; ALDER, K.J.; KIRSTEIN, C.L. Adolescents differ from adults in cocaine conditioned place preference and cocaine-induced dopamine in the nucleus accumbens septi. **Eur. J. Pharmacol.**, v.550, p.95-106, 2006.
- BAILEY, C.P. et al. Prolonged changes in neurochemistry of dopamine neurones after chronic ethanol consumption. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.66, p.153-161, 2000.
- BALENTINE, D.A.; HARBOWY, M.E.; GRAHAM, H.N. Tea: The plant and its manufacture; chemistry and consumption of the beverage. In: SPILLER, G.A. **Caffeine**. 1th ed. Florida:CRC Press LLC, 1998, p. 35-72.
- BARONE, J.J.; ROBERTS, H.R. Caffeine consumption. **Fd. Chem. Toxic.**, v.34, p.119-129, 1996.
- BERNSTEIN, G.A. et al. Caffeine effects on learning, performance, and anxiety in normal school-age children. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry**, v.33, p.407-415, 1994.
- BHATTACHARYA, S.K.; SATYAN, K.S.; CHAKRABARTI, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. **J. Psychopharmacol.**, v.11, p.219-224, 1997.

BOLANOS, C.A.; GLATT, S.J.; JACKSON, D. Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. **Dev. Brain Res.**, v.111, p.25-33, 1998.

BRAMSTEDT, K.A. Caffeine use by children: the quest for enhancement. **Subst. Use. Misuse.**, v.42, p.1237-1251, 2007.

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

BROWN, R.M.; SHORT, J.L. Adenosine A_{2A} receptors and their role in drug addiction. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.60, p.1409-1430, 2008.

BURKE, L.M. Caffeine and sports performance. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v.33, p.1319-1334, 2008.

CANNAZZA, G. et al. Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-DOPA prodrugs by mean of HPLC-EC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.36, p.1079-1084, 2005.

CASEY, B.J.; JONES, R.M.; HARE, T.A. The adolescent brain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1124, p.111-126, 2008.

CASTER, J.M.; KUHN, C.M. Maturation of coordinated immediate early gene expression by cocaine during adolescence. **Neuroscience**, v.160, p.13-31, 2009.

CASTER, J.M.; WALKER, Q.D.; KUHN, C.M. Enhanced behavioral response to repeated dose cocaine in adolescent rats. **Psychopharmacology**, v.183, p.218–225, 2005.

CLAUSTRE, Y. et al. Pharmacological studies on stress-induced increase in frontal cortical dopamine metabolism in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.238, p.693-700, 1986.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. **The biochemical basis on neuropharmacology**. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2003. p.416.

CORTEZ, A.M. et al. Age-dependent effects of κ -opioid receptor stimulation on cocaine-induced stereotyped behaviors and dopamine overflow in the caudate-putamen: an *in vivo* microdialysis study. **Neuroscience**, v.169, p.203-213, 2010.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.86, p.189-199, 2007.

DALLA, C. et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiol. Behav.**, v. 93, p.595-605, 2008.

DALY, J.W.; FREDHOLM, B.B. Caffeine - an atypical drug of dependence. **Drug Alcohol Depend.**, v.51, p.199-206, 1998.

DEL ARCO, A.; MORA, F. Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. **J. Neural. Transm.**, v.116, p.941-952, 2009.

DE LUCA, M.A. et al. Caffeine and accumbens shell dopamine. **J. Neurochem.**, v.103, p.157-163, 2007.

ELSWORTH, J.D.; ROTH, R.H. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of parkinson's disease. **Exp. Neurol.**, v.144, p.4-9, 1997.

EL YACOUBI, M. et al. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v.148, p.153-163, 2000a.

EL YACOUBI, M. et al. The stimulant effects of caffeine on locomotor behavior in mice are mediated through its blockade of adenosine A_{2A} receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v.129, p.1465-1473, 2000b.

FERRÉ, S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. **J. Neurochem.**, v.105, p.1067-1079, 2008.

FESTA, E.D. et al. Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels. **Neuropharmacology**, v.46, p.672-687, 2004.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.61, p.857-872, 2004.

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.**, v.105, p.110-113, 2005.

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

FREDHOLM, B.B. et al. Adenosine and brain function. **Int. Rev. Neurobiol.**, v.63, p.191-270, 2005.

GARRETT, B.E.; HOLTZMAN, S.G. Does adenosine receptor blockade mediate caffeine-induced rotational behavior? **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.274, p.207-214, 1995.

GRAHAM, H.N. Maté. In: SPILLER, G.A. **Caffeine**. 1th ed. Florida: CRC Press LLC, 1998, p.193-197.

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

HALLDNER, L. et al. The adenosine A₁ receptor contributes to the stimulatory, but not the inhibitory effect of caffeine on locomotion: a study in mice lacking adenosine A₁ and/or A_{2A} receptors. **Neuropharmacology**, v.46, p.1008-1017, 2004.

HAN, M.E. et al. Regulation of cerebrospinal fluid production by caffeine consumption. **Neuroscience**, v.10, p.1-12, 2009.

HARNACK, L.; STANG, J.; STORY, M. Soft drink consumption among US children and adolescents: nutritional consequences. **J. Am. Diet. Assoc.**, v.99, p.436-441, 1999.

HERVÉ, D. et al. $G\alpha_{olf}$ levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. **J. Neurosci.**, v.21, p.4390-4399, 2001.

HSU, C.W.; WANG, C.S.; CHIU, T.H. Caffeine and a selective adenosine A_{2A} receptor antagonist induce sensitization and cross-sensitization behavior associated with increased striatal dopamine in mice. **J. Biomed. Sci.**, v.17, p.1-10, 2010.

HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C.; NESTLER, E.J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.29, p.565-598, 2006.

IZENWASSER, S.; FRENCH, D. Tolerance and sensitization to the locomotor-activating effects of cocaine are mediated via independent mechanisms. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.73, p.877-882, 2002.

JAIN, N. et al. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v.116, p.2127-2133, 1995.

JONES, S.; KAUER, J.A. Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. **J. Neurosci.**, v.19, p.9780-9787, 1999.

KAPLAN, G.B. et al. Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. **J. Clin. Pharmacol.**, v.37, p.693-703, 1997.

KARCZ-KUBICHA, M. et al. Involvement of adenosine A_1 and A_{2A} receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p.1281-1291, 2003.

KENDLER, K.S. et al. Genetic and environmental influences on alcohol, caffeine, cannabis, and nicotine use from early adolescence to middle adulthood. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.65, p.674-682, 2008.

KIRCH, D.G. et al. Effect of chronic caffeine administration on monoamine and monoamine metabolite concentrations in rat brain. **Neuropharmacology**, v.29, p.599-602, 1990.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. **Neuropsychopharmacology**, v.24, p.97-129, 2001.

KOOB, G.F.; LE MOAL, M. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. **Neuropsychopharmacology**, v.36, p.3113-3123, 2008.

- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In:_____. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.262-277.
- LAVIOLA, G. et al. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.275, p.345-357, 1995.
- LAVIOLA, G.; PASCUCCHI, T.; PIERETTI, S. Striatal dopamine sensitization to D-amphetamine in periadolescent but not in adult rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.68, p.115-124, 2001.
- LEDENT, C. et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. **Nature**, v.388, p.674-678, 1997.
- LUDDEN, A.B.; WOLFSON, A.R. Understanding adolescent caffeine use: connecting use patterns with expectancies, reasons, and sleep. **Health Educ. Behav.**, v.37, p.330-342, 2010.
- LUFT, A.R.; SCHWARZ, S. Dopaminergic signals in primary motor cortex. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.27, p.415-421, 2009.
- MACDONALD, R.L.; SKERRITT, J.H.; WERZ, M.A. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. **J. Physiol.**, v.370, p.75-90, 1986.
- MAHAN, L.C. et al. Cloning and expression of an A₁ adenosine receptor from rat brain. **Mol. Pharmacol.**, v.40, p.1-7, 1991.
- MATHEWS, I.Z.; WATERS, P.; MCCORMICK, C.M. Changes in hyporesponsiveness to acute amphetamine and age differences in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brain over adolescence in male and female rats. **Dev. Psychobiol.**, v.51, p.417-412, 2009.
- MEYER, L.; CASTON, J. Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57Bl6/J male mice. **Brain Res.**, v.1039, p.171-176, 2005.
- MOLL, G.H. et al. Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. **Dev. Brain Res.**, v.119, p.251-257, 2000.
- NORDQUIST, R.E. et al. Expression of amphetamine sensitization is associated with recruitment of a reactive neuronal population in the nucleus accumbens core. **Psychopharmacology**, v.198, p.113-126, 2008.
- O'BRIEN, C.P. Dependência e uso abusivo de drogas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p.465-481.
- OKADA, M. et al. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. **J. Neurochem.**, v.69, p.2581-2588, 1997.

OKADA, M. et al. Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. **J. Neurosci.**, v.11, p.1-9, 1999.

OKADA, M.; MIZUNO, K.; KANEKO, S. Adenosine A₁ and A₂ receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. **Neurosci. Lett.**, v.212, p.53-56, 1996.

OLAZÁBAL, D.E. et al. The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. **Brain Res. Bull.**, v.63, p.259-268, 2004.

ORBETA, R.L. et al. High caffeine intake in adolescents: associations with difficulty sleeping and feeling tired in the morning. **J. Adolesc. Health**, v.38, p.451-453, 2006.

PANOS, J.J.; BAKER, L.E. An in vivo microdialysis assessment of concurrent MDMA and cocaine administration in Sprague-Dawley rats. **Psychopharmacology**, v.209, p.95-102, 2010.

PATEL, B.A. et al. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.818, p.269-276, 2005.

PAWLAK, R. et al. Differential effects of nicotine against stress-induced changes in dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. **Eur. J. Pharmacol.**, v.387, p.171-177, 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th ed. San Diego: Elsevier, 2005.

PIERCE, R.C.; KUMARESAN, V. The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.30, p.215-238, 2006.

QUARTA, D. et al. Adenosine receptor-mediated modulation of dopamine release in the nucleus accumbens depends on glutamate neurotransmission and N-methyl-D-aspartate receptor stimulation. **J. Neurochem.**, v.91, p.873-880, 2004.

RAPOPORT, J.L. et al. Behavioral and cognitive effects of caffeine in boys and adult males. **J. Nerv. Ment. Dis.**, v.169, p.726-732, 1981.

REPPERT, S.M. et al. Molecular cloning and characterization of a rat A₁ - adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. **Mol. Endocrinol.**, v.5, p.1037-1048, 1991.

RIVKEES, S.A.; PRICE, S.L.; ZHOU, F.C. Immunohistochemical detection of A₁ adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. **Brain Res.**, v.677, p.193-203, 1995.

SCHOLL, J.L. et al. Individual differences in amphetamine sensitization, behavior and central monoamines. **Physiol. Behav.**, v.96, p.493-504, 2009.

SHAHBAZI, M. et al. Age- and sex-dependent amphetamine self-administration in rats. **Psychopharmacology**, v.196, p.71-81, 2008.

SHAPIRO, R.E. Caffeine and headaches. **Neurol. Sci.**, v.28, p.179-183, 2007.

SOLINAS, M. et al. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of nucleus accumbens. **J. Neurosci.**, v. 22, p.6321-6324, 2002.

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

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.24, p.417-463, 2000.

SPILLER, M.A. The Coffee Plant and Its Processing. In:_____. **Caffeine**. 1th ed. Florida:CRC Press LLC, 1998, p.79-95.

STEVENS, M.C. et al. Age-related cognitive gains are mediated by the effects of white matter development on brain network integration. **Neuroimage**, v.48, p.738-746, 2009.

SVENNINGSSON, P. et al. Cellular expression of adenosine A_{2A} receptor messenger RNA in the rat central nervous system with special reference to dopamine innervated areas. **Neuroscience**, v.80, p.1171-1185, 1997.

TARAZI, F.I.; TOMASINI, E.C.; BALDESSARINI, R.J. Postnatal development of dopamine D₄-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D₂-like receptors. **Dev. Brain Res.**, v.110, p.227-233, 1998a.

TARAZI, F.I.; TOMASINI, E.C.; BALDESSARINI, R.J. Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. **Neurosci. Lett.**, v.254, p.21-24, 1998b.

TARKA, S.M.J.; HURST, W.J. Introduction to the chemistry, isolation, and biosynthesis of methylxanthines. In: SPILLER, G.A. **Caffeine**. 1th ed. Florida:CRC Press LLC, 1998, p. 1-11.

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

TEMPLE, J.T. Caffeine use in children: what we know, what we have left to learn, and why we should worry. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.33, p.793-806, 2009.

TILLEMANN, H. et al. Critical role of the embryonic mid-hindbrain organizer in the behavioral response to amphetamine and methylphenidate. **Neuroscience**, v.163, p.1012-1023, 2009.

TRUSSEL, L.O.; JACKSON, M.B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.82, p.4857-4861, 1985.

USHIJIMA, I.; CARINO, M.A.; HORITA, A. Involvement of D₁ and D₂ dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.52, p.737–741, 1995.

VIDAL, J. et al. Social stress during adolescence in Wistar rats induces social anxiety in adulthood without affecting brain monoaminergic content and activity. **Physiol. Behav.**, v.92, p.824-830, 2007.

WAHLSTROM, D.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.34, p.631-648, 2010.

WALKER, Q.D.; KUHN, C.M. Cocaine increases stimulated dopamine release more in periadolescent than adult rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.30, p.412-418, 2008.

XIE, X.; RANKUMAR, V.; TOTH, L.A. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. **Comp. Med.**, v.57, p.538-545, 2007.

YOSHIMURA, H. The potential of caffeine for functional modification from cortical synapses to neuron networks in the brain. **Curr. Neuropharmacol.**, v.3, p. 309-316, 2005.