



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-**  
**GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – ASSOCIAÇÃO**  
**AMPLA UFSCAR/UNESP**



**ROBERTA ZANCHETA**

**MODULAÇÃO CONTEXTO-ESPECÍFICA DOS EFEITOS**  
**COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DECORRENTES DA**  
**CAFEÍNA**

**SÃO CARLOS – SP**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE**



**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – ASSOCIAÇÃO  
AMPLA UFSCAR/UNESP**

**ROBERTA ZANCHETA**

**MODULAÇÃO CONTEXTO-ESPECÍFICA DOS EFEITOS  
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS DECORRENTES DA  
CAFEÍNA**

**Dissertação apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas – Associação Ampla UFSCar/UNESP,  
como parte dos requisitos 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

Z29m Zancheta, Roberta  
Modulação contexto-específica dos efeitos comportamentais e neuroquímicos decorrentes da cafeína. / Roberta Zancheta. – Araraquara, 2010  
53 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. Cafeína. 2. Sensibilização. 3. Tolerância. 4. Contexto ambiental. 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 Roberta Zancheta

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



Profa. Dra. Roberto DeLucia.....



Profa. Dra. Marcia Gallacci.....



***Dedico essa dissertação as duas  
pessoas mais importantes da minha  
vida: meus pais Ivani e Eder.***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu amado pai por tudo de maravilhoso que ele foi em minha vida. Pai meu exemplo de vida muito obrigada pelo apoio incondicional todos esses anos, e por todos os valores ensinados. Hoje meu pai eu tenho certeza que sei o que é saudade, infelizmente é somente através de palavras que eu posso demonstrar meu amor, respeito e eterna admiração. Agradeço também minha mãe pelo carinho, amparo e coragem principalmente nos momentos difíceis. Mãe é em você que eu encontro a força e confiança necessária para enfrentar os obstáculos, pois com seu jeitinho abençoado você me faz acreditar que sempre após a tempestade DEUS reserva um lindo dia de sol para todos.

Agardeço a minha irmã mais velha Luciana minha eterna conselheira em todos os momentos. Aos meus sobrinhos amados João Victor e Vitória e ao meu cunhado Júnior.

Aos meus avós Irma e Hercules que sempre me incentivaram nos estudos. Obrigada por serem tão lindos e especiais.

Agradeço minha orientadora Profa Dra Cleopatra da Silva Planeta. Aos meus olhos a Cleo é uma orientadora brilhante, sua facilidade e clareza para ensinar é imensa, e sua forma de trabalhar nos estimula a aprender, buscar novos conhecimentos e pensar de forma crítica. Muito obrigada Cleo pela paciência e dedicação todos esses anos, mas obrigada principalmente por ser uma pessoa amiga e compreensiva. É com muito carinho e alegria que eu declaro minha extrema admiração

Agradeço imensamente ao Marcelo amigo muito querido que será lembrado por toda minha vida. Não tenho nem palavras para agradecer sua incansável ajuda durante todos esses anos, seu jeito calmo e paciente de ensinar só me faz admirá-lo ainda mais. Amigo não tenho dúvida você nasceu para ensinar.

Agradeço a Ana Paula que para mim é muito mais que uma amiga é uma irmã. Muito obrigada aninha por sua ajuda em todos os experimentos e também pelo seu

carinho e preocupação constante. Nunca esquecerei sua incondicional amizade nos piores momentos da minha vida que aconteceram esse ano. Sua amizade foi um presente de DEUS, obrigada irmãzinha por fazer parte da minha vida.

Agradeço a toda família Possi, João, Lúcia e Maurício por me acolherem com tanto carinho. Dona Lúcia minha segunda mãe obrigada por tudo.

Um agradecimento especial aos meus amigos Fábio, Rodrigo e Paulão que sempre estavam dispostos a ajudar, ensinar e também trabalhar em equipe. Obrigada também pelos inúmeros momentos felizes vividos durante todos esses anos.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP: Tarciso, Sheila, Marília, Egberto, Joyce, Karina, Yara, Vanessa, Alianda, Ana Cláudia, Thiago, Diego, Liany, Bruna.

Agradeço à Rosana, Elisabete e Tirene pelo constante auxílio, muito importante para o desenvolvimento dessa dissertação.

Agradeço os outros professores do departamento Ricardo Luiz Nunes de Souza, Paulo José de Campos Nogueira, José Francisco Fracasso e Maria do Carmo Longo sempre dispostos a ajudar no que fosse possível .

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e à Fapesp pelo suporte financeiro.

E por fim, agradeço à Universidade Estadual Paulista e à Universidade Federal de São Carlos por disponibilizarem ótimas instalações para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo. A administração repetida de psicostimulantes pode aumentar ou diminuir o efeito da substância, induzindo sensibilização ou tolerância, respectivamente, dependendo do procedimento de administração. Além da dose e do regime de administração, o ambiente onde a substância é administrada parece modular as mudanças comportamentais que ocorrem após administração repetida. O objetivo do presente estudo foi analisar a influência do contexto ambiental nas respostas comportamentais induzidas pela cafeína após administração repetida dessa substância. Também foi investigado se as alterações comportamentais estavam relacionadas a mudanças nas concentrações teciduais de dopamina e seus metabólitos no córtex pré-frontal medial, núcleo accumbens e caudado putamen. Para tanto, administramos cafeína (15mg/kg) ou salina (1mL/kg) a ratos adultos em dias alternados durante 13 dias (uma injeção a cada 48 horas; 7 administrações no total), o tratamento repetido com cafeína foi realizado de duas formas: 1) pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor; 2) não pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor. Três dias após a última injeção de cafeína ou salina foi realizado o teste comportamental dos animais. Imediatamente após o registro do comportamento os animais foram decapitados e seus encéfalos foram removidos para determinação das concentrações de dopamina e seus metabólitos por cromatografia líquida de alta resolução. Nossos resultados mostraram que a administração repetida de cafeína induziu sensibilização psicomotora quando as injeções foram pareadas ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor dos animais, enquanto tolerância foi observada quando os animais receberam cafeína repetidamente em um ambiente distinto daquele onde o teste locomotor dos animais foi realizado. Alterações dopaminérgicas foram detectadas no córtex pré-frontal medial, caudado putamen e núcleo acumbens em resposta ao tratamento repetido e a injeção aguda de cafeína. Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração repetida de cafeína induz comportamentos adaptativos opostos dependendo do contexto ambiental de tratamento. Alterações comportamentais não se relacionam às neuroquímicas.

**Palavras-chave:** Cafeína. Sensibilização. Tolerância. Contexto ambiental. Dopamina.



## ABSTRACT

Caffeine is the psychostimulant drug most consumed in the world. Repeated administration of psychostimulants can either decrease or increase the drug effect, inducing tolerance or sensitization, respectively; depending on the administration procedure. Besides dose and regime of drug administrations, the environment where drug is administered seems to modulate the changes in locomotor activity following repeated psychostimulant administration. The purpose of the present study was to examine the influence of the environmental context on caffeine-induced psychomotor stimulation following repeated administration of this drug. We also investigated whether the behavioral alterations were related to changes on dopamine or its metabolites tissue levels in the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate putamen. For this purpose adult rats received caffeine (15mg/kg) or saline (1ml/kg) on alternate days for 13 days (one injection every 48 hours, seven administrations in total), the repeated treatment with caffeine was performed in two ways: 1) paired with the environment where the behavioral test was performed, 2) non-paired with the environment where the behavioral test was performed. Three days after the last injection of caffeine or saline the behavioral test was performed. Immediately after the behavioral test the animals were killed by decapitation and their brains were removed for determination of dopamine and its metabolites by HPLC. Our results showed that repeated caffeine induces psychomotor sensitization when injections were paired with the environment where the animals were subsequently tested; while tolerance was observed when the animals received caffeine in an environment different from that where tests were performed. Dopaminergic alterations were detected in the medial prefrontal cortex, caudate putamen and nucleus accumbens in response to repeated treatment with caffeine and acute injection of caffeine. In conclusion, the present results demonstrated that the environment where caffeine is administered is a key factor modulating the expression of the organism adaptations to repeated caffeine drug effects. The behavioral alterations were not associated to neurochemical changes.

**Keywords:** Caffeine. Sensitization. Tolerance. Environmental context. Dopamine

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Caixa para medida da atividade locomotora .....26
- Figura 2:** Atividade locomotora dos animais após pré-tratamento com cafeína durante o período de habituação no ambiente (pareado/não pareado) ao teste locomotor.....35
- Figura 3:** Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento ....37
- Figura 4:** Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento.....39

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Alterações das concentrações de dopamina e seus metabólitos no CPFm, NAc e CP após pré-tratamento com cafeína não pareado ao ambiente do teste locomotor .....41

**Tabela 2:** Alterações das concentrações de dopamina e seus metabólitos no CPFm, NAc e CP após pré-tratamento com cafeína não pareado ao ambiente do teste locomotor .....43

## LISTA DE ABREVIACOES

ATV: rea tegmental ventral

CP: caudado putamen

CPFm: córtex pré-frontal medial

DA: dopamina

EPM: erro padrão da média

i.p.: intra-peritoneal

NAc: núcleo acumbens

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Histórico, Epidemiologia e Efeitos da cafeína .....	13
1.2 Sensibilização e Tolerância a cafeína .....	16
1.3 Mecanismo de ação e alterações neuroquímicas induzidas pela cafeína .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Avaliação da atividade locomotora.....	25
3.3 Dissecção das áreas encefálicas.....	26
3.4 Quantificação das concentrações de dopamina e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) acoplada a detector eletroquímico.....	27
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	29
4.1 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento.....	29
4.2 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento .....	30

4.3 “Turnover” de dopamina após pré-tratamento com cafeína (pareado/não pareado) ao ambiente do teste locomotor.....	31
<b>5 Análise estatística .....</b>	<b>33</b>
<b>6 Resultados.....</b>	<b>35</b>
6.1 Habituação ao ambiente onde foi realizado o teste comportamental .....	35
6.2 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento.....	36
6.3 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento.....	38
6.4 “Turnover” de dopamina no CPFm, CP e NAc após teste com cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento .....	40
6.5 “Turnover” de dopamina no CPFm, CP e NAc após teste com cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento .....	42
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico, Consumo e Efeitos da cafeína

Os fármacos psicostimulantes são substâncias que aumentam a atividade psíquica e motora. Seus principais efeitos são: aumento da atividade motora, euforia e excitação, redução da sensação de fadiga e do apetite. Os principais representantes dessa classe de substâncias psicoativas são a cocaína, a anfetamina e seus derivados, e as xantinas (cafeína, teofilina e teobromina) (O'BRIEN, 2003).

A cafeína está presente em mais de 60 espécies de plantas do mundo, sendo provavelmente a substância psicoativa mais consumida pelas pessoas como constituinte regular da dieta. Ela está presente no café, chá, refrigerantes, alimentos e medicamentos (FREDHOLM et al., 1999; FRARY; JOHNSON; WANG, 2005). Sua concentração varia de 40 a 180mg/150ml no café, de 24 a 50mg/150ml no chá, de 15 a 29mg/180ml nos refrigerantes de cola e de 1 a 36mg/28g de chocolate (BARONE; ROBERTS, 1996). A quantidade de cafeína ingerida diariamente pelos brasileiros é de aproximadamente 41 mg, sendo que 26 mg dessa cafeína ingerida são provenientes do café, 1 mg do chá, 10 mg do mate e 4 mg do cacau. Esse consumo é relativamente baixo se comparado ao consumo de outros países, como por exemplo, Estados Unidos e Canadá, onde o consumo é de 210 a 238mg/dia e Suécia e Finlândia, onde o consumo chega a 400 mg/pessoa/dia (BARONE; ROBERTS, 1996).

A maior parte da cafeína ingerida pela população é proveniente do café e do chá. A concentração de cafeína nos grãos de café varia de acordo com a espécie. As duas principais espécies de interesse comercial do gênero *Coffea* são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, denominados respectivamente, Arabica e Robusta. O grão seco da espécie *Coffea arábica* contém cerca de 1,1% de cafeína enquanto a *Coffea robusta* apresenta aproximadamente 2,2%. A quantidade de cafeína extraída dos grãos depende da técnica utilizada na preparação, variando em 75% no café fervido, 80% no café expresso e quase 100% no café filtrado (LUNDSBERG, 1998). As técnicas de preparação que apresentam maior eficiência na extração de cafeína são utilizadas em países que consomem principalmente a espécie *arábica* (por exemplo, o café filtrado na Suécia) e técnicas de extração com



menor eficiência são utilizadas em países onde é consumido mais a espécie *robusta* (por exemplo, o café expresso na Itália).

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 (BALENTINE; HARBOWY; GRAHAM, 1998).

O mate é a bebida preparada a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*, e no Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile constitui a principal fonte de consumo de cafeína. Normalmente 50g de mate rende 1 litro de bebida contendo aproximadamente 160mg de cafeína (GRAHAN, 1998).

Na semente do cacau a principal metilxantina encontrada é a teobromina, mas também ocorrem pequenas quantidades de cafeína (APGAR; TARKA, 1998). Alimentos e bebidas de chocolate são importantes fontes de cafeína principalmente na dieta de crianças e adolescentes. Para crianças de 7 a 10 anos o consumo de cafeína varia entre 0,5 a 1,8mg/kg, sendo que 26 a 55% dessa cafeína ingerida é proveniente de refrigerantes (maior parte da cafeína ingerida), 17 a 40% de bebidas e alimentos de chocolate, 6 a 34% do chá e 0 a 22% do café (MORGAN; STULTS; ZABIK, 1982; ARBEIT et al., 1988).

O consumo habitual de café ou refrigerante produz concentrações plasmáticas capazes de alterar positivamente as funções cognitivas e psicomotoras (FREDHOLM et al., 1999). Por muitos séculos, estuda-se os efeitos estimulantes da cafeína como, por exemplo, redução da fadiga, do sono, e aumento do estado de alerta. Essas propriedades da cafeína tem sido alvo de atletas, motoristas de caminhão, membros das forças militares e outras populações que precisam combater a fadiga ou aumentar sua capacidade de realizar atividades ocupacionais. Dessa forma a disponibilidade de bebidas energéticas e suplementos que contém cafeína aumentam a oportunidade das pessoas consumirem a cafeína como um agente ergogênico (BURKE, 2008).

Vários estudos têm demonstrado os efeitos benéficos da cafeína na atividade cognitiva (melhora do raciocínio lógico e rápido processamento da informação) e memória (SMITH; TOLA, 1998) Os efeitos da cafeína sobre o humor também tem sido investigado em seres humanos, doses baixas dessa substância são associadas a efeitos considerados subjetivamente “positivos”, tais como sensação de maior energia, maior estado de alerta, capacidade de concentração, motivação para o trabalho e, ainda, o desejo de socialização. Entretanto, doses

elevadas podem causar efeitos considerados desagradáveis como ansiedade, agitação, tensão, tremor e nervosismo (BENOWITZ, 1990). Dessa forma, para evitar a ocorrência dos efeitos desagradáveis os indivíduos ajustam, conforme a sua necessidade, a ingestão de bebidas que contêm cafeína (DALY; FREDHOLM, 1998).

Os efeitos da cafeína sobre a atividade locomotora em roedores também têm sido amplamente investigados. Tipicamente, a cafeína produz efeito bifásico sobre a locomoção. Doses baixas de cafeína administradas em roedores aumentam a atividade locomotora, enquanto doses altas não apresentaram efeito, ou apresentaram diminuição na atividade locomotora. De acordo com a literatura, no rato, o efeito máximo da cafeína é observado depois da administração de doses entre 15 e 30 mg/kg, enquanto doses mais elevadas (acima de 100 mg/kg) não produzem efeito ou diminuem a atividade locomotora (SOLINAS et al., 2002; FISONE; BORGKVIST; USIELLO et al., 2004).

Resultados do nosso laboratório corroboram essas observações. Assim, demonstramos que a cafeína altera de forma dose-dependente a atividade locomotora de ratos adultos e adolescentes. O aumento foi significativo em relação ao grupo controle (salina) a partir da dose de 10 mg/kg e o efeito máximo foi observado com a dose de 30 mg/kg, sendo que doses de 60 e 120 mg/kg não estimularam a atividade locomotora (MARIN et al., 2005). Levando-se em consideração as diferentes taxas de metabolismo da cafeína entre roedores e humanos, a dose de 10 mg/kg de cafeína em ratos corresponde à cerca de 2 a 3 xícaras de café para uma pessoa de 70 kg (FREDHOLM et al., 1999).

A cafeína atua como reforçador positivo em humanos e animais (NEHLIG, 1999). No entanto, suas propriedades reforçadoras são baixas se comparadas a outros psicostimulantes como cocaína e anfetamina. Porém, há várias demonstrações de que a sua utilização pode aumentar o uso de outras substâncias de abuso. Por exemplo, foi demonstrada associação entre a utilização de cafeína, tabaco e álcool (ISTVAN; MATARAZZO, 1984; SWANSON; LEE; HOPP, 1994). O uso de cafeína parece influenciar também o padrão de consumo de cocaína e anfetamina, podendo aumentar a vulnerabilidade ao abuso destes psicostimulantes (BUDNEY et al., 1993; KOZLOWSKI et al., 1993).

Embora existam controvérsias, alguns estudos relatam que a cafeína preenche alguns dos critérios para diagnóstico de dependência de modo semelhante às anfetaminas e cocaína. Por exemplo, pode-se observar o desenvolvimento de

tolerância com o uso repetido, aparecimento de síndrome de abstinência na interrupção do uso e leve efeito reforçador (HUGGHES et al.,1998; NEHLIG, 1999).

## **1.2 Sensibilização e Tolerância a cafeína**

Atualmente, a dependência de substâncias psicoativas é conceituada como uma síndrome comportamental na qual o uso da substância adquire prioridade na vida do indivíduo. De acordo com esse conceito, a dependência é caracterizada por um conjunto de sintomas indicativos de que o indivíduo perdeu o controle do uso da substância psicoativa e o mantém a despeito das suas conseqüências adversas (DSM-IV).

As primeiras teorias que propunham explicar a dependência se concentravam nas conseqüências adversas decorrentes da interrupção do uso das substâncias psicoativas, fenômeno conhecido como síndrome de abstinência que se caracteriza por um intenso desconforto causado pela retirada da substância (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Dessa forma acreditava-se que os indivíduos dependentes mantêm o uso da substância para evitar os efeitos desagradáveis da síndrome de abstinência assim a substância atuaria como um reforçador negativo (O'BRIEN, 2003). Contudo, essa teoria não explicava o início do uso da substância de abuso.

Uma característica de todas as substâncias psicoativas de abuso é a propriedade de causar efeitos euforizantes e prazerosos, atuando como reforçadores positivos (WISE; BOZARTH, 1987). De acordo com esses mesmos autores o efeito reforçador positivo dessas substâncias é decorrente da ativação de um substrato neurobiológico comum, o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Essa hipótese é comprovada por vários estudos que demonstraram que a administração aguda de psicostimulantes, como cocaína e anfetamina, e outras substâncias de abuso que comprovadamente causam farmacodependência causa a liberação de dopamina (DA) no núcleo acumbens (NAc) e caudado putamen (CP) (DICHIARA; IMPERATO, 1988). Esse aumento da DA no NAc parece mediar o efeito reforçador positivo das substâncias de abuso (KOOB, 1992; KOOB; LE MOAL, 2001).

Os principais componentes do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico são a área tegmental ventral (ATV, sítio de corpos celulares de

neurônios dopaminérgicos) e suas projeções para regiões do sistema límbico incluindo o núcleo acúmbens (NAc), o tubérculo olfativo, a amígdala e o córtex frontal e límbico. A ativação desse circuito é responsável pelo efeito reforçador das substâncias de abuso (KOOB, 1992; KOOB; LE MOAL, 2001).

A sensação de bem-estar, ou seja, o reforço positivo causado pela substância explica o padrão de uso ocasional, mas não responde por que ocorre a perda do controle do uso a despeito de conseqüências adversas. O uso prolongado de substâncias psicoativas causa neuroadaptações que se expressam como tolerância ou sensibilização.

A tolerância caracteriza-se pela diminuição dos efeitos de uma dose fixa da droga no decorrer da administração prolongada, ou ainda, pela necessidade de aumentar-se a dose para obtenção dos efeitos iniciais. A interrupção do uso da substância causa o fenômeno conhecido como síndrome de abstinência (JAFFE, 1990).

A sensibilização comportamental consiste do aumento gradual da atividade locomotora observado após a administração repetida e intermitente da substância psicoativa. Esse fenômeno resulta de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico (ROBINSON; BECKER, 1986; NESTLER; AGHAJANIAN, 1997). Segundo Robinson; Berridge, (1993), a sensibilização não resultaria no aumento do efeito reforçador das substâncias psicoativas, mas regularia o impulso motivacional e a atenção a estímulos salientes. Desse modo, as substâncias de abuso produziriam sensibilização do sistema dopaminérgico e isto tornaria os estímulos (uso da droga e comportamentos relacionados) altamente salientes, atrativos e desejados. Assim, com o uso repetido, a droga e os estímulos associados tornam-se progressivamente mais atrativos e dessa forma se desenvolve um desejo compulsivo (“fissura”) pela droga que é capaz de controlar o comportamento.

Em roedores, a sensibilização comportamental é uma característica comum das substâncias que produzem dependência (ROBINSON; BECKER, 1986). A indução da sensibilização comportamental depende do procedimento experimental de administração da substância psicoativa. A via de administração deve promover início rápido do efeito, e as administrações devem ser intermitentes. Geralmente as vias de administração endovenosa ou intra-peritoneal (i.p.) são as mais utilizadas (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Hope, et al., (2005) demonstraram que a

administração intermitente de cocaína causa sensibilização da atividade locomotora, enquanto a administração contínua por meio de “minibombas” subcutâneas pelo mesmo período de tempo causa tolerância da atividade locomotora.

Além da forma de administração, o ambiente no qual a substância psicoativa é administrada desempenha importante papel na modulação da expressão da sensibilização comportamental (BROWMAN; BADIANI; ROBINSON, 1998; CROMBAG et al., 2001). A sensibilização comportamental à psicostimulantes, como a anfetamina e a cocaína, pode ser observada quando as injeções repetidas dessas substâncias são administradas na gaiola moradia e o teste realizado em um ambiente diferente dela (BADIANI; ANAGNOSTARAS; ROBINSON, 1995a; BADIANI; BROWMAN; ROBINSON, 1995b; ROBINSON et al., 1998). Entretanto, a sensibilização comportamental é mais robusta se as administrações do psicostimulante são pareadas ao ambiente do posterior teste com a substância (ANAGNOSTARAS; ROBINSON 1996; MARIN et al., 2009). Desse modo, o pareamento entre o ambiente e as administrações da substância pode facilitar a expressão da sensibilização comportamental (VEZINA; LEYTON, 2009). Esse efeito do pareamento ambiental já é demonstrado para psicostimulantes como a cocaína e anfetamina, mas não para a cafeína.

A sensibilização comportamental em resposta ao tratamento repetido com cafeína foi demonstrada em poucos estudos. A administração de cafeína pareada ao ambiente de teste e em doses moderadas (15mg/kg i.p.) durante duas semanas em dias alternados foi capaz de promover sensibilização comportamental (SIMOLA et al., 2006 a,b; TRONCI et al., 2006). Por outro lado, outros autores demonstram que a administração contínua de cafeína pela implantação de minibombas subcutâneas induz tolerância da atividade locomotora de ratos (KAPLAN et al., 1993). Lau; Falk, (1995) também mostraram evidências de tolerância comportamental à cafeína após longo período de injeções (i.p.) diárias da substância. Contudo, de acordo com a literatura o tratamento mais utilizado para induzir tolerância é a administração oral *ad libitum* de cafeína na água (CHOU et al., 1985; HOLTZMAN; MANTE; MINNEMAN, 1990; SVENNINGSSON; NOMIKOS; FREDHOLM, 1999).

Dessa forma, as respostas comportamentais obtidas após tratamento repetido com cafeína pode ser dependente das doses, protocolo de administração e do ambiente em que a substância é administrada.

### 1.3 Mecanismo de Ação e alterações neuroquímicas induzidas pela cafeína

Quanto ao mecanismo de ação, em doses normalmente consumidas por humanos, a cafeína atua predominantemente como antagonista dos receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  (FREDHOLM et al., 1999). Os receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$  estão localizados em várias regiões do sistema nervoso central incluindo componentes das vias dopaminérgicas, como CP e o NAc (FREDHOLM et al., 1999). O receptor  $A_1$  está acoplado à proteína  $G_i$  (inibição de adenilil ciclase) e  $G_o$  (ativação de canais de potássio e de cálcio) (TRUSSEL; JACKSON, 1985; MACDONALD; SKERRIT; WERZ, 1986). A maioria dos receptores  $A_1$  está localizada nos terminais pré – sinápticos, onde inibem a liberação de vários neurotransmissores incluindo a DA e a serotonina (5-HT) (OKADA et al., 1996; 1999). Os receptores  $A_{2A}$  estão acoplados às proteínas  $G_s$  e  $G_{olf}$  que ativam a adenilil ciclase (HERVÉ et al., 2001), esses receptores estão localizados pós-sinapticamente em terminais dopaminérgicos, como por exemplo, no corpo estriado e o tubérculo olfativo (FREDHOLM et al., 1999; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004) onde estão envolvidos no controle de movimentos voluntários e dos aspectos motivacionais e cognitivos do comportamento motor (SCHIFFMAN; JACOBS; VANDERHAEGEN, 1991; FINK et al., 1992; SCHIFFMAN; VANDERHAEGHEN, 1993).

Os receptores  $A_1$  estão localizados nos terminais pré-sinápticos dos neurônios aferentes glutamatérgicos e dopaminérgicos. Nesses terminais, eles atuam como heteroreceptores mediando a inibição da liberação de DA e glutamato induzida pela adenosina (SOLINAS et al., 2002). No terminal pós-sináptico os receptores  $A_1$  interagem negativamente com os receptores dopaminérgicos D1 localizados nos neurônios GABAérgicos da projeção estriado-nigral (FERRÉ et al., 1997). Os receptores  $A_{2A}$  estão localizados principalmente na região pós-sináptica somatodendrítica dos neurônios GABAérgicos da projeção estriadopalidal (HETTINGER et al., 2001), onde eles interagem negativamente com os receptores dopaminérgicos D2. Assim, a cafeína pode facilitar a transmissão dopaminérgica aumentando a liberação de DA e os efeitos da DA mediados pelos receptores D2 (FERRÉ et al., 1997).

A cafeína pode atuar como inibidor das fosfodiesterases, entretanto a sua afinidade por essas enzimas é baixa e concentrações elevadas (na faixa de

milimolar) são necessárias para a obtenção de efeitos significativos (CARDINALI, 1980). De forma semelhante, concentrações milimolares são necessárias para que a cafeína mobilize cálcio de estoques intra-celulares, efeito que é mediado por canais sensíveis a rianodina (MCPHERSON et al., 1991; SITSAPESAN; MCGARRY; WILLIAMS, 1995). Contudo, essas concentrações produzem efeitos tóxicos em humanos. As concentrações plasmáticas usuais de cafeína após ingestão, por exemplo, de três xícaras de café (aproximadamente 300 mg de cafeína) não excede 30  $\mu$ M (BONATI et al., 1982), e nessa faixa de concentração a cafeína exerce seu principal mecanismo de ação que é o bloqueio dos receptores de adenosina, principalmente  $A_1$  e  $A_{2A}$ .

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 dos 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 descritas acima, a concentração intracelular de AMPc, atividade de enzimas cinases e concentração iônica intracelular (YOSHIMURA, 2005; XIE et al., 2007). Essas alterações culminam por alterar a atividade neuronal e seu conteúdo ou liberação de neurotransmissores, como por exemplo, dopamina (SOLINAS et al., 2002; FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004).

Solinas et al., (2002) demonstraram através de estudos de microdiálise *in vivo* que a administração sistêmica de dose moderadas de cafeína (10-30 mg/kg i.p.), ou de um antagonista seletivo dos receptores de adenosina  $A_1$ , aumentam o nível extracelular de DA no NAc. Dessa forma, alguns efeitos da cafeína podem estar relacionados ao aumento da liberação de neurotransmissores decorrente do bloqueio dos receptores  $A_1$  (FISONE; BORGKVIST; USIELLO, 2004).

No entanto, estudo recente de De Luca et al., (2007) questiona a liberação de DA no NAc induzida pela cafeína. Esses autores demonstraram também pela técnica de microdiálise, que doses de 10 e 30 mg/kg i.p. de cafeína não estimulam a liberação de DA no NAc, mas em vez disso aumentam a liberação de DA somente no córtex pré-frontal medial (CPFm). Através do implante da cânula na região intermediária entre o CPFm e NAc os autores sugeriram que trabalhos anteriores mediram na verdade no NAc a DA difundida a partir do CPFm.

Acquas; Tanda; Di Chiara, (2002) demonstraram que um procedimento de administração repetida de cafeína capaz de induzir tolerância comportamental foi acompanhado de redução da liberação de DA no CPFm induzida pela cafeína, enquanto nenhuma alteração na quantidade de DA no NAc foi encontrada. No entanto, Quarta et al., (2004) demonstraram tolerância da liberação de DA no NAc induzida pela cafeína após 14 dias de sua administração na água.

Alterações nos sistemas dopaminérgicos também podem ser avaliadas pela determinação das concentrações teciduais de neurotransmissores e seus metabólitos utilizando-se cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção eletroquímica (CHI; ODONTIADIS; FRANKLIN, 1999; MAYERHOFER; KOVAR; SCHMITD, 2001; STROTHER et al., 2005; TSUNODA et al., 2006).

Hadfield; Milio, (1989) mostraram por meio da dosagem de neurotransmissores e seus metabólitos em homogenato tecidual, que a administração de altas doses de cafeína aumenta a utilização de DA e 5-HT em varias áreas encefálicas em camundongos. No entanto, as doses de cafeína utilizadas (100 e 200 mg/kg i.p.) não refletem as quantidades normalmente consumidas por humanos (FREDHOLM et al., 1999).

Vários estudos demonstraram a participação da neurotransmissão dopaminérgica na mediação do efeito agudo da cafeína, entretanto, os estudos quanto a participação desses sistemas de neurotransmissores na mediação dos efeitos crônicos da cafeína ainda são bastante limitados.



**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Os experimentos realizados neste estudo tiveram como objetivos investigar:

a-) se o contexto ambiental exerce influência nas respostas comportamentais induzidas pela cafeína após administrações repetidas dessa substância;

b-) se as alterações comportamentais estão relacionadas com alterações nas concentrações teciduais de DA, e seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e ácido diidroxifenil acético (DOPAC), no CPFm, NAc e CP.

*MATERIAIS E MÉTODOS*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (180g a 200g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia do Campus de Araraquara - UNESP no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Grupos de 3 a 4 animais foram mantidos em caixas plásticas de 32 x 40 x 16 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. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo claro/escuro entre as 8:00 a.m e 17:00 p.m.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP (CEP-07/2008) 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 (Fig. 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 Dissecção das áreas encefálicas

Os encéfalos foram dissecados em criostato sob temperatura de  $-15$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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 aproximadamente as seguintes coordenadas a partir do bregma:  $+3,7\text{mm}$  a  $+2,7\text{mm}$  para o CPFm;  $+2,0\text{mm}$  a  $+1,0\text{mm}$  para o NAc e CP.

### **3.4 Quantificações das concentrações de dopamina, e seus metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) 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). Em resumo, as estruturas encefálicas foram dissecadas e congeladas (-80°C). Para a determinação das concentrações de DA e seus metabólitos HVA e DOPAC, as áreas dissecadas foram pesadas, homogeneizadas em ácido perclórico 0,1M, centrifugadas a 13.150 g, 20min, 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, 150 µL para o NAc e 200 µL para o CP.

Trinta microlitros do sobrenadante foram injetados 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% 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 DA, DOPAC e HVA injetadas no cromatógrafo em triplicata. O limite de detecção e quantificação foram, respectivamente, para a DA: 0,5 e 1,66, para o DOPAC: 0,7 e 2,4, para o HVA: 1,9 e 6,4 ng/ml. Quando a concentração da amostra destas substâncias ficava abaixo do limite de quantificação, as mesmas eram excluídas. As concentrações das substâncias eram corrigidas pela massa das amostras de tecido dissecadas, sendo expressas em ng da substância por mg de tecido.

*DELINEAMENTO EXPERIMENTAL*

## 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 4.1 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento

O protocolo utilizado nesse estudo foi baseado no trabalho de Simola et al., (2006a,b) e consistiu em duas etapas:

1) Tratamento: Nessa etapa os animais foram divididos em dois grupos que receberam injeções i.p. de 15 mg/kg de cafeína (N = 20) (Grupo CAF) ou salina (1mL/kg) (Grupo SAL) (N=20), em dias alternados durante 13 dias (uma injeção a cada 48h; total 7 administrações). Nos dias de tratamento os animais foram transportados em sua gaiola moradia do biotério para a sala onde foi realizado o teste comportamental e ali permaneceram por 40 minutos. Após esse período de habituação à sala, os animais receberam as injeções de cafeína ou salina e foram colocados na caixa de atividade locomotora por 20 minutos (pareamento injeção/ambiente). Entre a exposição de cada rato à caixa de atividade o chão e as paredes da caixa eram limpos com álcool 70% e secos com papel toalha.

2) Teste: Três dias após a última administração de cafeína ou salina os animais foram transportados em sua gaiola moradia do biotério para a mesma sala onde foi realizado o tratamento, como descrito acima, e foram colocados individualmente na caixa de atividade por 30 minutos para habituação, ao final desse período registrou-se as unidades de locomoção (item 3.2).

Após a habituação os grupos CAF e SAL foram aleatoriamente subdivididos em dois grupos que receberam cafeína (10 mg/kg; i.p.) (CAF + CAF; N = 10) e (SAL + CAF; N = 10) ou salina (SAL + SAL; N=10) e (CAF + SAL; N=10) Imediatamente após as injeções os animais foram colocados na caixa de atividade e a locomoção foi registrada ao final de 30 minutos.

Após a análise comportamental, os animais foram transferidos para uma sala adjacente, onde foram sacrificados por decapitação, sendo seus encéfalos rapidamente removidos (90s) e congelados em isopentano resfriado sobre gelo seco. Após esse procedimento, os encéfalos foram armazenados a -80 °C para posterior dissecação das áreas encefálicas de interesse CPFm, NAc e CP (item 3.3) e quantificação das amostras por HPLC (item 3.4)

A dose de 15 mg/kg de cafeína utilizada baseou-se nos estudos de Simola et al., (2006a,b), que demonstraram a indução de sensibilização à cafeína



induzida pela administração repetida desta dose. No entanto, utilizamos a dose de 10 mg/kg no dia do teste com base em estudos prévios do laboratório nos quais demonstrou-se que a dose de 15mg/Kg causava efeito máximo na atividade locomotora Marin et al., (2005), o que dificultaria a observação de sensibilização comportamental.

#### **4.2 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento**

Esse experimento também consistiu de duas etapas como descrito no experimento 4.1.

1) Tratamento: Nessa etapa os animais foram divididos em dois grupos que receberam injeções i.p. de 15 mg/kg de cafeína (Grupo CAF) (N = 16) ou salina (1mL/kg) (Grupo SAL) (N=16), em dias alternados durante 13 dias (uma injeção a cada 48h; total 7 administrações). Entretanto, as administrações foram realizadas em um ambiente distinto do qual foi realizado o teste de locomoção, os animais receberam injeções de cafeína ou salina i.p. no próprio biotério. Assim, nesse experimento os animais nunca foram expostos ao ambiente onde foi realizado o teste comportamental.

2) Teste: Três dias após a última administração de cafeína ou salina os animais foram transportados em sua gaiola moradia do biotério para a sala onde foi realizado o teste locomotor, e foram colocados individualmente na caixa de atividade por 30 minutos para habituação, ao final desse período registrou-se as unidades de locomoção (item 3.2).

Após a habituação os grupos CAF e SAL foram aleatoriamente subdivididos em dois grupos que receberam cafeína (10 mg/kg; i.p.) (CAF + CAF; N = 8) e (SAL + CAF; N = 8) ou salina (SAL + SAL; N=8) e (CAF + SAL; N=8) Imediatamente após as injeções os animais foram colocados na caixa de atividade e a locomoção foi registrada ao final de 30 minutos.

Após a análise comportamental, os animais foram transferidos para uma sala adjacente, onde foram sacrificados por decapitação, sendo seus encéfalos rapidamente removidos (90s) e congelados em isopentano resfriado sobre gelo seco. Após esse procedimento, os encéfalos foram armazenados a -80 °C para posterior dissecação das áreas encefálicas de interesse CPFm, NAc e CP (item 3.3) e quantificação das amostras por HPLC (item 3.4).

### **4.3 “Turnover” de dopamina após o pré-tratamento com cafeína (pareado/não pareado) ao ambiente do teste locomotor.**

Imediatamente após o registro da atividade locomotora, os animais foram decapitados, seus encéfalos retirados, e o CPFm, NAc e CP foram dissecados como no item 3.3. As concentrações de DA, e seus metabólitos foram determinadas como descrito no 3.4.

Os resultados foram expressos como “turnover”, que corresponde ao cálculo da razão entre a concentração dos metabólitos e seu respectivo neurotransmissor. Esse índice é considerado um indicador da atividade de um determinado sistema, pois representa a taxa de utilização do neurotransmissor (CHI; ODONTIADIS; FRANKLIN, 1999; MAYERHOFER; KOVAR; SCHMITD, 2001; STROTHER et al., 2005; TSUNODA et al., 2006).



## 5. Análise estatística

Os dados da habituação foram analisados pelo teste *t*-student para amostras independentes comparando o pré-tratamento cafeína e salina.

Os dados comportamentais após a injeção com cafeína foram analisados pela ANOVA bifatorial, considerando os fatores pré-tratamento (salina x cafeína 15 mg/kg) e teste (salina x cafeína 10 mg/Kg).

Os dados neuroquímicos foram analisados pela ANOVA bifatorial, considerando os fatores pré-tratamento (salina x cafeína 15 mg/kg) e teste (salina x cafeína 10 mg/kg).

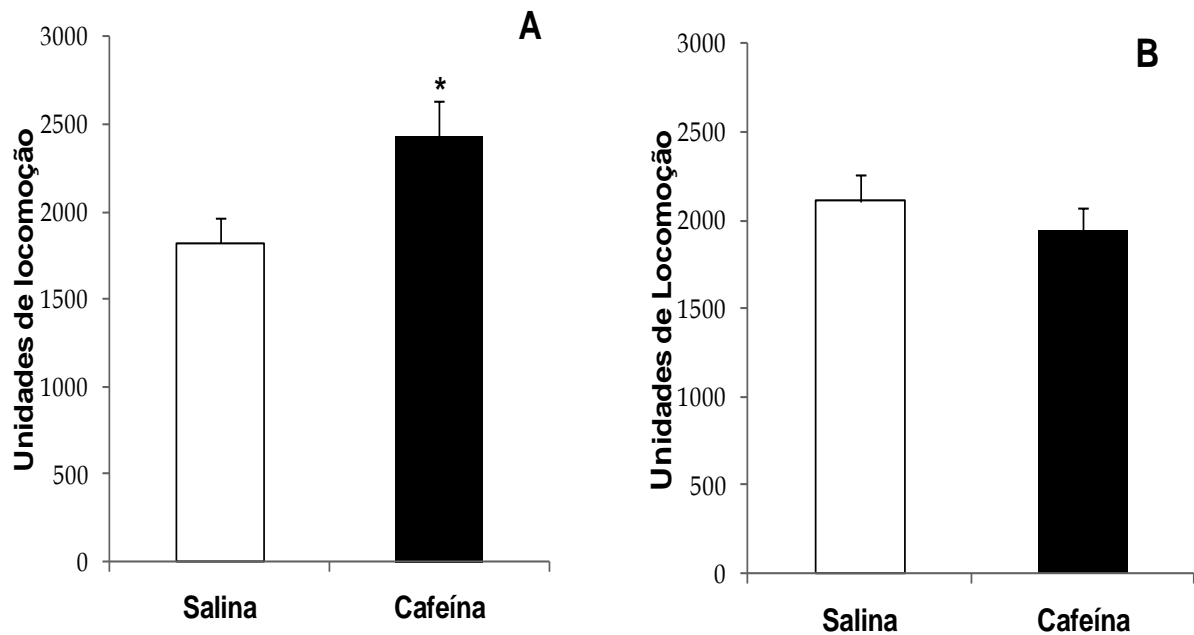
Nos casos em que a ANOVA mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) os dados foram submetidos à análise post-hoc de Newman-Keuls para verificação das diferenças entre os grupos de interesse.

*RESULTADOS*

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Habituação ao ambiente onde foi realizado o teste comportamental

O teste t-Student para amostras independentes comparando o pré-tratamento cafeína e salina mostrou que os animais que receberam pré-tratamento com cafeína pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor apresentaram maior atividade locomotora no período de habituação ( $t = -2.17$ ;  $p < 0.05$ ). Entretanto, não houve diferença significativa quando o pré-tratamento com cafeína não foi pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor (Fig. 2).



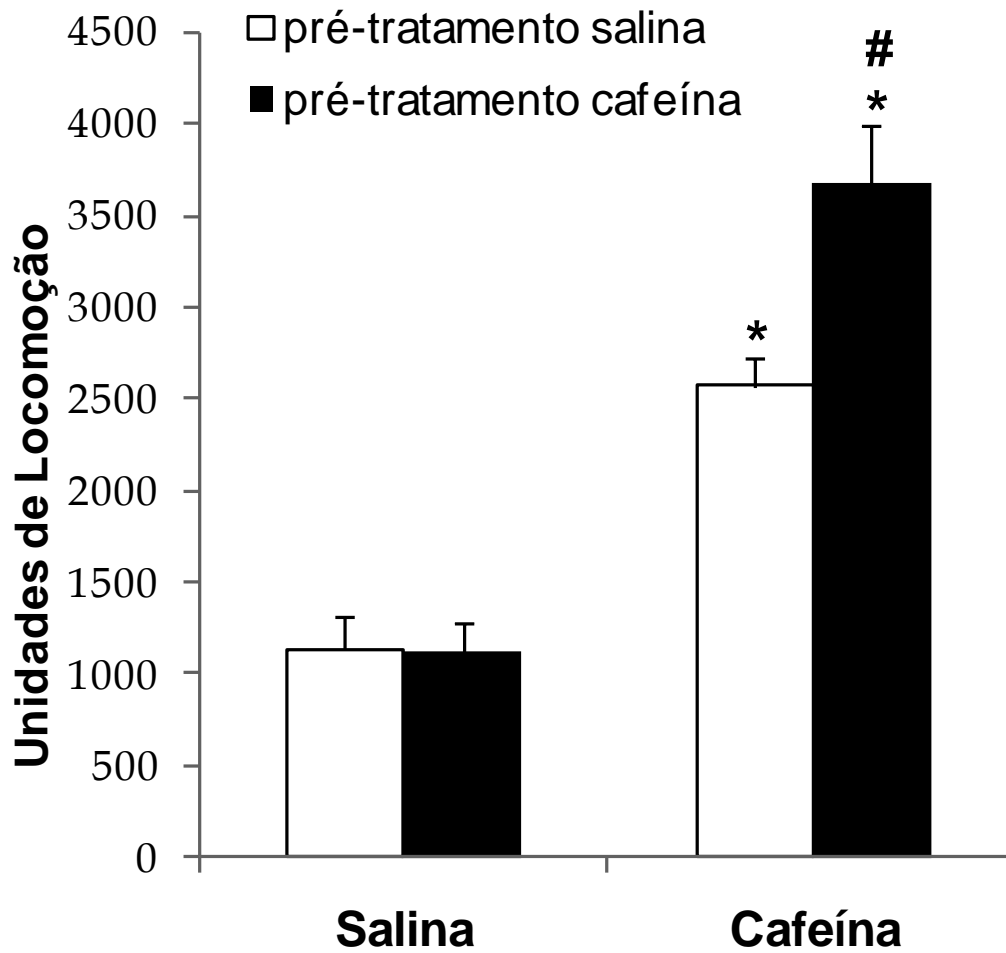
**Figura 2:** Atividade locomotora dos animais após pré-tratamento com cafeína durante o período de habituação no ambiente pareado (A) e no ambiente não pareado (B) ao teste locomotor. As barras representam a média  $\pm$  EPM das unidades de locomoção acumuladas nos 30 min após injeção i.p. de cafeína (10mg/kg) ou salina (1ml/kg) (N=16-20 animais por grupo).

\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo controle (teste t-Student)

## 6.2 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento

A figura 3 mostra o resultado da análise da atividade locomotora dos animais em resposta ao pré-tratamento com cafeína ou salina, pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor.

ANOVA bifatorial revelou diferença significativa para os fatores pré-tratamento [ $F_{(1,34)} = 6.005$ ;  $p < 0.05$ ] e teste [ $F_{(1,34)} = 81.835$ ;  $p < 0.01$ ]. Além disso, houve interação significativa entre os fatores pré-tratamento e teste [ $F_{(1,34)} = 6.309$ ;  $p < 0.05$ ]. Considerando o fator pré-tratamento a análise de Newman-Keuls revelou que a cafeína aumentou significativamente a locomoção em relação ao grupo salina. Essa mesma análise foi realizada considerando os fatores pré-tratamento e teste, revelando que a injeção aguda de cafeína (teste) aumentou significativamente a atividade locomotora nos grupos pré-tratados com salina ou cafeína (SAL-SAL vs SAL-CAF e CAF-SAL vs CAF-CAF;  $p < 0.01$ ). Observou-se também que o grupo de animais pré-tratados com cafeína apresentou atividade locomotora significativamente maior quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com salina (SAL-CAF vs CAF-CAF;  $p < 0.01$ ), caracterizando a presença de sensibilização comportamental quando o teste é realizado no ambiente pareado ao tratamento repetido com cafeína (Fig. 3).



**Figura 3:** Efeito psicomotor da cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento. As barras representam a média  $\pm$  EPM das unidades de locomoção acumuladas nos 30 min após injeção i.p. de cafeína (10mg/kg) ou salina (1ml/kg).

\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo controle (CAF-SAL vs CAF-CAF; SAL-SAL vs SAL-CAF)

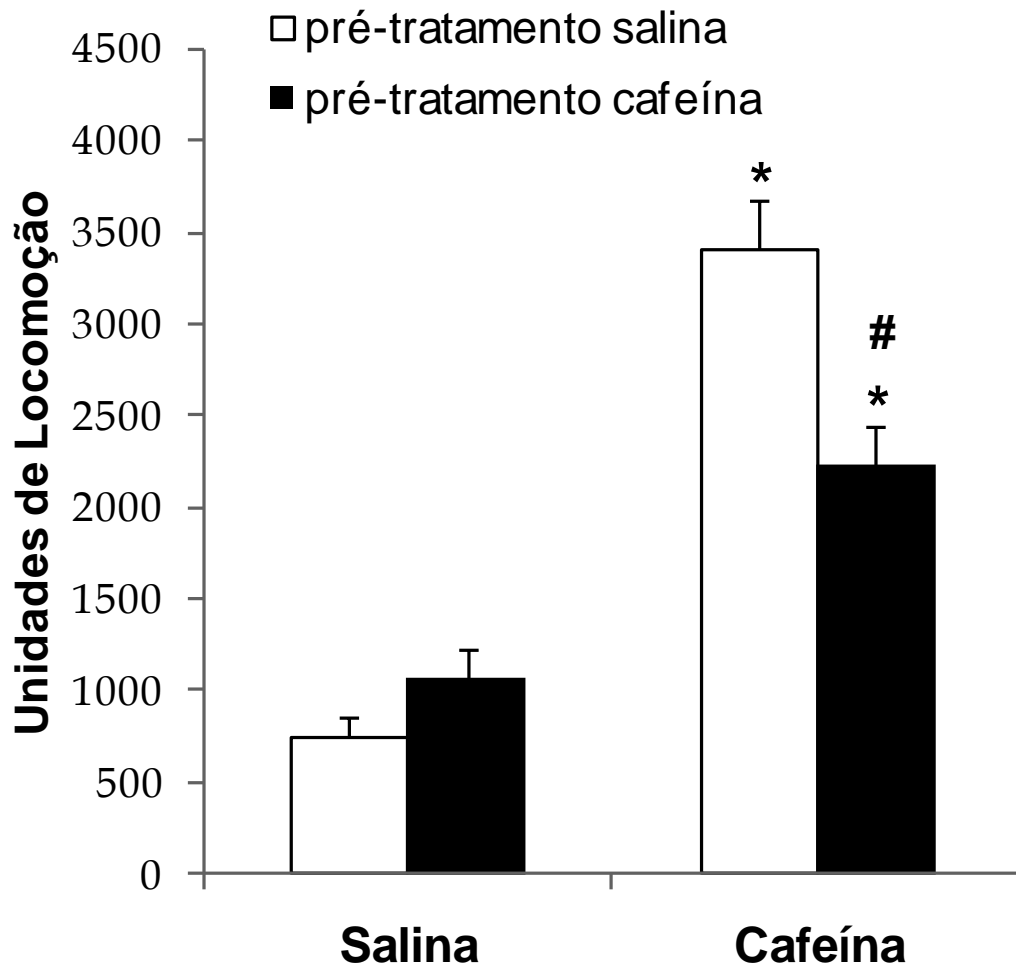
#  $p < 0,05$  comparado ao grupo pré-tratado com salina e desafiado com cafeína (SAL-CAF vs CAF-CAF)



### 6.3 Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento

A figura 4 mostra o resultado da análise da atividade locomotora dos animais em resposta ao pré-tratamento com cafeína ou salina não pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor.

ANOVA bifatorial revelou diferença significativa para os fatores pré-tratamento [ $F_{(1,27)} = 4.804$ ;  $p < 0.05$ ] e teste [ $F_{(1,27)} = 98.224$ ;  $p < 0.01$ ]. Além disso, houve interação significativa entre os fatores pré-tratamento e teste [ $F_{(1,27)} = 15.191$ ;  $p < 0.01$ ]. Considerando o fator pré-tratamento a análise de Newman-Keuls revelou que a cafeína diminuiu significativamente a locomoção em relação ao grupo salina. Essa mesma análise foi realizada considerando os fatores pré-tratamento e teste, revelando que a injeção aguda de cafeína (teste) aumentou significativamente a atividade locomotora nos grupos pré-tratados com salina ou cafeína (SAL-SAL vs SAL-CAF e CAF-SAL vs CAF-CAF;  $p < 0.01$ ). Observou-se também que o grupo de animais pré-tratados com cafeína apresentou atividade locomotora significativamente menor quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com salina (SAL-CAF vs CAF-CAF;  $p < 0.001$ ), caracterizando a presença de tolerância comportamental quando as injeções de cafeína não foram pareadas com o ambiente do teste locomotor (Fig. 4).



**Figura 4:** Efeito psicomotor da cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento. As barras representam a média  $\pm$  EPM das unidades de locomoção acumuladas nos 30 min após injeção i.p. de cafeína (10mg/kg) ou salina (1ml/kg).

\*  $p < 0,05$  em relação ao respectivo controle (CAF-SAL vs CAF-CAF; SAL-SAL vs SAL-CAF)

#  $p < 0,05$  comparado ao grupo pré-tratado com salina e desafiado com cafeína (SAL-CAF vs CAF-CAF)

#### **6.4 “Turnover” de dopamina no CPFm, CP e NAc após teste com cafeína no ambiente pareado ao pré-tratamento**

No CPFm ANOVA bifatorial não revelou diferença significativa para o turnover de DA considerando o fator pré-tratamento [ $F_{(1,33)}=0,04$ ;  $p=0,84$ ] mas revelou diferença significativa para o fator teste [ $F_{(1,33)}=6,35$ ;  $p<0,01$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,33)}=0,007$ ;  $p=0,93$ ]. Análise de Newman-Keuls, considerando o fator teste, revelou que a injeção aguda de cafeína aumentou significativamente o “turnover” de DA no CPFm nos animais independentemente do pré-tratamento que eles receberam.

Em relação ao CP ANOVA bifatorial não revelou diferença significativa para o “turnover” de DA considerando o fator pré-tratamento [ $F_{(1,33)}=1,34$ ;  $p=0,25$ ] mas revelou diferença significativa para o fator teste [ $F_{(1,33)}=4,61$ ;  $p<0,03$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,33)}=2,04$ ;  $p=0,16$ ]. Análise de Newman-Keuls considerando o fator teste revelou que a injeção aguda de cafeína diminuiu significativamente o “turnover” de DA no CP nos animais independentemente do pré-tratamento que eles receberam.

No NAc ANOVA bifatorial não revelou diferença significativa para o “turnover” de DA considerando o fator pré-tratamento [ $F_{(1,34)}=0,01$ ;  $p=0,90$ ] mas revelou diferença significativa para o fator teste [ $F_{(1,34)}=5,81$ ;  $p<0,02$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,34)}=0,29$ ;  $p=0,58$ ]. Análise de Newman-Keuls considerando o fator teste revelou que a injeção aguda de cafeína diminuiu significativamente o “turnover” de DA no NAc nos animais independente do pré-tratamento que eles receberam (Tabela 1).

**Tabela 1:** Alterações das concentrações de dopamina e seus metabólitos (média  $\pm$  EPM) no CPFm, NAc e CP após pré-tratamento com 15mg/kg de cafeína pareado ao ambiente do teste locomotor (n=6-10 animais/grupo).

		<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>HVA</b>	<b>DOPAC+HVA/DA</b>
<b>CPFm</b>	<b>SAL-SAL</b>	0,062 $\pm$ 0,010	0,030 $\pm$ 0,005	0,036 $\pm$ 0,007	0,477 $\pm$ 0,113
	<b>CAF-SAL</b>	0,060 $\pm$ 0,010	0,028 $\pm$ 0,003	0,022 $\pm$ 0,005	0,483 $\pm$ 0,137
	<b>SAL-CAF</b>	0,062 $\pm$ 0,012	0,024 $\pm$ 0,004	0,048 $\pm$ 0,010	0,839 $\pm$ 0,176
	<b>CAF-CAF</b>	0,059 $\pm$ 0,019	0,033 $\pm$ 0,006	0,037 $\pm$ 0,005	0,880 $\pm$ 0,137
<b>NAc</b>	<b>SAL-SAL</b>	1,051 $\pm$ 0,209	0,630 $\pm$ 0,140	0,154 $\pm$ 0,028	0,787 $\pm$ 0,155
	<b>CAF-SAL</b>	1,198 $\pm$ 0,128	0,700 $\pm$ 0,100	0,200 $\pm$ 0,035	0,865 $\pm$ 0,116
	<b>SAL-CAF</b>	1,212 $\pm$ 0,233	0,465 $\pm$ 0,096	0,133 $\pm$ 0,029	0,567 $\pm$ 0,104
	<b>CAF-CAF</b>	0,971 $\pm$ 0,145	0,406 $\pm$ 0,080	0,109 $\pm$ 0,019	0,516 $\pm$ 0,081
<b>CP</b>	<b>SAL-SAL</b>	1,193 $\pm$ 0,146	0,396 $\pm$ 0,026	0,067 $\pm$ 0,008	0,464 $\pm$ 0,033
	<b>CAF-SAL</b>	0,987 $\pm$ 0,140	0,310 $\pm$ 0,045	0,054 $\pm$ 0,009	0,363 $\pm$ 0,050
	<b>SAL-CAF</b>	1,470 $\pm$ 0,179	0,292 $\pm$ 0,042	0,046 $\pm$ 0,008	0,324 $\pm$ 0,043
	<b>CAF-CAF</b>	1,489 $\pm$ 0,169	0,293 $\pm$ 0,028	0,061 $\pm$ 0,008	0,335 $\pm$ 0,031

### 6.5 “Turnover” de dopamina no CPFm, CP e NAc após teste com cafeína no ambiente não pareado ao pré-tratamento

No CPFm ANOVA bifatorial não revelou diferença significativa para o “turnover” de DA considerando os fatores pré-tratamento [ $F_{(1,27)}=0,18$ ;  $p=0,66$ ] e teste [ $F_{(1,27)}=2,09$ ;  $p=0,15$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,27)}=0,46$ ;  $p=0,49$ ].

Em relação ao CP ANOVA bifatorial não revelou diferença significativa para o “turnover” de DA considerando os fatores pré-tratamento [ $F_{(1,27)}=0,05$ ;  $p=0,81$ ] e teste [ $F_{(1,27)}=1,88$ ;  $p=0,18$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,27)}=0,06$ ;  $p=0,79$ ].

No NAc ANOVA bifatorial revelou diferença significativa para o “turnover” de DA considerando o fator pré-tratamento [ $F_{(1,27)}=4,22$ ;  $p<0,04$ ], entretanto não revelou diferença significativa para o fator teste [ $F_{(1,27)}=3,35$ ;  $p=0,07$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F_{(1,27)}=1,06$ ;  $p=0,31$ ]. Considerando o fator pré-tratamento a análise de Newman-Keuls revelou que a cafeína diminuiu significativamente o “turnover” de DA no NAc (Tabela 2).

**Tabela 2:** Alterações das concentrações de dopamina e seus metabólitos (média  $\pm$  EPM) no CPFm, NAc e CP após pré-tratamento com 15mg/kg de cafeína não pareado ao ambiente do teste locomotor (n=6-10 animais/grupo).

		<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>HVA</b>	<b>DOPAC+HVA/DA</b>
<b>CPFm</b>	<b>SAL-SAL</b>	0,043 $\pm$ 0,008	0,116 $\pm$ 0,010	0,173 $\pm$ 0,013	7,159 $\pm$ 2,709
	<b>CAF-SAL</b>	0,033 $\pm$ 0,010	0,117 $\pm$ 0,015	0,190 $\pm$ 0,026	10,252 $\pm$ 2,602
	<b>SAL-CAF</b>	0,151 $\pm$ 0,064	0,096 $\pm$ 0,011	0,135 $\pm$ 0,016	5,046 $\pm$ 2,758
	<b>CAF-CAF</b>	0,075 $\pm$ 0,021	0,116 $\pm$ 0,019	0,173 $\pm$ 0,021	4,345 $\pm$ 3,032
<b>NAc</b>	<b>SAL-SAL</b>	0,104 $\pm$ 0,033	0,083 $\pm$ 0,010	0,123 $\pm$ 0,009	2,541 $\pm$ 0,612
	<b>CAF-SAL</b>	0,121 $\pm$ 0,028	0,085 $\pm$ 0,010	0,087 $\pm$ 0,014	1,179 $\pm$ 0,332
	<b>SAL-CAF</b>	0,152 $\pm$ 0,032	0,068 $\pm$ 0,007	0,099 $\pm$ 0,012	1,278 $\pm$ 0,472
	<b>CAF-CAF</b>	0,184 $\pm$ 0,036	0,092 $\pm$ 0,015	0,109 $\pm$ 0,016	0,827 $\pm$ 0,153
<b>CP</b>	<b>SAL-SAL</b>	0,071 $\pm$ 0,006	0,035 $\pm$ 0,004	0,021 $\pm$ 0,004	0,304 $\pm$ 0,063
	<b>CAF-SAL</b>	0,060 $\pm$ 0,013	0,026 $\pm$ 0,004	0,018 $\pm$ 0,004	0,356 $\pm$ 0,167
	<b>SAL-CAF</b>	0,096 $\pm$ 0,011	0,028 $\pm$ 0,004	0,028 $\pm$ 0,007	0,189 $\pm$ 0,078
	<b>CAF-CAF</b>	0,094 $\pm$ 0,009	0,034 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,004	0,186 $\pm$ 0,055

*DISCUSSÃO*

## 7. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos a influência do contexto ambiental nas alterações comportamentais e na transmissão dopaminérgica induzida pelo tratamento repetido com cafeína.

Nossos resultados demonstraram que os animais que receberam pré-tratamento com cafeína pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor apresentaram maior atividade locomotora durante o período de habituação no dia do teste quando comparado aos animais que receberam pré-tratamento pareado com salina. Entretanto, quando não houve pareamento pré-tratamento – ambiente, ou seja, os animais recebiam as injeções na própria gaiola-moradia, não foi observada diferença significativa na atividade locomotora dos animais durante o período de habituação. Assim, o pareamento injeção – ambiente parece induzir o condicionamento da atividade locomotora.

Resultados semelhantes foram obtidos para a anfetamina e cocaína. Por exemplo, Fraioli et al., (1999) observaram que os animais que receberam pré-tratamento com anfetamina pareado a um determinado ambiente apresentaram maior atividade locomotora durante o período de habituação nesse mesmo ambiente quando comparado aos animais que receberam pré-tratamento pareado com salina. Nesse mesmo sentido, Carey; Damianopoulos; Shanahan, (2006, 2008) demonstraram que animais que receberam cocaína em uma arena de campo aberto quando comparado aos que receberam salina nesse mesmo ambiente apresentaram maior atividade locomotora em resposta a uma injeção subsequente de salina nessa mesma arena.

De acordo com o condicionamento Pavloviano o tratamento com a substância psicoativa de abuso constitui o estímulo incondicionado e o efeito induzido pela substância a resposta incondicionada. Após o uso repetido de substâncias psicoativas de abuso, as dicas ambientais relacionadas ao uso tornam-se estímulos condicionados ao efeito das substâncias, assim uma simples exposição a esses estímulos pode evocar efeitos semelhantes àqueles obtidos com o uso da substância (resposta condicionada) (EHRMAN et al.,1992). Por exemplo, quando um animal é exposto pela segunda vez a um ambiente previamente pareado com cocaína, a memória dos efeitos produzidos pela cocaína é primeiramente ativada por estímulos ambientais e pode ser reforçada com um segundo tratamento com



cocaína. Então, ao longo do tratamento repetido e pareado, a memória aos efeitos da cocaína é progressivamente consolidada e, portanto, duradoura (LEE; MILTON; EVERITT, 2006).

Dessa forma, os resultados obtidos durante o período de habituação sugerem que o aumento da locomoção nos animais que receberam pré-tratamento pareado com cafeína é uma resposta condicionada, pois durante o pré-tratamento ocorreu uma associação de estímulos ambientais aos efeitos estimulantes da cafeína. Entretanto, durante o teste o procedimento de injeção parece mascarar essa resposta condicionada, pois os animais do grupo (CAF-SAL) não apresentaram atividade locomotora maior que os animais do grupo (SAL-SAL). Alternativamente, ao final do período de 30 minutos pode ter ocorrido a habituação dos animais ao ambiente e, portanto nenhuma diferença foi observada na atividade locomotora entre os grupos que receberam injeção de salina. Para confirmar essa possibilidade seria importante analisar o decurso temporal durante os trinta minutos de habituação.

A administração repetida de psicostimulantes como, por exemplo, cocaína e anfetamina resultam em neuroadaptações que podem se expressar como sensibilização ou tolerância (ROBINSON; BERRIDGE, 1993). Vários autores demonstraram que injeções repetidas e intermitentes dessas substâncias produzem aumento da atividade locomotora dos animais em resposta a uma injeção subsequente dessas substâncias, fenômeno denominado sensibilização (HEIDBREder; THOMPSON; SHIPPENBERG, 1996; MATTSON et al., 2007; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2008). Contudo, enquanto injeções repetidas diárias i.p de cocaína (15 mg/kg) induz sensibilização psicomotora a administração contínua de cocaína por meio de “minibombas” subcutâneas na mesma dose produz tolerância (HOPE et al., 2005). Além da dose e regime de administração da substância, o ambiente onde a droga é administrada parece modular o desenvolvimento de mudanças na atividade locomotora de animais que receberam tratamento repetido com psicostimulantes (POST et al., 1981, 1992).

Nossos resultados mostraram que a administração de 15 mg/kg de cafeína em dias alternados (uma injeção a cada 48 horas) durante 13 dias promoveu sensibilização comportamental quando as injeções foram realizadas no mesmo ambiente onde os animais foram, subsequentemente, submetidos ao teste (3 dias após a última injeção). Nossos resultados corroboram com aqueles obtidos por Simola et al., (2006a,b). Esses autores, utilizando um protocolo experimental

semelhante ao nosso, demonstraram que animais pré-tratados com cafeína 15 mg / kg i.p. em dias alternados durante 13 dias, apresentaram aumento da atividade locomotora após a injeção aguda cafeína ou anfetamina no mesmo contexto ambiental onde essas substâncias foram administradas previamente. Por outro lado, Cauli; Morelli, (2002), não evidenciaram a expressão da sensibilização comportamental quando administraram 15mg/kg de cafeína em dias alternados durante duas semanas na gaiola-moradia e testaram a expressão em um ambiente distinto a esse.

A sensibilização comportamental não é uma consequência inevitável à exposição a uma substância que potencialmente possa causar dependência, ou seja, não é um simples fenômeno farmacológico. A indução e a expressão da sensibilização podem ser fortemente moduladas por fatores não farmacológicos, incluindo fatores ambientais associados com a administração da droga, nesse sentido a sensibilização tem sido descrita como um processo associativo (ROBINSON; BERRIDGE, 2001). Por exemplo, é demonstrado que quando ratos são tratados repetidamente com psicostimulantes em ambientes distintos de sua gaiola-moradia e são testados naquele mesmo ambiente, esses desenvolvem sensibilização psicomotora robusta. De forma contrária, muitos ratos não expressam a sensibilização quando analisados em ambiente distinto àquele em que receberam a substância repetidamente. A sensibilização contexto dependente provavelmente decorre da associação de estímulos ambientais com os efeitos positivos da substância psicoativa de abuso, a qual tem sido amplamente demonstrada para substâncias como cocaína e anfetamina (ANAGNOSTARAS; ROBINSON, 1996; ROBINSON et al., 1998; DUVAUCHELLE et al., 2000; ROBINSON; BERRIDGE, 2003, MARIN et al., 2009). Por exemplo, quando anfetamina, cocaína e morfina foram administradas aos animais na caixa de avaliação da atividade locomotora estes desenvolveram sensibilização mais robusta do que quando estes receberam cafeína na gaiola moradia (BADIANI; ANAGNOSTARAS; ROBINSON, 1995a; BADIANI; BROWMAN; ROBINSON, 1995b; BADIANI; OATES; ROBINSON, 2000).

Segundo Robinson; Berridge, (2003), a associação contextual pode aumentar a propriedade da substância em induzir sensibilização. Este fato estaria correlacionado com o porquê dicas ambientais seriam tão importantes para o desenvolvimento da fissura e conseqüente recaída. Baseado nessas observações e

em nossos resultados pode-se supor que o desenvolvimento da sensibilização comportamental à cafeína é contexto-dependente.

Contudo, existem evidências da ocorrência de sensibilização comportamental a outros psicostimulantes que é independente do contexto na qual as substâncias foram administradas. Por exemplo, Marin; Cruz; Planeta, (2008) demonstraram que administração repetida e intermitente de 10mg/kg de cocaína por 5 dias não pareada ao ambiente de teste foi capaz de promover sensibilização comportamental. No mesmo sentido, foi demonstrado que a administração repetida de anfetamina (5mg/Kg) na gaiola-moradia também produziu sensibilização (SANTOS et al., 2009). Nossos resultados sugerem que o desenvolvimento de sensibilização comportamental à cafeína ocorre somente quando esta substância é administrada no mesmo ambiente em que foi realizado o teste locomotor e, este fato pode estar associado ao menor potencial reforçador da cafeína quando comparada a outros psicostimulantes.

A exposição repetida às substâncias psicoativas pode se expressar também como tolerância. No presente estudo demonstramos que tolerância comportamental a cafeína ocorre quando o pré-tratamento foi realizado em um ambiente distinto do teste. De acordo com a literatura tolerância aos efeitos psicostimulantes da cafeína geralmente é induzida através da administração dessa substância em água de beber (CHOU et al., 1985; SVENNINGSSON; NOMIKOS; FREDHOLM, 1999), por meio de minibombas subcutâneas (KAPLAN et al., 1993) ou por um longo período (21 dias) administrações i.p. (LAU; FALK, 1995).

Nossos resultados da expressão de tolerância comportamental estão de acordo com aqueles obtidos por Acquas; Tanda; Di Chiara, (2002). Esses autores demonstraram tolerância aos efeitos psicostimulantes da cafeína após administração de 25mg/kg (i.p.), duas vezes ao dia, durante 7 dias em suas gaiola- moradia. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a tolerância a estimulação psicomotora induzida pela cafeína parece ser evidente quando dicas ambientais não estão presentes.

As neuroadaptações relacionadas à tolerância estão envolvidas na diminuição dos efeitos de uma dose fixa da substância psicoativa de abuso no decorrer do uso prolongado e sintomas da síndrome de abstinência que ocorrem após a interrupção do uso da substância (ROBINSON; BERRIDGE, 2003). Alguns trabalhos demonstram relatos de vários sintomas de abstinência após o uso

prolongado de cafeína em humanos, incluindo apatia, dor de cabeça, ansiedade, diminuição do comportamento motor, tremor e náusea (FREDHOLM et al., 1999).

Embora existam controvérsias quanto ao desenvolvimento de dependência à cafeína, nossos resultados após tratamento repetido demonstram que esta substância induz alterações comportamentais que são semelhantes àquelas induzidas pela anfetamina e cocaína, sugerindo assim o potencial de dependência da cafeína. Nesse sentido, muitos indivíduos relataram sinais e sintomas que preenchem os critérios para diagnóstico de dependência, como por exemplo, consumo de cafeína em maiores quantidades do que o pretendido, esforços mal sucedidos em interromper o uso da substância, síndrome de abstinência na falta da substância e desenvolvimento de tolerância (Hughes et al., 1998). Porém, de forma contrária, Satel, (2006) relata que as características envolvidas no consumo da cafeína são inconsistentes para caracterizarem dependência.

As neuroadaptações (sensibilização ou tolerância) induzidas pelo tratamento prolongado com psicostimulantes resultam de adaptações neuroquímicas e moleculares do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (ROBINSON; BECKER, 1986; NESTLER, 2001). As alterações no sistema dopaminérgico podem ser avaliadas pela determinação das concentrações teciduais de neurotransmissores e seus metabólitos utilizando-se cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção eletroquímica (CHI; ODONTIADIS; FRANKLIN, 1999; MAYERHOFER; KOVAR; SCHMITD, 2001; STROTHER et al., 2005; TSUNODA et al., 2006). Assim, alguns autores analisam apenas as concentrações isoladas da dopamina ou dos metabólitos, para a interpretação dos resultados (OLAZÁBAL et al., 2004; SHIEH; YANG, 2008). Enquanto outros calculam a razão entre os metabólitos e o neurotransmissor (“turnover”) (DAVIS et al., 2008; FESTA et al., 2004). Esse último parâmetro é bastante utilizado e foi adotado no presente estudo, pois reflete a dinâmica da síntese, liberação, recaptção e metabolismo da dopamina (NISSBRANDT; CARLSSON, 1987).

Nossos resultados demonstraram que os animais que receberam pré-tratamento com cafeína pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor apresentaram alterações dopaminérgicas no CPFm, CP e NAc diferentes daquelas apresentadas pelos animais que receberam o pré-tratamento com cafeína em um ambiente distinto de onde foi realizado o teste locomotor.

Assim, nos animais que receberam tratamento pareado observou-se que a injeção aguda de cafeína no dia do teste aumentou de forma significativa o turnover de DA no CPFm, e diminuiu o “turnover” de DA no CP e no NAc, independente do pré-tratamento que eles receberam. Nos animais que receberam pré-tratamento não pareado observou-se que o pré-tratamento com cafeína diminuiu de forma significativa o turnover de DA no NAc.

De acordo com a literatura, pré-tratamento e a injeção aguda de cafeína promovem alterações nas concentrações teciduais de dopamina em áreas encefálicas como, por exemplo, CPFm, CPu e NAc. Nesse sentido, Hadfield; Milio (1989) demonstraram aumento nas concentrações teciduais de dopamina e seus metabólitos no CPFm e estriado após injeção aguda de cafeína. O tratamento crônico com cafeína também aumentou as concentrações teciduais de dopamina no estriado (KIRCH et al., 1990). Entretanto, esses dois estudos usaram doses de cafeína maiores que as doses usadas nesse trabalho (100 e 200 mg/kg injeção aguda e 50 mg/kg/dia no estudo crônico) que não corresponde as doses de cafeína utilizadas em nosso trabalho.

De acordo com os dados fornecidos pela análise estatística não podemos correlacionar as alterações comportamentais obtidas em resposta ao pré-tratamento com cafeína com as alterações dopaminérgicas encontradas no CPFm, CPu e CP. Demonstrações de sensibilização comportamental à cafeína são ainda recentes na literatura e não há resultados sobre a liberação de neurotransmissores em resposta a injeção aguda de cafeína em animais sensibilizados.

Contudo, os mecanismos neuroquímicos envolvidos na sensibilização de psicostimulantes como cocaína e anfetamina já foram bem discutidos, existem muitas evidências de que a administração repetida destes psicostimulantes promove aumento na liberação de dopamina no sistema mesocorticolímbico (PIERCE; KALIVAS, 1997; PONTIERE; TANDA; DI CHIARA, 1995). Nesse sentido, vários estudos demonstraram que o tratamento repetido com cocaína potencializa a liberação de DA e aumenta a sensibilidade dos mecanismos de segundos mensageiros mediados pela DA no NAc (CADONI; DI CHIARA, 2000; NESTLER, 2001). Assim o sistema dopaminérgico parece ser importante para o desenvolvimento da sensibilização comportamental. Neste sentido, era esperado que o pré-tratamento com cafeína também alterasse as concentrações teciduais de

DA no NAc, porém nenhuma alteração nessa região foi evidenciada nesse estudo após o desafio com cafeína.

A literatura é escassa e nosso estudo foi uns dos primeiros a investigar as alterações neuroquímicas relacionadas à sensibilização e a tolerância comportamental induzida pela cafeína, além disso, de acordo com nossas possibilidades foi realizada somente análise tecidual, assim a ausência de relação entre aumento das concentrações teciduais de DA e o desenvolvimento dessas respostas comportamentais induzidas pela cafeína nas áreas encefálicas investigadas, não invalida a hipótese das alterações dopaminérgicas estarem envolvidas no desenvolvimento desses fenômenos.

Por exemplo, alguns estudos utilizando a técnica de microdiálise puderam correlacionar as respostas comportamentais obtidas após tratamento repetido com cafeína com alterações neuroquímicas. Nesse sentido, Quarta et al., (2004) demonstraram que após 14 de administração de cafeína em água ocorreu tolerância da liberação de DA no NAc. Acquas; Tanda; Di Chiara, (2002) evidenciaram também através da técnica de microdiálise que a administração i.p. repetida de cafeína capaz de induzir tolerância comportamental foi acompanhada pela redução de DA no CPFm, enquanto nenhuma alteração na quantidade de DA no NAc foi encontrada.

Dessa forma, a utilização de outras metodologias como microdiálise e também a investigação de possíveis alterações pós-sinápticas poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos relacionados à sensibilização e tolerância comportamental à cafeína.

*CONCLUSÃO*

## 8. CONCLUSÃO

Em nosso estudo, demonstramos que o pré-tratamento com cafeína induziu sensibilização comportamental quando foi pareado ao ambiente onde foi realizado o teste locomotor, porém quando o tratamento não foi pareado ao ambiente do teste locomotor observamos tolerância comportamental. Alterações na atividade dopaminérgica foram detectadas no córtex pré-frontal medial, caudado putamen e núcleo acumbens em resposta ao pré-tratamento e a injeção aguda de cafeína, essas não foram relacionadas às alterações comportamentais. Portanto, de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que a administração repetida de cafeína induz comportamentos adaptativos opostos dependendo do contexto ambiental do tratamento, ou seja, o ambiente pode afetar o efeito das substâncias psicoativas e modular as alterações relacionadas ao uso prolongado de cafeína.



*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUAS, E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. **Neuropsychopharmacology**. v.27, p.182-93, 2002.

ANAGNOSTARAS, S.G.; ROBINSON, T.E. Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. **Behav Neurosci**. v.110, p.1397-1414, 1996.

APGAR, J.L.; TARKA, S.M. Methylxantine composition and consumption patterns of cocoa and chocolate products. In: SPILLER, G.A. Caffeine. 1<sup>th</sup> ed. Florida: CRC Press LLC, 1998, p.163-192.

ARBEIT, M.L. et al. Caffeine intakes of children from a biracial population: The Bogalusa Heart Study. **J Am Diet Assoc**. v.88, p.466-471, 1988.

BADIANI, A.; ANAGNOSTARAS, S.G.; ROBINSON, T.E. The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. **Psychopharmacol**. v.117, p.443-52, 1995a.

BADIANI, A.; BROWMAN, K.E.; ROBINSON, T.E. Influence of novel versus home environments on sensitization to the psychomotor stimulant effects of cocaine and amphetamine. **Brain Res**. v.674, p.291-98, 1995b.

BADIANI, A.; OATES, M.M.; ROBINSON, T.E. Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. **Psychopharmacol**. v.151, p. 273-82, 2000.

BALENTINE, D.A.; HARBOWY, M.E.; GRAHAM, H.N. Tea: The plant and its manufacture; chemistry and consumption of beverage. In: SPILLER, G.A. Caffeine. 1<sup>th</sup> ed. Florida: CRC Press LLC, 1998, p.35-72.

BARRONE, J.J.; ROBERTS, H.R. Caffeine consumption. **Food Chem Toxicol**. v. 34, p.119-129, 1996.

BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. **Annu Rev. Med**. v.41, p.272-88, 1990.

BONATI, M.; LATINI, R.; GALLETTI, F.; YOUNG, J.F.; TOGNONI, G.; GARATTINI, S. Caffeine disposition after oral doses. **Clin. Pharmacol Ther**. v.32, p.98-106, 1982.

BROWMAN, K.E.; BADIANI, A.; ROBINSON, T.E. The influence of environment on the induction of sensitization to the psychomotor activating effects of intravenous cocaine in rats is dose-dependent. **Psychopharmacology**. v.8, p.90-137, 1998.

BUDNEY, A.J.; HIGGINS, S.T.; HUGHES, J.R.; BICKEL, W.K. Nicotine and caffeine use in cocaine-dependent individuals. **J Subst Abuse**. v.5, p.117-130, 1993.

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

CADONI, C.; DI CHIARA, G. Differential changes in accumbens shell and core dopamine in behavioral sensitization to nicotine. **Eur J Pharmacol.** v.387, p.23-25, 2000.

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.

CARDINALI, D.P. Methylxanthines: possible mechanisms of action in the brain. **Trends Pharmacol Sci.** v.1, p.405-407, 1980.

CAREY, R.J.; DAMIANOPOULOS, E.N. Cocaine conditioning and sensitization: The habituation factor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v.84, p.128-133, 2006.

CAREY, R.J.; DAMIANOPOULOS, E.N.; SHANAHAN, A.B. A cocaine memory trace or an anti-habituation effect. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v.90, p.625-631, 2008.

CAULI, O.; MORELLI, M. Subchronic caffeine administration sensitizes rats to the motor-activating effects of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists. **Psychopharmacology.** v. 162, p.246-254, 2002.

CHI, J.D.; ODONTIADIS, J.; FRANKLIN, M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr B Biomed Sci Appl.** v.731, p.361-367, 1999.

CHOU, D.T.; KHAN, S.; FORDE, J.; HIRSH, K.R. Caffeine Tolerance: Behavioral, Electrophysiological and neurochemical Evidence. **Life Sci.** v.36, p. 2347-2358, 1985.

CROMBAG, H.S. et al. The ability of environmental context to facilitate psychomotor sensitization to amphetamine can be dissociated from its effect on acute drug responsiveness and on conditioned responding. **Neuropsychopharmacology.** v. 24, p. 680-90, 2001.

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

DAVIS, J.F. et al. Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. **Behav Neurosci.** V.122, p.1257-63, 2008.

DE LUCA, M.A.; BASSAREO, V.; BAUER, A.; DI CHIARA, G. Caffeine and accumbens shell dopamine. **J Neurochem.** v.103, p.157-163, 2007.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.85, p.5274-5278, 1988.

DUVAUCHELLE, C.L. et al. Effects of cocaine context on NAcc dopamine and behavioral activity after repeated intravenous cocaine administration. **Brain Res.** v.862, p.49-58, 2000.

EHRMAN, R.; ROBBINS, S.J.; CHILDRESS, A.R.; O'BRIEN, C.P. Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. **Psychopharmacology.** v.1992, p.523–9, 2000.

FRAIOLI, S.; CROMBAG, H.S.; BADIANI, M.D.; ROBINSON, T.E. Susceptibility to Amphetamine-induced locomotor sensitization is modulated by environmental stimuli. **Neuropsychopharmacology.** v.20, p.534-541, 1999.

FERRÉ, S. et al. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. **Trends Neurosci.** v.10, p.482-7,1997.

FESTA, E.D. et al. Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels. **Neuropharmacology.** v.46, p.672-87, 2004.

FINK, J. S. et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptor in rat striatum. **Mol. Brain Res.** v.14, p.186–195, 1992.

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

FRAIOLI, S.; CROMBAG, H.S.; BADIANI, A.; ROBINSON, T.E. Susceptibility to amphetamine-induced locomotor sensitization is modulated by environmental stimuli. **Neuropsychopharmacology.** v.20, p.533-41, 1999.

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.

GRAHAN, H.N. Maté. In: SPILLER, G.A. Caffeine. 1<sup>th</sup> 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.

HEIDBREder, C.A.; THOMPSON, A.C.; SHIPPENBERG, T.S. Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. **J Pharmacol Exp Ther.** v.278, p.490-502, 1996.

HERVÉ, D. et al. Gaolf levels are regulated by receptor usage and control dopamine and adenosine action in the striatum. **J. Neurosci.** v.21, p. 4390–4399, 2001.

HETTINGER, B.D.; LEE A.; LINDEN, J.; ROSIN, D.L. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. **J. Comp. Neurol.** v.431, p.331-46, 2001.

HOLTZMAN, S.G.; MANTE, S.; MINNEMAN, K.P. Role of adenosine receptors in caffeine tolerance. **J. Pharmacol.** v.256, p. 62-68, 1991.

HOPE, B.T.; CROMBAG, H.S.; JEDYNAK, J.P.; WISE, R. A. Neuroadaptations of total levels of adenylate cyclase, protein kinase A, tyrosine hydroxylase, cdk5 and neurofilaments in the nucleus accumbens and ventral tegmental area do not correlate with expression of sensitized or tolerant locomotor responses to cocaine. **J Neurochem.** v.92, p.536-545, 2005.

HUGHES, J.R. et al. Endorsement of DSM-IV dependence criteria among caffeine users. **Drug Alcohol Depend.** v.52, p.99-107, 1998.

ISTIVAN, J.; MATARAZO, J.D.; Tobacco, alcohol, and caffeine use: A review of their interrelationships. **Psychol Bull.** v.95, p.301-326, 1984.

JAFFE, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Eds.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** 8<sup>th</sup> ed. New York: Pergamon, 1990, p.523-573.

KAPLAN, G.B.; GREENBLATT, D.J.; KENT, M.A.; COTREAU-BIBBO, M.M. Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding. **J Pharmacol Exp Ther.** V.266, p.1563-72, 1993.

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. Neural mechanisms of drug reinforcement. **Ann N Y Acad Sci.** v.654, p.171-191, 1992.

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

KOZLOWSKI, L.T. et al. Patterns of alcohol, cigarette, and caffeine and other drug use in two drug abusing populations. **J. Subst Abuse Treat.** v.10, p.171-179, 1993.

LAU, C.E.; FALK, J.L.; Dose-dependent surmountability of locomotor activity in caffeine tolerance. **Pharmacol Biochem Behav.** v.52, p.139-43, 1995.

LEE, J.L.C.; MILTON, A.L.; EVERITT, B.J. Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation. **J Neurosci.** v.26, p.5881-7, 2006.

LUNDESBERG, L.S. Caffeine Consumption. In: SPILLER, G.A. Caffeine. 1<sup>th</sup> ed. Florida: CRC Press LLC, 1998, p.199-224.

MACDONALD, R.L.; SKERRIT, J.H.; WERZ, M.A. Adenosine agonists reduced voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. **J.Physiol.** v.370, p.75-90, 1986.

MARIN, M.T.; CRUZ, F.C.; PLANETA, C.S. Cocaine-induced behavioral sensitization in adolescent rats endures until adulthood: Lack of association with GluR1 and NR1 glutamate receptor subunits and tyrosine hydroxylase. **Pharmacol Biochem Behav.** v.91, p.109-114, 2008.

MARIN, M.T.; PARO, A.H.; ZANCHETA, R.; PLANETA, C.S. Comparação da estimulação da atividade locomotora induzida pela cafeína em ratos adultos e adolescentes. In: Reunião Anual Da Federação de Sociedades de Biologia Experimental 19, Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil, 2005.

MARIN, M.T. et al. Context-specific modulation of cocaine-induced locomotor sensitization and ERK and CREB phosphorylation in the rat nucleus accumbens. **Eur J Neurosci.** v.30, p.1931-40, 2009.

MATTSON, B.J. et al. Repeated amphetamine administration outside the home cage enhances drug-induced Fos expression in rat nucleus accumbens. **Behav Brain Res.** v.185, p.88-98, 2007.

MAYERHOFER, A.; KOVAR, K.A.; SCHMITD, W.J.; Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nicleos accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. **Neurosci Lett.** v.308, p.99-102, 2001.

MCPHERSON, P.S. et al. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release chanel. **Neuron.** v.7, p.386-391, 1991.

MORGAN, K.J.; STULTS, V.J.; ZABIK, M.E. Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. **Regul Toxicol Pharmacol.** v.2, p.296–307, 1982.

NEHLIG, A. Are we dependent upon coffe and caffeine? A review on human and animal data. **Neurosc Biobehav Rev.** v.23, p.563-76, 1999.

NESTLER, E.J.; AGHAJANIAN, G.K. Molecular and cellular basis of addiction. **Science.** v.278, p.58-63, 1997.

NESTLER, E.J. Molecular basis of long-term plasticity undelying addiction. **Nature Rev Neurosc.** v.2, p.119-128, 2001.

NISSBRANDT, H.; CARLSSON, A. Turnover of dopamine and dopamine metabolites in rat brain: comparison between striatum and substantia nigra. **J Neurochem.** v.49, p.959-67, 1987.

O'BRIEN, C.P. Dependência e uso abusivo de drogas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (eds). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica.** 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p.465-481.

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.

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

OLAZÁBAL, D.E.; ABERCROMBIE, E.; ROSENBLATT, J.S.; MORRELL, J.I. 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.259-68, 2004.

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.

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

PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Res Brain Res Rev.** v.25, p.192-216, 1997.

PONTIERI, F.E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with “core” of the rat nucleus accumbens. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.92, p.12304-12308, 1995.

POST, R.M.; LOCKFELD, A.; SQUILLACE, K.M.; CONTEL, N.R. Drug–environment interaction: context dependency of cocaine-induced behavioral sensitization. **Life Sci.** v.28, p.755–760, 1981.

POST, R.M.; WEISS, S.R.; FONTANA, D.; PERT, A. Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine. **Ann NY Acad Sci.** v.654, p.386–399, 1992.

QUARTA, D. et al. Opposite modulatory roles for adenosine A1 and A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. **J Neurochem.** v.88, p.1151-1158, 2004.

ROBINSON, T.E.; BECKER, J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain Res.** v.396, p.157-198, 1986.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. **Brain Res Brain Res Rev.** v.18, p.247-291, 1993.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Incentive-sensitization and addiction. **Addiction.** v.96, p.103-114, 2001.

ROBINSON, T.E.; BERRIDGE, K.C. Addiction. **Annu Rev Psychol.** v.54, p.25-53, 2003.

ROBINSON, T.E.; BROWMAN, K.E.; CROMBAG, H.S.; BADIANI, A. Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration. **Neurosci Biobehav.** v.22, p.347-54, 1998.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addict Biol.** v.11, p.2-38, 2006.

SANTOS, G.C. et al. Amphetamine- and nicotine-induced cross-sensitization in adolescent rats persists until adulthood. **Addict Biol.** v.14, p.270-5, 2009.

SATEL, S. Is caffeine addictive? A review of the literature. **Am J Drug Alcohol Abuse.** v.32, p.493-502, 2006.

SCHIFFMAN, S.N.; JACOBS, O.; VANDERHAEGEN, J.J. Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. **J. Neurochem.** v.57, p.1062-1067, 1991.

SCHIFFMAN, S. N.; VANDERHAEGEN, J.J. Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. **J. Neurosci.** v.13, p.1080-1087, 1993.

SHIEH, K.R.; YANG, S.C. Effects of estradiol on the stimulation of dopamine turnover in mesolimbic and nigrostriatal systems by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in female rats. **Neuroscience.** v.154, p.1589-97, 2008.

SIMOLA, N.; CAULI, O.; MORELLI, M. Sensitization to caffeine and cross-sensitization to amphetamine: Influence of individual response to caffeine. **Behav Brain Res.** v.172, p.72-79, 2006a.

SIMOLA, N.; TRONCI, E.; PINNA, A.; MORELLI, M. Subchronic intermittent caffeine amplifies the motor effects of amphetamine in rats. **Amino Acids.** v.31, p.359-363, 2006b.

SITSAPESAN, R.; MCGARRY, S.J.; WILLIAMS, A.J. Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and  $CA^{2+}$  release. **Trends Pharmacol Sci.** v.16, p.386-391, 1995.

SMITH, D.B.; TOLA, K. Caffeine: Effects on psychological functioning and performance. In: SPILLER, G.A. Caffeine. 1<sup>th</sup> ed. Florida: CRC Press LLC, 1998, p.251-301.

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

STROTHER, W.N.; LUMENG, L.; LI, T.K.; MCBRIDE, W.J.; Dopamine and serotonin content in select brain regions of weanling and adult alcohol drinking rat lines. **Pharmacol Biochem Behav.** v.80, p.229-237, 2005.



SVENNINGSSON, P.; NOMIKOS, G.G.; FREDHOLM, B.B. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. **J Neurosci.** v.19, p.4011-4022, 1999.

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

TRONCI, E. et al. Potentiation of amphetamine-mediated responses in caffeine-sensitized rats involves modifications in A2A receptors and zif-268 mRNAs in striatal neurons. **J Neurochem.** v.98, p.1078-1089, 2006.

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

TSUNODA, M. et al. Subacute administration of tributyltin chloride modulates neurotransmitters and their metabolites in discrete brain regions of maternal mice and their F1 offspring. **Toxicol Ind Health.** v.22, p.15-25, 2006.

VEZINA, P.; LEYTON, M. Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. **Neuropharmacology.** v.56, p.160-168, 2009.

WISE, R.A.; BOZARTH, M.A. A psychomotor stimulant theory of addiction. **Psychol Ver.** v.94, p.469-92, 1987.

XIE, X. et al. Expression of striatal adenosine and dopamine receptors in mice deficient in the p50 subunit of NF-kappaB. **Life Sci.** v.81, p.1031-41, 2007.

YOSHIMURA, H. The potential of caffeine for functional modification from cortical synapses to neuron networks in the brain. **Curr Neuropharmacol.** v.3, p.309-16, 2005.