

KATHIANE DOS SANTOS SANTANA

EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE  
SAGUIS (*Callithrix jacchus*)

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte para  
obtenção do título de mestre em  
Psicobiologia

NATAL

2009

EFEITOS DA CAFEÍNA SOBRE A MEMÓRIA DE  
SAGUIS (*Callithrix jacchus*)

KATHIANE DOS SANTOS SANTANA

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte para  
obtenção do título de mestre em  
Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. John Fontenele  
Araújo

NATAL

2009

*"Dedico este trabalho a todos familiares e amigos que me reservaram um pouquinho de atenção e carinho ao longo desses dois anos árduos de trabalho, que apesar de tudo foram de extrema aprendizagem e crescimento pessoal."*

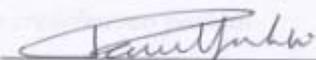
Título: "Efeitos da cafeína sobre a memória de saguis (*Callithrix jacchus*)"

Autora: Kathiane dos Santos Santana

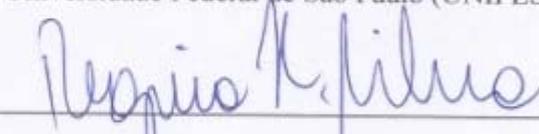
Data da defesa: 05 de junho de 2009.

Banca Examinadora:

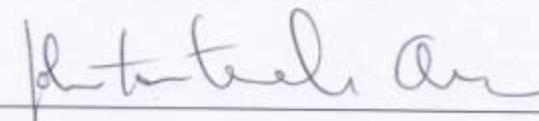
*Dedico este trabalho a todos familiares e amigos que me incentivaram em sua  
atenção e apoio ao longo desses dois anos de trabalho, que apesar de  
de diversas dificuldades e*



Profa. Dra. Paula Ayako Tiba  
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)



Profa. Dra. Regina Helena da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof. Dr. John Fontenele Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Santana, Kathiane dos Santos.

Efeitos da cafeína sobre a memória de saguis (*Callithrix jacchus*) /  
Kathiane dos Santos Santana. – Natal, RN, 2009.  
66 f.

Orientador: John Fontenele Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em  
Psicobiologia.

1. Saguis – Dissertação. 2. Cafeína – Dissertação. 3. Memória –  
Dissertação. 4. Sono – Dissertação. 5. Atividade locomotora –  
Dissertação. I. Araújo, John Fontenele. II. Universidade Federal do Rio  
Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 599.821(043.3)

*"Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação."*

*(John Dewey)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais por me darem esse crédito de confiança. A eles todo meu respeito, amor e carinho eterno.

Aos meus irmãos e demais familiares pelo apoio e incentivo que a mim foram destinados. Sei que algumas vezes brigamos, mas o que nos une são laços bem mais fortes. Adoro todos vocês e meu muito obrigada pelas tantas vezes que eu necessitei e todos estavam lá para me dar uma mão.

Ao meu orientador John, por dar oportunidade, lá em setembro de 2004, a uma estudante de biologia. Apostou, ensinou, reclamou um pouquinho e abriu muitas portas. E cá estou me tornando mestra. Foram anos de dedicação que eu só tenho a agradecer. Espero sempre contar com sua ajuda e parceria neste meu início de carreira como pesquisadora.

A duas excelentes pesquisadoras e professoras que conheci ao longo da minha iniciação científica: A primeira é Verónica Valentinuzzi por me ensinar boa parte do que sei sobre a técnica de condicionamento com saguis. Quantas vezes acordamos cedo e debaixo de chuva para fazer experimentos, e quantas vezes ainda levei uns bons “carões” dela. Mas o que importa foi o quanto aprendi e amadureci ao seu lado. A segunda é Regina Silva. Extremamente paciente e generosa por emprestar sua cafeína para meus experimentos, ela é uma pessoa que sempre me deu toques de como melhorar o projeto, sem falar que foi graças as suas aulas de psicofarmacologia que tive o “insight” para minha linha de pesquisa no mestrado.

Aos meus companheiros e amigos de Laboratório: André Pontes, Breno, Christiane, Fabiano, Patrícia, Rafaela e Renato. Nossas conversas no laboratório e fora dele renderam risadas e discussões interessantes

A todos os funcionários do Núcleo de primatologia: Edinólia, Flávio, Antônio (Tota), Geniberto, Zé Rubens, Márcio, Francisco e Luis. Obrigada por cada um cuidar, na função que lhes são destinados, dos meus “macaquinhos”.

Aos todos os professores e meus companheiros de pós-graduação em Psicobiologia, em especial Fábio, Ronaldo e Nelson, que são amigos pra toda hora, a qualquer momento. Pessoas especiais como vocês são bem difíceis de descrever!

Aos meus queridos amigos Katrine, Juliana e Fernando por tudo e por todos os momentos passados juntos. Nem preciso dizer que vocês são pessoas importantes na minha vida.

A todos os demais amigos... Apesar de não citar em nomes, cada um tem um espaço bem significativo no meu coração, que não é de mãe, mas sempre cabe mais um!

## RESUMO

SANTANA, K.S. (2009). Efeitos da cafeína sobre a memória de saguis (*Callithrix jacchus*). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

A cafeína é considerada a droga psicoativa mais utilizada no mundo, apresentando diversos efeitos centrais e periféricos. No Sistema Nervoso Central, o principal efeito ocorre via bloqueio de receptores para adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>2a</sub>, que mediam a indução do sono de ondas lentas. O bloqueio destes receptores por alimentos ou bebidas que contenha cafeína acarreta em comportamentos como aumento do estado de alerta, ânimo e atividade locomotora. Na memória, os efeitos da cafeína são muito controversos, visto a diversidade de protocolos experimentais e o fato dela não ter o mesmo efeito para todas as fases do processamento da memória – aquisição, consolidação e evocação. Assim, tendo como sujeito o sagui (*Callithrix jacchus*), nosso objetivo foi avaliar os efeitos da cafeína na memória deste primata através do paradigma de preferência condicionada pelo lugar, onde o animal escolhe um contexto devido à presença de comida. Avaliamos também a atividade locomotora. Para o experimento foram utilizados 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) com idade entre 3 e 9 anos, oriundos do Núcleo de Primatologia da UFRN (IBAMA, Nº1/24/92/0039-0). O experimento contou com cinco fases: dois dias de *pré-exposição* ao aparato. *Treinos*, onde os saguis foram condicionados a discriminar um contexto reforçado (CR) de um não-reforçado (CNR) durante 8 dias. Em seguida houve *administração oral* da cafeína ou placebo, ambos a 10mg/kg, por oito dias consecutivos ( $\pm$  1,5 horas antes do início do sono), com distribuição dos animais em grupos: placebo (recebendo a substância placebo) e repetido (ingerindo cafeína). Após isso, foi realizado o *retreino* ao aparato, seguido da administração do placebo (surgindo os grupos abstinência e placebo) ou cafeína aos novos grupos repetido e agudo. Por último, o dia do *teste*, sem o reforço, afim de avaliar o sujeito quanto à aprendizagem ao CR. As sessões no aparato duravam 8 min, e iniciavam às 6:15h para a pré-exposição, treinos e teste. O retreino começou às 15:15h para que a consolidação da tarefa fosse dependente de sono. Os dados comportamentais foram constituídos pelo tempo gasto (em %), frequência de contatos e latência (em segundos) para o primeiro contato no CR e CNR. Na locomoção foram registrados a atividade geral e locomoção em contato com o aparato e fora dele (em quadrantes). Adicionalmente avaliamos possíveis diferenças entre machos e fêmeas na tarefa. Os resultados mostraram que na fase de pré-exposição os animais se habituaram ao aparato e não apresentaram diferença a quaisquer contextos. Nos treinos eles foram capazes de aprenderem a tarefa de condicionamento, independente do sexo. Para o retreino, os 2 grupos exibiram maior interação no contexto reforçado em relação ao não-reforçado. Todavia, na atividade locomotora, animais do grupo repetido se locomoveram de forma semelhante tanto em contato com o aparato e fora dele, enquanto que animais do grupo placebo se locomoveram mais em contato com o aparato. Na fase de teste os saguis que ingeriram cafeína apresentaram maior atividade locomotora em relação ao placebo, corroborando com trabalhos que demonstram aumento na locomoção. Quanto à aprendizagem, os grupos repetido e abstinência tiveram pior desempenho desta tarefa específica se comparado aos animais placebo e agudo. Isso sugere que a administração prolongada da cafeína prejudicou a memória por afetar o sono, que é, em grande parte, responsável pelos processos consolidativos.

Palavras chaves: Cafeína, Saguis, Memória, Sono, Atividade locomotora.

## ABSTRACT

SANTANA, K.S (2009). Effects of caffeine on memory in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Caffeine is considered the most consumed psychostimulant in the world, presenting several central and peripheral effects. In the Central Nervous System the major effect occur by its antagonistic activity at the A<sub>1</sub> and A<sub>2a</sub> subtypes of the adenosine receptors. These receptors are responsible for the slow-wave sleep induction, and their binding, caused by the consumption of foods and beverages that contain caffeine, cause behaviors like increase of alertness, mood and locomotion. The effects of caffeine on memory are still discussed because of the diversity of experimental protocols. Also, it does not have the same effects on all stages of the processing of memory - acquisition, consolidation and recall. Thus, using the marmoset (*Callithrix jacchus*) as subject, we aim to evaluate the effects of caffeine on the memory of this primate through the conditioned place preference paradigm, where the animal selects a context by presence of food. This cognitive task consists of five phases. The first phase was two sessions of pre-exposure, in which they were evaluated for preference for any compartment of the apparatus. Then, we proceeded the training, conditioning the animals to the food-present context for 8 days. Then, there was administration of caffeine or placebo (10mg/kg) for 8 consecutive days, during the pre-sleep phase, where the 20 animals were distributed in two groups: placebo and repeated. The fourth phase was one day of retraining, a re-exposure of the apparatus to the marmosets followed by the administration of caffeine (for the repeated group and a new group called abstinence) or placebo (for placebo and abstinence groups). Finally, was the test where we evaluated if the subjects learned where the food was present. Moreover, in this work we evaluate the existence of differences between females and males on the task, and the locomotor activity for the experimental groups. The results showed that in the pre-exposure phase the animals were habituated on the apparatus and did not present differences for any contexts. In training, they were able to learn the conditioning task, independent of gender. For the retraining, the two groups exhibited more interactions in rewarded context than that in non-rewarded context. Nevertheless, in the locomotor activity, the repeated group moved similarly in contact with the apparatus and outside of it. In the other hand, the animals of the placebo group moved more when in contact with the apparatus. In the test phase, the marmosets under influence of caffeine presented an increase in the locomotor activity when compared with the placebo group, corroborating works that show this increase in locomotion. In the learning evaluation, the continuous and abstinence groups had a bad performance in the task in relation to the placebo and acute groups. This suggests that the prolonged administration of caffeine disrupts the memories because it affected sleep, which is largely responsible offline processing of memories.

Keywords: Caffeine, Common marmosets, Memory, Sleep, Locomotor activity.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	15
A cafeína	15
O sono e a cafeína	20
Memória e cafeína	25
A tarefa cognitiva: o condicionamento de lugar	28
O sagui ( <i>Callithrix jacchus</i> ) como modelo experimental	29
<b>OBJETIVOS:</b> Gerais e específicos	32
<b>METODOLOGIA</b>	33
Sujeitos experimentais	33
Equipamentos e drogas	34
Aparato experimental	35
Delineamento experimental	36
Análise dos dados	40
Análise estatística	40
<b>RESULTADOS</b>	42
Fase de pré-exposição	42
Fase de treino	45
Fase de retreino	48
Fase de teste	52
<b>DISCUSSÃO</b>	56
Fase de pré-exposição	56
Fase de treino	57
Fase de retreino	59
Fase de teste	60

<b>CONCLUSÃO</b>	64
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65
<b>ANEXO I:</b> Planilhas do Excel utilizadas para 1) coleta dos dados comportamentais e de atividade locomotora; 2) armazenamento dos dados.	72
<b>ANEXO II:</b> Resultados complementares. Gráficos de comparação entre machos e fêmeas na tarefa de condicionamento de lugar.	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A<sub>1</sub>** – Receptores para Adenosina do tipo A<sub>1</sub>

**A<sub>2a</sub>** – Receptores para Adenosina do tipo A<sub>2a</sub>

**A<sub>2b</sub>** – Receptores para Adenosina do tipo A<sub>2b</sub>

**A<sub>3</sub>** – Receptores para Adenosina do tipo A<sub>3</sub>

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**CPP** – Conditioned place preference (preferência condicionada pelo lugar)

**CPA** – Conditioned place aversion (aversão condicionada pelo lugar)

**EEG** – Eletroencefalograma

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**REM** – Rapid eye movement (movimento rápido dos olhos)

**SOL** – Sono de ondas lentas

**UFRN** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Estrutura química da cafeína

**Figura 2:** Hipnograma de um indivíduo adulto normal.

**Figura 3:** Cérebro humano num corte sagital. Em destaque a região do prosencéfalo basal.

**Figura 4:** O Saguí (*Callithrix jacchus*).

**Figura 5:** Aparato experimental utilizado para a tarefa de condicionamento de lugar.

**Figura 6:** Esquema do procedimento experimental.

**Figura 7:** 16 dos 18 quadrantes que servem para contagem da atividade locomotora do animal.

**Figura 8:** **a)** Taxa de exploração no aparato, em porcentagem e, **b)** frequência de entradas no aparato durante as habituações.

**Figura 9:** **a)** Taxa de exploração, em porcentagem, **b)** frequência de entradas, e **c)** tempo de latência para a primeira entrada dos contextos a serem reforçados em relação aos não reforçados, durante as sessões de habituação.

**Figura 10:** Frequência de atividade locomotora durante as sessões de habituação.

**Figura 11:** Atividade locomotora geral de machos e fêmeas na pré-exposição.

**Figura 12:** Curva de aprendizagem dos saguis durante a fase de treino.

**Figura 13:** Atividade locomotora dos animais durante as sessões experimentais de treino.

**Figura 14:** Demonstra o quanto fêmeas e machos se movimentaram em contato com o aparato versus fora do aparato.

**Figura 15:** Taxa de exploração **a)** para os últimos três treinos e **b)** para o retreino.

**Figura 16:** Frequência de entrada nos contextos **a)** durante os últimos três treinos e **b)** no retreino.

**Figura 17:** Tempo de latência para o primeiro contato com os contextos **a)** durante os últimos três treinos e **b)** no retreino.

**Figura 18:** Frequência de atividade locomotora durante **a)** os últimos três treinos e **b)** no retreino.

**Figura 19:** Taxa de exploração entre os grupos durante o teste.

**Figura 20:** Frequência de entradas nos contextos durante o teste.

**Figura 21:** Latência para o primeiro contato com os contextos reforçado e não-reforçado durante o teste.

**Figura 22:** Atividade locomotora dos 4 grupos experimentais durante o teste.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** As principais plantas que contém o princípio ativo cafeína.

**Tabela 2:** Quantidade de cafeína presente em algumas bebidas e itens alimentares.

**Tabela 3:** Grupos que foram estudados no experimento.

## **INTRODUÇÃO**

### **A cafeína**

Não há evidências reais sobre a descoberta dos efeitos da cafeína, porém uma das mais aceitas e divulgadas é a do pastor Kaldi, que viveu há cerca de mil anos, na região que hoje é a Etiópia (Neves 1974). Ao observar suas cabras, notou que elas ficavam alegres e saltitantes sempre que mastigavam os frutos dos arbustos existentes em alguns campos de pastoreio, arbustos estes que era o cafeeiro. O pastor notou que as frutas eram fonte de energia e motivação, e com a ajuda delas o rebanho conseguia caminhar por vários quilômetros. Assim, Kaldi comentou sobre o comportamento dos animais com um monge da região, que decidiu experimentar o poder dos frutos e levou consigo até o monastério. Este começou a utilizar os frutos na forma de infusão, percebendo que isto o ajudava a resistir ao sono enquanto orava ou em suas longas horas de leitura. Esta descoberta expandiu-se rapidamente entre os monastérios, criando uma demanda pela bebida. Espalhou-se de tal maneira que hoje ela é considerada a droga psicoativa mais amplamente utilizada no mundo (Fredholm et al. 1999).

A razão dessa popularidade, que ultrapassa os limites culturais e de idade, é devido às propriedades psicoestimulantes da cafeína, como aumento da concentração e cognição (Haskell et al. 2008), melhoria do humor (Smith 2002), aumento do estado de alerta (Rogers et al. 2003), diminuição da fadiga (Fredholm et al. 1999), entre tantos outros. Estes efeitos positivos combinam-se com a ausência (ou quase) de efeitos negativos (Fisone et al. 2004), que são comuns à maioria das droga psicoativas, como as anfetaminas, cocaína e nicotina, que causam com mais frequência efeitos negativos e a dependência mais pronunciada do indivíduo a droga, sem falar nos sintomas de abstinência mais drásticos. Todavia, a cafeína

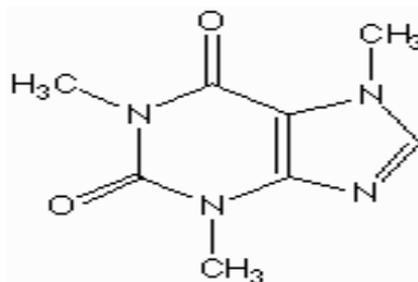
em excesso pode ocasionar alguns sintomas negativos como irritabilidade, agitação, dor de cabeça, insônia e efeitos ansiogênicos (Garett & Griffiths 1997; Kaplan et al. 1997).

Pertencente ao grupo das Xantinas, que são caracterizadas por estimularem o sistema nervoso central, a cafeína foi purificada e isolada em 1820, pelo químico alemão Ferdinand Runge. A 1,3,7-trimetilxantina 3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona (figura 1) é extraída de plantas alcalóides (tabela 1), e encontra-se presente em alguns itens alimentares tais como chocolates e bebidas, como no chá e no café (tabela 2).

PLANTAS	NOME CIENTÍFICO
Folhas e talos do Chá mate	<i>Ilex paraguariensis</i>
Sementes do café	<i>Coffea arabica</i>
Fruto de cacau	<i>Theobroma cacao</i>
Frutos de guaraná	<i>Paulinia cupana</i>
Cola	<i>Cola acuminata</i>

**Tabela 1:** As principais plantas que contém o princípio ativo cafeína.  
Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cafe%C3%ADna> .

Após a ingestão via oral, em condições normais, ela é completamente absorvida no trato gastrointestinal (cerca de 99%) para a corrente sanguínea (Meyer & Quenzer 2005) e o pico de concentração plasmática para humanos é alcançado após 30-60 minutos da ingestão (Lorist & Tops 2003). Decorrida a ingestão oral, a cafeína pode ser encontrada em todo corpo e tem a capacidade de atravessar membranas biológicas, como a barreira hematoencefálica e placentária (Lorist & Tops 2003). Para doses de até 10 mg/kg, a meia-vida desta droga é de 0,7 a 1,2 horas em ratos e camundongos, 3 a 5 horas em macacos (Bonati et al, 1984; 1985), e 2,5 a 4,5 horas em humanos (Arnaud 1987). A biotransformação desta substância ocorre principalmente no fígado, onde este a converte em uma variedade de metabólitos, dos quais 95% destes são eliminados através da urina, 2 a 5% pelas fezes e o restante por meio de fluidos corporais como a saliva (Meyer & Quenzer 2005).



**Figura 1:** Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina 3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona)  
Fonte: <http://www.netdrugs.info/images/moleculas/CAFEINA.gif>.

A cafeína possui uma variedade de mecanismos de ação (Daly & Fredholm 1998), por isso ela é considerada uma droga “suja”, ou seja, que atua inespecificamente e simultaneamente em vários receptores. Devido a esse fato, o estudo com essa substância é difícil tendo em vista que os resultados decorrentes da sua utilização pode ser causado pela diversidade de mecanismos e efeitos.

Apesar da existência desses vários mecanismos, o principal deles quando se procurar estudar o sistema nervoso central acontece via bloqueio de receptores metabotrópicos para adenosina (Daly & Fredholm 1998, Meyer & Quenzer 2005). Atualmente já foram identificados quatro subtipos desse receptor: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, sendo que a cafeína bloqueia potencialmente os subtipos A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (Acquas et al. 2002), os quais encontram-se amplamente distribuídos no cérebro (Lee & Reddington 1986; Palmer & Stiles 1995; Dixon et al. 1996). O subtipo A<sub>1</sub> é mais presente nas camadas corticais, hipocampo e estriado dorsal, e o subtipo A<sub>2a</sub> co-localizado com receptores dopaminérgicos no estriado ventral (Palmer & Stiles 1995; Dixon et al. 1996). Ambos os subtipos mediam a maioria dos efeitos comportamentais da cafeína (Howell & Byrd 1993; Roger et al. 1994), bem como estão ligados à indução do sono de ondas lentas (que será comentado posteriormente). Assim, o bloqueio deles através da cafeína promove os estados comportamentais de ânimo, alerta, vigilância e atenção já mencionados anteriormente.

PRODUTO	VOLUME OU PESO	QUANTIDADE DE CAFEÍNA (mg)
Bebidas		
Café	150 ml	74 – 83
Café descafeinado	150 ml	2 – 3
Chá	150 ml	24 – 30
Cacau	150 ml	4 – 5
Refrigerante de cola normal ou diet	180 ml	26 – 58
Refrigerante de cola livre de cafeína	180 ml	0
Chocolates		
Chocolate doce ou ao leite	28 g	6 – 30
Chocolate preto	28 g	5 – 35
Chocolate quente	28 g	35 – 60

**Tabela 2:** Quantidade de cafeína presente em algumas bebidas e itens alimentares. Adaptado de Meyer & Quenzer 2005.

Outro mecanismo de ação central da cafeína é o aumento indireto da atividade dopaminérgica pelo bloqueio de receptores para adenosina que estão co-localizados com receptores para dopamina (Garett & Griffiths 1997). Ambos os receptores interagem funcionalmente e o bloqueio dos receptores para adenosina pela cafeína em baixas quantidades faz com que os auto-receptores para o neurotransmissor dopamina também estejam bloqueados (Xie et al. 2007). O resultado disso são maiores concentrações de dopamina nos indivíduos que ingeriram a cafeína. Dessa forma, comportamentos dependentes da dopamina serão mais proeminentes e exacerbados. Um desses comportamentos são o aumento da locomoção em roedores e primatas em situações experimentais (Howell et al.

1997; Daly & Fredholm 1998; Fredholm et al. 1999, Ferré 2008), e aumento da sensação de prazer e bem-estar tanto em humanos quanto não-humanos.

Outras formas de ação da cafeína se dão por meio do bloqueio de um subtipo de receptor para o neurotransmissor inibitório GABA (subtipo GABA<sub>A</sub>), fazendo com haja os efeitos psicoestimulantes (Meyer & Quenzer 2005). Ademais, a cafeína estimula o aumento da concentração e liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular do retículo endoplasmático, fato este que é importante para liberação de neurotransmissores como a dopamina (Daly 1993) e para a existência dos efeitos comportamentais decorrentes do uso desta substância. Ainda, o bloqueio dos receptores para adenosina já mencionados pode levar a outros efeitos secundários importantes sobre demais neurotransmissores, incluindo a noradrenalina, serotonina, acetilcolina e glutamato, o que interfere em muitas funções fisiológicas (Fredholm et al. 1999).

Além destes efeitos mais relacionados ao sistema nervoso, a cafeína possui efeitos periféricos em várias regiões do corpo. Entre eles estão: (1) dilatação dos brônquios, sendo por isso utilizado em remédios contra asma (efeito broncodilatador) (Cole et al. 1996), e (2) no tratamento de crises de enxaqueca. Ambos os efeitos citados acima acontecem devido à vasodilatação que a cafeína provoca, com posterior aumento do fluxo sanguíneo para os tecidos em geral. Os vasos sanguíneos cerebrais, por sua vez, apresentam diminuição do calibre, com aumento de sua resistência à passagem do sangue (Barone & Roberts, 1996). Essa propriedade de contrair os vasos cerebrais e dilatação dos tecidos em geral justifica o emprego da cafeína no tratamento de crises de enxaqueca e asma, respectivamente; (3) estimulação do coração, devido ao aumento do aporte sanguíneo para essa região; (4) aumento da excreção urinária (Meyer & Quenzer 2005; Altimari et al. 2006); (5) aumento da força muscular devido ao aumento da quantidade de cálcio disponível para o processo

contrátil na fibra muscular (Cole et al. 1996; Altimari et al. 2006); (6) Age sobre a enzima lipase, uma lipoproteína que mobiliza os depósitos de gordura para utilizá-la como fonte de energia no lugar do glicogênio muscular, tornando assim o corpo mais resistente à fadiga (Altimari et al. 2006), entre tantas outros efeitos periféricos. É importante destacar ainda que em doses muito elevadas a cafeína pode provocar a liberação espontânea de íons cálcio dentro do músculo, desencadeando pequenos tremores involuntários, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (Cole et al. 1996).

A tolerância aos efeitos da cafeína ocorre através do uso crônico, ocasionando adaptações celulares e sendo necessário o aumento da ingestão desta substância por parte de quem a consome (Arnaud 1987). Uma retirada brusca pode provocar sintomas de abstinência, tais como letargia, irritabilidade e dores de cabeça, em um indivíduo com ingestão prolongada de 600 miligramas (6 xícaras de café) ou mais por dia (Cole et al. 1996; Fredholm et al. 1999).

### **O sono e sua relação com a cafeína**

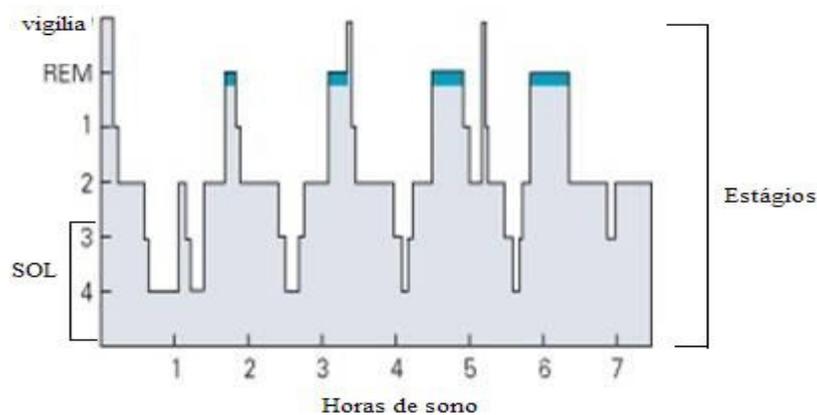
O sono é um estado essencial para a sobrevivência dos humanos e demais animais (Pearlman & Becker 1974; Stickgold et al. 2000; Fenn et al. 2003). Desde os tempos antigos, os humanos se ocupam em estudá-lo como forma de entender um pouco da sua biologia ou ainda de decifrar mitos contidos nos sonhos. Vários relatos a respeito do sono e sonhos foram contados por civilizações antigas e livros históricos. Todavia, eles geralmente não se detinham a dar uma explicação científica para esse fenômeno, ao invés disso, valiam-se de idéias ilógicas e místicas. Um dos primeiro relatos, com certo caráter científico acerca do

sono surgiu na Grécia Antiga com o filósofo Aristóteles e o seu livro “*De Somno*” (Timo-Iaria 2008). Através dele, chegou-se a conclusão que a alma não saía do corpo enquanto dormíamos e os sonhos não se tratavam de bruxas ou demônios nos amedrontando, e sim de um evento natural de grande relação com os acontecimentos que ocorrera durante o dia anterior. Além disso, ele defendeu a idéia de que outros mamíferos, como cães e gatos também eram capazes de sonhar (Timo-Iaria 2008).

Contudo, o que revolucionou o estudo do sono de forma a deixá-lo mais dinâmico foi a descoberta, pelo neuropsiquiatra alemão Hans Berger, de que a atividade elétrica gerada pelo córtex podia ser registrada. Com a utilização de eletrodos fixados no couro cabeludo ou dentro da calota craniana acoplados a um sistema capaz de registrar a variada atividade elétrica, ele criou um aparelho chamado de eletroencefalograma (EEG), no ano de 1929 (Ballone 2005). Antes desse instrumento o que existiam eram apenas indagações e inferências de como a circuitaria cerebral se comportava durante esta fase da vida em que dormimos. Agora o que existem são milhares de trabalhos tendo como foco principal a temática sono.

Anteriormente, este fenômeno fora considerado como um período de interrupção ou cessação do estado da vigília, o qual é prevalente nos animais vertebrados (Kleitman 1987). Porém, o que se considera atualmente a respeito do sono é que ele se trata de um processo ativo envolvendo múltiplos e complexos mecanismos fisiológicos e comportamentais em vários sistemas e regiões do sistema nervoso central (Siegel 2005). Esta fase da vida nos humanos e na maioria dos primatas do Novo e Velho Mundo ocorre em intervalos periódicos, geralmente alocados durante a noite. Ela pode ser caracterizada pela suspensão temporária da atividade perceptivo-sensorial e motora voluntária (Kleitman 1987), por meio de mudanças eletrofisiológicas na atividade cerebral, bem como através de comportamentos específicos, como diminuição da atividade locomotora, movimentação dos olhos, atonia muscular, entre outros (Siegel 2005; Andersen & Bittencourt 2008).

A partir destes indícios, podemos caracterizar dois estados principais (figura 2), que se revezam ciclicamente: sono não-REM e o sono REM (sigla da denominação inglesa Rapid Eye Movement). O sono não-REM é predominante na primeira parte do sono, e tem como evento importante o sono de ondas lentas (SOL), que é caracterizado pela sincronização da atividade neural do córtex, pela diminuição do tônus muscular, dos movimentos corporais, da frequência respiratória, da frequência cardíaca, do metabolismo, da pressão sanguínea e temperatura corporal (Purves et al. 2004). Ademais, é sugerido que no SOL ocorra com maior frequência, em relação à vigília, o processo de reverberação das memórias adquiridas quando os animais estavam acordados (Ribeiro et al. 2004). A reverberação ocorre nas regiões hipocámpais e neocorticais, e tem sido proposto que esse processo colabora na transferência das representações de memórias entre as regiões (Born et al. 2006). Assim, é importante para a memória, a reativação neural e o fortalecimento dos circuitos envolvidos na experiência que os sujeitos passaram anteriormente.



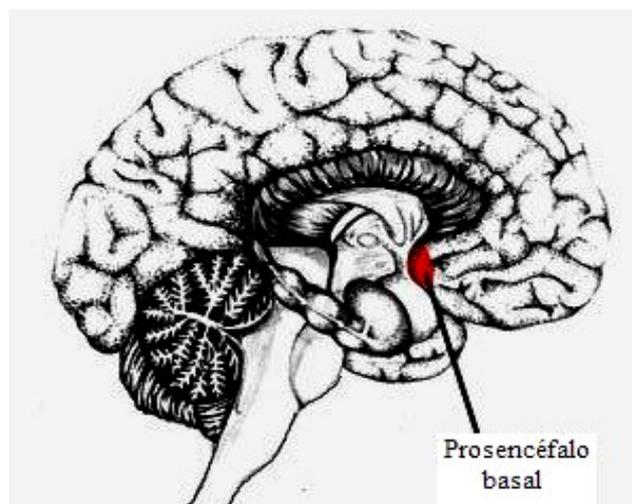
**Figura 2:** Hipnograma de um indivíduo adulto normal. Neste é possível observar os períodos de vigília, sono não-REM (compreendido pelas fases 1, 2, 3 e 4) e REM ao longo do tempo. Adaptado de Kandel et al. 2003.

O sono REM por sua vez, acontece predominante durante a segunda metade do sono em humanos e demais primatas, aves e alguns répteis (Hoshino 2008). Também chamado de sono paradoxal, pois há ocorrência de dessincronização da atividade eletro-cortical semelhante à

vigília. Ele é caracterizado em humanos e alguns modelos animais (mamíferos, aves e alguns répteis) por um padrão de ondas do EEG com frequências variadas e de baixa voltagem, dos movimentos oculares rápidos, e movimentação do restante do corpo geralmente limitada e vinculada aos sonhos (Andersen & Bittencourt 2008).

Para a maioria dos mamíferos encontramos uma distribuição de aproximadamente 75% de sono de ondas lentas e 25% de sono paradoxal ou REM (Lacrampe 2002), e é nesta última etapa que a consolidação das memórias durante a fase de sono geralmente ocorrem. Segundo Rauchs et al. (2005), quanto maior a complexidade da tarefa maior é o período de REM do sujeito, pois o processamento da consolidação seria mais demorado por envolver um maior número de neurônios.

Quanto aos mecanismos fisiológicos que induzem o sono, embora ainda não sejam conhecidos todos os processos, sabemos que o aumento de adenosina no cérebro é um dos mecanismos fundamentais (Basheer et al. 2004). Este aumento ocorre mais precisamente na região do prosencéfalo basal (figura 3), onde a adenosina atua como um modulador no controle do ciclo vigília-sono (Mackiewicz et al. 2003).



**Figura 3:** Cérebro humano num corte sagital. Em destaque a região do prosencéfalo basal.

Fonte: [http://web.bvu.edu/faculty/ferguson/Course\\_Material/BioPsych/Chpt9\\_Sleep\\_Dreams.html](http://web.bvu.edu/faculty/ferguson/Course_Material/BioPsych/Chpt9_Sleep_Dreams.html)

A adenosina, no sistema nervoso central, é geralmente um neuromodulador inibitório de neurônios como os dopaminérgicos, colinérgicos e gabaérgicos (sendo os dois primeiros excitatórios e o último inibitório). Hipotetisa-se que esta substância se acumula extracelularmente durante a vigília e atua localmente nos terminais pós-sinápticos (Porkka-Heiskanen et al. 2002) ocasionando a indução do sono. A adenosina é um componente da molécula de ATP (adenosina trifosfato), e a quebra desta última serve nos processos metabólicos do indivíduo, pois fornece energia para as mais diversas funções celulares. Assim, ao utilizar-se o ATP haverá a produção de subprodutos, incluindo a adenosina. E como ao longo do dia do indivíduo muitas moléculas de ATP são utilizadas, proporcionalmente muitas unidades de adenosina ficam acumuladas nas fendas sinápticas no início do período de repouso (Mackiewicz et al. 2003), causando inibição de neurônios excitatórios promotores da vigília. Por isso que no final do dia sentimos cansados e sonolentos. Passada a noite de sono, grande parte da adenosina será metabolizada para o meio intracelular, por meio de transportadores de nucleosídeos (para, por exemplo, a produção de novas moléculas de ATP) ou ainda será excretada para fora do corpo. Dessa forma os níveis de adenosina ficarão reduzidos o suficiente para que a inibição dos neurônios promotores da vigília termine e então acordemos (Porkka-Heiskanen et al. 2002; Meyer & Quenzer 2005).

Como a adenosina é indutora do sono e a cafeína bloqueia os receptores para este neuromodulador, então a ingestão de cafeína antes de dormir deixará o indivíduo por mais tempo acordado. Sugere-se que se deva ao fato dos sujeitos metabolizarem mais lentamente esta substância quando estão para dormir, em relação ao que estão em vigília (Levy & Zylber-Katz 1983). Assim, ao ingerir cafeína numa fase pré-sono consideráveis mudanças nas variáveis da polissonografia serão vistas, como a latência prolongada para entrar no sono de ondas lentas com a posterior redução da mesma; diminuição na eficiência do sono; e, aumento de despertares durante o sono (Drapeau et al. 2006; Paterson et al. 2007). Também foi

demonstrado que a cafeína pode causar perturbações no sono em ratos, resultando num decréscimo no tempo total de sono e aumento na latência para iniciar o sono de ondas lentas, indicando um possível modelo animal de insônia (Schwierin 1996; Shinomiya et al. 2004). Então, foi a partir desses e demais estudos que os pesquisadores supõem que a cafeína interfere com os mecanismos modulatórios na regulação do sono (Fredholm et al. 1999).

### **Memória e cafeína**

Um comportamento é o resultado da interação entre genes e ambiente. E um dos mecanismos pelos quais o comportamento é alterado é a formação de memória e a aprendizagem (Kandel et al. 2003). A aprendizagem é o processo de aquisição de informações em que há mudanças comportamentais. Nesta etapa, os estímulos externos são transmitidos pelas vias sensoriais e armazenados em um sistema transitório. Já a memória é a capacidade de adquirir e armazenar informações que posteriormente poderão ser evocadas ou recuperadas (Tulving 1995), uma vez que estas encontram-se estáveis e consolidadas (Tomaz 1993). Estes dois componentes são essenciais para a sobrevivência, pois a partir deles é que o indivíduo poderá adaptar-se ao meio, bem como modificar comportamentos em função de experiências anteriores.

A memória não é uma entidade singular, ela consiste de muitas fases separadas que depende de diferentes sistemas cerebrais, os quais interagem entre si (Squire & Zola-Morgan 1996; Squire 2004). Nela, podemos identificar três fases fundamentais: aquisição, consolidação e evocação. A primeira fase refere-se à entrada de um evento qualquer nos sistemas neurais associados à memória, como objeto, som, acontecimentos, pensamentos,

emoções, comportamentos, etc. Alguns desses eventos podem ser esquecidos imediatamente outros podem ser armazenados por um curto ou longo período de tempo (Lent 2004). Quando um evento é memorizado por um tempo prolongado, diz-se que ocorreu um processo de consolidação. Neste uma memória temporária (que não depende da memória de curto-prazo) é convertida em uma forma permanente, por meio de conexões entre os lobos temporais mediais e áreas neocorticais (McGaugh 2000). Já a evocação diz respeito à recuperação de memórias já consolidadas (Born et al. 2006), as quais podem ser expressas sob duas formas: uma primeira de maneira verbal (declarativa) para humanos, ou relacional para não-humanos dado o aspecto relacional da memória declarativa. Por sua vez, uma segunda forma é por meio não-verbal (não-declarativa), onde o sujeito evoca as memórias através de atos, reflexos, desempenho motor ou resposta emocional (Squire 2004).

Tendo em vista o caráter da memória não só para a vida dos humanos, mas também para os demais animais que a possuem, é interessante saber como a substância em estudo pode atuar ou interferir nas fases do processo mnemônico. Já foi visto nos tópicos anteriores que a cafeína tem vários efeitos centrais e periféricos no sujeito, devido esta ser uma droga de "ação suja". Por isso são contraditórios alguns resultados da ação da cafeína (Angellucci et al. 1999). A maioria dos estudos a respeito mostram efeitos benéficos na memória de curto e longo-prazo em ratos (Angelucci et al. 2002) e humanos (Koppelstaetter et al. 2008), sem falar na melhoria das tarefas de esquiva passiva ou inibitória também para ratos (Suzuki et al. 1993; Kopf et al. 1999; Pereira et al. 2002). Entretanto, outros trabalhos não mostram nenhum efeito na memória em humanos (Loke 1990); ou que prejudicam, em altas doses a memória de humanos e ratos (Hindmarch et al. 2000).

Sugere-se esses efeitos controversos pelo fato dessa substância não apresentar efeitos positivos em todos os tipos de memória e que estes efeitos podem não ser os mesmos para todas as fases do processamento da memória – aquisição, consolidação e evocação (Angelucci

et al. 1999). Além do que, os vários tipos de tarefas cognitivas empregadas e protocolos experimentais também colaboram para a diversificação dos resultados.

Uma das grandes dificuldades para quem estuda os efeitos da cafeína na memória é o fato de a maioria dos trabalhos focarem apenas os efeitos da administração aguda no desempenho. Poucos ressaltam conjuntamente os efeitos agudos, crônicos e de abstinência na memória, e principalmente em primatas, como é o nosso caso. Ademais, outro problema é qual quantidade certa deve-se administrar com o intuito de verificar algum efeito na memória. Como é sabido, efeito dela é representado por uma curva em forma de U invertida. Estima-se que doses psicoestimulantes baixas, em torno de 10 a 15 mg/kg cause melhora no desempenho cognitivo em ratos (Angelucci et al. 2002) e macaco rhesus (Buffalo et al. 1993), aumento da atenção e alerta, além do aumento de comportamentos relacionado a neurotransmissão da dopamina, como a atividade locomotora (Fisone et al. 2003). Já em doses muitas altas, entre 30 e 60 mg/kg (Fredholm et al. 1999), tem-se efeitos depressores, como déficits na memória e hipolocomoção. Acima disso (>60 mg/kg) as doses podem ser deletérias ou até fatais (Fredholm et al. 1999). Por isso, conhecer o efeito dual da cafeína é importante para obter o resultado desejado.

Os efeitos da cafeína ainda podem acontecer de forma indireta na memória. Um deles ocorre via perturbação na fase de sono. Como a maioria dos eventos consolidativos ocorrem neste período (Rasch & Born 2007) e esta substância atua de forma a aumentar a latência para entrar em repouso (Drapeau et al. 2006), é provável que a ingestão antes de dormir acarrete em algum malefício na consolidação e recordação da memória tanto para humanos quanto para os demais animais. Outra forma indireta ocorre devido ao estado de ansiedade que doses elevadas ou os efeitos da abstinência podem provocar (Garett & Griffiths 1997). Ao ficar com níveis além do normal de cortisol (ou corticosterona para roedores), o indivíduo tende a se concentrar menos na tarefa. Com isso ela erra mais e não aprende corretamente o que lhe fora

ensinado, tendo um desempenho aquém quando comparado a sujeitos sem efeitos ansiogênicos.

### **A tarefa cognitiva : o condicionamento de lugar**

Nas décadas de 20 e 30, o psicólogo americano Burrhus Frederic Skinner propôs uma metodologia com base no condicionamento - processo de aprendizagem e modificação de comportamento através de mecanismos estímulo-resposta sobre o indivíduo, o qual ele denominou de condicionamento operante (Ferreira 2004). Este foi chamado de operante porque o pesquisador era quem modelava o comportamento com o intuito de o animal realizar a resposta esperada. O instrumento fundamental desta metodologia de Skinner é a modelagem do comportamento por meio do reforço, que pode ser positivo (uma recompensa) ou negativo (ação que evita uma consequência indesejada). É o caso do rato privado de alimentação que, numa experiência, percebe que o acionar de uma alavanca levará ao recebimento de comida. Ele tenderá a repetir o movimento cada vez que quiser saciar sua fome.

O paradigma de condicionamento, que inicialmente fora realizado com pombos e ratos, tornou-se tão estabelecido que pode ser estendido aos primatas não-humanos e humanos de forma eficaz. Com isso, ao longo dos anos, esta metodologia para avaliar aprendizagem tomou várias direções, a qual uma delas é o condicionamento de lugar.

Este tipo de condicionamento é uma técnica comumente utilizada para avaliar preferência por um estímulo ambiental que tem sido associado de duas maneiras: a um reforço positivo, sendo chamado de preferência condicionada por lugar (do inglês CPP – Conditioned place preference); ou negativo, o qual recebe o nome de aversão condicionada por lugar (CPA – Conditioned place aversion). Em geral este procedimento de condicionamento envolve

muitas tentativas onde o animal é apresentado a um reforço (como comida, odores, drogas de abuso, choque) e este é pareado a um ambiente. Posteriormente espera-se que os sujeitos frequentem e permaneçam por mais (ou menos) tempo no compartimento onde fora associado com o estímulo positivo ou negativo. Estas variáveis (frequência e permanência), bem como a latência para o primeiro contato com o ambiente reforçado servem como um indicativo de preferência ou aversão e, portanto, são medidas de aprendizagem. Nos trabalhos de CPP realizados com hamsters (Ralph et al. 2002 e Cain et al. 2004a), ratos (Cain et al. 2004b) e saguis (Valentinuzzi et al. 2008) demonstraram, através das variáveis de aprendizagem acima citadas, que estas três espécies de mamíferos foram capazes de associar um cheiro agradável ou a presença de comida a um determinado ambiente.

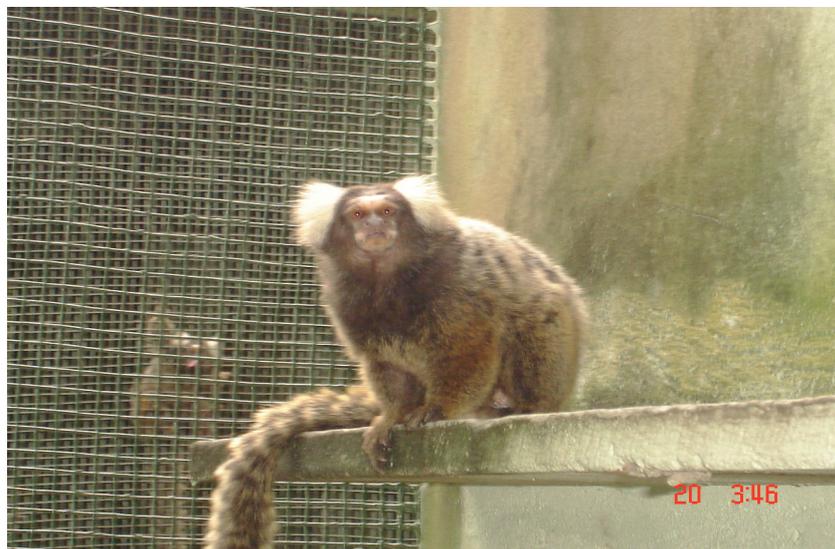
Neste trabalho em especial utilizaremos a preferência condicionada por lugar, onde parearemos um contexto a uma situação agradável, que será a presença de alimentos apreciados pelos animais (jujuba, leite condensado, bolacha doce e larvas do inseto tenébrio [Classe Coleptera]). Valentinuzzi et al. (2008) e Santana et al. (2009), demonstraram que os saguis foram capazes de associar alimentos a um ambiente espacialmente diferente do outro. Assim, esse pequeno primata passou a fazer parte dos modelos animais utilizados para tarefas de condicionamento de lugar.

### **O sagui (*Callithrix jacchus*) como modelo experimental**

É um pequeno primata neotropical que ocorre naturalmente no nordeste brasileiro, da Bahia ao Maranhão (Napier & Napier 1967; Ávila-Pires 1969), e que existe em abundância no Rio Grande do Norte. Pertencente à família *Callitrichidae* e ao gênero *Callithrix*, eles são um dos menores macacos do mundo, medindo entre 18 cm de comprimento e cerca de 30 cm de

cauda e peso corporal de menos de 500 g quando adultos. Devido sua fácil e barata manutenção e boa adaptação em cativeiro (Epple 1970) eles são constantemente utilizados em pesquisas como sujeitos experimentais em várias áreas (Abbott et al. 2003): nutrição, toxicologia, fisiologia, endocrinologia, farmacologia, cronobiologia, comportamento, neurociência entre tantos outros.

Os saguis (figura 4) são animais de hábitos estritamente diurnos e a principal característica corporal que distingue esta espécie das demais do seu gênero são os tufos de pêlos longos e brancos que saem ao redor de cada orelha e a cauda não preênsil marcada com anéis de pêlos brancos e pretos (Guerra et al. 1998). Os machos e fêmeas dessa espécie possuem isomorfia quanto as características fenotípicas, diferenciando-se apenas ao olhar a genitália (Epple 1970), e na natureza alimentam-se principalmente de insetos, goma de árvores e frutas. Além disso, podem ter até quatro filhotes por ano, visto que a gestação dura em torno de 5 meses, com partes comumente gemelares.



**Figura 4:** O Saguí (*Callithrix jacchus*).  
Foto: Kathiane dos Santos Santana.

Quanto ao período de repouso (sono), o mesmo se recolhe para sua toca ou árvore ao pôr-do-sol, e acordando próximo ao nascer do sol (Stevenson & Rylands 1988). Com isso tem-se mais ou menos um período de 12 horas de sono. Outro fato interessante é que eles possuem o sono semelhante ao dos humanos, no que diz respeito, por exemplo, a duração, número e padrão de ciclos de sono não-REM e REM. (Crofts et al. 2001; Phillipens et al. 2004).

Já no que diz à utilização dos saguis como modelos experimentais em memória, é recomendável o uso deles a partir dos 18 meses, período em que são considerados adultos (Abbott et al. 2003). Dessa forma tem-se a garantia que toda circuitaria cerebral relacionada aos processos mnemônicos estejam maduros.

Além disso, pelo fato deles terem uma grande proximidade filogenética para com os humanos, pois ambos compartilham a mesma ordem (primatas), sua relevância para o estudo em questão é ainda maior se comparado a modelos animais constantemente utilizados que são os roedores. O sagui, portanto, assemelha-se em uma série de mecanismos fisiológicos o que nos serve como um bom sujeito quando o objetivo é compreender, comparativamente, o que se passa no corpo humano.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Nosso objetivo foi o de avaliar os efeitos da cafeína em saguis adultos cativos numa tarefa de aprendizagem. A substância em questão fora administrada em três situações diferentes (aguda, continua e abstinência), num período próximo à fase de sono dos animais.

### **Objetivos específicos**

- . Avaliar se os animais respondem satisfatoriamente à tarefa cognitiva antes da administração da cafeína;
- . Avaliar o efeito da cafeína em uso repetido e agudo na evocação da memória em tarefa de condicionamento de lugar;
- . Avaliar o efeito de abstinência da cafeína após uso repetido na evocação da memória em tarefa de condicionamento de lugar;
- . Verificar a atividade locomotora dos saguis nas situações experimentais;
- . Avaliar possíveis diferenças no condicionamento e no efeito da cafeína entre machos e fêmeas.

## METODOLOGIA

### Sujeitos experimentais:

Foram utilizados 20 saguis adultos cativos (10 machos e 10 fêmeas) oriundos do Núcleo de Primatologia da UFRN (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, n°. 1/24/92/0039-0). Eles pesavam entre 350 a 480g, variando entre 3 e 9 anos, e foram mantidos em gaiolas individuais (220 cm comprimento x 90 cm largura x 220 cm altura), sob condições naturais de iluminação, umidade e temperatura. A alimentação era oferecida duas vezes ao dia: a primeira em torno das 7:00 – 8:00 h consistindo de uma mistura de leite, ovos cozidos, pão, vitaminas A, B e C e aminoácidos; e a segunda por volta das 13:00 -14:00 h a qual alternava entre uma variedade de frutas, batata doce e pedaços de frango. O alimento permanece nas gaiolas durante duas horas, após o qual é retirado e a água encontra-se sempre disponível ao animal. Cada gaiola tem uma caixa ninho retangular de madeira (32cm comprimento X 15cm altura X 15cm largura) , bem como poleiros e plataformas para que eles possam pular e correr. Os 20 sujeitos foram divididos em 4 grupos, com 5 animais cada, de acordo com a tabela 3 abaixo:

<b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>SEXO DOS ANIMAIS</b>	<b>DOSE REPETIDA (8 dias)</b>	<b>(9º DIA)</b>
1. Placebo (controle)	3 machos e 2 fêmeas	placebo	placebo
2. Agudo	2 machos e 3 fêmeas	placebo	agudo
3. Repetido	2 machos e 3 fêmeas	caféina	caféina
4. Abstinência	3 machos e 2 fêmeas	caféina	placebo

**Tabela 3:** Grupos que foram estudados no experimento.

A dose repetida constou da administração de cafeína ou placebo, por um período de 8 dias. Já no nono dia houve a ingestão de cafeína (para os grupos agudo e repetido) e placebo (para os grupos abstinência e placebo). Todas essas administrações ocorreram num período próximo à fase de sono dos animais, conforme esquema que será mostrado posteriormente na figura 6.

### **Equipamentos e droga:**

Para o experimento em questão foram utilizados notebook (IBM) e câmera filmadora (Sony). Eles serviram para o registro comportamental das sessões em que houve a utilização dos aparatos experimentais.

Já a cafeína (Sigma), em tratamento contínuo e agudo, foi administrada em doses de 10 mg/kg para cada sagui, o que corresponde de 2 a 3 xícaras de café para humanos (Fredholm et al. 1999). Essas doses foram pesadas e calculadas tendo como base a pesagem mais recente que estava contida no histórico de cada sagui. As porções de cafeína estiveram sob forma de pó e foram colocadas numa pequena porção de fruta, jujuba, uva-passa ou leite condensado, que em seguida o pesquisador ofertava aos animais previamente privados de sua alimentação (cerca de duas horas de privação), para assim ter-se a certificação que ingeriram toda cafeína ali contida. A diversidade de alimentos que foram fornecidos aos sujeitos deveu-se ao gosto amargo da cafeína. Então para eliminar a possibilidade deles associarem o gosto amargo da cafeína ao alimento, havia então as mudanças no tipo de alimento. Ao término da administração o alimento habitual do período da tarde foi colocado na gaiola dos sujeitos. O placebo, por sua vez, constitui-se de amido, o qual esteve na mesma concentração das doses de cafeína (10 mg/kg). O fato de escolhermos 10 mg/kg de cafeína nesse experimento decorre

de estudos anteriores (Howell & Landrum 1997) mostrarem que esta seria a dose limiar capaz de promover efeitos psicoestimulantes em primatas, como chimpanzés.

#### **Aparato experimental (figura 5):**

O aparato experimental para o condicionamento de lugar foi utilizado durante as sessões de habituação, treino, retreino e teste (a serem discutidos no próximo tópico). Ele é feito de acrílico e consiste de uma pirâmide de base quadrada (0,40 m x 0,33 m de base e 0,46 m de altura) ligada a um cubo (0,31 m de lado), por meio de um corredor (paralelogramo de 0,16 m x 0,25 m x 0,14 m). O corredor possui em seu topo uma entrada retangular (0,10 m x 0,11 m), o que permite acesso do animal ao interior do aparato. Para alocar a recompensa, durante as fases de treino e retreino, dois tubos pretos de filme fotográfico (5 cm de altura e 2,8 cm de diâmetro) foram usados com a finalidade de não permitir que os animais vejam o reforço do lado de fora do aparato. Esta caixa experimental apresentou-se sob duas versões, o que permitiu a rotação da pirâmide e do cubo, que são contextos espaciais diferentes, entre os dois lados (esquerda-direita) de forma randômica.



**Figura 5:** Aparato experimental utilizado para a tarefa de condicionamento de lugar.  
Foto: Kathiane dos Santos Santana.

### **Delineamento experimental:**

Antes da introdução da substância, os animais foram habituados e treinados ao aparato. Vale salientar que a alimentação dos saguis pela manhã (entre 7:00 – 8:00 h) era apenas oferecida após o término de cada sessão experimental, e a alimentação do período da tarde (14:00 – 15:00 h) após a administração da cafeína ou placebo, para que assim tivessem motivação para explorar o aparato e ingerirem as substâncias, respectivamente.

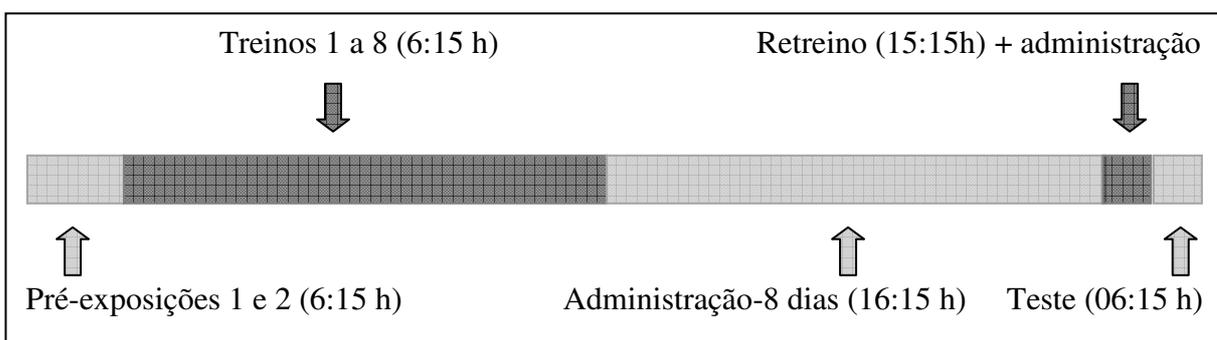
O experimento contou com cinco fases (figura 6): pré-exposição, treinos, administração da cafeína ou placebo, retreino seguido da administração, e o teste. Nos dois primeiros dias ocorreram as sessões de pré-exposição ao aparato, sem nenhum reforço. Neste, avaliamos a neutralidade para os dois contextos e a resposta exploratória dos sujeitos a estímulos novos. Nos 8 dias subsequentes houve as sessões de treinos (condicionamento propriamente dito), onde os animais receberam o reforço positivo por todos estes dias sempre em um dos contextos que foram previamente selecionados randomicamente – o contexto reforçado. Assim, nesta fase pretendeu-se gerar preferência por um dos contextos. Tanto a pré-exposição quanto os treinos iniciaram às 6:15 h, com 8 minutos de duração para cada animal.

Após as pré-exposições e treinos, a administração da cafeína ou placebo (tendo cada grupo 10 animais) se deu por um período de oito dias, a partir das 16:15 h, e a apresentação dos aparatos aos saguis foram temporariamente suspensas. O tempo de administração em questão foi selecionado pelo fato de ser próximo ao final de atividade dos animais, que é ao pôr-do-sol (Stevenson & Rylands 1988; Menezes et al. 1993). Dessa forma, tendo como referência o pico de concentração de cafeína plasmática em humanos, que é cerca de 30-60 minutos após ingestão (Hindmarch et al. 2000), a concentração máxima da substância nos saguis ficaria bem próxima ao início do repouso, que é cerca de 16:45 h (Menezes et al. 1993). Já a quantidade de dias para administração da cafeína foi definida com a finalidade de

não provocar efeitos pronunciados de abstinência aos animais que irão ser submetidos à droga.

No nono dia (após as administrações repetidas de cafeína ou placebo), o aparato experimental foi reintroduzido na gaiola dos sujeitos (retreino), como forma de se lembrarem do condicionamento e também para verificar se já existe algumas diferenças entre os grupos que receberam repetidamente a cafeína ou placebo. A tarefa comportamental no retreino iniciou às 15:15 h, com duração de 8 minutos, com o reforço continuando no braço em que estivera antes da interrupção. Quando todos os animais finalizavam esta sessão experimental (em torno de 16:15 – 16:30 h) eles receberam uma porção de alimento contendo a dose aguda de cafeína (originando os grupos repetido e agudo) ou o placebo (com os grupos placebo e abstinência). Essa mudança de horário durante o retreino foi sugerida com a finalidade de a consolidação dessa tarefa cognitiva não sofrer interferências de outras atividades que o animal faça durante o dia, e também com o intuito desta sessão ser uma tarefa dependente de sono.

No décimo dia, começando às 6:15 h, houve o teste no aparato sem o reforço alimentar no contexto reforçado, com o intuito de verificar a preferência do animal, e por conseguinte a aprendizagem ao contexto entre os os quatro grupos experimentais (placebo, agudo, repetido e abstinência).



**Figura 6:** Esquema do procedimento experimental. Nesta são mostradas as sessões experimentais, a quantidade de dias e o horário que se inicia cada fase.

Nas fases que tem-se a utilização do aparato experimental (pré-exposição, treinos, retreino e teste) os saguis eram livres para entrarem e saírem a qualquer momento dos 8 minutos das sessões experimentais. Nestas fases, foram quantificados o tempo transcorrido (em segundos) para o animal entrar nos contextos reforçado e não-reforçado - latência; frequência de entradas nestes objetos; e a porcentagem do tempo de permanência que o animal ficou em cada contexto, levando-se em consideração os 8 minutos do experimento. Também avaliamos a atividade locomotora dos animais, por meio da delimitação de 18 quadrantes na gaiola e no aparato experimental (figura 7). Todos os parâmetros citados foram registrados através de uma macro do programa Excel.

A cada sessão realizada com um sagui o aparato foi higienizado, através da utilização de água e álcool (concentração a 5%) e papel toalha. Assim, evita-se os odores e a marcação de cheiro do animal anterior, que pode vir a atrapalhar na resposta do sujeito posterior.



**Figura 7:** 16 dos 18 quadrantes que servem para contagem da atividade locomotora do animal. A saber: 1) plataforma esquerda, 2) plataforma direita, 3) grade frente (não mostrada na figura), 4) grade atrás, 5) atrás do aparato, 6) em cima do quadrado, 7) em cima do corredor, 8) em cima do triângulo, 9) dentro do triângulo, 10) dentro do corredor, 11) dentro do quadrado, 12) contato com o triângulo, 13) contato com o corredor, 14) contato com o quadrado, 15) em frente ao triângulo, 16) fora do contato visual do pesquisador (não mostrado na figura), 17) em frente ao corredor, 18) em frente ao quadrado.

## **Análise dos dados**

A coleta dos dados comportamentais foram realizadas no momento do experimento através de uma macro elaborada no Excel 2007 (Microsoft Inc.) (Anexo I), a qual registrou a duração de cada comportamento. Consideramos que os saguis entraram ou saíram do contexto quando a cabeça e os membros anteriores atravessaram os limites de cada ambiente.

Ao finalizar os oitos minutos de observação, os dados provenientes desta macro foram repassados a uma outra planilha do Excel (Anexo I). Ela mostrava a quantidade de vezes e tempo de permanência (posteriormente transformado em taxa de exploração) que o animal passou nos contextos reforçado e não-reforçado e do lado de fora do aparato. Esta planilha ainda ofereceu os dados do tempo decorrido do início da sessão ao início da interação com cada contexto (latência).

A quantificação da atividade locomotora para cada animal se fez através dos vídeos que foram gravados para todas as sessões experimentais. Para a atividade locomotora, delimitamos quadrantes na gaiola e no aparato, num total de 18 padrões (figura 5), e cada vez que o sujeito atravessou de um para o outro quadrante esta frequência foi computada. O registro deste último comportamento citado foi também feito por meio da macro gerada pelo programa Excel.

## **Análise estatística**

No presente estudo, para avaliar preferência condicionada por lugar, duas metodologias foram empregadas para quantificar o desempenho dos animais: (1) a avaliação comportamental da tarefa e 2) a atividade locomotora.

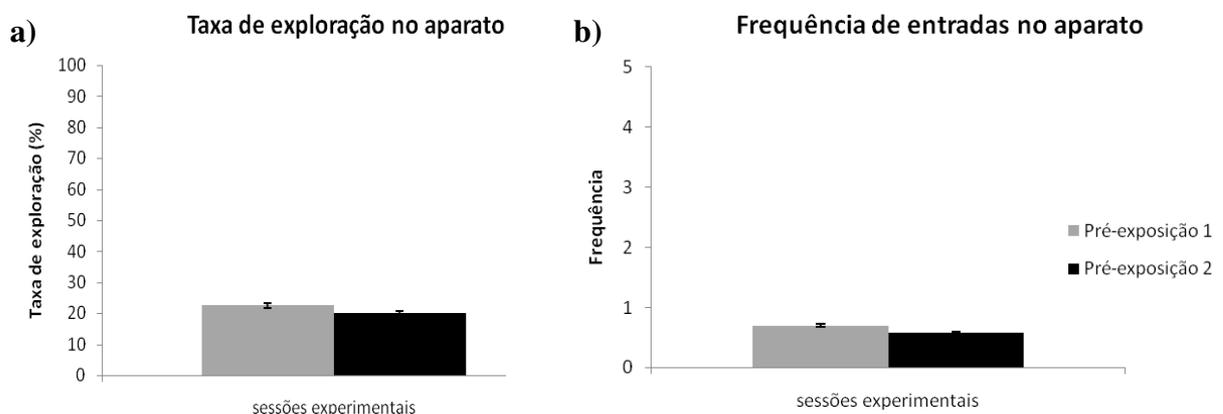
Na avaliação comportamental da tarefa, as variáveis *taxa de exploração*, *frequência* e *latência* não obedeceram a uma distribuição normal, de acordo com o teste de *Kolmogorov-Sminov*, que foi significativo ( $p < 0,05$ ) para uma distribuição não-normal. Por isso os dados foram analisados através dos testes não-paramétricos de *Wilcoxon* (comparando diferenças intra-grupo), e *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* (comparando diferenças entre grupos). Por outro lado, como a atividade locomotora seguiu uma distribuição normal, empregamos o teste *t* para medidas dependentes e independentes. Os gráficos resultantes foram construídos pelo programa Excel 2007 (Microsoft Inc.), através da média e erro padrão dos parâmetros em estudo. Os resultados foram significativos quando o  $p \leq 0,05$ , a uma significância de 95% e as barras presentes nos gráficos correspondem aos erros padrões de cada média.

## RESULTADOS

### Fase de pré-exposição

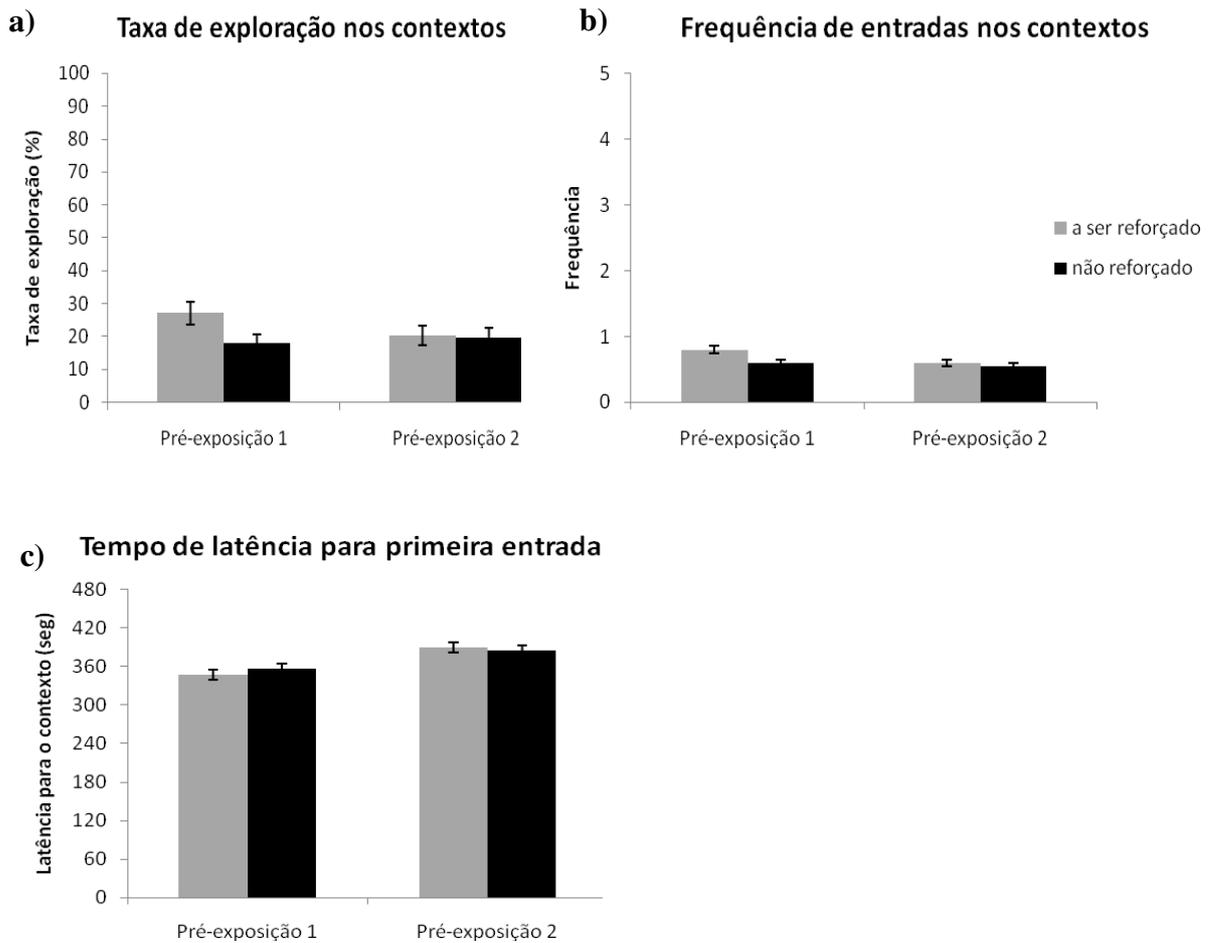
Nestes dois dias de pré-exposição ao aparato foram analisados o quanto os 20 animais interagiram com o aparato e se eles tinham alguma preferência a um dos contextos do aparato a serem reforçados ou não. Para tanto, utilizamos o teste de Wilcoxon como medida estatística para a taxa de exploração em ambos os contextos, frequência de entradas em cada um destes compartimentos e a latência para a primeira entrada.

Na figura 8 (a e b) são exibidas a taxa de exploração no aparato e a frequência total que os sujeitos gastaram no aparato, independente dos contextos. Os resultados mostram que os animais não apresentaram diferenças na interação com o aparato nos dois dias de pré-exposição.



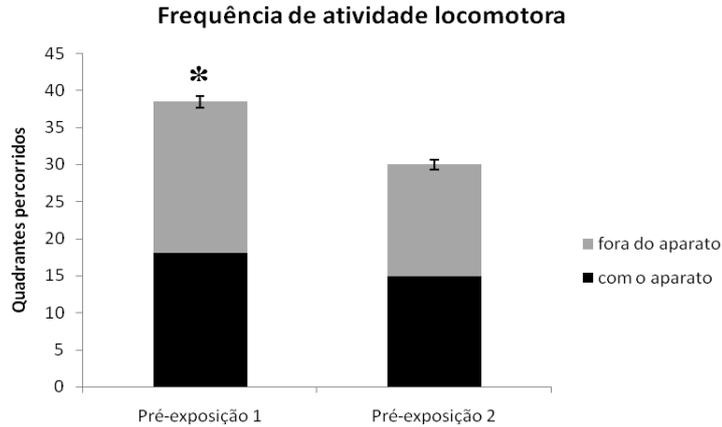
**Figura 8:** a) Taxa de exploração no aparato, em porcentagem e, b) frequência de entradas no aparato durante as habituações. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Além disso, os saguis não apresentaram nenhuma preferência a um contexto específico, de acordo com a taxa de exploração (figura 9a), frequência (figura 9b) e latência para o primeiro contato (figura 9c) do contexto a ser reforçado em relação daquele não-reforçado.



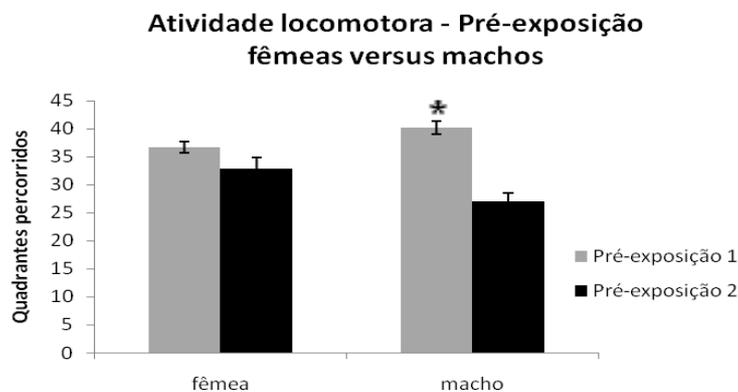
**Figura 9:** a) Taxa de exploração, em porcentagem, b) frequência de entradas, e c) tempo de latência para a primeira entrada dos contextos a serem reforçados em relação aos não reforçados, durante a fase de pré-exposição. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Para a atividade locomotora, subdivimos essa variável em dois grandes grupos: o primeiro diz respeito a toda frequência de atividade realizada dentro, sobre ou em contato com o aparato (barras pretas, fig. 10); e o segundo em relação às atividades locomotoras realizadas fora do aparato (barras cinzas, fig. 10). Os resultados mostram que os sujeitos exploraram de forma semelhante tanto em contato com o aparato quanto fora dele durante os dias de pré-exposição. Contudo, houve redução da atividade exploratória no segundo dia quando comparado ao primeiro dia da fase de pré-exposição. (Teste *t* dependente,  $p=0,008$ ).



**Figura 10:** Frequência de atividade locomotora durante a fase de pré-exposição. A presente estatística não mostrou diferenças quanto à exploração com aparato e fora dele. Todavia, houve diferença na atividade locomotora geral do primeiro dia de habituação em relação ao segundo dia. \*Teste *t* para medidas repetidas com  $p=0,008497$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Em relação a fase de pré-exposição, tanto machos quanto fêmeas tiveram uma atividade e interação com o aparato semelhantes. Além disso, a taxa de exploração nos dois contextos, frequência e latência para o primeiro contato também foram muito similares, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os sexos (figuras a, b1, b2, c1 e c2 – Anexo II). Para a atividade locomotora com o aparato e fora dele também não foram encontradas diferenças significativas. Contudo ao comparar-se a atividade locomotora geral, apenas os machos tiveram diminuição na quantidade de quadrantes percorridos na fase de pré-exposição 2, de acordo com o teste *t* para medidas dependentes (figura 11).



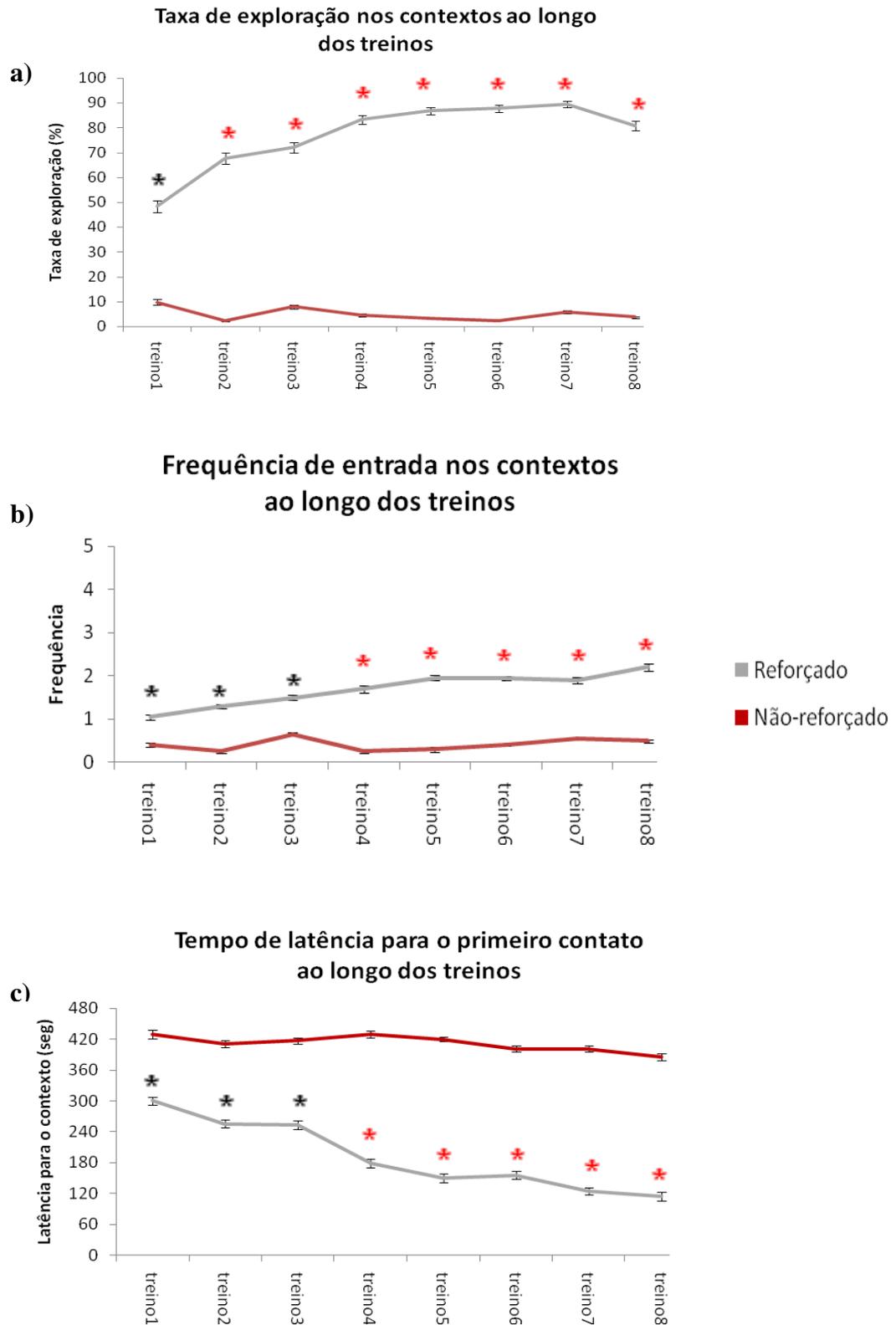
**Figura 11:** Atividade locomotora geral de machos e fêmeas na pré-exposição. Para este gráfico foi encontrada diferença significativa apenas para os machos, pois no segundo dia eles percorreram menos quadrantes do que no primeiro. Teste *t* para medidas dependentes,  $*= p<0,05$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Como utilizamos o número igual de machos e fêmeas no experimento (10 sujeitos para cada sexo), adicionalmente avaliou-se a existência de alguma diferença entre os gêneros quanto ao desempenho da tarefa cognitiva e interação ao aparato. Assim, alguns resultados desta situação estão no Anexo II, referente aos resultados complementares.

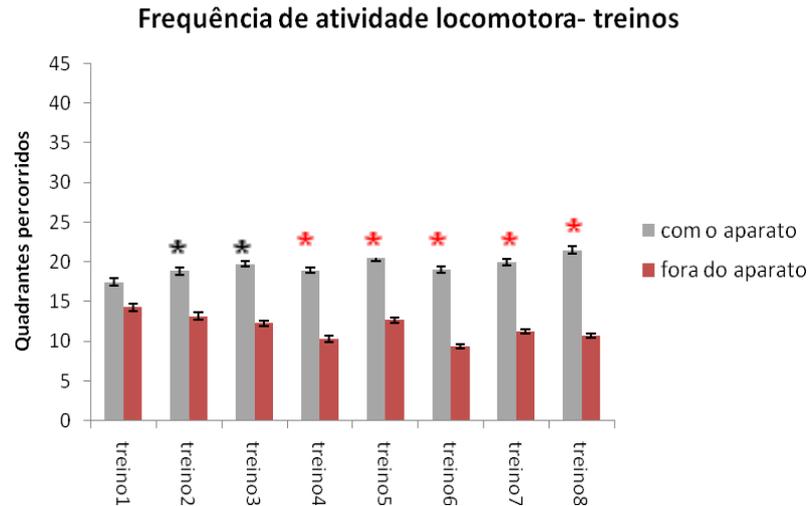
### **Fase de treino**

Nos treinos os saguis foram capazes de aprender a tarefa requisitada: associarem o ambiente espacialmente diferente do outro por meio de uma experiência agradável. Esses resultados de aprendizagem são comprovados através da figura 12, a qual demonstra aumento da taxa de exploração (fig. 12a) e frequência no contexto reforçado ao longo dos 8 dias (fig. 12b), bem como a diminuição na latência para a entrada neste ambiente (fig. 12c). Nesta figura, todos os gráficos estão plotados sob forma de curvas para a visualização da aprendizagem dos animais ao longo do tempo.

A atividade locomotora durante os 8 dias de treino seguiu um padrão similar para os sujeitos experimentais (figura 13). Contudo, pode-se notar diferença significativa (teste *t* dependente,  $p < 0,05$ ) quando comparou-se a atividade locomotora com o aparato daquela realizada fora do aparato. A única exceção foi o treino 1 que não teve diferença estatisticamente significativa.

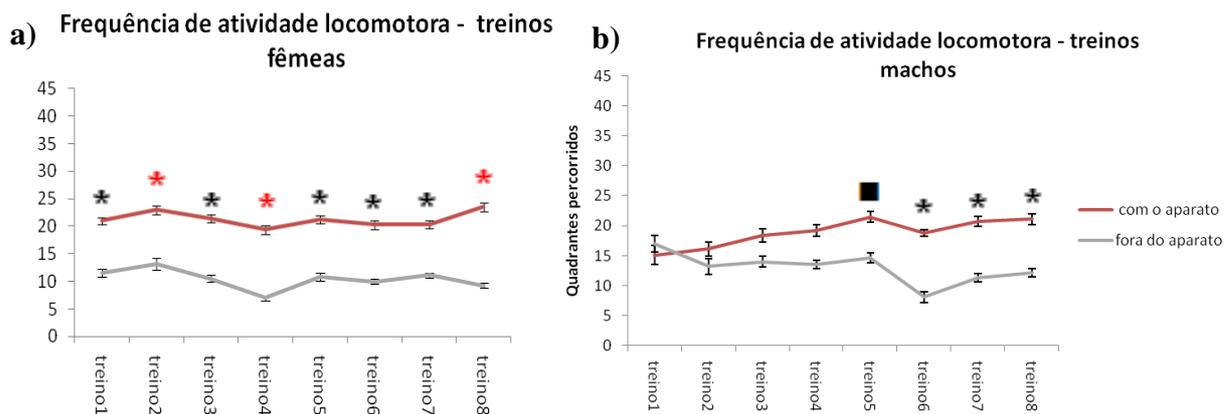


**Figura 12:** Curva de aprendizagem dos saguís durante a fase de treino. Os gráficos acima representam **a)** taxa de exploração, **b)** frequência de contato e **c)** tempo de latência para o primeiro contato nos contextos reforçado e não-reforçado. Nestes é possível perceber a curva de aprendizagem dos animais em relação à tarefa de condicionamento. Wilcoxon, \* →  $p < 0,05$ ; \* →  $p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



**Figura 13:** Atividade locomotora dos animais durante as sessões experimentais. Neste gráfico é possível observar diferenças significativas da frequência de atividade com o aparato e fora dele. Teste *t* para medidas dependentes, \* →  $p < 0,05$ ; \* →  $p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Entre machos e fêmeas não foram verificadas diferenças significativas quanto as variáveis comportamentais (taxa de exploração, frequência e latência) de acordo com o teste de *Mann-Whitney*. O que houve foram diferenças em relação ao contexto reforçado versus não-reforçado (figuras d1, d2, e1, e2, f1 e f2 – Anexo II). Para a atividade locomotora também não foram encontradas diferenças entre os gêneros tanto para atividade geral quanto para atividade com o aparato versus fora do aparato (teste *t* independente). Contudo, as fêmeas desde o primeiro dia se locomoveram mais em contato com o aparato do que fora dele (teste *t* dependente,  $p < 0,05$ ), enquanto que para os machos essa diferença foi vista apenas no sexto dia, com tendência para diferença no quinto dia (figuras 14 a e b).



**Figura 14:** Demonstra o quanto fêmeas e machos se movimentaram em contato com o aparato versus fora do aparato. O teste *t* independente não mostrou diferenças entre os sexos. Todavia, o teste *t* dependente revelou diferenças para todas os treinos entre as fêmeas (fig. 14a) e para os machos tendência, seguida por diferenças apenas no quinto dia em diante (fig. 14b). Teste *t* dependente, \* =  $p < 0,001$ ; \* =  $p < 0,05$ ; ■ =  $p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

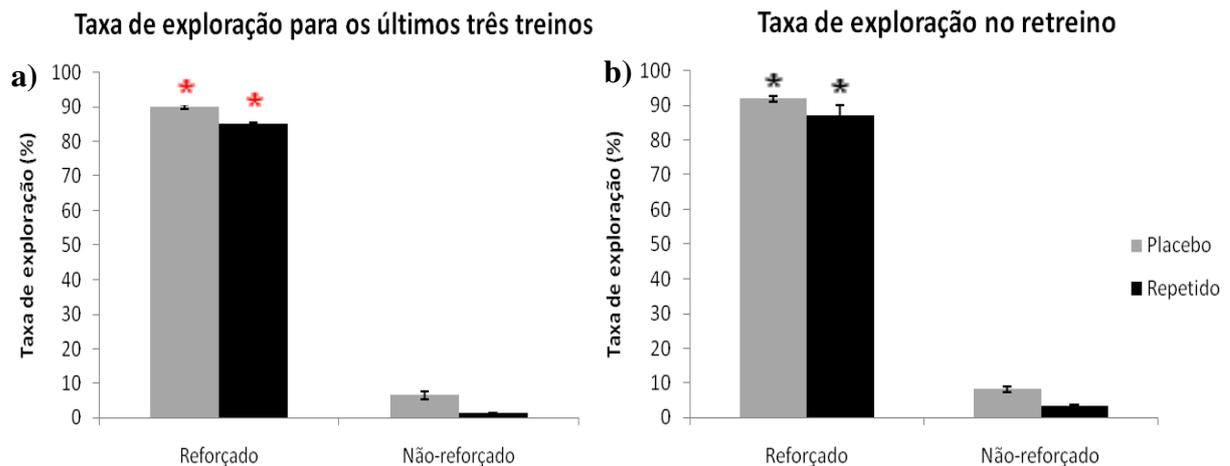
### Fase de retreino

Com término da fase de treino e a demonstração de que os animais aprenderam a discriminar o local reforçado, iniciamos a administração das substâncias por um período de 8 dias, sempre num período que antecede o sono dos animais. Para o grupo repetido, a cafeína na dose de 10 mg/kg foi administrada oralmente durante estes dias; já para os grupos placebo e agudo a substância ingerida pelos sujeitos foi o amido (na mesma concentração da cafeína). Decorrido esse tempo, no nono dia, a fase de retreino foi realizada com a recolocação do aparato juntamente com o reforço no contexto em que estivera anteriormente. Para melhor visualização dos resultados desta sessão experimental, ao lado de cada gráfico do retreino colocamos um outro que representa a média dos últimos três treinos realizados pelo animais que ingeriram cafeína por oito dias (grupos repetido e abstinência) ou placebo por oito dias (grupos agudo e placebo).

Dessa maneira, observou-se que os dados entre os animais que ingeriram cafeína ou placebo repetidamente não apresentaram diferenças significativas durante os três últimos

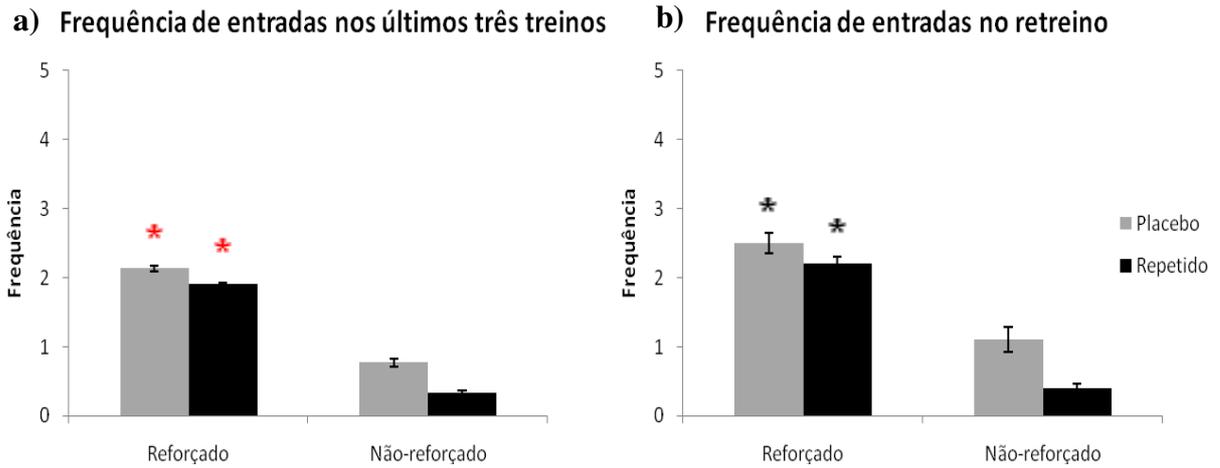
treinos na variável taxa de exploração. O que houve foi a diferença do contexto reforçado em relação ao contexto não-reforçado (fig. 15a).

Ao confrontar este gráfico da média dos últimos três treinos com o retreino (fig. 15b), observou-se que eles não diferiram. Ademais, no retreino também existiu diferença significativa ao comparar-se os contextos reforçado e não reforçado, para ambos os grupos.

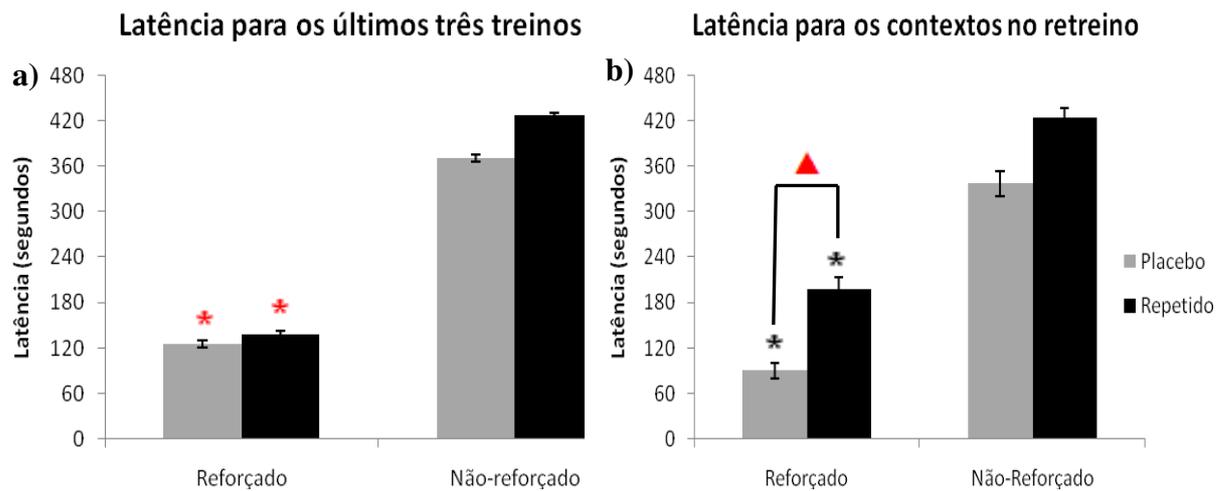


**Figura 15:** Taxa de exploração **a)** para os últimos três treinos e **b)** para o retreino. Nota-se que houve diferenças significativas em relação ao contexto reforçado para o não reforçado em ambos os gráficos. Wilcoxon, \* →  $p < 0,05$ ; \* →  $p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Para os comportamentos frequência (figura 16) e latência para o primeiro contato (figura 17), a diferença do contexto reforçado em relação ao não-reforçado ainda permaneceu significativo, como o que fora exibido para a taxa de exploração durante os treinos e retreino. Adicionalmente, para a variável “latência” foi encontrado na sessão de retreino diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) ao comparar o grupo placebo com o repetido para o contexto com reforço.



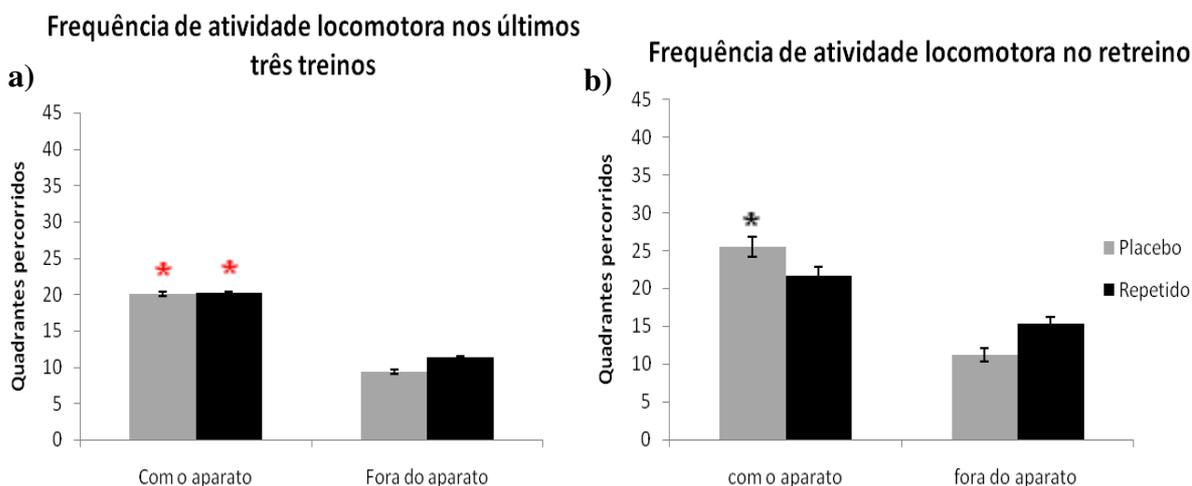
**Figura 16:** Frequência de entrada nos contextos **a)** durante os últimos três treinos e **b)** no retreino. Nestes gráficos são percebidas diferenças significativas em relação ao contexto reforçado para o não-reforçado. Wilcoxon, \* →  $p < 0,05$ ; \* →  $p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão.



**Figura 17:** Latência para o primeiro contato com os contextos **a)** durante os últimos três treinos e **b)** no retreino. Na figura **a)** os 2 grupos apresentaram diferenças significativas em relação ao contexto. Para a figura **b)** encontramos diferenças entre o contexto reforçado e não-reforçado, bem como diferença significativa ao comparar o grupo placebo com repetido para o contexto reforçado (Mann-Whitney,  $\blacktriangle$  →  $p < 0,05$ ). Wilcoxon, \* →  $p < 0,05$ ; \* →  $p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Na atividade locomotora para os últimos três treinos foram encontradas diferenças estatisticamente significativas apenas para diferenças intragrupo. Essas dizem respeito a frequência de locomoção realizada em contato com o aparato em detrimento das atividades realizadas fora desta (fig. 18a). No retreino (fig. 18b), o grupo repetido não diferiu

significativamente para as 2 situações de atividade locomotora. Entretanto, no grupo placebo houve diferença significativa (teste *t* dependente,  $* = p < 0,05$ ). Ao comparar os últimos três treinos com o retreino, o teste *t* para medidas independentes não revelou nenhuma diferença para as atividades realizadas fora e com o aparato.



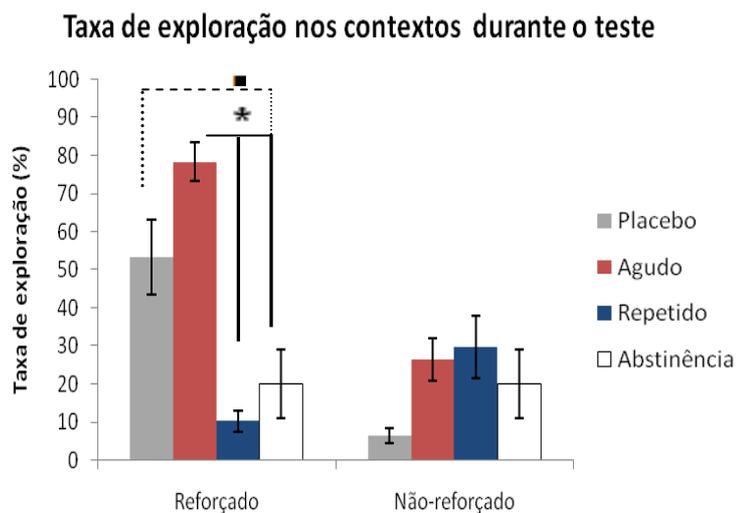
**Figura 18:** Frequência de atividade locomotora durante a) os últimos três treinos e b) no retreino. Na figura a os 2 grupos apresentaram diferenças significativas em relação à atividade locomotora. Para a figura b encontramos diferença em relação atividade realizada com o aparato e fora dele apenas para o grupo placebo. Teste *t* para medidas dependentes,  $* \rightarrow p < 0,05$ ;  $* \rightarrow p < 0,001$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Entre os gêneros, os resultados comportamentais da sessão de retreino não indicaram diferença entre eles. Ambos os sexos exploraram mais o contexto reforçado em detrimento do não-reforçado para as duas situações experimentais – placebo e repetido (figuras g, h e i – Anexo II). Para a atividade locomotora, obteve-se como resultado uma maior interação com aparato (independente do sexo) apenas para os saguis que não ingeriram cafeína (grupo placebo). Por sua vez, os animais que ingeriram a cafeína durante oito dias, não foi possível encontrar diferenças na interação com o aparato e fora dele (figura j – Anexo II).

## Fase de teste

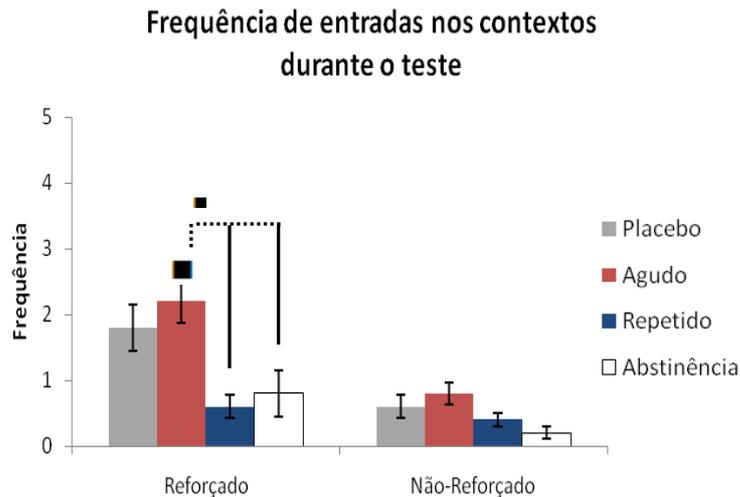
Após o retreino à tarde, os grupos agudo e contínuo receberam uma dose de 10 mg/kg de cafeína (entre 16:15 e 16:30 h), enquanto os animais do grupo placebo e abstinência ingeriram o amido. Decorrida a fase de sono destes indivíduos, no dia seguinte pela manhã foi realizada a sessão de teste.

Para a “taxa de exploração” (figura 19), o teste de *Mann-Whitney* revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o grupo agudo em relação aos grupos repetido e abstinência, e tendência estatística do grupo placebo em relação ao abstinência, numa situação de contexto reforçado. O teste de *Wilcoxon* não indicou diferenças intra-grupo.



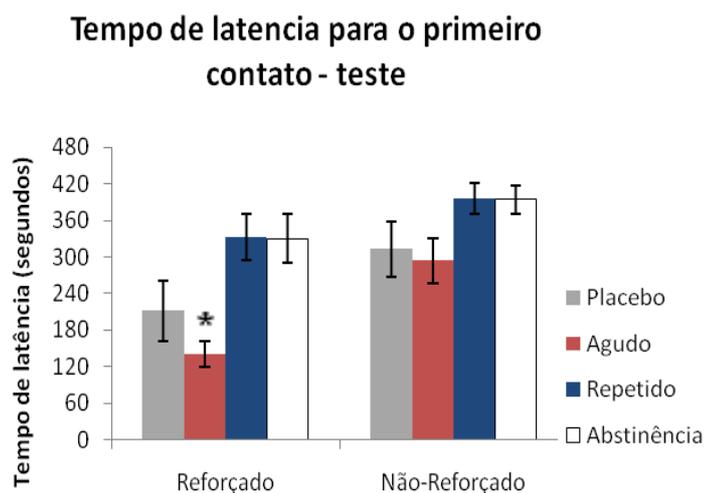
**Figura 19:** Taxa de exploração entre os grupos durante o teste. Neste o teste U de Mann-Whitney encontrou diferenças significativas do grupo agudo em relação aos grupos crônico e abstinência (\*→  $p < 0,05$ ), e tendência do grupo placebo em relação ao abstinência (■ →  $p < 0,08$ ). Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Quando se levou em consideração a variável “frequência” nos dois contextos (figura 20), foram encontradas apenas tendência em relação ao contexto reforçado e não-reforçado para o grupo agudo (*Wilcoxon*,  $p < 0,08$ ), e entre este último se comparado aos grupos contínuo e abstinência (*Mann-Whitney*,  $p < 0,08$ ) numa situação de contexto reforçado.



**Figura 20:** Frequência de entradas nos contextos durante o teste. O ■ representa a tendência ( $p < 0,08$ ) existente para o grupo agudo em relação aos grupos contínuo e abstinência para o contexto reforçado. Já o ■ significa a tendência ( $p < 0,08$ ) entre o grupo agudo na situação reforçado versus não-reforçado. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

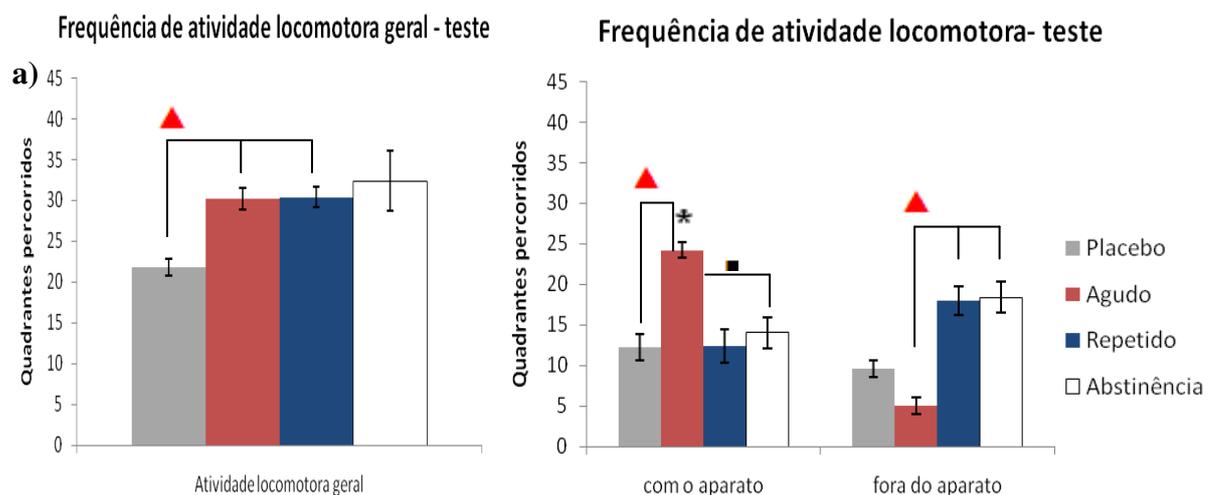
Já para a latência de entrada nos contextos reforçado e não-reforçado (figura 21), o teste de *Wilcoxon* (comparação intra-grupo) mostrou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) apenas para o grupo agudo. O teste de *Mann-Whitney* não observou diferenças entre os quatro grupos experimentais.



**Figura 21:** Latência para o primeiro contato com os contextos reforçado e não-reforçado durante o teste. Neste foi demonstrada diferença apenas para o grupo agudo. *Wilcoxon*, \* $\rightarrow p < 0,05$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

Na atividade locomotora quando se observou a locomoção geral durante o teste (fig. 22a) os animais do grupo placebo tiveram um menor número de quadrantes percorridos quando comparado aos grupos agudo e repetido (que receberam cafeína na tarde anterior), segundo o teste *t* para medidas independentes que revelou significância para essa diminuição ( $p < 0,05$ ). Apesar de o grupo abstinência ter uma média superior quanto aos quadrantes percorrido em relação ao placebo, esta diferença não foi significativa o bastante.

Quando a atividades realizada com o aparato e fora do aparato foi analisada (fig. 22b) o grupo agudo teve maior frequência de locomoção com o aparato em relação ao grupo placebo (teste *t* independente,  $p < 0,05$ ) e tendência para o grupo abstinência ( $p < 0,08$ ). Além disso esses mesmos indivíduos que receberam a cafeína agudamente tiveram menor frequência de quadrantes percorridos do que os grupos repetido e abstinência fora do aparato. Ao verificar diferenças intra-grupo (teste *t* dependente) apenas o grupo agudo teve diferença estatística, ou seja, se movimentaram mais em contato com o aparelho experimental do que fora dele.



**Figura 22:** Atividade locomotora dos 4 grupos experimentais durante a fase de teste. **a)** Atividade locomotora geral; **b)** atividade com, sobre e dentro do aparato versus fora do aparato. Na figura “a” é possível observar diferenças significativas na diminuição da atividade locomotora do grupo placebo para os grupos agudo e repetido (teste *t* independente,  $\blacktriangle \rightarrow p < 0,05$ ). Para a figura “b” são mostrados os seguintes achados: o grupo agudo se locomoveu mais em contato com o aparato do que fora dele; o grupo agudo se locomoveu mais em contato com aparato do que os grupos placebo e abstinência. Além disso, ainda os animais agudos se locomoveram menos do que os animais dos grupos repetido e abstinência. Teste *t* dependente,  $* \rightarrow p < 0,05$ . Teste *t* independente;  $\blacktriangle \rightarrow p < 0,05$ ;  $\blacksquare \rightarrow p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.

No teste assim como no retreino os dados comportamentais tanto de machos quanto de fêmeas não foram significativos (figuras k1, k2, l1, l2, m1 e m2 – Anexo II). A atividade locomotora com o contexto e fora do contexto também não diferiu, todavia a atividade geral sim. As fêmeas do grupo placebo percorreram menos quadrantes quando comparados as demais dos outros grupos que receberam cafeína (figura o – Anexo II). Entre os machos nas quatro situações não houve diferenças significativas, apesar da média do grupo placebo ser menor do que os outros 3 grupos experimentais.

## **DISCUSSÃO**

### **Fase de pré-exposição**

Durante a pré-exposição os resultados mostraram que os saguis não apresentaram preferência por qualquer um dos dois contextos. Os animais interagiram de maneira similar nos comportamentos taxa de exploração, frequência e latência para estas duas sessões em que não há apresentação do alimento (figura 9), não havendo também diferenças destes quando se comparou os sexos (Anexo II). Esses resultados para os saguis (independente do sexo) reforçam a idéia de neutralidade para os ambientes, o que favoreceu a realização dos treinos sem um viés para determinado contexto. Essa neutralidade entra em consonância com os resultados de experimentos realizados com hamsters por Ralph et al. (2002) e Cain et al. (2004a); com ratos por Cain et al. (2004b), e com saguis por Valentinuzzi et al. (2008), os quais também demonstraram que os sujeitos experimentais não tinham preferência para um dado contexto durante a fase de pré-exposição.

A atividade locomotora durante esta fase (figura 10) apresentou uma diferença estatisticamente significativa do primeiro para o segundo dia, ou seja, os animais se locomoveram mais no primeiro dia do que no segundo dia da fase de pré-exposição. Sugere-se que isso se deva ao fato de os sujeitos terem se habituado ao aparato experimental introduzido em sua gaiola. Essa habituação dos animais a objetos já anteriormente apresentados é largamente encontrada em tarefas de reconhecimento de objetos para ratos e camundongos (Ennaceur & Delacour 1988; Bevins & Besheer 2006), e primatas não-humanos (Saunders et al. 1984; Zola-Morgan & Squire, 1985, 1986).

Para o desempenho dos sexos na atividade locomotora, houve diferenças significativas na diminuição da atividade do primeiro para o segundo de pré-exposição apenas para os

machos (figura 11). Isso pode significar que eles se habituaram mais rapidamente do que as fêmeas à novidade. O fato de as fêmeas não terem essa diminuição na locomoção pode ser explicado porque na sociedade dos saguis elas que são as dominantes (Hearn 1983; Steveson & Rylands 1988), e por isso necessitam serem mais cautelosas ao novo objeto. Box (1984, 1988) em seus trabalhos realizados com machos e fêmeas de saguis demonstraram que elas exibem comportamento mais investigativo quando expostas a objetos não-familiares e são mais exploratórias quando colocadas em um ambiente novo no cativeiro. Na natureza, a exploração inadequada pode levá-las a escolhas erradas, o que pode acarretar tanto a elas quanto o seu grupo perda de território, alimento ou mesmo a morte. Assim, a maior atividade e exploração dentro e em torno do aparato foram a maneira que elas garantiram que o aparelho era seguro para que pudessem interagir.

### **Sessões de treinos**

Nos treinos, o qual não houve a utilização da cafeína, foi verificado que os saguis interagiram com o aparato. Adicionalmente, demonstrou-se que estes sujeitos se condicionam e aprendem a discriminar a tarefa corretamente (figura 12). Essa aprendizagem foi exemplificada através da diminuição na latência, e o aumento da permanência (pela taxa de exploração) e frequência no contexto reforçado em relação ao não-reforçado. Estas variáveis acima citadas são parâmetros utilizados como medidas de aprendizagem, e que foram confirmados com resultados significativos para a tarefa cognitiva do estudo em questão que foi a preferência condicionada por lugar.

Os achados relatados nos treinos replicam os experimentos de Valentinuzzi et al. (2008) e Santana et al. (2009), os quais utilizaram protocolos parecidos e que também tiveram como

sujeitos o *Callithrix jacchus*. Estes trabalhos e o nosso foram capazes de demonstrar que os pequenos primatas neotropicais foram capazes de fazer associações e relembrarem das diferenças existentes entre os dois contextos espacialmente distintos (pirâmide e cubo) que se aleatorizavam quanto a direção (direita – esquerda) no decorrer da fase de treino. Essa capacidade de aprenderem que o contexto havia um reforço positivo é especialmente importante em situações onde os animais estão no campo e necessitam recordar que num determinado ambiente rico na diversificação da flora, haviam alimentos apreciados (no caso dos saguis frutas, pequenos insetos e gomas de árvore) ou inimigos que poderiam potencialmente colocar sua vida em risco. Dessa forma, a aprendizagem tem papel fundamental em modelar o comportamento destes animais em função das experiências anteriormente vividas, deixando o mesmo mais eficiente e otimizado.

Para atividade locomotora geral, os animais se locomoveram semelhantemente durante os oito dias da fase de treino (figura 13). Porém a atividade realizada dentro, sobre ou com o aparato foi significativamente maior quando comparada com a atividade realizada fora do aparato. Fazendo uma comparação entre os sexos, foi encontrado que as fêmeas desde o primeiro dia se movimentam mais em contato com o aparato do que fora dele, enquanto que os machos só começaram a ter essa diferença a partir do sexto dia de treino (figura 14). Esta maior interação com aparato desde o primeiro dia pode ter ocorrido porque o reforço que estava contido neste objeto foi algo mais motivador para elas do que para eles, uma vez que a ingestão de alimentos para as fêmeas primatas muitas vezes pode estar relacionado com a capacidade futura de gerar descendentes (Wrangham 1979; Van Schaik & Van Noordwijk 1988). E uma vez elas usufruindo mais do contato com aparato, maiores chances terão para alimentar e quem sabe ser uma futura dominante e provedora de filhotes em detrimento de outras que se alimentariam menos.

Além disso, assim como na fase de pré-exposição, não foram encontradas diferenças significativas nas variáveis comportamentais entre machos e fêmeas nos treinos para esta tarefa condicionada pelo lugar. Apesar de as curvas de aprendizado favorecerem mais as fêmeas (figuras d1, d2, e1, e2, f1 e f2 – Anexo II), não houve diferenças estatisticamente significativas ao comparar o desempenho com os machos. Assim, ambos exploraram de maneira semelhante e tiveram resultados significativos no contexto reforçado em relação ao não-reforçado. Com isso podemos sugerir que para os indivíduos da espécie *C. jacchus* o sexo não é um fator preponderante para que saíssem melhor nesta tarefa cognitiva, como mostrou o trabalho de Valentinuzzi et al. (2008) o qual teve protocolo experimental bem semelhante ao do estudo em questão e que também utilizou número parecido de machos e fêmeas e não encontrou diferenças entre os mesmos na execução da tarefa.

### **Fase de retreino**

No retreino, para o grupo repetido que recebeu cafeína por 8 dias, e o grupo placebo que ingeriu amido pela mesma quantidade de tempo, não foram observadas diferenças quanto ao desempenho cognitivo da tarefa. Acreditamos que tais resultados entre os grupos experimentais tenham sido similares e tão positivos, pelo fato de nesta sessão ter a presença de alimento, fazendo com que os sujeitos, principalmente aqueles que ingeriram a cafeína, se motivassem pela comida, uma vez que estavam parcialmente privados da alimentação.

Entretanto, ao analisarmos a atividade locomotora tanto para o grupo repetido quanto para o placebo, vimos que a frequência de locomoção com e fora do aparato foi semelhante para os que receberam repetidamente a cafeína. Supõe-se então que os animais sob os efeitos mais prolongados desta droga psicoativa podem não ser tão objetivos em relação aos

indivíduos do grupo placebo, já que não se recordavam de maneira eficaz como alcançar o contexto com o reforço, necessitando percorrer mais quadrantes até chegarem lá. Já os animais até o momento livres de cafeína percorreram mais vezes o aparato, pois se lembravam da estratégia mais eficiente e menos custosa (energeticamente) de chegar ao local correto.

As separações dos animais entre os sexos para avaliar os efeitos comportamentais da cafeína no retreino não tiveram resultados significativos, assim como nas sessões de treinos. Por isso o fato de escolhermos agrupar os sexos e apresentá-los como resultados principais, uma vez que juntando machos e fêmeas aumenta-se a quantidade de sujeitos em cada grupo experimental.

### **Sessão de teste**

Depois dos animais do grupo agudo e repetido receberem cafeína, e os do placebo e abstinência ingerirem amido após retreino, eles dormiram. Na manhã seguinte o teste foi realizado, e encontramos como resultados o melhor desempenho dos grupos placebo e agudo e um pior para os grupos repetido e abstinência. Ou seja, a cafeína promoveu déficits na memória para esta tarefa específica aos animais que a receberam por tempo mais prolongado. Outro resultado foi a inexistência de diferenças entre os sexos (Anexo II), o que corrobora ainda mais para a semelhança dos indivíduos da espécie *C. jacchus* nesta tarefa cognitiva.

Apesar de no retreino o grupo que tomou cafeína repetidamente ter resultado satisfatório para as variáveis comportamentais, talvez pela presença de comida no aparato experimental, o mesmo não aconteceu no teste, já que estes animais, agora nos grupos repetido e abstinência, tiveram piores performances nas três variáveis comportamentais em estudo (taxa de exploração, frequência e latência) em relação aos animais placebo e os agudos. Com isso,

aqueles animais ao realizarem o teste sem as pistas alimentares, não foram capazes de responderem à tarefa corretamente, provavelmente por não se lembrarem do ambiente reforçado nas sessões anteriores, e por isso não persistiram na interação com o mesmo.

Quando os saguis realizaram os treinos e logo após a fase de vigília tiveram que dormir, é provável que tenha ocorrido no SOL modificações sinápticas no hipocampo e neocórtex, além de mudanças significativas na atividade elétrica se comparado à vigília e ao REM (Wilson & McNaughton 1994; Marshall et al. 2006); mudanças essas que são importantes para o processo de consolidação “offline” das memórias (Marshall & Born 2007). Contudo, quando administrarmos cafeína após o término dos treinos, durante 8 dias consecutivos sempre no final da vigília, possa ser que esta substância tenha interferido nessa subfase do sono não-REM, pois ela pode ter bloqueado os receptores adenosinérgicos dos tipos  $A_1$  e  $A_{2A}$  indutores deste tipo de sono (Acquas et al. 2002). Além disso, é provável que os sujeitos sob efeitos desta substância tenham uma menor qualidade e eficiência no sono, já que como fora explicado no item “Introdução” os indivíduos são mais sensíveis a cafeína quando a ingerem perto de dormirem, pois demoram mais tempo para metabolizá-la (Levy & Zylber-Katz 1983). E ao prejudicar o sono de onda lentas dos saguis, devido a ingestão da cafeína, possa ser que ela também prejudique o processo de consolidação “offline” a longo-prazo para esta tarefa cognitiva, assim consecutivamente, afetando o desempenho dos animais durante o teste.

Ademais supomos também que algum efeito ansiogênico, além do normal, colaborou com a falha na recordação, principalmente para o grupo abstinência. Como já foi dito anteriormente, abstinência a cafeína pode levar a sintomas como falta de concentração e ansiedade em humanos e modelos animais (Fredholm et al. 1999) os quais podem ter levado indiretamente ao mau desempenho dos saguis. Para confirmar a existência do efeito ansiogênico, uma boa alternativa será reanalisar os vídeos e observar se há o aparecimento de comportamentos estereotipados (que são indicativos de estresse, como piloereção e

movimentação do tipo “vaivém”). Assim, ao observar esses vídeos podemos comparar o comportamento dos animais nas sessões de retreino com as sessões que não haviam administração da cafeína.

O desempenho dos animais do grupo agudo não diferiu daqueles do grupo placebo. Para a taxa de exploração no contexto reforçado (figura 19), o grupo agudo permaneceu por tempo significativamente maior neste ambiente em relação aos animais repetidos e tendência para significância em relação ao grupo abstinência. Quanto à latência (figura 21) e número de frequências no contexto (figura 20), os resultados destas variáveis exibiram, respectivamente, diminuição no tempo para o primeiro contato com o contexto reforçado e tendência para o aumento na frequência de entradas neste somente para os animais agudos. Ainda com relação à última variável, estes animais frequentaram por mais vezes o ambiente com comida do que aqueles sujeitos do grupo repetido e abstinência.

Esse bom desempenho cognitivo do grupo que ingeriu cafeína agudamente corrobora com os achados de vários estudos, seja com humanos ou modelos animais (Griffiths & Woodson 1988; Smith et al. 1994; Riedel & Jolles 1995; Angelucci et al. 1999). Dentre eles estão os experimentos realizados por Angelucci et al. (2002), o qual eles treinaram ratos para o labirinto aquático de Morris e em seguida administravam cafeína. Os pesquisadores encontraram que baixas e agudas doses (até 10 mg/kg) foram capazes de aumentar a melhora no desempenho dos ratos para acharem a plataforma submersa. Já em humanos, a pesquisa liderada por Rasch et al. (2008) também encontrou resultados positivos. Eles aplicaram dois antidepressivos, que diminuem a quantidade de sono REM, após tarefas dependentes de sono. Os resultados mostraram que doses agudas destas drogas não foram capazes de prejudicar a consolidação de memórias procedurais durante a fase de sono, uma vez que os sujeitos tiveram desempenho melhor se comparado aqueles que receberam apenas o placebo.

Outro dado a ser discutido e de relevância tal foi a menor atividade locomotora geral que o grupo placebo desenvolveu em relação aos demais sujeitos que receberam a cafeína aguda ou repetidamente (figura 22). Estes resultados não fogem do esperado que a maioria dos trabalhos, os quais também demonstram aumento na atividade locomotora em modelos animais que ingerem cafeína ou seus agonistas em detrimento daqueles que não ingerem (Howell et al. 1997; Fredholm et al. 1999; Ferré 2008).

Quando animais ou humanos ingerem a droga em estudo, a mesma tem a capacidade de bloquear receptores para adenosina do subtipo  $A_1$  e  $A_{2a}$ . Este fato faz com que haja um aumento na liberação do neurotransmissor dopamina (Ferré et al. 1992), uma vez que os receptores para adenosina deixarão de antagonizar com os de dopamina. Como consequência tem-se aumento de comportamentos relacionado a neurotransmissão da dopamina, como o comportamento motor, que é um dos efeitos mais evidentes observados em pesquisa animal (Lorist & Tops 2003) e que como já dito anteriormente, foi confirmado no presente trabalho.

Apesar de não termos registrado a fase de sono destes primatas por meio de métodos mais acurados, os resultados nos levam a crer que os sujeitos foram sensíveis aos efeitos da cafeína no que diz respeito a déficits na memória (para animais do grupo abstinência e repetido), e atividade locomotora (para todos que ingeriram esta substância psicoativa). Esperamos que no futuro a utilização de actímetros, telemetria ou eletrodos nos sirvam como ferramentas eficazes para avaliar o ciclo vigília-sono, bem como irregularidades neste ocasionados por esta ou outras drogas psicoativas. Ademais, o uso de técnicas imunohistoquímicas neste modelo primata ou em roedores pode ser uma boa alternativa para verificar expressão de genes imediatos relacionados a aprendizagem, corroborando ainda mais para um resultado preciso acerca de como o animal está se comportando à tarefa cognitiva e à administração da droga.

## CONCLUSÃO

A partir do que fora exposto nos resultados e discussão, podemos concluir e sugerir que:

. Os animais responderam satisfatoriamente à tarefa de condicionamento de lugar, ou seja, foram capazes de aprender onde se encontrava o alimento em detrimento do ambiente espacialmente diferente. Por tal fato, o paradigma experimental em estudo mostra-se aplicável por tratar-se de uma tarefa de aprendizagem que não requer medidas invasivas ou que causem dor ou desconforto aos animais, que é comum em estudos de aprendizagem em animais como roedores.

. Após a administração da cafeína, os grupos de uso repetido e abstinência tiveram pior desempenho no teste em relação aos animais placebo e agudo. Isto sugere que a cafeína agiu inibindo a memória nesta tarefa cognitiva específica.

. Animais sob efeito repetido, de abstinência ou agudo da cafeína apresentaram maior atividade locomotora se comparado ao grupo placebo, o que demonstrou o caráter estimulante desta substância.

. Machos e fêmeas não diferiram nas variáveis comportamentais, ressaltando assim a semelhança dos gêneros nesta tarefa cognitiva.

. Fêmeas exploraram e se locomoveram mais em contato com contexto, colocando em evidência a dominância e melhor aproveitamento do reforço em relação ao sexo oposto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D. H., Barnett, D. K., Colman, R. J., Yamamoto, M. E., Schultz-Darken, N.J.** 2003. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comparative Medicine*, 4, **53**, 339-350.
- Acquas, E., Tanda, G., Di Chiara, G.** 2002. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology*, 2, **27**, 182-193.
- Altimari, L. R., Moraes, A. C., Tirapegui, J., Moreau, R. L. M.** 2006. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42**, 17-27.
- Andersen, M. L. & Bittencourt, L. R. A.** 2008. Fisiologia do Sono. In: *Medicina e Biologia do Sono* (Org. por Tufik, S.). pp.1-6. Barueri, SP: Manole.
- Angelucci, M. E. M., Vital, M. A. B. F., Cesário, C., Zadusky, C. R., Rosalen, P. L., Da Cunha, C.** 1999. The effect of caffeine in animal models of learning and memory. *European Journal of Pharmacology*, **373**, 135-140.
- Angelucci, M. E. M., Cesário, C., Hiroi, R. H., Rosalen, P. L., Da Cunha, C.** 2002. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **35**, 1201-1208.
- Arnaud, M. J.** 1987. The pharmacology of caffeine. In: *Progress in Drug Research*. (Org. por Sharma, S., Lien, E. J., Saxena, A. K.), pp. 273-314. Birkhauser Verlag AG.
- Ávila-Pires, F. D.** 1969. Taxonomia e zoogeografia do gênero "Callithrix jacchus" Erxleben, 1777 (Primates, Callithrichidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **29**, 49-64.
- Ballone, G. J.** 2005. *Eletroencefalograma*. Encontrado em 5 de janeiro de 2009, <http://virtualpsy.locaweb.com.br/index.php?art=356&sec=42>.
- Barone, J.J. & Roberts, H. R.** 1996. Caffeine consumption. *Food Chemical Toxicology*, **34**, 119-129.
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M. McCarley, R. W.** 2004. Adenosine and sleep-wake regulation. *Progress in Neurobiology*, **73**, 379-396.
- Bevins, R. A., Besheer, J.** 2006. Object recognition in rats and mice: a one trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols*, **1**, 1306-1311.
- Bonati, M., Celardo, A., Galletti, F., Latini, R., Tursi, F., Belvedere, G.** 1984. Kinetics of caffeine metabolism in control and 3-methylcholanthrene induced rat liver microsomes. *Toxicology Letters*, **21**, 53-58.

- Bonati, M., Jiritano, L., Bortolotti, A., Gaspari, F., Filippeschi, S., Puidgemont, A., Garattini, S.** 1985. Caffeine distribution in acute toxic response among inbred mice. *Toxicology Letters*, **29**, 25-31.
- Born, J., Rasch, B., Gais, S.** 2006. Sleep to remember. *The Neuroscientist*, **5**, 12, 410-424.
- Box, H. O.** 1984. *Primate behaviour and social ecology*. New York: Chapman & Hall.
- Box, H. O.** 1988. Behavioural responses to environmental change: observations on captive marmosets and tamarins (Callitrichidae). *Animal Technology*, **39**, 9-16.
- Buffalo, E. A., Gillam, M. P. Allen, R. R., Paule, M. G.** 1993. Acute effects of caffeine on several operant behaviors in rhesus monkeys. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **46**, 733-737.
- Cain, S. W., Ko, C. H., Chalmers, J. A., Ralph, M. R.** 2004a. Time of day modulation of conditioned place preference in rats depends on the strain of rat used. *Neurobiology of Learning and Memory*, **81**, 217-220.
- Cain, S. W., Chou, T., Ralph, M. R.** 2004b. Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behavioral Brain Research*, **150**, 201-205.
- Cole, K. J., Costill, D. L., Starling, R. D., Goodpaster, B. H., Trappe, S. W., Fink, W. J.** 1996. Effects of caffeine ingestion on perception of effort and subsequent work production. *International Journal of Sport Nutrition*, **6**, 2, 14-23.
- Crofts, H. S., Wilson, S., Muggleton, N. G., Nutt, D. J., Scott, E. A. M., Pearce, P. C.** 2001. Investigation of the sleep electrocorticogram of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using radiotelemetry. *Clinical Neurophysiology*, **112**, 2650-2273.
- Daly, J. W.** 1993. Mechanism of action of caffeine. In: *Caffeine, coffee and health* (Org. por Garattini, S). pp.97-140. New York: Raven Press Ltd.
- Daly, J. W. & Fredholm, B. B.** 1998. Caffeine – an atypical drug dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, **51**, 199-206.
- Dixon, A. K., Gubitza, A. K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J., Freeman, T. C.** 1996. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British Journal of Pharmacology*, **118**, 1461-1468.
- Drapeau, C., Hamel-Hérbet, I., Robillard, R., Selmaoui, B., Filipini, D., Carrier, J.** 2006. Challenging sleep in aging: the effects of 200 mg of caffeine during the evening in young and middle-age moderate caffeine consumers. *Journal of Sleep Research*, **15**, 133-141.
- Ennaceur, A., Delacour, J.** 1988. A new one-trial for neurobiological studies of memory in rats 1: behavioural data. *Behavioral Brain Research*, **31**, 47-59.
- Epple, G.** 1970. Maintenance, breeding, and development of marmoset monkeys (Callitrichidae) captivity. *Folia Primatologica*, **12**, 56-76.

- Fenn, K. M., Nusbaum, H. C., Margoliash, D.** 2003. Consolidation during sleep of perceptual learning of spoken language. *Nature*, **425**, 614-616.
- Ferreira, M.** 2004. Grandes pensadores: B. F. Skinner. *Escola*, **176**, 20-22.
- Ferré, S., Fuxe, K., Von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B.** 1992. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience*, **51**, 501-512.
- Ferré, S.** 2008. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, **105**, 1067-1079.
- Fisone, G., Borgkvist, A., Usiello, A.** 2004. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**, 857-872.
- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., Zvartau, E. E.** 1999. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, **51**, 83-133.
- Garett, B. E. & Griffiths, R.** 1997. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacological Chemical Behavior*, **57**, 533-541.
- Griffiths, R. R. & Woodson, P. P.** 1988. Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **29**, 419-427.
- Guerra, R. F., Takase, E., Santos, C. V.** 1998. Cross-fostering between two species of marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*). *Revista Brasileira de Biologia*, **58**, 665-669.
- Haskell, C. F., Kennedy, D. O., Milne, A. L., Wesnes, K. A. Scholey, A. B.** 2008. The effects of L-theanine, caffeine and their combination on cognition and mood. *Biological Psychology*, **77**, 113-122.
- Hearn, J. P.** 1983. Reproduction in New world primates. In: *New models in medical science* (Org. por Hearn, J. P.). pp. 183-223. Inglaterra: MTP Press.
- Hindmarch, I., Rigney, U., Stanley, N., Quinlan, P., Rycroft, J., Lane, J.** 2000. A naturalistic investigation of the effects of day-long consumption of tea, coffee and water on alertness, sleep onset and sleep quality. *Psychopharmacology*, **149**, 203-216.
- Hoshino, K.** 2008. Aspectos Filogenéticos do Sono. In: *Medicina e Biologia do Sono* (Org. por Tufik, S.). pp.1-6. Barueri, SP: Manole.
- Howell, L. L. & Byrd, L. D.** 1993. Effects of CGS 15943, a nonxanthine adenosine agonist, on behaviour of squirrel monkey. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **267**, 432-439.
- Howell, L. L., Coffin, V. L., Spealman, R. D.** 1997. Behavioral and physiological effects of xanthines in nonhuman primates. *Psychopharmacology*, **129**, 1-14.

- Howell, L. L. & Landrum, A. M.** 1997. Effects of chronic caffeine administration on respiration and schedule-controlled behaviour in rhesus monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **283**, 190-199.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M.** 2003. *Princípios da Neurociência*. 4.ed. São Paulo: Manole.
- Kaplan, G. B., Grenblatt, D. J., Ehrenberg, B. L., Goddard, J. E., Cotreau, M. M., Harmatz, J. S., Shader, R. I.** 1997. Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. *Journal Clinical of Pharmacology*, **37**, 693-703.
- Kleitman, N.** 1987. Introduction: definition of terms. In: *Sleep and Wakefulness*. pp-3-7. Chicago: The University of Chicago Press.
- Kopf, S. R., Melani, A., Pedata, F., Pepeu, G.** 1999. Adenosine and memory storage: effect of A1 and A2 receptors antagonists. *Psychopharmacology*, **146**, 214-249.
- Koppelstaetter, F., Poeppel, T. D., Siedentopf, C. M., Ischebeck, A., Verius, M., I. Haala, I., Mottaghy, F. M., Rhomberg, P., Golaszewski, S., Gotwald, S., Lorenz, I. H., Kolbitsch, C., Felber, S., Krause, B. J.** 2008. Does caffeine modulate verbal working memory processes? an fMRI study. *NeuroImage*, **39**, 492-499.
- Lacrampe, C.** 2002. *Sleep and rest in animals*. Paris: Sophie de Sivry-L'Iconoclaste.
- Lee, K. S. & Reddington, M.** 1986. Autoradiographic evidence for multiple CNS binding sites for adenosine derivates. *Neuroscience*, **19**, 535-549.
- Lent, R.** 2004. *Cem Bilhões de Neurônios*. São Paulo: Atheneu.
- Levy, M. & Zyber-Katz, E.** 1983. Caffeine metabolism and coffee-attributed sleep disturbances. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **33**, 770-775.
- Loke, W. H.** 1990. Effects of repeated caffeine administration on cognition and mood. *Human Psychopharmacology*, **5**, 339-348.
- Lorist, M. M. & Tops, M.** 2003. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain and Cognition*, **53**, 82-94.
- Mackiewicz, M., Nikonova, E. V., Zimmerman, J. E., Raymond J. Galante, Zhang, L., Cater, J. R., Geiger, J. D., Pack, A. I.** 2003. Enzymes of adenosine metabolism in the brain: diurnal rhythm and the effect of sleep deprivation. *Journal of Neurochemistry*, **85**, 348-357.
- Marshall, L., Helgadóttir, H., Mölle, M., Born, J.** 2006 Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature*, **444**, 610-613.
- Masrshall, L. & Born, J.** 2007. The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*, 10, **11**, 442-450.
- McGaugh, J. L.** 2000. Memory – a century of consolidation. *Science*, **287**, 248-251.

- Menezes, A. A. L., Moreira, L. F. S., Azevedo, C. V. M., Costa, S. F., Castro, C. S. S.** 1993. Behavioral Rhythms in the captive common marmoset (*Callithrix jacchus*) under natural environmental conditions. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, **26**, 741-745.
- Meyer, J. S., Quenzer, L. F.** 2005. Nicotine and caffeine. In: *Psychopharmacology: Drugs, the brain, and behavior*. pp. 303-326. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Napier, J. R & Napier, P. H.** 1967. *A handbook of living primates*. New York: Academic Press.
- Neves, C.** 1974. *A estória do café*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café.
- Palmer, T. M & Stiles, G. L.** 1995. Adenosine receptors. *Neuropharmacology*, **34**, 683-694.
- Paterson, L. M., Wilson, S. J., Nutt, D. J., Hutson, P. H., Ivarsson, M.** 2007. A translational, caffeine-induced model of onset insomnia in rats and healthy volunteers. *Psychopharmacology*, **191**, 943-950.
- Pearlman, C. & Becker, M.** 1974. REM sleep deprivation impairs bar-press acquisition in rats. *Physiology & Behavior*, **13**, 813-817.
- Pereira, G. S., Mello & Souza, T., Vinade, E. R. C., Choi, H., Rodrigues, C., Battastini, A. M. O., Izquierdo, I., Sarquis, J. J. F., Bonan, C. D.** 2002. Blockade of adenosine A1 receptors in the posterior cingulate cortex facilitates memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, **437**, 151-154.
- Philippens, I.H., Kersten, C.J., Vanwersch, R.A., Strijkstra, A.M.** 2004. Sleep and sleep EEG spectra in marmoset monkeys. *Sleep-Wake Research Netherlands*, **15**, 49-51.
- Porkka-Heiskanen, T., Alanko, L., Kalinchuk, A., Stenberg, D.** 2002. Adenosine and Sleep. *Sleep Medicine Reviews*, **4**, **6**, 321-332.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. M.** 2004. Sleep and wakefulness. In: *Neuroscience*. pp. 659-686. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Ralph, M. R., Ko, C. H., Antoniadis, E. A., Seco, P., Irani, F., Presta, C., McDonald, R.** 2002. The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behavioural Brain Research*, **136**, 179-184.
- Rasch, B., Born, J.** 2007. Maintaining memories by reactivation. *Current Opinion in Neurobiology*, **17**, 698-703.
- Rasch, B., Pommer, J., Diekelmann, S., Born, J.** 2008. Pharmacological REM sleep suppression paradoxically improves rather impairs skill memory. *Nature Neuroscience*, 1-2.
- Rauchs, G., Desgranges, B., Foret, J., Eustache, F.** 2005. The relationships between memory systems and sleep stages. *Journal of Sleep Research*, **14**, 123-140.

- Ribeiro, S., Gervasoni, D., Soares, E. S., Zhou, Y., Lin, S. C., Pantoja, J., Lavine, M., Nicoletis, M. A. L.** 2004. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLOS Biology*, **2**, 126-137.
- Riedel, W. J. & Jolles.** 1996. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. *Drugs and Aging*, **8**, 245-274.
- Roger, P. J., Richardson, N. J., DERNONCOURT, C.** 1994. Caffeine use: is there a net benefit for mood and psychomotor performance. *Neuropsychobiology*, **31**, 195-199.
- Rogers, P. J., Martin, J., Smith, C., Heatherley, S. V., Smit, H. J.** 2003. Absence of reinforcing, mood and psychomotor performance effects of caffeine in habitual non-consumers of caffeine. *Psychopharmacology*, **167**, 54–62.
- Santana, K. S., Souza, C. R. P., Sousa, D. S., Silva, R. H., Valentinuzzi, V. S., Mota, M. T. S.** 2009. NEWroscience 2008 Abstracts - Comparison between genders in *Callithrix jacchus* on a place conditioned task. *Epilepsy & Behavior Supplement*, **14**, 86-98.
- Saunders, R. C., Murray, E. A., Mishkin, M.** 1984. Further evidence that amygdala and hippocampus contribute equally to recognition memory, *Neuropsychologia*, **22**, 785–796.
- Schwierin, B., Borbely, A. A., Tobler, I.** 1996. Effects of N6-cyclo-pentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat. *European Journal Pharmacology*, **300**, 163-171.
- Siegel, J. M.** 2005. Clues to the functions of the mammalian sleep. *Nature*, **27**, **437**, 1264-1271.
- Shinomiya, K., Omichi, J., Ohnishi, R., Ito, H., Yoshida, T., Kamei, C.** 2004. Effects of chlorogenic acid and its metabolites on the sleep-wakefulness cycle in rats. *European Journal Pharmacology*, **504**, 185-189.
- Smith, A., Maben, A., Brockman, P.** 1994. Effects of evening meals and caffeine on cognitive performance, mood and cardiovascular functioning. *Appetite*, **22**, 57-65.
- Smith, A.** 2002. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 1243–1255.
- Squire, L. R.** 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, **82**, 171-177.
- Squire, L. R., Zola-Morgan, S.** 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 24, 13515-13522.
- Stevenson, M. F. & Rylands, A. B.** 1988. The marmosets, genus *Callithrix*. In: *Ecology and behavior of neotropical primates* (Org. por Mittermeier, A. B., Rylands, A. T., Coimbra-Filho, A. F.; Fonseca, G. A. B.). Washington, USA: World Wildlife Foundation. pp.131-221.

- Stickgold, R., James, L. T., Hobson, A.** 2000. Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nature Neuroscience*, **3**, 676-679.
- Suzuki, F., Shimada, J., Shiozaki, S., Ichikawa, S., Ishii, A., Nakamura, J., Nonaka, H., Kobayashi, H., Fuse, E.** 1993. Adenosine A1 antagonists. 3. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine- or N6-((R)-phenylisopropyl) adenosine-induced cognitive disturbance. *Journal of Medical Chemical*, **36**, 2508-251.
- Timo-Iaria, C.** 2008. Evolução histórica do sono. In: *Medicina e Biologia do Sono* (Org. por Tufik, S.). pp.1-6. Barueri, SP: Manole.
- Tomas, C.** 1993. Amnésias. In: *Neurobiologia das doenças mentais* (Org. por Graeff, F. G., Brandão, M. L.). pp.175-184. São Paulo: Editora Lemos.
- Tulving, E.** 1995. Introduction. In: *The cognitive neuroscience* (Org. por Gazzaniga, M.). pp.751-753. Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology.
- Valentinuzzi, V. S., Neto S. P. D., Carneiro, B. T. S., Santana, K. S., Araujo, J. F., Ralph, M. R.** 2008. Memory for time of training modulates performance on a place conditioning task in marmosets. *Neurobiology of learning and memory*, **89**, 604-607.
- Van Schaik, C. P. & Van Noordwijk, M. A.** 1988. Scramble and contest in feeding competition among female long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Behaviour*, **105**, 77-98.
- Wilson, M. A. & McNaughton, B. L.** 1994. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science*, **265**, 676-679.
- Wrangham, R. W.** 1979. On the evolution of ape social systems. *Social Science Information*, **18**, 335-368
- Xie, X., Ramkumar, V., Toth, L. A.** 2007. Adenosine and dopamine receptor interactions in striatum and caffeine-induced behavioral activation. *Comparative Medicine*, **57**, 538-545.
- Zola-Morgan, S. & L.R. Squire, L. R.** 1985. Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia, *Behavioral Neuroscience*, **99**, 22-34.
- Zola-Morgan, S. & L.R. Squire, L. R.** 1986. Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus, *Behavioral Neuroscience*, **100**, 155-160.

## **ANEXO I:**

**Planilhas do Excel utilizadas para 1) coleta dos dados comportamentais e de atividade locomotora; 2) armazenamento dos dados.**



c19\_treino5\_1011 [Modo de Compatibilidade] - Microsoft Excel

Normal Layout da Página Modos de Exibição de Pasta de Trabalho

Início Inserir Layout da Página Fórmulas Dados Revisão Exibição

Visualização da Quebra de Página Modos de Exibição Personalizados Tela Inteira

Mostrar/Ocultar

Zoom 100% Zoom na Seleção

Organizar Tudo Congelar Painéis

Salvar Espaço de Trabalho Janelas

Macros

Janela

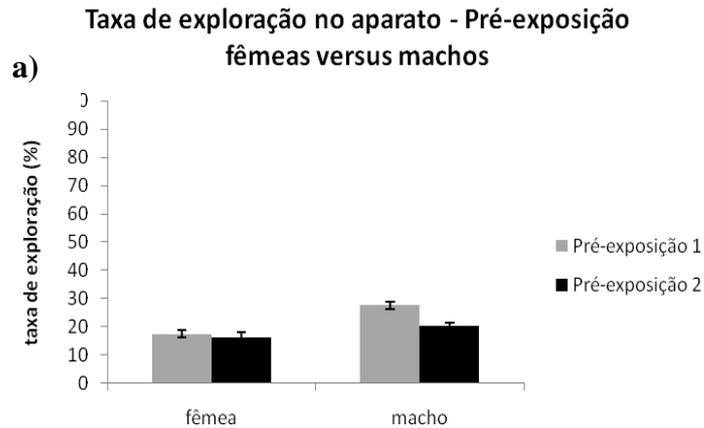
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	
2																			
3	10/11/2008 06:33	f	01:30	0	0	0	1	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:01:30	Corredor	0:00:33	5	0:01:30	Corredor	Triângulo	00:00:00	Quadrado
4	10/11/2008 06:34	c	00:05	1	0	0	0	0:00:05	0:00:00	0:00:00	0:00:00	Triângulo	0:01:10	2	0:02:22	Triângulo	00:00:00	00:00:00	
5	10/11/2008 06:34	q	00:25	0	0	1	0	0:00:00	0:00:00	0:00:25	0:00:00	Quadrado	0:00:25	1	0:01:35	Quadrado	00:00:00	00:01:35	
6	10/11/2008 06:35	c	00:22	1	0	0	0	0:00:22	0:00:00	0:00:00	0:00:00	Fora	0:05:53	3	0:02:22	Fora	00:00:00	00:00:00	
7	10/11/2008 06:35	t	00:05	0	1	0	0	0:00:00	0:00:05	0:00:00	0:00:00				0:02:27		00:00:00	00:00:00	
8	10/11/2008 06:35	c	00:01	1	0	0	0	0:00:01	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:04:17		00:00:00	00:00:00	
9	10/11/2008 06:35	f	01:49	0	0	0	1	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:01:49				0:05:24		00:00:00	00:00:00	
10	10/11/2008 06:37	c	00:02	1	0	0	0	0:00:02	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
11	10/11/2008 06:37	t	01:05	0	1	0	0	0:00:00	0:01:05	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
12	10/11/2008 06:38	c	00:03	1	0	0	0	0:00:03	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
13	10/11/2008 06:38	f	02:34	0	0	0	1	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:02:34				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
14	10/11/2008 06:41	222	#####	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
15			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
16			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
17			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
18			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
19			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
20			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
21			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
22			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
23			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
24			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
25			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
26			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
27			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
28			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
29			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
30			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
31			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
32			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
33			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
34			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
35			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	
36			00:00	0	0	0	0	0:00:00	0:00:00	0:00:00	0:00:00				0:00:00		00:00:00	00:00:00	

Plan1 Plan2 Plan3

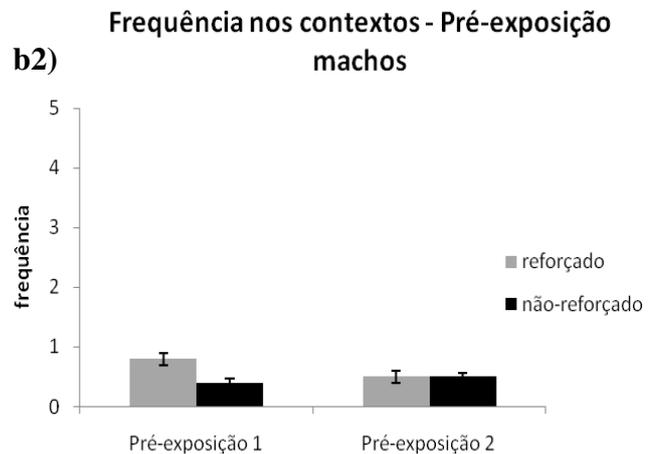
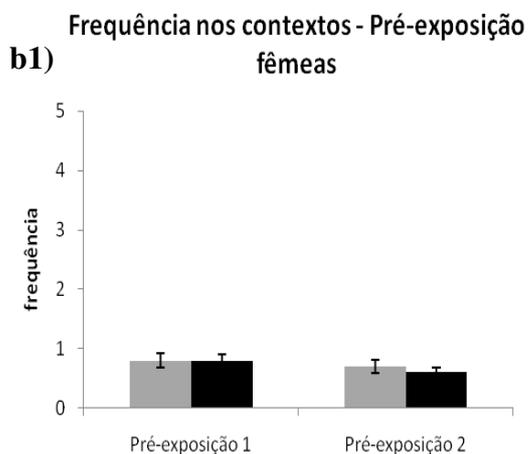
Pronto 80%

## **ANEXO II:**

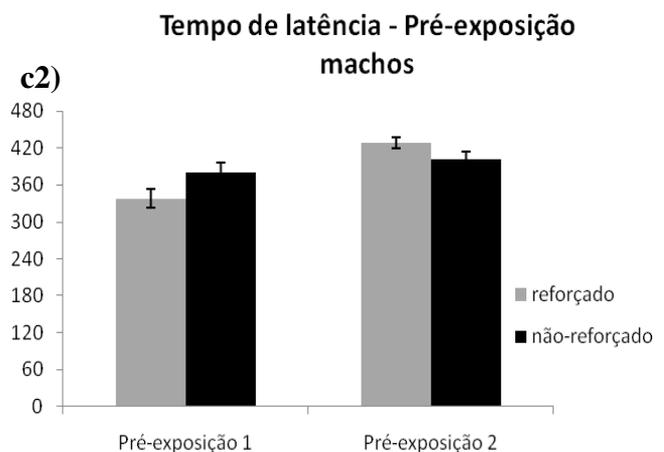
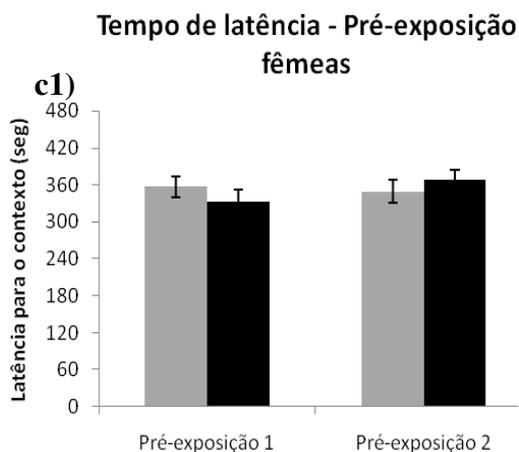
**Resultados complementares. Gráficos de comparação entre machos e fêmeas na tarefa de condicionamento de lugar.**



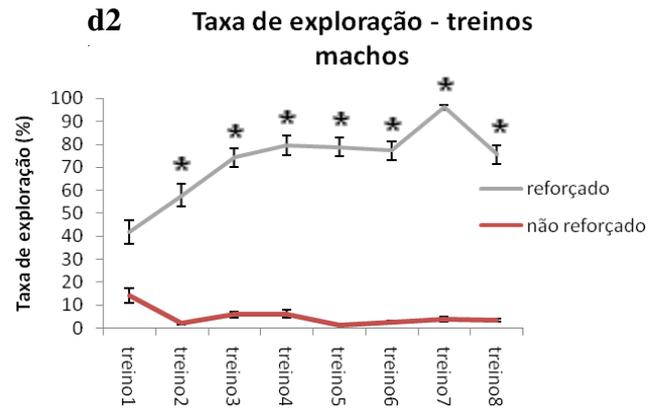
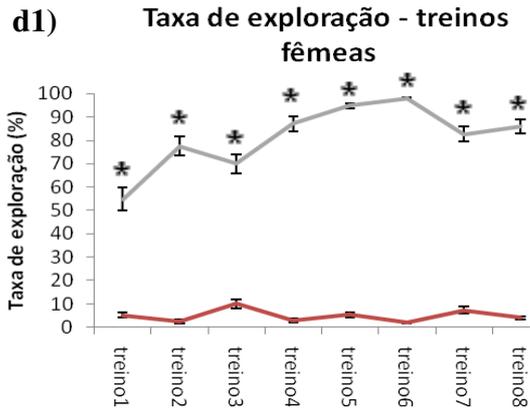
**Figura a:** Taxa de exploração dos gêneros durante a fase de pré-exposição. Neste percebe-se que não há diferenças significativas entre o total explorado no aparato no primeiro e segundo dia de habituações. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



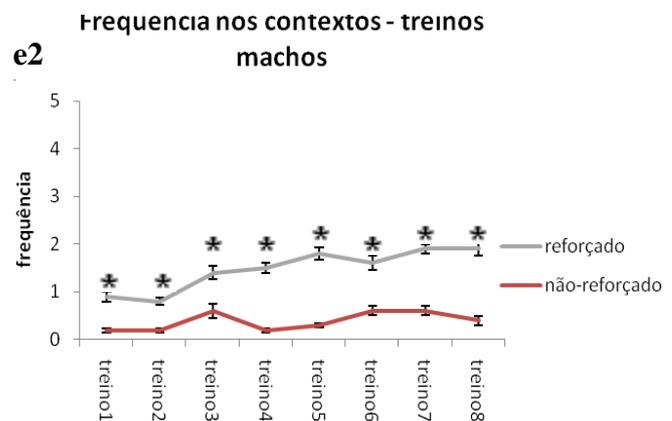
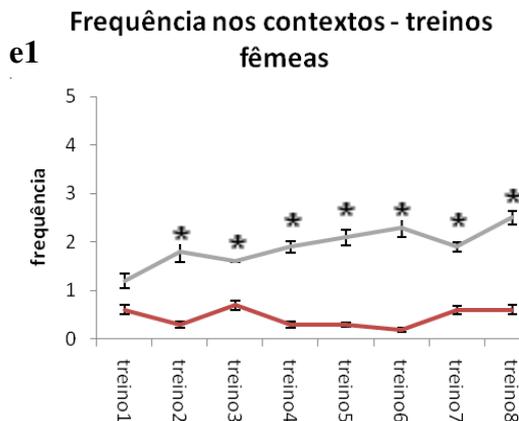
**Figuras b1 e b2:** Representam o quanto fêmeas e machos frequentaram os contextos a serem reforçados ou não durante a fase de pré-exposição. Não foram verificadas diferenças significativas para ambos os sexos. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



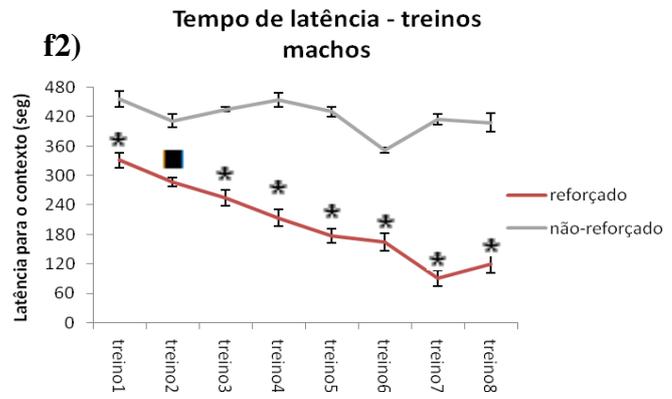
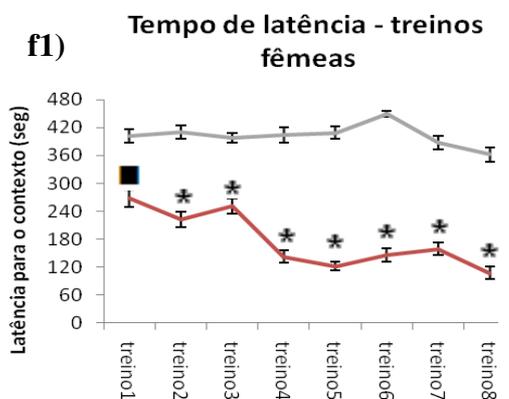
**Figuras c1 e c2:** Correspondem ao tempo (em segundos) que fêmeas e machos levam para fazer o primeiro contato com os contextos a serem-reforçados ou não durante a fase de pré-exposição. Para ambos não houve diferenças estatisticamente significativas. Barras de erro representam o erro padrão dos dados dos dados.



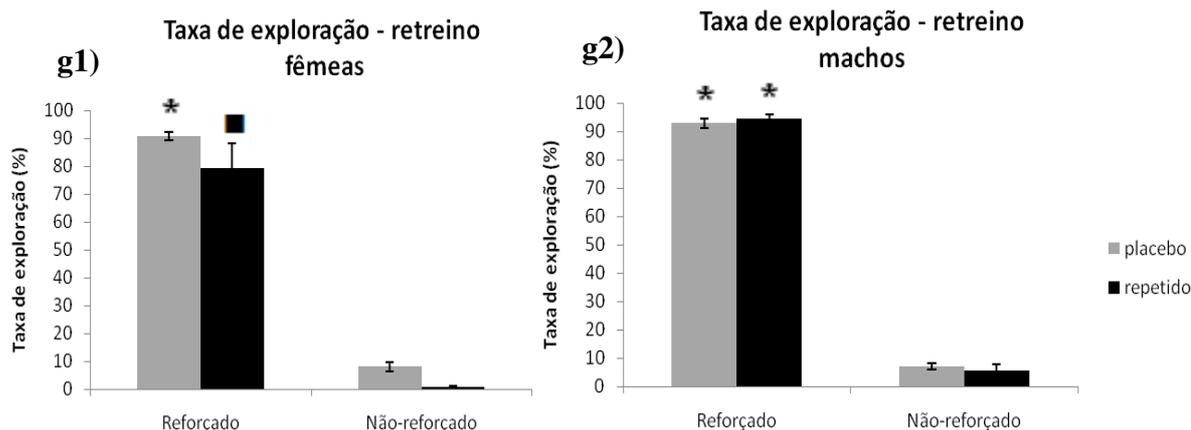
**Figuras d1 e d2:** Taxa de exploração nos contextos reforçado e não-reforçado para machos e fêmeas. O teste de *Mann-Whitney* não revelou diferenças entre machos e fêmeas. Contudo o teste de *Wilcoxon* mostrou diferenças quando comparou-se a taxa de exploração no contextos entre os gêneros. Neste é possível observar também que os machos começaram a explorarm mais o contexto reforçado apenas no segundo dia de treino. *Wilcoxon*, \*=  $p < 0,05$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



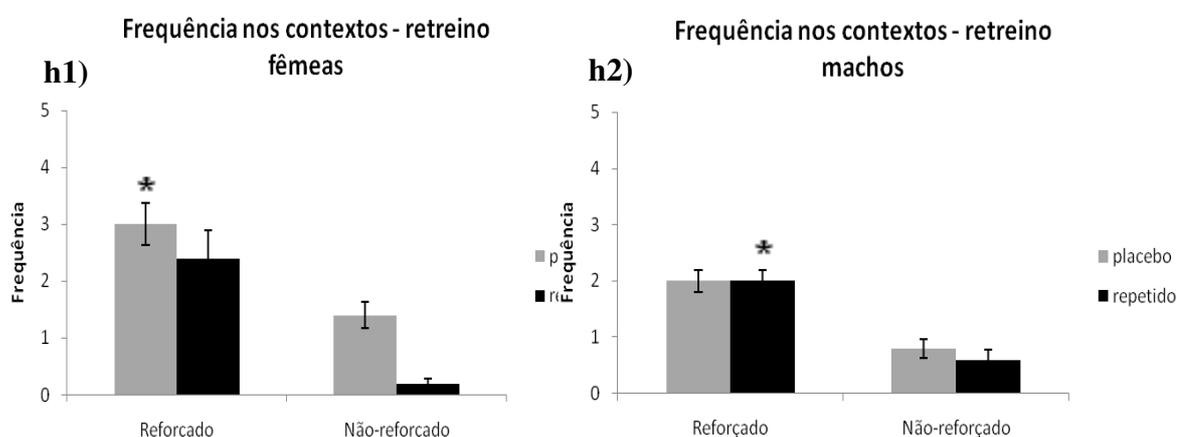
**Figuras e1 e e2:** Frequência de entradas nos contextos reforçado e não-reforçado durante os treinos para os gêneros. Eles não diferiram significativamente (*Mann-Whitney*). Contudo, levando-se em conta os contextos, cada um dos sexos teve melhor desempenho no contexto que havia a comida em relação daquele que não tinha. A exceção foi o treino 1 para as fêmeas, pois não teve diferença estatística. *Wilcoxon*, \*=  $p < 0,05$ . Barras de erros representam o erro padrão dos dados.



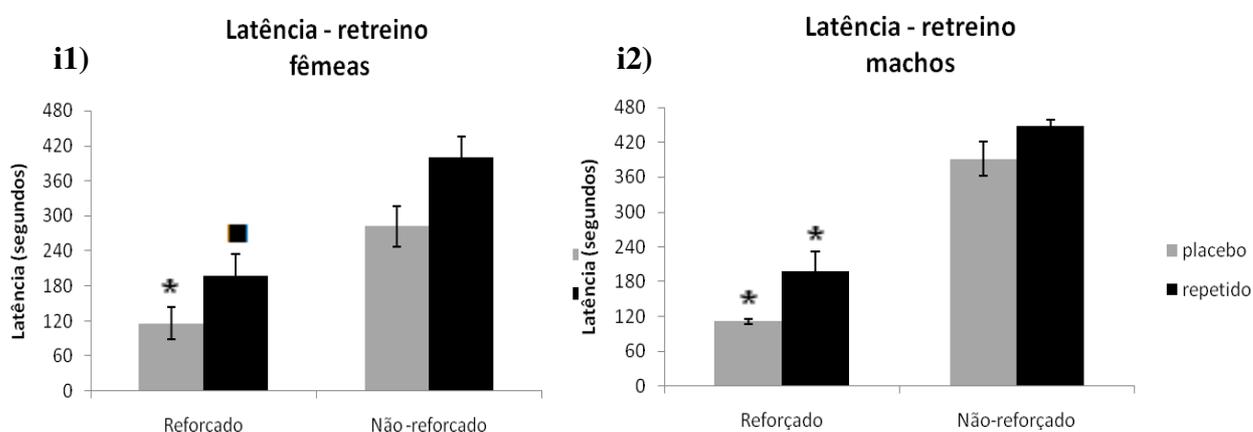
**Figuras f1 e f2:** Representam o tempo que fêmeas e machos gastaram para entrar nos contextos reforçado e não-reforçado. Os sexos não diferiram entre eles (Teste de *Mann-Whitney*). Entretanto o tempo que demorarm para entrar no contexto com comida foi menor em todas as sessões, para ambos os grupos. *Wilcoxon*, \*=  $p < 0,05$ ; ■ =  $p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



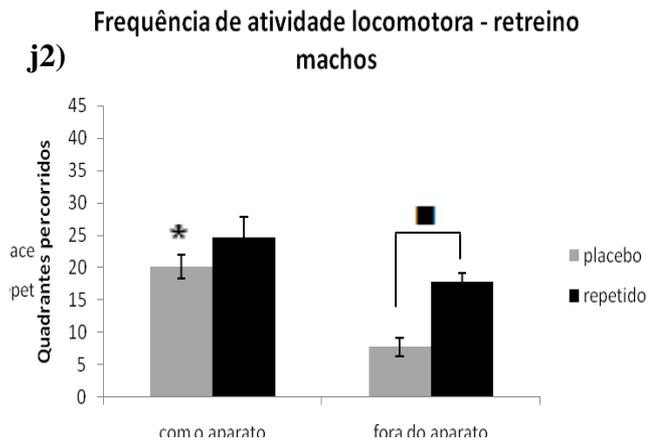
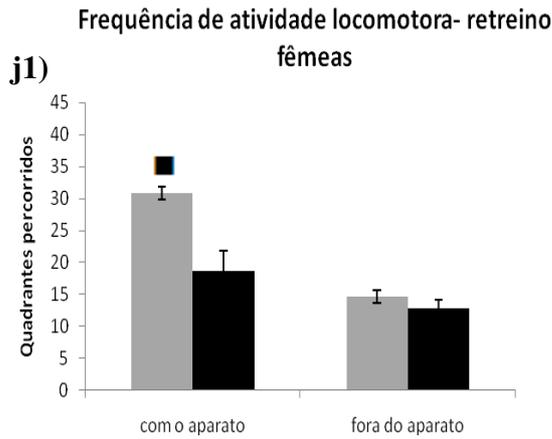
**Figura g1 e g2:** Taxa de exploração nos contextos para ambos os sexos, nas duas condições de administração da cafeína: placebo e repetido. Nesta sessão não foram percebidas diferenças entre os gêneros nem para os grupos experimentais, apenas diferenças do contexto reforçado versus não-reforçado. Wilcoxon, \*=  $p < 0,05$ ; ■ =  $p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



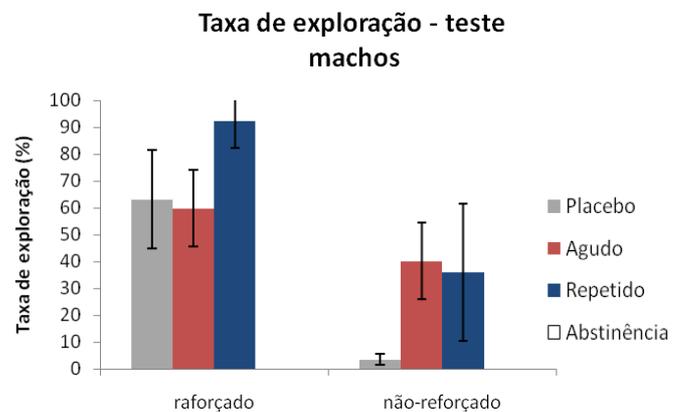
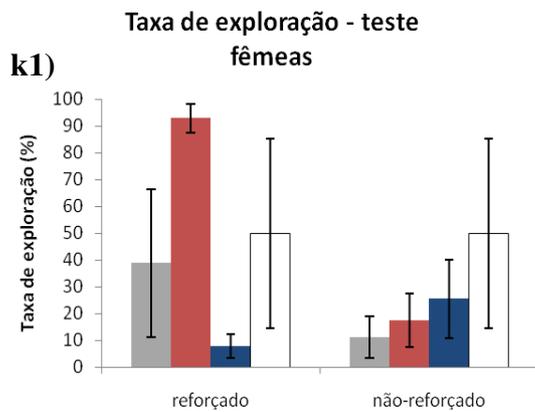
**Figura h1 e h2:** Frequência de entrada nos contextos para machos e fêmeas durante o retreino nas duas situações experimentais: placebo e repetido. Ambos os sexos demonstraram uma maior frequência de entrada para o contexto reforçado em relação ao não-reforçado. Wilcoxon, \*=  $p < 0,05$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



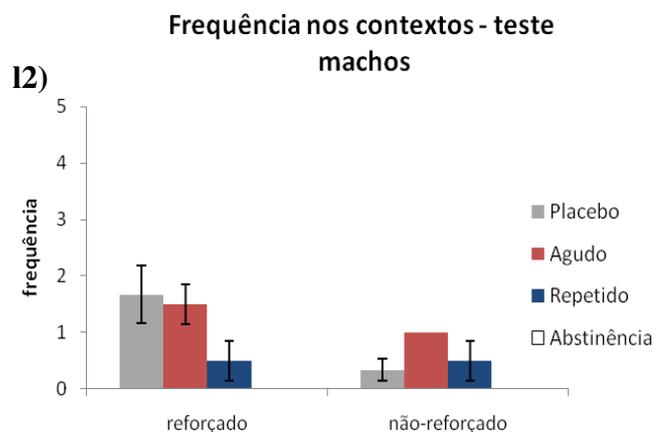
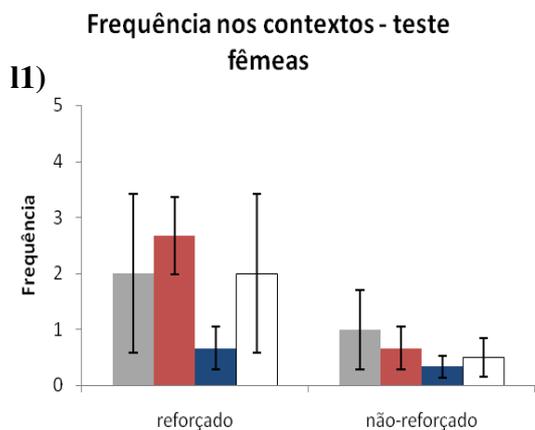
**Figura i1 e i2:** Latência para a primeira entrada nos contextos, para fêmeas e machos nas duas situações experimentais: placebo e repetido. Ambos os sexos demonstraram diminuição no tempo de entrada para o contexto reforçado em relação ao não-reforçado, contudo a diferença não foi significativa ao comparar-se os gêneros. Wilcoxon, \*=  $p < 0,05$ ; ■ =  $p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



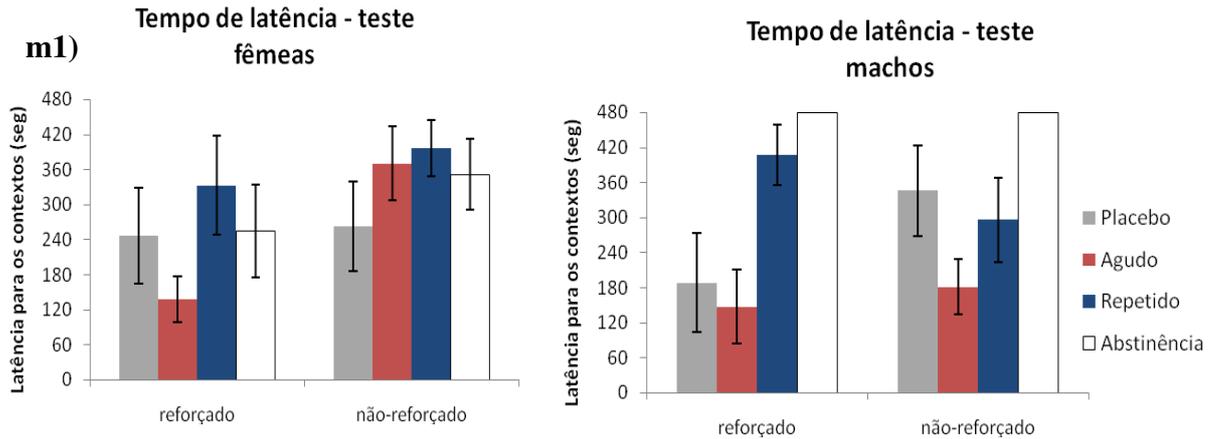
**Figura j1 e j2:** Freqüência de atividade locomotora com o aparato versus fora do aparato, para fêmeas e machos durante o retreino. Ambos os sexos interagem mais com o aparato quando não ingerem cafeína. Já aqueles que ingerem repetidamente não há diferença de interação com o aparato e fora dele. Adicionalmente, encontramos uma tendência ao comparar a atividade dos machos fora do aparato, quando eles ingerem ou não a cafeína. Teste *t* independente, \* =  $p < 0,05$ ; ■ =  $p < 0,08$ . Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



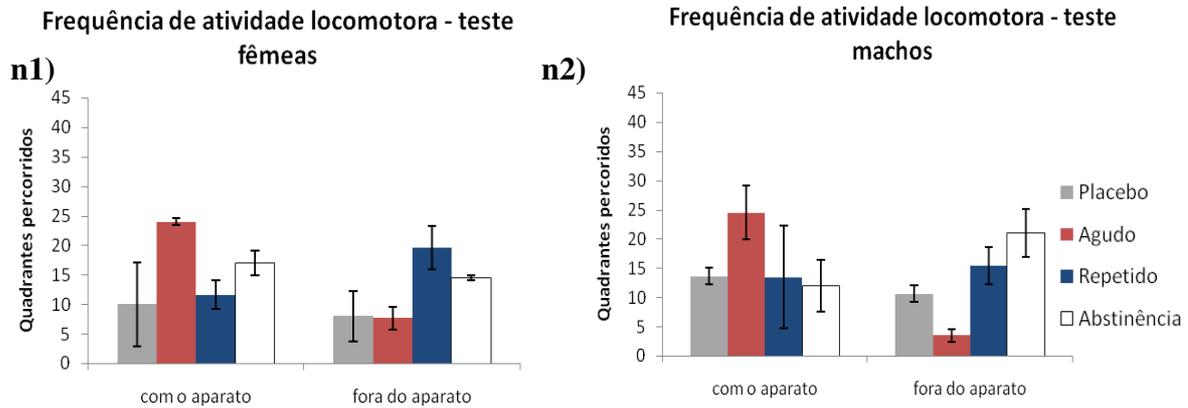
**Figuras k1 e k2:** Taxa de exploração nos contextos para ambos os sexos, nas quatro condições de administração da cafeína: placebo, agudo, repetido e abstinência. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



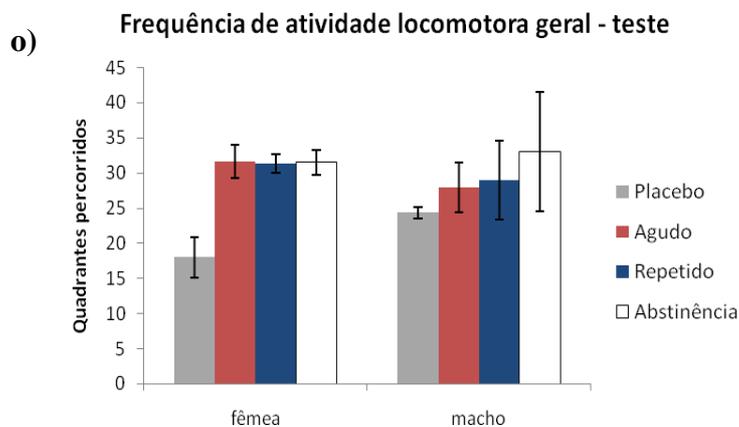
**Figuras l1 e l2:** Freqüência de entrada nos contextos reforçado e não–reforçado para machos e fêmeas durante o teste nas quatro situações experimentais: placebo, agudo, repetido e abstinência. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



**Figuras m1 e m2:** Tempo de latência, em segundos, para a primeira entrada nos contextos reforçado e não-reforçado durante o teste nas quatro situações experimentais: placebo, agudo, repetido e abstinência. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



**Figuras n1 e n2:** Frequência de atividade locomotora com o aparato versus fora do aparato para fêmeas e machos durante a sessão de teste, nas quatro situações experimentais: placebo, agudo, repetido e abstinência. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.



**Figura o:** Frequência de atividade locomotora geral durante o teste para fêmeas e machos nas quatro situações experimentais: placebo, agudo, repetido e abstinência. Barras de erro representam o erro padrão dos dados.