

KATHIANE DOS SANTOS SANTANA

A CAFEÍNA COMO AGENTE MODULADOR DO CICLO
ATIVIDADE-REPOUSO E MEMÓRIA EM SAGUIS

(Callithrix jacchus)

Tese apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Doutor em
Psicobiologia.

NATAL

2014

KATHIANE DOS SANTOS SANTANA

A CAFEÍNA COMO AGENTE MODULADOR DO CICLO
ATIVIDADE-REPOUSO E MEMÓRIA EM SAGUIS

(Callithrix jacchus)

Tese apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte, para
obtenção do título de Doutor em
Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. John Fontenele Araujo

NATAL

2014

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Santana, Kathiane dos Santos.

A cafeína como agente modulador do ciclo atividade-reposo e memória em Saguís (*Callithrix jacchus*) / Kathiane dos Santos Santana. – Natal, RN, 2014.

95 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. John Fontenele Araujo.

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

1. *Callithrix jacchus*. – Tese. 2. Cafeína. – Tese. 3. Memória. – Tese. I. Araujo, John Fontenele. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 599.821

Título: A cafeína como agente modulador do ciclo atividade-reposo e memória em saguis.

Autor: Kathiane dos Santos Santana

Data da Defesa: 26/09/2014

Banca Examinadora

Profa. Dra. Crhistiane Andressa da Silva
Universidade Federal da Paraíba, PB

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa
Universidade Federal da Paraíba, PB

Prof. Dr. Hindiael Aeraf Belchior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Profa. Dra. Nicole Leite Galvão Coelho
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Prof. Dr. John Fontenele Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas (...) E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, pela vida que me deram e por tudo que me proporcionaram e ainda me proporcionam. A eles todo meu respeito, carinho e amor eternos!

Aos meus irmãos e familiares pelo apoio e incentivo ao longo de toda essa jornada.

Ao meu orientador John, que ao longo desses 10 anos sob sua orientação me ensinou a fazer Ciência e a ele agradeço boa parte da profissional que sou hoje. Muito obrigada por tudo e por me aturar tanto tempo (rsrs)... agora é o momento de alçar novo voos! Espero sempre poder contar com seus conselhos!

Aos meus queridos amigos, que com a amizade a alegria, nas horas boas e ruins, fizeram dessa minha caminhada mais prazerosa.

Aos companheiros (e amigos) que passaram ou ainda estão no LNRB, em especial Crhis, Bruna, Carol, Cleanto, Felipe e Julio. Nesse tempo de lab compartilhamos problemas e dividimos as angústias. Mas ao mesmo tempo também passamos por muitos momentos alegres, que fizeram valer a pena a vida de estudante acadêmica.

Aos estudantes de IC, em especial Ricardo e Manu, por me ajudarem na árdua função de cuidar dos saguis. Não foi fácil, mas conseguimos dar conta do recado.

A todos os envolvidos no Núcleo de Primatologia, por me darem o suporte necessário para que eu pudesse trabalhar com os saguis.

Ao professor Marconi e seus estudantes de IC pela enorme ajuda na construção dos sistemas baseados em giroscópio.

Aos professores, estudantes e funcionários da Pós Graduação em Psicobiologia.

Aos meus adoráveis saguis, que me permitiram estudá-los, e me ensinaram a respeitar, não somente eles, mas todos os animais utilizados em experimentação animal.

Ao CNPQ, por acreditar e ter investido em meu doutorado, colaborando também com a profissional que sou hoje.

A todos os envolvidos acima mencionados, **MUITO OBRIGADA!** Vim, vi e venci!

RESUMO

SANTANA, K.S. (2014). A cafeína como agente modulador do ciclo atividade-reposo e memória em saguis (*Callithrix jacchus*). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

A cafeína é a substância psicoativa mais utilizada, com efeitos na melhoria da atenção, humor, memória e alerta. Mas quando ingerida próxima ao horário de dormir, o que também pode interferir na memória. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da cafeína na memória, e se este efeito é dependente de alterações do ciclo de atividade-reposo, em saguis (*Callithrix jacchus*). Foram utilizados 16 saguis adultos (10 fêmeas e 6 machos), mantidos individualmente em laboratório e submetidos ao ciclo claro-escuro 12:12 h. Para registro do ciclo atividade-reposo foi utilizado dois sensores. O sensor baseado em giroscópio totaliza atividade a cada 30 seg, e detecta o mínimo de movimentação exercida pelo animal, sendo inédito em averiguar atividade noturna. O segundo sensor é o de infravermelho, que totaliza a cada 5 min e não detecta movimento dentro da caixa ninho, sendo utilizado pra registro diurno. Ainda utilizamos câmera para registro da fase de reposo para um sagui. A tarefa cognitiva teve todas as sessões gravadas, e contou com cinco fases: 1) dois dias de habituação. 2) Treinos, onde os saguis discriminavam um contexto reforçado (CR) de um não-reforçado (CNR) por 8 dias. 3) Administração oral da cafeína (10mg/kg) ou placebo mais ou menos 1 hora antes do início do sono, por 8 dias, com animais ingerido placebo ou cafeína. 4) Retreino, seguido da administração do placebo (com o grupo placebo - GP) ou cafeína (com os grupos contínuo- GC e agudo- GA). 5) Teste, para avaliar aprendizagem ao CR. As sessões duravam 8 min, e iniciavam às 7:00 h para as habituações, treinos e teste; e às 15:15 h para o retreino. Os resultados demonstraram que para a primeira validação dos sensores baseados em giroscópio, que foi a comparação com o registro da câmera, houve coincidência dos métodos de 68,57% do registro de atividade noturna. Assim, os sensores baseados em giroscópio foram capazes de detectar atividade noturna. A segunda validação foi a comparação da atividade locomotora registrada pelos sensores de infravermelho, onde as curvas de atividade para ambos os sensores se assemelharam quanto ao padrão de distribuição. Ao averiguar o efeito da cafeína no ritmo de atividade-reposo para GP, GA e GC, utilizando os sensores baseado em giroscópio e de infravermelho, a maioria das diferenças existentes foram intra-grupo. Para os dados da tarefa cognitiva, os saguis aprenderam a discriminar CR de CNR. Quanto ao efeito da cafeína na evocação da memória, o GC apresentou déficits para recordação da tarefa durante o teste, e GA não foi afetado pela administração da cafeína. Como conclusões, temos que a cafeína próxima ao sono possui efeito modulatório na memória em saguis. Ainda, o sensor baseado em giroscópio foi capaz de registrar atividade noturna. Portanto o uso deste dispositivo, não invasivo, permite os saguis exibirem seu comportamento dentro das condições laboratoriais, o mais natural possível.

Palavras chave: cafeína, sono, memória, sensor baseado em giroscópio, sagui-comum.

ABSTRACT

SANTANA, K.S. (2014). Caffeine modulates Activity-Rest Cycle and memory in marmosets (*Callithrix jacchus*). PhD Thesis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal.

Caffeine is the most consumed psychostimulant, with effects on attention, memory, and arousal. But when this substance is ingested near to bedtime there is a decrease on sleep, interfering on mnemonic processes. So, our aim was to investigate how the caffeine ingested near to sleep onset acts on sleep and memory in marmosets. We used 16 adult marmosets, single housed, in a 12:12h light-dark cycle. For registering locomotor activity were used two kinds of sensors. The gyroscope sensor registers activity each 30 sec and detects motion with good accuracy. Because of this we used this sensor for detecting nocturnal activity. The second sensor was based on infrared and accumulates activity each 5 min and it's not able to detect nocturnal activity, just diurnal activity. We also used camera for registering Rest phase of one marmoset. For the cognitive task, the animals needed to learn a rewarded context (CR) when compared to a non-rewarded context (CNR). This experiment comprises 5 phases: 1) Two days of habituation to apparatus; 2) Training for 8 days; 3) oral administration of caffeine (10 mg/kg) or placebo administration \pm 1h before sleep onset, for 8 days, with marmosets receiving placebo or caffeine; 4) retraining to apparatus and after that, placebo administration (placebo group-GP), or caffeine administration (with continuous group-GC and acute group-GA); 5) Test, for evaluating learning to CR. The sessions were filmed and each one had 8 min of duration. At 7 am started the habituation, training and test sessions, and at 3:15 pm started retraining. The results for gyroscope sensor showed that there was coincidence of 68,57% with nocturnal register of the cameras. Then, the gyroscope sensors detected nocturnal activity for all experimental groups. Moreover, when compared sensor gyroscope with sensor based on infrared, was observed that both sensor presented similarity on patterns of activity curve. When we observed the effects of caffeine on Activity-Rest Cycle in GP, GA and GC, is possible to see that that gyroscope sensors and based on infrared presented only intra group differences. As behavioral results, the marmosets learned to discriminate CR when compared to CNR. Moreover, GP presented deficits on memory recall during the test, and GA increased the memory recall, when both were compared to GP. We concluded that the marmosets were able to learning the cognitive task and that the caffeine ingested near to sleep onset acts modulating memory in these animals. Moreover the gyroscope sensor can be used as alternative tool for investigating nocturnal activity. Then, the utilization of this non-invasive device allows marmosets exhibit their behavior within the laboratory conditions as natural as possible.

Keywords: caffeine, sleep, memory, gyroscope sensors, common marmosets.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Sono	05
1.2 Memória	09
1.3 O uso do sagui como sujeito experimental	13
1.3.1 Sagui: um animal genuinamente diurno	13
1.3.2 Entendendo o ciclo vigília /sono (CVS) em saguis	14
1.4 Utilização de dispositivos para detecção do ciclo de atividade-reposo na experimentação animal.	15
1.5 Justificativa para o estudo	16
2. OBJETIVOS	18
3. METODOLOGIA	19
3.1 Sujeitos experimentais	19
3.2 Registro de atividade locomotora e ciclo de atividade-reposo em saguis	20
3.3 Aparato experimental	23
3.4 Tarefa cognitiva: preferência condicionada por lugar	24
3.5 Delineamento experimental	25
3.6 Sobre a administração da cafeína	29
3.7 Avaliação comportamental	31
3.8 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Detecção da atividade noturna	35
4.2 Comparação dos sistemas para detectar o ritmo de atividade-reposo	37
4.3 Efeito da cafeína no ritmo de atividade-reposo para os sensores de giroscópio	40
4.4 Efeito da cafeína no ritmo de atividade-reposo para os sensores de infravermelho	49
4.5 Aprendizagem dos saguis à tarefa cognitiva de preferência condicionada	62
4.6 Efeito da cafeína na evocação da memória em saguis	65
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8. ANEXOS	90
I. Actogramas e gráficos em forma de onda: sensor de infravermelho	90
II. Capítulo de livro: Functional Organization of Circadian Timing System of diurnal Primate (marmoset).	93

LISTA DE ABREVIATURAS

A1 – Receptores para Adenosina do tipo A1

A2a – Receptores para Adenosina do tipo A2a

A2b – Receptores para Adenosina do tipo A2b

A3 – Receptores para Adenosina do tipo A3

ATP – Adenosina Trifosfato

CPP – Conditioned place preference (preferência condicionada pelo lugar)

CPA – Conditioned place aversion (aversão condicionada pelo lugar)

EEG – Eletroencefalograma

REM – Rapid eye movement (movimento rápido dos olhos)

SOL – Sono de ondas lentas

UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

IV – Variabilidade intradiária

IS – Estabilidade interdiária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hipnograma de um indivíduo adulto normal. Neste é possível observar os períodos de vigília, sono não-REM (compreendido pelas fases N1, N 2 e N3 ou sono de ondas lentas) e REM ao longo do tempo.

Figura 2: Modelo de regulação do sono baseado em dois processos. Nesta figura, o processo Circadiano “C” funciona de modo a restringir o sono num horário do dia que é apropriado ao indivíduo.

Figura 3: Dispositivos utilizados para o experimento: sensores de infravermelho (circulado em vermelho) e sensores baseados em giroscópio (à direita), os quais são acoplados na parede do cano de dormir.

Figura 4: Aparato experimental utilizado para a tarefa cognitiva.

Figura 5: Esquema do procedimento experimental.

Figura 6: Saguí interagindo de dentro da sua gaiola com o aparato experimental.

Figura 7: Representação de como a cafeína ingerida uma hora antes da fase de sono tem efeito no aumento da atividade locomotora de saguis mantidos em ambientes de laboratório.

Figura 8: Actogramas representativos de um saguí.

Figura 9: Comparação das curvas de atividade locomotora entre os sensores baseados em giroscópio (eixo situado à esquerda) e os sensores de infravermelho (eixo situado à direita).

Figura 10: Comparação das curvas de atividade locomotora entre os sensores baseados em giroscópio (eixo situado à esquerda) e os sensores de infravermelho (eixo situado à direita).

Figura 11: Actogramas dos três grupos experimentais, os quais foram construídos com a utilização dos sensores baseados em giroscópio. Para entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento, os actogramas foram divididos em a) Linha de base 1, b) Linha de base 2, c) Habituação + treinos, d) Administração das substâncias + retreino + teste e e) Pós-experimento.

Figura 12: Gráficos em forma de onda dos três grupos experimentais, construídos com a utilização dos sensores baseados em giroscópio. Para o entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento em cada um dos animais, os gráficos em forma de onda foram divididos em Linha de base 1 (LB1), Linha de base 2 (LB2), Habituação + treinos (HAB+TR), Administração das substâncias + retreino + teste (ADM+RET+TES) e Pós-experimento (PÓS).

Figura 13: Efeito da cafeína na atividade locomotora no claro para cada fase experimental, registrado através do sensor baseado em giroscópio. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas diferenças intragrupo. (Teste T, $p > 0,05$).

Figura 14: Atividade noturna coletada ao longo das fases experimentais, através dos sensores baseados em giroscópio. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde foi possível observar uma tendência intergrupo, apenas no que diz respeito a primeira sessão de administração da cafeína, onde o grupo contínuo teve atividade locomotora maior se comparado aos grupos controle e agudo (\dagger , ANOVA, $F(2,13) = 3,30$, $p \leq 0,06$). Além disso, diferenças intragrupo foram observadas (teste T dependente, $p \leq 0,05$).

Figura 15: Efeito da cafeína no somatório da atividade locomotora durante o claro, para cada fase experimental. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas diferenças intragrupo. (teste T, $p > 0,05$).

Figura 16: Efeito da cafeína no somatório da atividade locomotora durante o escuro, registrado através do sensor baseado em giroscópio para cada fase experimental. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde foi possível observar uma tendência intergrupo, apenas no que diz respeito a primeira sessão de administração da cafeína, onde o grupo contínuo teve atividade locomotora maior se comparado aos grupos controle e agudo (\dagger , $F(2,13) = 3,09$, ANOVA $p \leq 0,06$). Além disso, diferenças intragrupo são observadas (teste T dependente, $p \leq 0,05$).

Figura 17: Actogramas de animais representativos dos três grupos experimentais, obtidos pelos sensores de infravermelho. Para entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento, os actogramas foram divididos em a) Linha de base 1,

b) Linha de base 2, c) Habituação + treinos, d) Administração das substâncias + retreino + teste e e) Pós-experimento.

Figura 18: Gráficos em forma de onda dos três grupos experimentais, os quais foram obtidos através dos sensores de infravermelho. Para o entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento em cada um dos animais, os gráficos em forma de onda foram divididos em Linha de base 1 (LB1), Linha de base 2 (LB2), Habituação + treinos (HAB+TR), Administração das substâncias + retreino + teste (ADM+RET+TES) e Pós-experimento (PÓS).

Figura 19: Efeito da cafeína na média da fase ativa para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Figura 20: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Figura 21: Efeito da cafeína na média do fim da atividade locomotora para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Figura 22: Efeito da cafeína na média da Variabilidade intradiária (IV) para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Figura 23: Efeito da cafeína na média da estabilidade interdiária (IS) para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo. Não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas intragrupo. Teste T para medidas dependentes. Agudo: Lb1 x adm+ret, $T(4) = 3,12$, $p = 0,035$; Lb2 x adm+ret, $T(4) = 2,72$, $p = 0,047$; hab+tr x adm+ret, $T(4) = 4,24$, $p = 0,013$. Contínuo: Lb1 x adm+ret, $T(4) = 4,52$, $p = 0,010$; Lb2 x adm+ret, $T(4) = 3,90$, $p = 0,017$; hab+tr x adm+ret, $T(4) = 3,67$, $p = 0,021$.

Figura 24: Latência para o primeiro contato com CR e CNR durante os treinos. À esquerda, o gráfico demonstra que os saguis frequentam mais rapidamente o contexto reforçado com alimento (Wilcoxon, $*p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 25: Duração dos contatos que os saguis realizaram no CR e CNR durante o treino. À esquerda o gráfico demonstra que os saguis permanecem por mais tempo no contexto pareado com a presença de alimento (Wilcoxon, $*p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 26: Duração das observações que os saguis fizeram nos CR e CNR durante o treino. À esquerda, o gráfico demonstra que os saguis observam por mais tempo o contexto pareado com a presença de alimento (Wilcoxon, $*p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 27: Efeito da cafeína na latência para contato com CR e CNR durante a sessão de retreino. É possível observar os três grupos interagem mais rapidamente no contexto que houve a presença de alimento (Wilcoxon, $* p < 0,05$. placebo Z= 3,52, p=0,0004; agudo: Z=2,02, p=0,043; contínuo: Z=2,02, p=0,043). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 28: Efeito da cafeína na duração de contatos para o CR e CNR durante a sessão de retreino. Nesta figura verifica-se que os saguis, dos três grupos permanecem por mais tempo em contato com o contexto que foi reforçado (Wilcoxon, $*p < 0,05$. placebo: Z= 1,99, p= 0,047; agudo: Z= 2,02, p=0,043; contínuo: Z= 2,02, p=0,043). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 29: Efeito da cafeína na duração de observações realizadas para o CR e CNR durante a sessão de retreino. Nesta observa-se que os saguis dos três grupos observam por mais tempo o contexto que foi reforçado (Wilcoxon, $*p < 0,05$. placebo: Z=2,20, p=0,028; agudo: Z= 2,02, p=0,043; contínuo: Z= 2,02, p=0,043). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 30: Efeito da cafeína na latência para contato com CR e CNR durante a sessão de teste. Nesta figura é possível observar que apenas o grupo que não ingeriu cafeína diminuiu significativamente a latência para o primeiro contato com o contexto reforçado (Wilcoxon, $*p < 0,05$. Z=1,99, p=0,046). Para o grupo agudo tem-se uma tendência para tal significância (Wilcoxon, Z=1,83, p=0,063) Diferindo desses resultados, o grupo de ingestão contínua apresentou resultados opostos, com tendência ao primeiro contato com o contexto não reforçado (Wilcoxon, Z=1,83, p=0,061). Ademais se verificou diferenças entre os grupos, onde o grupo agudo entrou em contato mais rapidamente com CR se comparado ao grupo contínuo (Mann-Whitney, $*p < 0,05$. Z= -2,40, p=0,016). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 31: Efeito da cafeína na duração de contatos para CR e CNR durante as sessão de teste. Nesta figura é possível observar que apenas os grupos de ingestão aguda e placebo permaneceram mais em contanto com o que contexto que foi reforçado (Wilcoxon, $* p < 0,05$. placebo:Z=1,99, p=0,046; agudo: Z=1,97; p=0,048). Além disso, as análises entre os grupos

demonstraram que estes dois grupos permaneceram mais tempo em contato com CR quando comparados ao grupo de ingestão contínua da cafeína (Mann-Whitney, $*p < 0,05$. placebo x contínuo: $Z = 3,00$, $p = 0,035$; agudo x contínuo: $Z = 1,98$, $p = 0,047$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 32: Efeito da cafeína na duração de observações para CR e CNR durante as sessões de teste. Nesta é possível verificar que apenas o grupo de ingestão aguda permaneceu mais tempo observando o contexto reforçado (Wilcoxon, $*p < 0,05$. , $Z = 1,02$, $p = 0,04$). Os demais grupos houve apenas tendência estatística para significância (Wilcoxon, placebo: $Z = 1,81$, $p = 0,0645$ e grupo contínuo: $Z = 1,82$, $p = 0,0679$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Figura 33: Relação entre o processo de regulação do sono proposto por Borbely (1982), com as variáveis não paramétricas IV e IS, e como todos estes modulam o sono, memória e cognição. Quando a cafeína é introduzida nesse modelo, percebe-se que ela modula tanto o componente homeostático como o circadiano, tendo como consequências prejuízos na eficiência do sono, memória e cognição.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Como os receptores centrais para Adenosina são afetados pela exposição à cafeína.

Tabela 2: Detecção de atividade noturna do sagui e a taxa de proporção de quanto os sensores baseados em giroscópio coincidiram ou não.

Tabela 3: Valores de T e p para as comparações entre os valores da média de atividade no claro e escuro totalizadas através do giroscópio. Em todas as sessões, os saguis movimentaram-se mais no claro em relação ao escuro (Teste T dependente).

Tabela 4: Efeito da cafeína na atividade locomotora no claro para cada fase experimental.

Tabela 5: Atividade noturna coletada ao longo das fases experimentais, através dos sensores baseados em giroscópio.

Tabela 6: Efeito da cafeína no somatório da atividade locomotora no claro para cada fase experimental.

Tabela 7: Efeito da cafeína no somatório da atividade locomotora no escuro para cada fase experimental, acrescido do erro padrão da amostra.

Tabela 8: Efeito da cafeína na média do mesor e erro padrão do mesor para cada fase experimental.

Tabela 9: Efeito da cafeína na média da amplitude para cada fase experimental, acrescidos dos dados em separado de cada um dos outliers destes grupos.

Tabela 10: Efeito da cafeína na duração da fase ativa do ciclo atividade-reposo em saguis.

Tabela 11: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, acrescida de seu erro padrão, para os três grupos experimentais.

Tabela 12: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, acrescida de seu erro padrão, para os três grupos experimentais.

Tabela 13: Efeito da cafeína na variabilidade intradiária (IV) para cada fase experimental.

Tabela 14: Valores de T e p significativos ($p \leq 0,05$) para os animais inseridos no grupo contínuo, quando analisado os parâmetros de IV.

Tabela 15: Efeito da cafeína na média da estabilidade interdiária (IS) para cada fase experimental.

Tabela 16: Apresentação das variáveis para as sessões de habituação.

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo conhecimento acerca dos mecanismos e funções do sono e memória nos humanos e demais animais sempre tiveram uma consideração especial nas Neurociências, Fisiologia e ciências afins. Desde os experimentos de memória realizados por Thorndike com gatos e cães (1898), a procura pelo engrama – localização física da memória – por Lashley (1920s) e Donald Hebb (1951), até a invenção do Eletroencefalograma por Hans Berger (1929), esses temas têm sido alvo constantes de investigações e veiculações na mídia. E o trabalho em questão surge como um ponto a mais para enriquecimento desses temas.

É interessante observar e entender como estas duas funções superiores são afetadas por substâncias exógenas ao nosso corpo. Tais substâncias vêm ganhando notoriedade e alcance popular, pois têm sido cada vez mais corriqueira a utilização com a finalidade de um estado geral de (aparente) bem estar. A exemplo destas substâncias exógenas tem o álcool. É sabido que em pequenas doses deixa o indivíduo relaxado e desinibido, mas em doses mais elevadas pode interferir na memória, capacidade de raciocínio e sono. Da mesma forma que o álcool, há também muitas outras substâncias de uso comum pelos humanos que podem igualmente afetar o sono e memória, como a nicotina e anfetaminas. Daí a notoriedade que os estudos nesse âmbito vêm ganhando, pois entendendo os efeitos destas substâncias, podemos tentar buscar alternativas para minimizar estes efeitos ou ainda descontinuar o uso.

A despeito das substâncias relatadas acima, há de se mencionar umas das mais utilizadas pela população, que é a cafeína. Quer seja como ingrediente ativo do café, ou em demais bebidas, alimentos ou fármacos que possuem essa substância em sua composição, a cafeína é de uso abrangente em todas as faixas etárias e populações espalhadas pelo mundo. O constante uso ao longo do dia possui efeitos na melhoria da atenção, humor, memória e alerta,

não somente em humanos como também em modelos animais (Ribeiro & Sebastião, 2010; Urry & Landolt, 2014; Ardaís et al., 2014). Mas como a ingestão da cafeína pode interferir no sono e na memória? A seguir, algumas explicações acerca dos mecanismos de ação da cafeína e como esta pode vir a modificar a expressão destas funções superiores num indivíduo.

A cafeína é um psicoestimulante pertencente ao grupo das Xantinas, que são caracterizadas por estimularem em curto prazo o sistema nervoso central. Tendo o nome científico de 1,3,7-trimetilxantina 3,7-diidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona, ela é extraída de plantas alcaloides e, encontra-se presente em alguns itens alimentares, como chocolates, e em bebidas como chá e café. Após a ingestão 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 em humanos é alcançado 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 dose letal de cafeína para o ser humano é de cerca de dez gramas, lembrando-se que uma xícara de café contém cerca de 125 mg de cafeína (James, 1997).

A cafeína possui uma variedade de mecanismos de ação, sendo uma droga que atua inespecificamente em vários receptores, centrais ou periféricos. Daí a diversidade de resultados encontrados de estudos envolvendo esta substância estimulante. Nos receptores periféricos, a cafeína poderá ter efeitos importantes como dilatação dos brônquios, estimulação do coração e aumento da excreção urinária, bem como diminuição da motilidade intestinal (Snedder, 1984). Enfim, produz-se um clássico estado de estimulação simpática, tal como se houvesse um comportamento de estresse onde as reservas corporais se mobilizariam.

No cérebro, ela alivia dores de cabeça. Ela também possui efeitos prejudiciais, como indução no aumento da secreção gástrica, agravando sintomas de gastrite e úlcera.

Contudo, quando se estuda o sistema nervoso central, foco de nosso estudo, o mecanismo de ação acontece via bloqueio de receptores metabotrópicos para adenosina (Daly & Fredholm, 1998; Meyer & Quenzer, 2005). Os efeitos celulares da adenosina são mediados via quatro subtipos de receptores para adenosina, todos acoplados à proteína G: A1, A2A, A2B, e A3 (Sebastiao & Ribeiro 2009). Todavia, os subtipos A1 e A2A (Tabela 1) são os envolvidos em promover os efeitos centrais. (Acguas et al., 2002, Urry & Landolt, 2014).

Tabela 1: Como os receptores centrais para Adenosina são afetados pela exposição à cafeína.

Receptor	Localização	Tipos de neurônios	Efeitos da cafeína	Ação da cafeína
A1	Em quase todas as áreas cerebrais, especialmente hipocampo, córtex cerebral e cerebelar e alguns núcleos talâmicos	Todos os tipos de neurônios (inespecífico)	Antagonista	Desinibição da liberação de neurotransmissores
A2A	Em regiões ricas em dopamina, Estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatório	Colocalizado com receptores D2.	Antagonista	Aumento da transmissão, via receptores D2

Adaptado de Lorist & Tops 2003

Estes dois subtipos de receptores para adenosina encontram-se amplamente distribuídos no cérebro (Lee & Reddington, 1986; Palmer & Stiles, 1995; Dixon et al., 1996). O subtipo A1 é mais presente em camadas corticais, hipocampo e estriado dorsal. E a estimulação dele abre diversos tipos de canais de potássio (K⁺), inibindo a enzima Adenilato ciclase (que cataliza a conversão de ATP a AMPc, uma importante molécula na transdução de sinal em eucariotas). Esta inibição acontece através da ativação das proteínas G inibitórias,

com consequente inativação transiente dos canais de sódio (Na^+) voltagem-dependentes (Bauer & Ishiwata, 2009).

Por sua vez, o subtipo A_{2a} encontra-se em menor quantidade de que o receptor anterior e geralmente co-localizado com receptores dopaminérgicos do subtipo D₂ no estriado ventral e algumas áreas dos gânglios basais (Palmer & Stiles, 1995; Dixon et al., 1996). Sua estimulação aumenta a atividade da Adenilato ciclase, por meio da ativação das proteínas G, induzindo assim a formação de Inositol fosfato e ativando a proteína quinase A – responsável, dentre outras coisas, por causar um bloqueio nas vias de consumo de ATP, por meio de reações bioquímicas de cascata (Urry & Landolt, 2014).

Por tudo que foi dito acima sobre os tipos de receptores para adenosina A₁ e A_{2a} e como eles agem a fim de promoverem os efeitos centrais inibitórios, é interessante como a cafeína age antagonizando estes receptores, com efeitos inversos esperados que a adenosina causaria. Dentre eles estão o envolvimento com a regulação do sono, ativação neural, aumento da motricidade e cognição (Ribeiro & Sebastião, 2010).

1.1 SONO

O sono é um estado fisiologicamente bem caracterizado na maioria dos animais vertebrados pela perda de consciência e reduzida responsividade ao estímulo externo. Ele ainda alterna com a fase de vigília de maneira circadiana (duração de aproximadamente 24 horas para a somatória das duas fases), sendo assim denominado o ciclo vigília-sono. E, muito diferente do que pensavam os primeiros estudiosos do sono, os quais tratavam este evento como uma cessação da vigília (Kleitman, 1987) e algo passivo, semelhante a um botão de

“liga ou desliga”, hoje o sono é reconhecido como um processo ativo envolvendo múltiplos e complexos mecanismos fisiológicos e comportamentais em vários sistemas e regiões do sistema nervoso central (Siegel, 2005).

Assim como o ciclo vigília-sono, a fase de sono também possui ritmicidade entre seus estágios, assim definidos: Sono não-REM (subdividido em N1, N2 e N3) e sono REM (figura 1). Este ritmo ultradiano (que apresenta frequência com duração menor que 24 h) dura em torno de 90 – 100 minutos entre os estágios de sono para o ser humano, e contam com 4 a 6 ciclos para uma noite de sono (Neves et al., 2013).

O estágio N1 do sono não-REM é o mais superficial do sono. Esta transição da vigília para o sono é caracterizada por discreta diminuição da atividade elétrica cerebral, presença de movimentos oculares rápidos e discreta hipotonia (Pinto Jr & Andersen, 2012). Com o aprofundamento do sono, chega-se ao estágio N2, o qual está presente tanto na primeira como segunda metade do sono e ocupa cerca de 50% do total de sono de um humano (Rasch & Born, 2013). Este possui como características o início da sincronização da atividade elétrica cerebral, que reflete a redução do grau de atividade dos neurônios corticais. O estágio N3 ou sono de ondas lentas (SOL) é predominante na primeira metade do sono e é caracterizado pela sincronização da atividade neural do córtex e 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). De modo geral, o sono NREM apresenta atividade neuronal, taxa metabólica, temperatura encefálica e atividade simpática reduzidas, aumento da atividade parassimpática, pouca atividade muscular e a regulação da temperatura pelo hipotálamo (Kandel, Schwartz & Jesse, 2003).

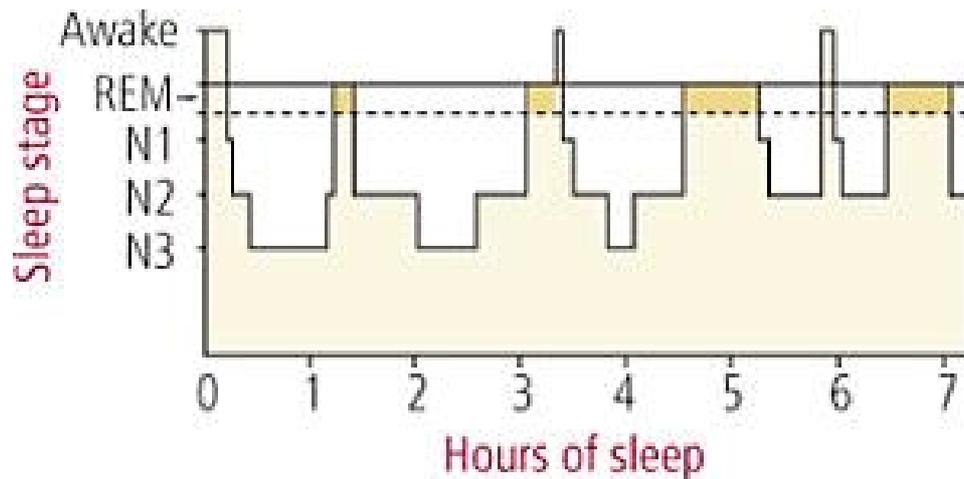


Figura 1: Hipnograma de um indivíduo adulto normal. Neste é possível observar os períodos de vigília, sono não-REM (compreendido pelas fases N1,N2 e N3 ou sono de ondas lentas) e REM ao longo do tempo. Fonte: <http://harvardhealth.staywell.com/viewNewsletter.aspx?NLID=65&INC=yes>.

O sono REM por sua vez, acontece predominantemente durante a segunda metade do sono em humanos e demais primatas, aves e alguns répteis (Hoshino, 2008). Também chamado de sono paradoxal, devido à dessincronização da atividade eletro-cortical semelhante à vigília. Ele é caracterizado em humanos e alguns modelos animais 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).

Ainda no que diz respeito ao sono, este é regulado por vários fatores internos e externos que interagem entre si. Por tal fato, em 1982 o pesquisador Borbely propôs um modelo de regulação do ciclo vigília-sono (figura 2), composto por dois mecanismos que agem através da interação entre a homeostase do sono e a ritmicidade circadiana controlando ativamente o sono. Estes dois mecanismos são os Processos Homeostático (Processo S) e Circadiano (Processo C).

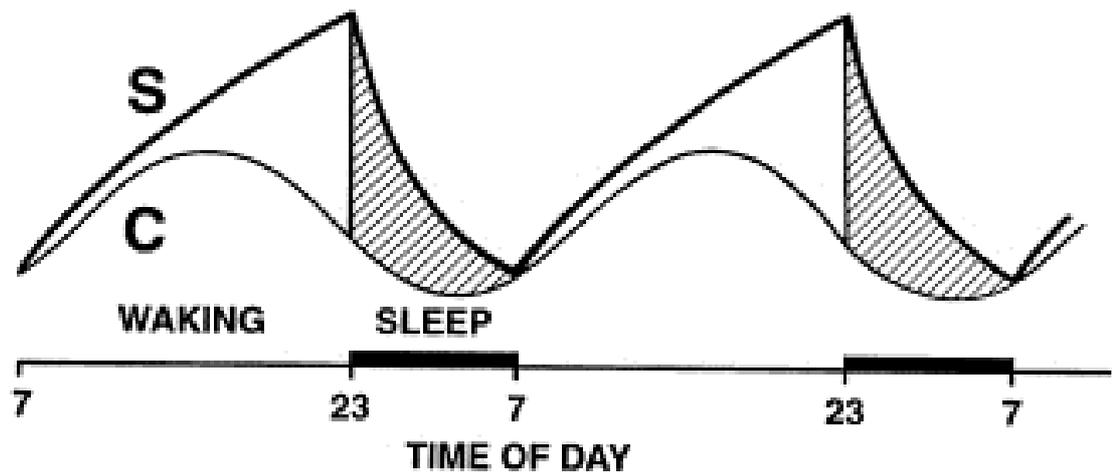


Figura 2: Modelo de regulação do sono baseado em dois processos. Nesta figura, o processo Circadiano “C” funciona de modo a restringir o sono num horário do dia que é apropriado ao indivíduo. Este mecanismo oscila com um período de aproximadamente 24 h e é controlado pelo sistema de temporização circadiano. Já o processo homeostático “S”, reflete o acúmulo da necessidade do sono durante o período de vigília de um animal e redução dessa necessidade durante a fase de sono. Hipotetiza-se que para o processo “S” um fator neuroquímico, a adenosina, é acumulada ao longo do dia, intensificando a necessidade do sono. (Borbely, 1982).

O processo S depende da duração da vigília prévia (mais tempo acordado, maior a pressão para dormir), de tal maneira que a pressão deste processo aumenta durante a fase de vigília e reduz durante o sono. Este atua através de fatores neuroquímicos que se acumulam nas fendas sinápticas durante a vigília, sendo a adenosina o candidato mais forte a esse posto (o qual será discutido com mais detalhes a seguir). Este processo homeostático interage com o processo C, que é regulado pelo Sistema de Temporização Circadiano e depende da hora que dormimos, de acordo com o nosso próprio ritmo circadiano. É intrínsecamente condicionado pelo valor mínimo da temperatura central e pelo ritmo de produção de melatonina, tendo um papel importante na duração do sono, sem depender da vigília prévia.

Assim, os componentes circadiano e homeostático trabalham em conjunto para regulando a vigília e o sono (Cajochen, Chellappa & Schmidt, 2010). Dessa forma, quando o processo "C" indica que é momento de dormir (atraves do mínimo de temperatura registrada),

o processo "S" também aponta que já acumulamos necessidade de sono suficiente para dormir (alta pressão homeostática do sono, pelo acúmulo de adenosina). (Urry & Landolt, 2014).

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), já comentado anteriormente como este sendo principal fator neuroquímico agindo no processo homeostático do sono. A adenosina é um subproduto do ATP (adenosina trifosfato), e atua como um neuromodulador inibitório do sistema nervoso central, agindo sobre várias redes neurais, como sistemas colinérgicos e monoaminérgicos, responsáveis pela ativação neural e promoção da vigília. Como ao longo do dia muitas moléculas de ATP são utilizadas para as mais diversas funções orgânicas, proporcionalmente muitas unidades de adenosina ficam acumuladas nas fendas sinápticas ao longo do dia (Mackiewicz et al., 2003), causando progressivamente inibição de neurônios excitatórios promotores da vigília. Este aumento ocorre mais precisamente na região do prosencéfalo basal. Assim, a adenosina modula o controle do ciclo vigília-sono (Mackiewicz et al., 2003). Esta afirmação pode ser corroborada por meio de achados que indicam que a cafeína possui capacidade de atenuar o aumento da propensão de sono associado com a progressão da vigília (Landolt, 2008). Dessa forma, o consumo de cafeína atuando no sistema adenosinérgico, parece ser uma ferramenta eficaz para modular a vulnerabilidade individual para os efeitos negativos da privação de sono sobre o desempenho cognitivo e sono (Snel & Lorist, 2011).

Ainda a respeito do sono, sabe-se que além de ter como principais funções a conservação de energia, equilíbrio do meio interno, restauração de eletrólitos no organismo, nos mecanismos neurais, entre outros, esse fenômeno tem uma forte influência nos mecanismos mnemônicos. O indivíduo ao realizar uma tarefa cognitiva ao longo do dia e após dormir, no sono de ondas lentas ocorrerão 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). Portanto, uma boa noite de sono é essencial para que os mecanismos relacionados aos processos mnemônicos atuem eficientemente.

1.2 MEMÓRIA

O vocábulo “memória” na língua portuguesa pode ter vários significados, dependendo do contexto ao qual a palavra for inserida: memória de computador, memória RAM, memória de elefante, memória imune, memória social e tantos outros sentidos.

Mas qual o significado do vocábulo memória e eventos a ele relacionados na expressão do comportamento de um ser vivo? É sabido que o comportamento é o resultado da interação entre genes e ambiente. E um dos mecanismos pelos quais o comportamento é alterado é através dos mecanismos de aprendizado e da formação de memória (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, consolidadas e menos passíveis de interferências (Tomaz, 1993). Tanto o aprendizado quanto a memória são essenciais para a sobrevivência, pois a partir destas habilidades é que o indivíduo poderá adaptar-se ao meio, modificar comportamentos em função de experiências anteriores, ou ainda maximizar este comportamento dado à vivência.

Para garantir que haja a formação de memória, com posterior modificação do comportamento, é necessário que a informação passe por três grandes subprocessos: Aquisição ou codificação, consolidação e recordação ou evocação. Durante a aquisição, a percepção de um estímulo resulta em um novo traço de memória, que num primeiro momento é altamente suscetível a interferências e pode enfraquecer com o tempo (Rasch & Born, 2013). Durante a consolidação, o traço de memória lábil é gradualmente estabilizado pelo provável envolvimento de múltiplos processos neurais de consolidação a longo e curto-prazo (McGaugh, 2000), os quais servem para fortificar e integrar esta nova memória a uma rede de conhecimento pré-existente. Durante a recordação, a memória estocada em regiões específicas do cérebro são acessadas e recuperadas.

Estudos tanto em humanos quanto em modelos animais demonstram que a memória não é uma entidade singular, que se localiza em apenas uma região cerebral. Ao contrário, ela é composta por vários sistemas que interagem entre si garantindo a resposta final (McGaugh, 2000). A exemplo da memória compartimentada em vários sistemas, temos o estudo com o paciente H. M (1926-2008). Scoville & Milner (1957) mostraram que mesmo sem a presença do lobo temporal medial, área importante que consolida informações de curto para longo prazo, este paciente ainda tinha capacidade de memorizar novas informações, embora alguns tipos de memória fossem deficientes.

Devido principalmente as pesquisas com o paciente H. M., os estudos relacionados à memória obtiveram grandes achados e definições até hoje seguidas pela comunidade científica. Dentre essas definições, temos a divisão da memória quanto a sua duração, a qual pode ser de curto ou longo prazo. Na memória de curto prazo a capacidade de armazenamento de informações se dá por tempo curto e de maneira relativamente limitada. Já na memória de longo prazo, as informações são estocadas e podem ser recordadas por prazos mais prolongados, talvez até indefinidamente.

Por sua vez, a memória pode ser evocada de duas formas: primeira, de maneira verbal (declarativa) para humanos, ou relacional para não humanos dado o aspecto relacional da memória declarativa; segunda forma, por meio não-verbal (não-declarativa), na qual o sujeito evoca as memórias através de atos, reflexos, desempenho motor ou resposta emocional (Squire, 2004). Estes dois tipos de sistemas de memórias são distinguidos dependendo do envolvimento de regiões do lobo temporal medial, particularmente do hipocampo, na aquisição da memória (Squire & Zola-Morgan, 1996).

A memória declarativa, dependente de hipocampo, pode ser dos tipos **1)** episódica – para eventos que envolvem um contexto espaço-temporal (incluindo memórias autobiográficas) e; **2)** semântica – para fatos que independem de um conhecimento contextual (Tulving, 1983). Por sua vez, a memória não-declarativa pode ser **1)** para hábitos e habilidades com dependência do neocórtex (Squire 2004); **2)** Perceptual ou *priming* – uma facilitação na recuperação de um estímulo que foi apresentado anteriormente e depende de mudanças dentro das vias do neocórtex (Squire, 2009); **3)** Condicionamento clássico – Aprendizado no qual um estímulo neutro é apresentado juntamente a um estímulo que provoca um ato, levando à evocação de uma resposta, e tem como estruturas cerebrais envolvidas a amígdala e cerebelo (Bear, Paradiso & Connors, 2008); **4)** Aprendizagem não-associativa (habituação e sensibilização) – forma robusta de memória, que atua por meio das vias reflexas, e que variações na intensidade do estímulo ditam a resposta final do indivíduo (Bear, Paradiso & Connors, 2008).

Após essa descrição sobre os aspectos gerais da memória, há de se ressaltar como a cafeína pode interagir com esse fenômeno. Já foi visto em 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). Além disso, tem que se considerar a quantidade e o horário de administração da cafeína, bem

como em qual fase do processamento mnemônico ocorreu. O efeito da cafeína é representado por uma curva em forma de U invertida. Estima-se que doses psicoestimulantes baixas de cafeína, em torno de 10 a 15 mg/kg, tenham efeito direto na melhoria do 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 relacionados a neurotransmissão da dopamina, como a atividade locomotora em roedores (Fisone et al., 2004). 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 em roedores. 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.

Além dos efeitos diretos relatados acima, os efeitos da cafeína ainda podem acontecer de forma indireta na memória. Um deles ocorre via perturbação da fase de sono. Como a maioria dos eventos consolidativos ocorrem nesta fase de repouso (Rasch & Born, 2007) e esta substância atua aumentando 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. Pesquisas têm demonstrado que a privação de sono, como aquela causada pela ingestão de cafeína, pode prejudicar não somente a codificação e consolidação, como também a recuperação da memória (Harrison & Horne, 2000). 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 acima do normal de cortisol (ou corticosterona para roedores), o indivíduo tende a se concentrar menos na tarefa. Com isso erra mais e não aprende corretamente o que lhe foi ensinado, tendo um desempenho aquém quando comparado a sujeitos sem efeitos ansiogênicos.

1.3 O USO DO SAGUI COMO SUJEITO EXPERIMENTAL

1.3.1 Sagui: um animal genuinamente diurno

Os saguis são primatas neotropicais de hábitos diurnos e é extensa a literatura que descreve tal característica nestes animais. Estudos desenvolvidos em condições de laboratório (Crofts et al., 2001; Phillipens et al., 2004; Hoffmann et al., 2012), condições seminaturais (Menezes et al., 1993) e em campo (Castro et al., 2003) demonstram este padrão de concentração diurna da fase ativa para os saguis. Ademais, mesmo animais apresentando deficiências na visão, como a cegueira congênita, ainda sincronizam sua atividade locomotora a fase de claro (Silva et al., 2005). Outro achado importante que confirma a diurnidade dos saguis é que independente da latitude em que o sagui se encontra e da sazonalidade ao longo do ano, a fase ativa permanece no claro (Menezes et al., 1998, Melo et al., 2010).

Outros parâmetros, que não apenas a inspeção da atividade locomotora, também corroboram com a afirmação dita anteriormente. Estes podem ser exemplificados pela variação de temperatura ao longo das 24 horas, em que os saguis apresentam elevação da temperatura ao longo do dia (decorrente dos hábitos diurnos), com declínio desta durante a fase de escuro (Hoffmann et al., 2012). Temos também os níveis do hormônio cortisol apresentando variação circadiana, com níveis elevados durante o início da fase ativa e redução significativa durante o dia (Cross & Rogers, 2004). Além disso, é observado que quando os saguis são testados para o nível de alerta, resultados positivos encontram-se alocados na fase de claro (Van Vliet et al., 2008; Hoffmann et al., 2012). Ou seja, por todos os pontos abordados, não resta dúvidas de que o sagui é um animal genuinamente diurno.

1.3.2 Entendendo o ciclo vigília/sono (CVS) em saguis

O ciclo vigília/sono é um ritmo biológico que age de forma significativa na expressão de comportamentos e funções dos seres vivos. Por tal fato, a compreensão do ritmo do CVS em saguis faz-se necessária para que haja um entendimento geral de sua biologia.

Como ponto de partida, há de se mencionar que o CVS dos saguis encontra-se adiantado em relação ao ciclo claro escuro (Erkert, 1989; Hoffman et al., 2012). Isto significa que estes animais iniciam suas atividades minutos precedentes ao claro e as finalizam antes do início da fase escura. Ao extrapolar esses dados para a natureza, estes correspondem ao início da vigília precedente ao nascer do sol, como uma forma de os saguis manterem-se alertas para atividades realizadas durante o dia como forrageio; e retorno a um esconderijo seguro antes do pôr do sol.

Na vigília do sagui há interação social com demais coespecíficos, os indivíduos locomovem, alimentam e esquivam-se de predadores. Já a fase de sono é caracterizada predominantemente pelo ato de dormir com pequenos microdespertares (Sri Kantha & Suzuki, 2006), denotando estado de vigilância a situações consideradas de perigo, como eventual ataque de predador (Muggleton et al., 2005). Tem-se mais ou menos um período de 12 horas de sono, sendo este monofásico por concentrar-se na fase escura. Outro fato interessante é que os saguis possuem o sono semelhante ao dos seres humanos, no que diz respeito ao número e padrão de ciclos de sono não-REM e REM, bem como alternância entre um estágio e outro de sono. (Crofts et al., 2001; Phillipens et al., 2004). Adicionalmente observa-se que estes primatas também possuem na primeira metade da noite grande incidência de sono de ondas lentas, a qual desaparece gradualmente na segunda metade da noite e vai dando lugar ao sono REM (Crofts et al., 2001).

Dado ao fato de os saguis possuírem grande proximidade filogenética com os humanos, já que ambos compartilham a ordem primata, este é um ponto que favorece e

justifica as pesquisas realizadas com esses sujeitos se comparado a modelos animais constantemente utilizados que são os roedores de forma geral. Os roedores, ao contrário dos saguis e seres humanos, são animais de hábitos predominantemente noturnos e com um sono polifásico, por ser alocado tanto na fase clara como escura. Portanto, o sagui assemelha-se em uma série de mecanismos fisiológicos e comportamentais o que nos serve como um bom sujeito experimental quando o objetivo é compreender, comparativamente, o que ocorre nos seres humanos.

1.4. UTILIZAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DE DISPOSITIVOS PARA DETECÇÃO DO CICLO DE ATIVIDADE-REPOUSO.

Na experimentação animal para que haja consistência nos resultados encontrados, é necessária a avaliação de uma série de parâmetros, que vão desde medidas comportamentais, fisiológicas, endócrinas entre tantas outras. E para que haja uma validação concisa destes tipos de dados, faz-se necessário o uso de dispositivos de mensuração, o qual é condicionado pela pergunta inicial da pesquisa e posteriormente a escolha da melhor ferramenta para o estudo.

Quando aplicado ao ciclo vigília sono ou ciclo de atividade-reposo, observa-se que dada à riqueza de estudos é perceptível que diversas técnicas são utilizadas para estudo e avaliação deste. Dentre elas temos as que avaliam indiretamente, como a utilização de sensores infravermelho posicionados acima da gaiola e uso de actímetros presos ao dorso ou pescoço (Sri Kantha & Suzuki, 2006; Gonçalves et al., 2009; Melo et al., 2010). Em ambos os casos tem-se como principal parâmetro a quantidade de atividade locomotora, e, ao estimar o

quanto o animal permaneceu parado ou em movimento, pode-se inferir as prováveis fases de vigília e sono, sendo esses métodos eficientes para um registro de atividade locomotora geral, principalmente a diurna. Por sua vez, a eletrofisiologia e a telemetria são consideradas como principais técnicas diretas de avaliação do CVS. Nestes, o uso de biopotenciais como eletroencefalograma (EEG), eletrocorticograma (ECoG), eletromiograma (EMG) e eletro-oculograma (EOG) servem como parâmetros fiéis e que se complementam ao precisarem em qual estado do CVS o se sagui encontra (Crofts et al. 2001, Phillipens et al., 2004; Hoffmann et al., 2012). Apesar de ambos se tratarem de técnicas invasivas, tanto a eletrofisiologia quanto a telemetria pode nos informar com detalhes o registro noturno de atividade exercida pelo animal, o que não acontecia com a actimetria e uso de sensores de infravermelho. Vale ressaltar ainda que os estudos pioneiros acerca do registro do CVS foram feitos através de observação comportamental (Erkert, 1989; Menezes et al., 1993). E, apesar do mínimo de tecnologia empregado, foram essenciais para o desenvolvimento da área.

Portanto, faz-se necessário o emprego de dispositivos na experimentação, e em nosso caso na observação do CVS, não apenas para automatizar uma função antes exercida pelo experimentador, mas também como uma maneira de registro do sono sem que os equipamentos utilizados para tal finalidade possam interferir no comportamento do animal.

1.5. JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Por ser a substância psicoativa mais amplamente utilizada no mundo, é interessante elucidar como a cafeína age no sono e como esta terá posterior ação na memória em saguis. É sabido que a cafeína ingerida ao longo do dia possui efeitos na melhoria da atenção, humor, memória e alerta tanto em humanos quanto modelos animais (Ribeiro & Sebastião, 2010;

Urry & Landolt, 2014; Ardaís et al., 2014). Contudo, o nosso interesse foi o de investigar a ingestão da cafeína próxima ao horário de sono, e como este uso que é diferente dos horários propostos na maioria dos estudos, acarreta em alguma falha ou prejuízo no sono e/ou memória.

Em minha dissertação de mestrado, esta mesma temática de averiguar como a cafeína ingerida próximo ao sono age na memória de saguis, em ambiente seminatural, foi estudada e obtive resultados muito intrigantes (Santana, 2009). Foi observado um prejuízo na recordação da memória para aqueles animais que ingeriram continuamente a cafeína próxima a esta fase de repouso. Supomos assim que de alguma forma a cafeína poderia ter interferido no sono destes animais, contudo não possuíamos dados capazes de demonstrar este efeito da cafeína no sono e memória. Por isso, a partir dessa lacuna que foi deixada no mestrado ficou o anseio de estudar na referida tese de doutorado como essa fase de repouso também é afetada pela cafeína.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cafeína na memória, e se este efeito é dependente de alterações do ciclo de atividade-reposo, em saguis-comuns (*Calithrix jacchus*).

Além disso, tivemos como objetivos específicos:

- 1) Verificar a viabilidade de um novo sistema de registro baseado em giroscópio para detecção de atividade noturna em saguis de forma não invasiva;
- 2) Averiguar a eficácia do sistema baseado em giroscópio na detecção do ritmo de atividade-reposo em saguis através da comparação com o sistema de infravermelho;
- 3) Avaliar o efeito da cafeína no ritmo de atividade-reposo utilizando o sistema de registro baseado em giroscópio;
- 4) Avaliar o efeito da cafeína no ritmo de atividade-reposo utilizando o sistema de registro de infravermelho;
- 5) Avaliar o protocolo experimental de tarefa cognitiva de preferéncia condicionada em saguis;
- 6) Verificar como a cafeína afeta na evocação da memória em tarefa de condicionamento de lugar.

3. METODOLOGIA

3.1 Sujeitos experimentais

O estudo em questão obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais para a utilização dos saguis (*Callithrix jacchus*) na experimentação animal (CEUA-UFRN nº 047/2010). Para tanto, utilizamos dezesseis saguis adultos, sendo dez fêmeas e seis machos, todos oriundos do Núcleo de Primatologia da UFRN (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, nº 1/24/92/0039-0). Os saguis selecionados para o experimento foram escolhidos tendo como critério serem da idade adulta – acima de um ano e meio e abaixo de sete anos até o término do experimento (média $4,3 \pm 1,3$ anos), e pesavam $371,69 \pm 35,11$ gramas.

Eles foram mantidos sob condições ambientais controladas, com ciclo claro-escuro 12:12 (início do claro às 6:30 h), a temperatura variava entre $24,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa com uma média de $66,8 \pm 5,4$ %. A iluminação artificial era fornecida sobre cada gaiola (25-30 cm do topo) por 1 lâmpada de LED branca de 3 W (KONGYO JY-388 42PCS) e na sala por 5 lâmpadas fluorescentes brancas de 25 W, totalizando uma intensidade média de $132,5 \pm 10,5$ lux a nível da metade da gaiola (a 52,5 cm do chão) Os animais foram alojados em gaiolas individuais (42 cm C X 68 cm L X 85 cm A, a 25 cm do chão) na Sala de Experimentação 1 do Laboratório de Neurobiologia e Ritmicidade Biológica – LNRB (470 cm C X 240 cm L X 340 cm A).

Os animais tinham à disposição porções de Pedigree Biscrok Junior - sabor leite (Pedigree®) e uva passa em um recipiente plástico, água disponível *ad libitum* em bebedouro de vidro. Ademais, a alimentação era oferecida duas vezes ao dia em horários aleatórios: a primeira em torno das 6:30 – 10:00 h, que poderia ser uma salada de frutas ou uma papa (de leite, ovos cozidos e pão). Adicionadas à alimentação da manhã eram colocados vitaminas A

e D (Aderogil D3® Gotas) e AminoMix® Pet (mix de aminoácidos, vitamínicos e minerais). A segunda alimentação era por volta das 13:00 -16:00 h a qual alternava entre uma variedade de frutas, batata doce, pedaços de frango, cenoura, jerimum ou ovo cozido. Esta alimentação era deixada de forma contínua, sendo apenas trocada pela manhã e tarde. Além disso, cada gaiola tinha um cano PVC como local de dormir (30 cm comprimento X 15 cm raio), bem como poleiros e plataformas como forma de enriquecimento ambiental.

3.2 Registro de atividade locomotora e ciclo de atividade-reposo em saguis

A atividade locomotora e o ciclo de atividade-reposo em saguis foram registrados por dois métodos: sensores de infravermelho e sensores baseado em giroscópio. Ambos registravam os animais individualmente, e suas peculiaridades estão descritas abaixo.

3.2.1 Sensores de infravermelho

Estes sensores ficavam acoplados na parte superior de cada gaiola a uma altura de 12 cm (figura 3, circulado em vermelho), e, seu acionamento acontecia toda vez que o animal atravessava o feixe de infravermelho. O *software* utilizado no controle do claro-escuro foi o SAP - Sistema para Acionamento Programado (desenvolvido por nosso grupo, responsável Marconi Rodrigues). Os dados foram registrados continuamente, e a cada 5 minutos a atividade era totalizada pelo software, num total de 288 registros diários para cada animal.

3.2.2 Sensores baseados em giroscópio

Estes sensores foram acoplados na parede do cano de dormir (figura 3). Para construção deste foi utilizada a Unidade de Medida Inercial (Inertial Measurement Unit – IMU). Esta medida trabalha através da detecção da taxa corrente de aceleração, usando um ou mais acelerômetros, e detecta mudanças nos eixos rotacionais, tais como inclinação, rotação e guinada usando um ou mais giroscópios. Tais giroscópios possuem a finalidade de medir a velocidade angular, sendo mais preciso quanto à finalidade de captar o menor tipo de vibração que o animal emite em qualquer lugar da gaiola. Para decodificar o sinal do IMU e processá-lo em um dado capaz de permitir a mensuração da atividade do sagui com alta precisão e baixo ruído, foi utilizado um microcontrolador baseado em Arduino. Este microcontrolador é uma plataforma física de computação de código aberto baseado numa simples placa e num ambiente de desenvolvimento para escrever o código para a placa. Os dados dos sensores baseados em giroscópio também foram registrados continuamente, só que a cada 30 segundos a atividade era totalizada, contando com um total de 2880 registros diários (coleta de dados dez vezes superior ao sistema de infravermelho). Após esses dados serem processados por algoritmos, tornou-se possível distinguir atividade locomotora e, indiretamente, de forma não invasiva, o ciclo sono/vigília destes pequenos primatas.

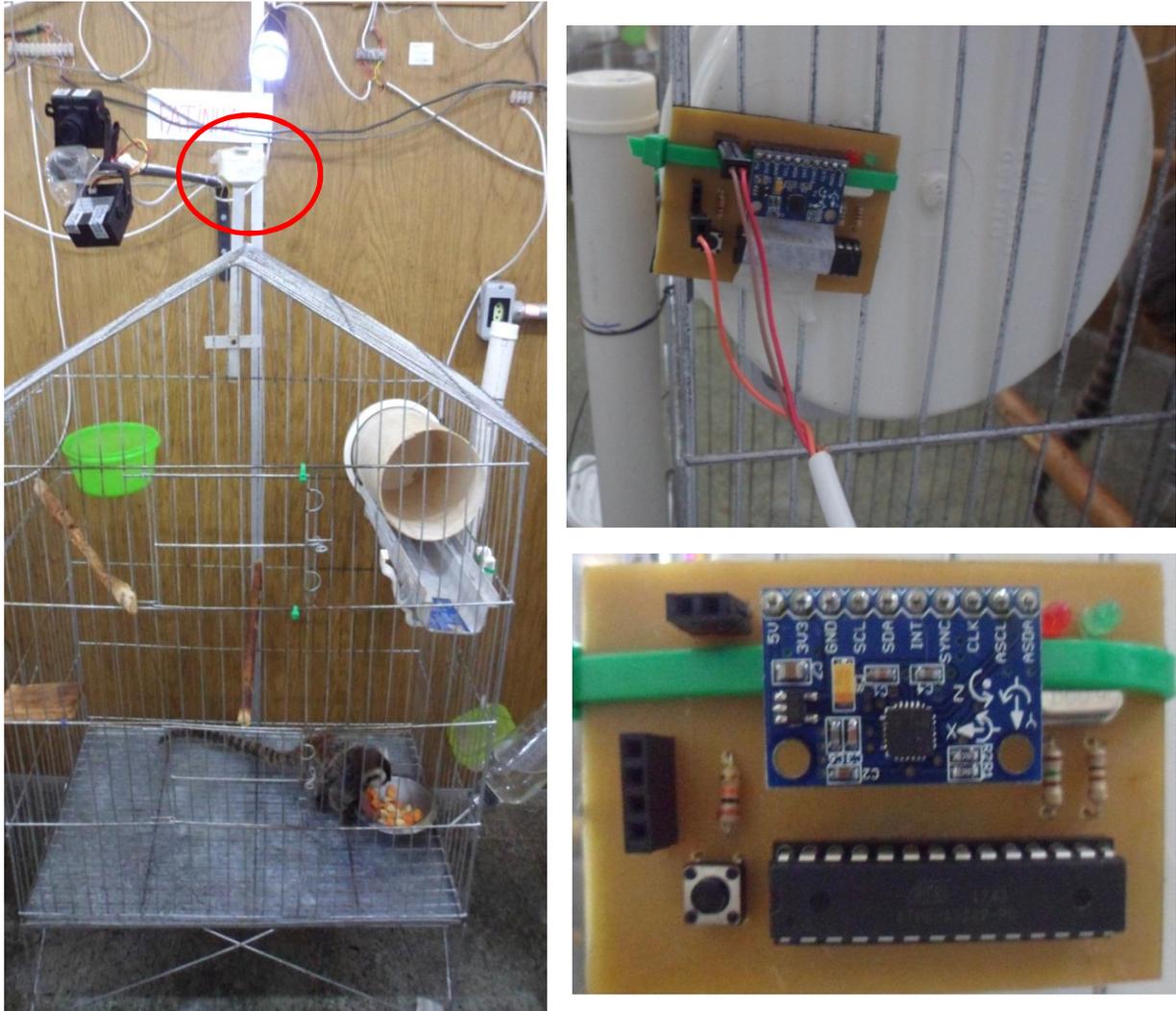


Figura 3: Dispositivos utilizados para o registro de atividade locomotora e do ciclo vigília-sono: sensores de infravermelho (circulado em vermelho) e sensores baseados em giroscópio (à direita), os quais são acoplados na parede do cano de dormir. Para construção deste, nós utilizamos a Unidade de Medida Inercial (Inertial Measurement Unit – IMU), que trabalha através da detecção da taxa corrente de aceleração, usando um ou mais acelerômetros, e detecta mudanças nos eixos rotacionais, tais como inclinação, rotação e guinada usando um ou mais giroscópios. Foto: Kathiane dos Santos Santana

Diferindo dos sensores baseados em giroscópio, os sensores de infravermelho não possuem a capacidade de detectar, ainda que indiretamente a fase do sono dos animais, já que o feixe de infravermelho não consegue ultrapassar a caixa ninho, não permitindo o registro da atividade. Entretanto, durante a fase do claro os saguis mal frequentam o local de dormida e movimentam-se dentro gaiola, sendo os sensores de infravermelho eficientes no registro desta

atividade diurna. Portanto, estes tipos de sensores foram utilizados no trabalho para detecção da atividade realizada durante a fase de claro. Por sua vez, os sensores baseados em giroscópio tem a capacidade de captar vibração dentro desse cano de dormir, sendo utilizado para avaliar a atividade noturna e/ou fase de repouso em saguis.

Para ambos os sensores, o ritmo circadiano de atividade locomotora foi analisado através do *software El Temps* (A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 2005). Por meio deste software, avaliamos os dados de 3 maneiras: 1) por meio do actograma, que é uma forma de representação gráfica para a análise visual de ritmos e verificação se a variável medida (atividade locomotora) tem ou não expressão rítmica; 2) gráfico em forma de onda, no qual são plotadas as médias dos valores obtidos em todos os dias, por horário de medição, onde o eixo x tem 24 horas e o y os valores da variável medida; 3) método de COSINOR.

3.3 Aparato experimental (figura 4)

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 plástico resistente, e consiste de um retângulo (0,40 m comprimento x 0,03 m de largura e 0,12 m de altura). O retângulo possui numa extremidade a figura de um triângulo e na outra um quadrado. Para alocar a recompensa, durante as fases de treino e retreino, dois orifícios foram realizados abaixo de cada figura geométrica. Esta caixa experimental apresentou-se em duas versões, o que permitiu a rotação do quadrado e triângulo, que são contextos espaciais diferentes, entre os dois lados (esquerda-direita) de forma randômica.



Figura 4: Aparato experimental utilizado para a tarefa cognitiva (0,40 m comprimento x 0,03 m de largura e 0,12 m de altura). Existe outro aparato onde as posições do quadrado e triangulo encontram-se invertidas, para que dessa forma o animal aprenda a associar o reforço pela figura geométrica e não com a direção. Foto: Kathiane dos Santos Santana

3.4 Tarefa Cognitiva: Preferência condicionada por lugar

O condicionamento de lugar 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 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. 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 utilizamos a preferência condicionada por lugar, onde parearemos um contexto a uma situação agradável, que foi a presença de alimentos apreciados pelos animais (jujuba, leite condensado, uva passa e bolacha doce). Valentinuzzi et al.. (2008) demonstraram que os saguis foram capazes de associar alimentos a um ambiente espacialmente diferente do outro. Assim, este pequeno primata passou a fazer parte dos modelos animais utilizados para tarefas de condicionamento de lugar.

3.5 Delineamento experimental da tarefa cognitiva:

O experimento contou com cinco fases (figura 5): habituação, treinos, administração da cafeína ou placebo, retreino seguido da administração, e o teste. Nos dois primeiros dias ocorreram as sessões de habituação 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 previamente selecionados randomicamente – o contexto reforçado - CR. Assim, pretendeu-se gerar preferência pelo contexto reforçado em detrimento do contexto não-reforçado – CNR . Tanto as habituações quanto os treinos iniciaram 30 minutos após as luzes acenderam, ou seja, a partir das 7:00 h, com 8 minutos de duração para cada animal. Esse

horário para experimentação foi escolhido, pois os saguis possuem dois picos de atividade locomotora: um situado de 30 minutos a 1 hora após início da vigília, e um segundo pico a tarde, por volta das 15 horas, que corresponde ao horário em que procuram um lugar seguro para dormir em ambiente natural. Portanto, o primeiro pico de atividade foi escolhido para a realização da tarefa cognitiva porque tem menos barulho externo e pouco movimento de pessoas no entorno da sala de experimentos.

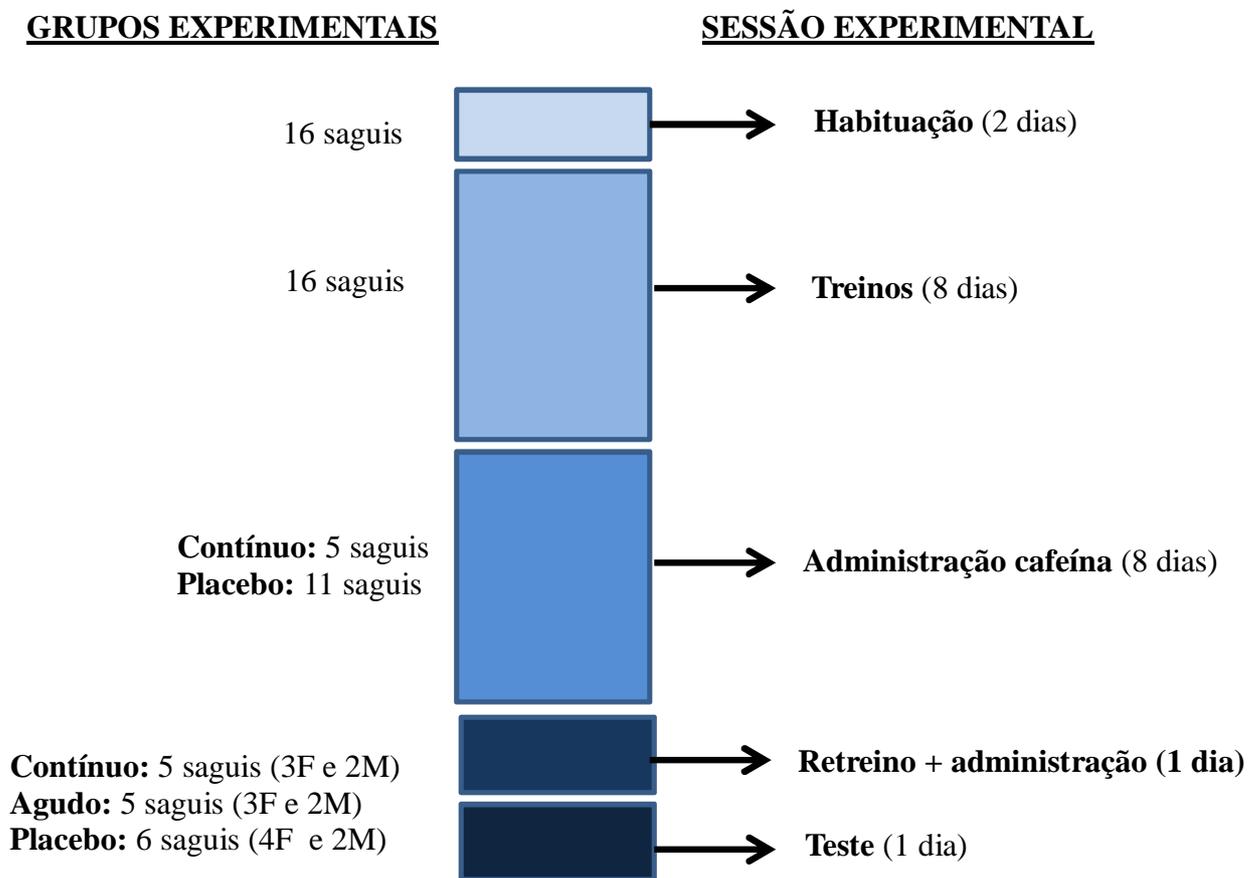


Figura 5: Esquema do procedimento experimental. Nele são mostradas as sessões experimentais com respectivas durações e os grupos experimentais.

Após as habituações e treinos, a administração da cafeína ou placebo aconteceu por um período de oito dias, a partir das 17:30 h (uma hora antes do apagar das luzes), sem a apresentação dos aparatos. O tempo de administração em questão foi selecionado por ser próximo ao final de atividade dos animais, que na natureza refere-se 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. Já a quantidade de dias para administração da cafeína foi definida com a finalidade de não provocar efeitos pronunciados de abstinência aos animais que seriam submetidos à substância.

No nono dia (após as oito administrações 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 existiram 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 local em que estava antes da interrupção. Quando todos os animais finalizavam esta sessão experimental (em torno de 16:15 – 16:30 h), eles recebiam, a partir das 17:30h, uma porção de alimento contendo a dose aguda de cafeína (originando os grupos repetido e agudo) ou o placebo (com o grupo placebo). 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, iniciando às 7:00 h, houve o teste ao 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 três grupos experimentais (placebo, agudo e contínuo).

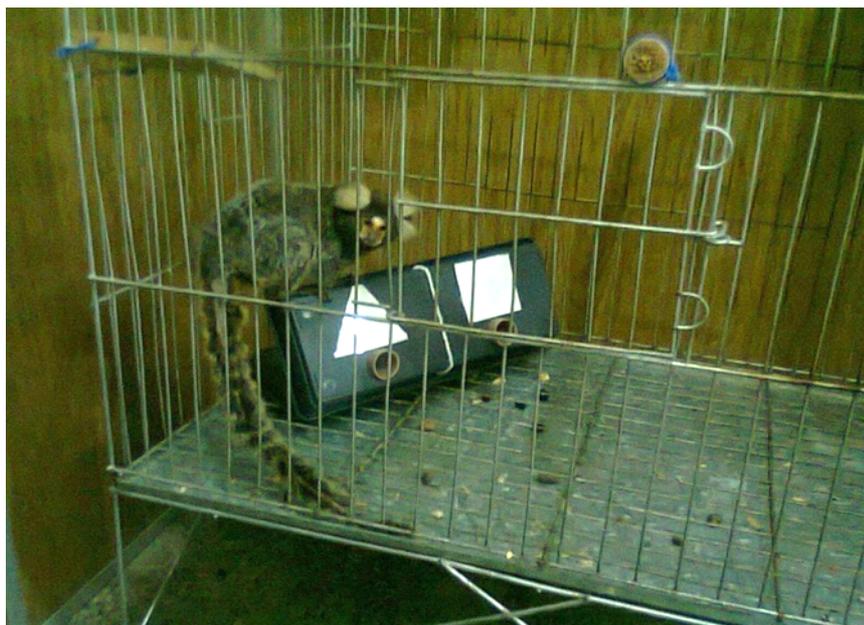


Figura 6: Saguí interagindo com o aparato experimental. Foto: Kathiane dos Santos Santana

A alimentação dos saguis pela manhã era oferecida após o término de cada sessão experimental, e a alimentação da tarde após a administração da cafeína ou placebo, para que assim tivessem motivação para explorar o aparato e ingerir as substâncias. Após cada sessão realizada, o aparato foi higienizado com água e álcool (concentração a 5%) e papel toalha. Essa medida de limpeza é tomada para evitar odores provenientes dos animais que passaram pelo aparato anteriormente.

Na figura 5 observamos adicionalmente a distribuição dos saguis quanto aos grupos experimentais atribuídos à pesquisa. Inicialmente, nas fases de habituações e treinos, temos os 16 saguis participando do experimento sem o uso da cafeína. Ao chegar à fase de administração, temos 11 animais recebendo a substância placebo e 5 animais ingerindo a cafeína por oito dias consecutivos. Após o retreino com posterior ingestão das substâncias, finalizamos com os grupos definidos: **a) Contínuo**: 5 animais (2 machos e 3 fêmeas) que

receberam por 9 dias consecutivos; **b) Agudo**: 5 animais (2 machos e 3 fêmeas) que receberam a cafeína somente após a sessão de retreino; **c) Placebo**: 6 animais (2 machos e 4 fêmeas, sendo uma grávida) que ingeriram por nove dias consecutivos a substância placebo.

3.6 Administração da cafeína

A dose repetida constou da administração de cafeína ou placebo, durante 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 próximo à fase de sono dos animais.

A cafeína (Sigma Aldrich), em tratamento contínuo ou 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 registrada no histórico de cada sagui. As porções de cafeína estavam sob forma de pó e foram colocadas numa pequena porção de fruta, jujuba, uva-passa ou leite condensado, que 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 as mudanças no tipo de alimento. Ao término da administração o alimento habitual da tarde era colocado na gaiola dos sujeitos. O placebo, por sua vez, constituiu-se de amido 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.

Além disso, dados de nosso grupo (não-publicados) demonstram que a cafeína ingerida cerca de uma hora antes do início do sono promoveu aumento na atividade locomotora em saguis (figura 7). Nesse experimento foram utilizadas oito saguis fêmeas em gaiolas individuais, isoladas em uma sala com condições ambientais constantes, e a atividade locomotora foi registrada através dos sensores de infravermelhos posicionados acima da gaiola.

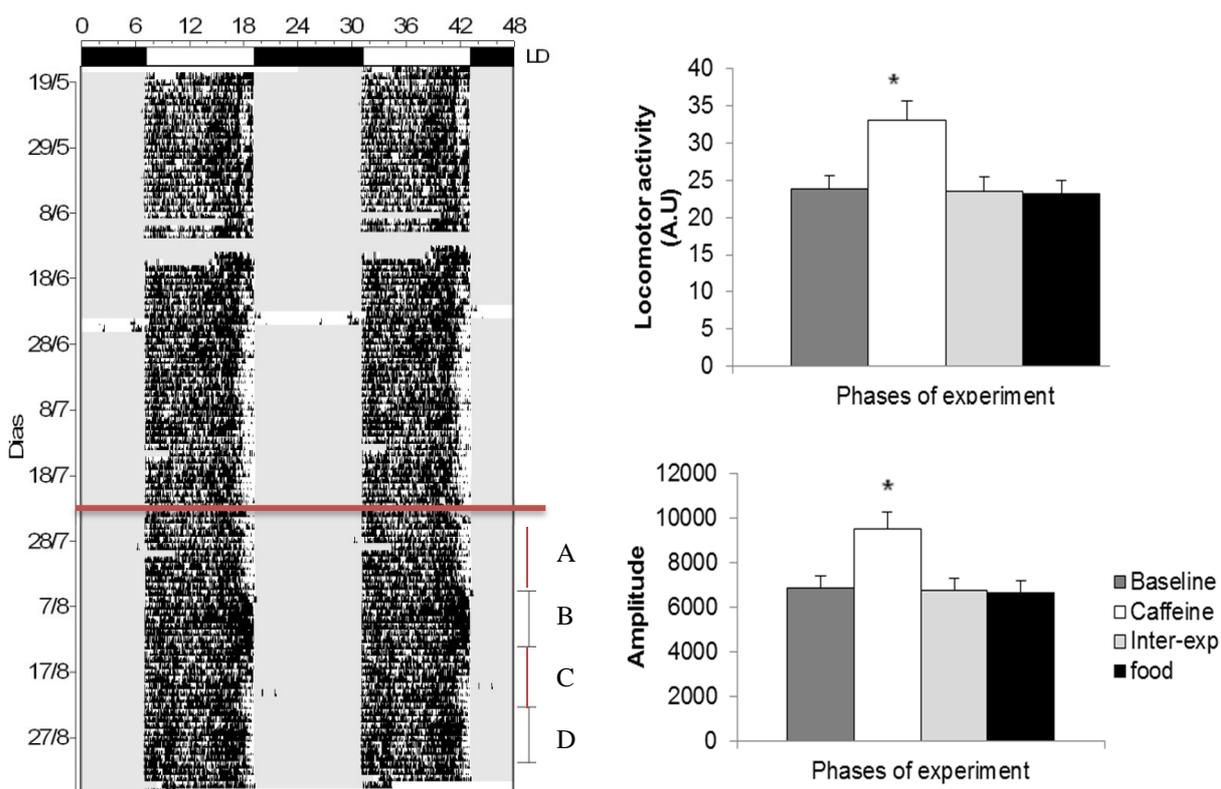


Figura 7: Representação de como a cafeína ingerida uma hora antes da fase de sono tem efeito no aumento da atividade locomotora de saguis mantidos em ambientes de laboratório. Abaixo do traçado vermelho temos as 4 fases experimentais: **a)** Linha de base do padrão de atividade locomotora; **b)** administração de cafeína 1h antes do apagar das luzes, seguida de oferta do alimento; **c)** fase entre experimentos, semelhante à linha de base e; **d)** Oferta de alimento 1h antes do apagar das luzes. Tanto para média da atividade locomotora quanto para a média da amplitude (visto a direita), temos que os dados relativos à fase de administração da cafeína são significativamente maiores, o que reflete o clássico efeito da cafeína no aumento da atividade locomotora (teste T dependente, * $p > 0,05$, barras representam o erro padrão da amostra).

Para a realização deste experimento temos as fases experimentais: **a)** Linha de Base de 10 dias, onde observamos o padrão da atividade locomotora basal dos saguis; **b)** administração de cafeína 1h antes do apagar das luzes, por 8 dias consecutivos, seguido de oferta do alimento; **c)** fase entre experimentos, que é semelhante a linha de base e com 10 dias de duração, e; **d)** Oferta de alimento 1h antes do apagar das luzes, por 8 dias consecutivos, com intuito de verificar se o aumento da atividade locomotora foi decorrente da ingestão da cafeína ou se pela disponibilidade alimentar .

Com isso temos que tanto para média da atividade locomotora quanto para a média da amplitude (visto à direita na figura 7), os dados relativos à fase de administração da cafeína são significativamente maiores, o que reflete o clássico efeito da cafeína no aumento da atividade locomotora (teste T dependente, * $p > 0,05$, barras representam o erro padrão da amostra).

3.7 Avaliação comportamental

A coleta dos dados comportamentais foi realizada através da gravação de vídeos para todas as sessões com o aparato experimental (habituações, treinos, retreino e teste). Após a visualização destes vídeos, os dados coletados foram transferidos a uma macro elaborada no Excel 2010 (Microsoft Inc.), a qual contabilizava a duração e frequência de cada comportamento, e que estão listados abaixo:

- 1) Fora: o animal não estava interagindo com o aparato experimental ou quando estava com o foco em outra coisa que não o aparato.
- 2) Falha: quando o animal derrubava o aparato.
- 3) Aproximação do contexto reforçado: quando o animal se aproximava do contexto reforçado.

- 4) Aproximação do contexto não-reforçado: quando o animal se aproximava do contexto não-reforçado.
- 5) Contato com o contexto reforçado: o animal tocava o contexto reforçado com uma das patas ou com boca.
- 6) Contato com o contexto não-reforçado: o animal tocava o contexto não-reforçado com uma das patas ou com a boca.
- 7) Atrás do contexto reforçado: quando o animal interagiu com a parte de trás do contexto reforçado.
- 8) Atrás do contexto não-reforçado: quando o animal interagiu com a parte de trás do contexto não-reforçado.
- 9) Observação contexto reforçado: quando o animal focava a atenção no contexto reforçado, sem tocar no mesmo.
- 10) Observação contexto não-reforçado: quando o animal focava a atenção no contexto não-reforçado, sem tocar no mesmo.

Ao finalizar os oito minutos de observação, os dados provenientes desta macro foram repassados a uma outra planilha do Excel, a qual filtrava com detalhes a quantidade e frequência dos comportamentos já citados, bem como a interação que o animal teve com os contextos reforçado e não-reforçado. Esta planilha ainda ofereceu os dados do tempo decorrido do início da sessão ao início da interação com cada contexto (latência).

Lembrando ainda que nas fases de utilização do aparato experimental, os saguis estavam livres para interagir a qualquer momento dos 8 minutos das sessões experimentais, sem pressão alguma do experimentador para este tipo de interação.

3.7 Análises estatísticas

3.8.1 Dados de atividade locomotora

Para facilitar a exibição e dispersão dos dados nos gráficos e tabelas nos resultados, e a análise estatística dos dados referentes à atividade locomotora, os dados foram agrupados da seguinte maneira:

- *Linha de base 1 (LB1)*: dados coletados de 20 a 11 dias antes do experimento propriamente dito.
- *Linha de base 2 (LB2)*: dados coletados de 10 a 1 dias antes do início do experimento.
- *Habituação + Treinos (hab+tr)*: dados coletados nos dois dias de habituação e os oito dias de treino.
- *Administração (adm 1-8)*: coleta de dados para cada dia das sessões de administração da cafeína ou placebo.
- *Retreino e administração cafeína (Ret+adm)*: coleta de dados realizada no retreino, o qual foi seguido pela administração da cafeína ou placebo.
- *Teste*: coleta de dados realizada no dia do teste.
- *Pós-experimento (pós)*: dados coletados por dez dias após o término dos experimentos.

Os dados referentes à atividade locomotora por ambos os sensores de infravermelho e baseado em giroscópio, bem como os dados comportamentais foram analisados estatisticamente através do programa Statistica (Statsoft). Inicialmente avaliamos se os dados destes parâmetros tinham distribuição normal. Ocorrendo de estes serem paramétricos quanto à sua distribuição (como foi o caso dos dados de atividade locomotora), utilizamos análise de

variância (ANOVA) de uma via. Ainda para análise paramétrica, aquele grupo de dados que apresentava $p \leq 0,05$ foi necessário que identificássemos quais dos pares de grupos diferem, e isto foi verificado com consequente teste de post hoc, que no nosso caso fora escolhido o teste HSD de Tukey. Já para as comparações realizadas intragrupos, utilizamos o teste T para medidas dependentes.

3.8.2 Dados comportamentais

Na avaliação comportamental da tarefa, as variáveis não obedeceram a uma distribuição normal, de acordo com o teste de *Kolmogorov-Sminorv* ($p < 0,05$). Por isso, os dados foram analisados através dos testes não paramétricos de ANOVA de *Friedman* (comparar três ou mais populações que sejam dependentes), *Wilcoxon* (comparando duas populações dependentes), *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* (ambos para medidas independentes, sendo o primeiro utilizado para comparar três ou mais populações, e o segundo teste compara duas populações).

Os gráficos e tabelas resultantes dos dados de atividade locomotora e comportamento foram construídos com a ajuda do programa Excel 2010 (Microsoft Inc.), através da média e desvio padrão dos parâmetros em estudo. As barras representam o desvio padrão e os resultados foram significativos quando o $p \leq 0,05$, a uma significância de 95%. Para resultados com $p \leq 0,07$, consideramos uma tendência estatística.

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DA ATIVIDADE NOTURNA

Como já comentado, os sensores baseados em giroscópio estão neste trabalho com o principal propósito de detectar com mais detalhes o ciclo de atividade-reposo dos saguis, com especial atenção ao registro da atividade noturna.

Portanto, durante 20 dias do experimento, além dos sensores de infravermelho e uso de sensores baseados em giroscópio, que é a inovação deste trabalho pelo fato de ser mais sensível às vibrações emanadas pelos saguis, utilizamos adicionalmente uma câmera que capta atividade no escuro na gaiola de um destes animais. Com isso poderíamos especular se a atividade locomotora noturna registrada pelo giroscópio estava em coerência com a real atividade exibida nos vídeos.

A tabela 2 registrou, para a fase de escuro, a precisão do registro pelo sensor baseado em giroscópio quando comparado com aquilo exibido pela câmera. Dessa forma, quando a câmera registrava um despertar noturno, ao mesmo tempo nós confrontávamos com o dispositivo para observar se havia concordância ou não dos resultados. Quando existia essa concordância entre os dispositivos, considerávamos como um real despertar. Por sua vez, quando havia registro de atividade na câmera, mas não no sensor, ou vice versa, consideramos como um falso negativo ou positivo, respectivamente.

Tabela 2: Detecção de atividade noturna do sagui e a taxa de proporção de quanto os sensores baseados em giroscópio coincidiram ou não.

Dias	ATIVIDADE NOTURNA COINCIDENTE (%)	GIROSCÓPIO DETECTA MOVIMENTO E VÍDEO NÃO DETECTA (%)	GIROSCÓPIO NÃO DETECTA MOVIMENTO E VÍDEO DETECTA (%)
1	67,3	25,5	7,2
2	62,8	27,9	9,3
3	70,2	22,7	7,1
4	73,1	21,1	5,8
5	62,8	28,6	8,6
6	65,3	26,8	7,9
7	73,7	18,9	7,4
8	69,1	24,6	6,3
9	65,9	27,4	6,7
10	72,3	19,6	8,1
11	70,7	21,9	7,4
12	69,8	21,4	8,8
13	71,8	19,5	8,7
14	61,2	29,0	9,8
15	64,7	27,0	8,3
16	70,1	21,3	7,8
17	67,9	25,6	6,5
18	71,3	24,4	4,3
19	72,6	20,6	6,8
20	68,8	21,7	9,5
TOTAL	68,57	23,78	7,65

Assim, dentro do que foi registrado pelos sensores baseados em giroscópio e aquilo que foi captado pelas câmeras, temos uma coincidência em ambos os métodos de 68,57% do registro de atividade locomotora para a fase de escuro. Já para os erros registrados, temos que em 23,78% dos dados foram errôneos pelo fato de o giroscópio detectar movimento enquanto

o vídeo não registrou. Os 7,65% restante dos dados não coincidentes dizem a respeito de o giroscópio não detectar movimento enquanto o vídeo conseguia registrar tal parâmetro.

Portanto, partir dos resultados encontrados acerca do registro noturno dos sensores baseado em giroscópio e pelo vídeo, é possível a especulação da eficiência do sensor baseado em giroscópio na detecção da atividade noturna, onde foi verificado que o método empregado para registro da atividade noturna obteve eficiência de cerca de 68,6%.

4.2. COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS BASEADO EM GIROSCÓPIO E DE INFRAVERMELHO PARA DETECTAR O RITMO DE ATIVIDADE-REPOUSO

A segunda maneira de validação foi através da comparação da atividade locomotora diurna registrada pelos sensores de infravermelho. Estes sensores foram escolhidos pelo fato de serem bem caracterizados e validados em diversos trabalhos científicos. De forma que tal comparação serviu para verificar se os sensores baseados em giroscópio foram bons o suficiente para detectarem atividade diurna.

Assim, através dos actogramas de um animal representativo, foi observado que tanto a atividade locomotora registrada para o sensor baseado em giroscópio (à direita, figura 8), como para o sensor de infravermelho (à esquerda, figura 8) apresentavam-se semelhantes na distribuição de atividade diurna. Além disso, quando a investigação da atividade noturna estava em evidência, esta foi visualizada apenas pelos dados obtidos do sensor baseado em giroscópio, dada a sua característica de coletar um mínimo de atividade, mesmo o animal permanecendo dentro de sua caixa ninho. Ao contrário, o sensor de infravermelho não tem essa capacidade de coleta da atividade noturna.

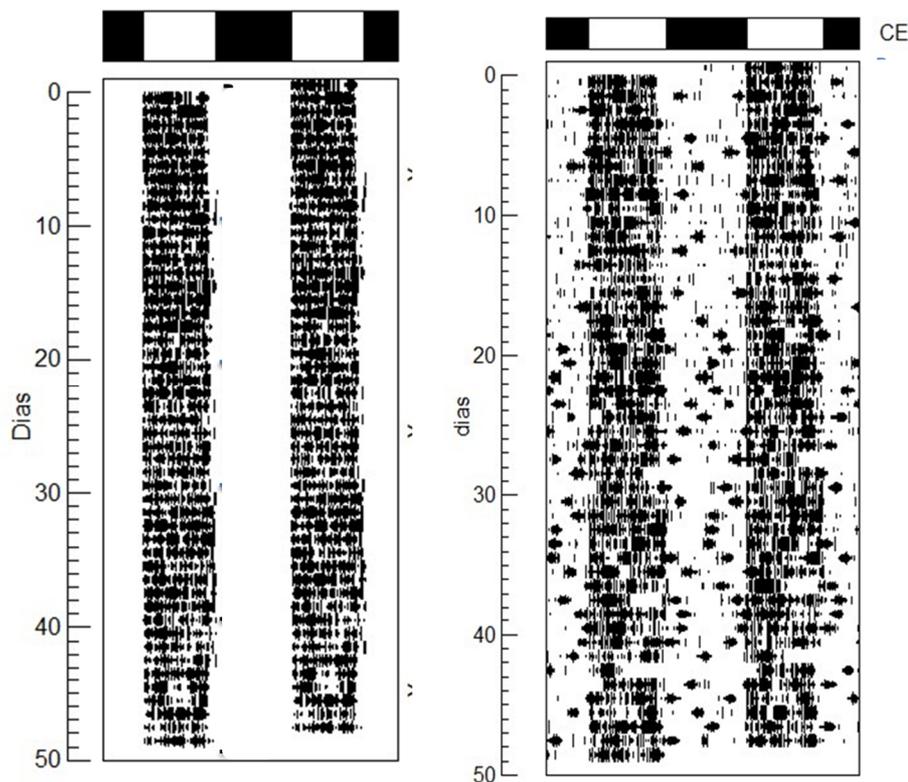


Figura 8: Actogramas representativos de um sagui. À esquerda, a atividade locomotora coletada pelo sensor de infravermelho, e à direita a movimentação captada pelo sensor baseado em giroscópio. Dessa maneira observa-se que existe um padrão para os actogramas no que diz respeito à atividade locomotora diurna. Quanto à atividade noturna, a mesma só pode ser vista através dos dados obtidos pelo sensor baseado em giroscópio, dada a sua característica de coletar um mínimo de atividade, mesmo o animal permanecendo dentro de sua caixa ninho, contrapondo-se ao sensor de infravermelho que faz apenas coleta de atividade diurna.

Ademais, para validação do novo sistema de registro, foram construídos gráficos onde plotamos a atividade locomotora diurna. O objetivo foi observar o padrão de coleta dos dados para os sensores baseados em giroscópio bem como para os de infravermelho, e, conseqüentemente avaliar se existiram semelhanças das curvas de atividade locomotora para ambos os sensores.

Nos dois gráficos que seguem temos os exemplos de como essas curvas se apresentam através da média de atividade locomotora dos 16 saguis do estudo. O primeiro gráfico corresponde aos vinte dias de linha de base (figura 9), e o segundo gráfico corresponde aos dez dias seguintes, referentes às sessões de habituação e treinos (figura 10). Nos dois gráficos as curvas da média de atividade locomotora para os sensores baseados em giroscópio e os de infravermelho se assemelham quanto ao padrão de distribuição. Tal fato nos remete a questão de o sensor baseado em giroscópio também ser um bom método para registro de atividade locomotora em saguis.

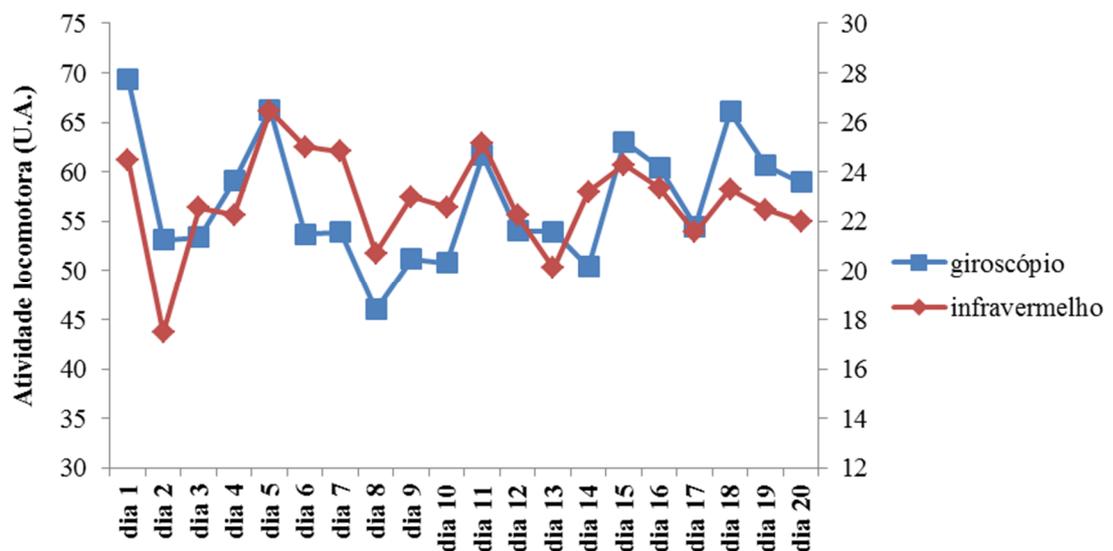


Figura 9: Comparação das curvas de atividade locomotora entre os sensores baseados em giroscópio (eixo situado à esquerda) e os sensores de infravermelho (eixo situado à direita). Nota-se que há semelhança entre os padrões de ambas as curvas. Os vinte dias registrados correspondem às médias da atividade diurna registrada nas linhas de base para os dezesseis saguis.

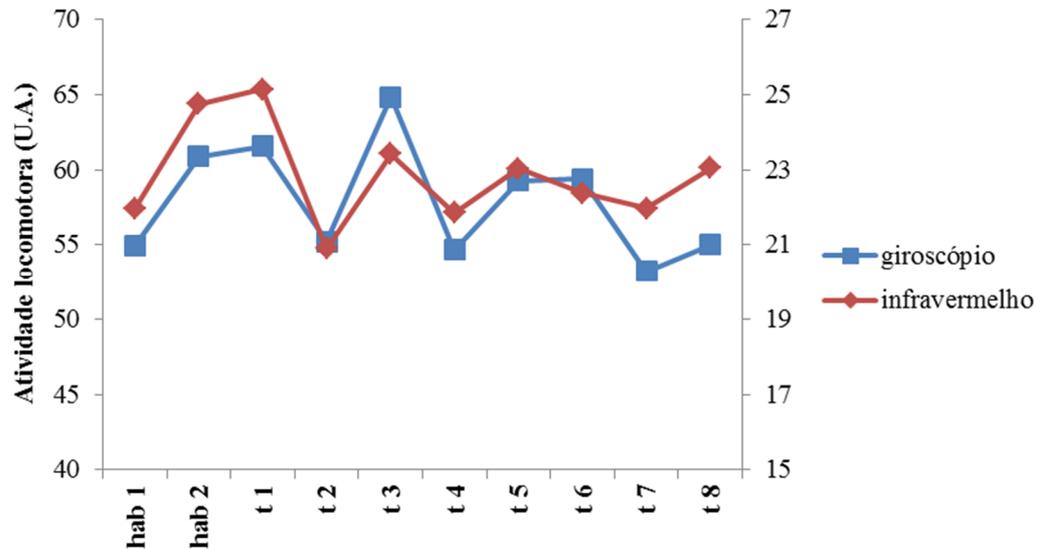


Figura 10: Comparação das curvas de atividade locomotora entre os sensores baseados em giroscópio (eixo situado à esquerda) e os sensores de infravermelho (eixo situado à direita). Nota-se que há semelhança entre os padrões de ambas as curvas. Os dez dias registrados correspondem às médias da atividade diurna nas sessões de habituação e treinos para os dezesseis saguis.

4.3. EFEITO DA CAFEÍNA NO RITMO DE ATIVIDADE-REPOUSO REGISTRADO PELOS SENSORES BASEADO EM GIROSCÓPIO

Os resultados para os sensores baseado em giroscópio giraram em torno de três pontos:

- 1) Inspeção visual dos dados através de actogramas e gráficos em forma de onda.
- 2) Média de atividade locomotora para as fases de claro e escuro, separadamente.
Expresso em unidades arbitrárias (U.A.).
- 3) Somatório da atividade locomotora para as fases de claro e escuro, separadamente.
Expresso em unidades arbitrárias (U.A.).

4.3.1 Inspeção visual

As figuras que seguem abaixo são de três saguis, onde cada uma destas figuras é representativa de um grupo experimental – placebo, agudo e contínuo (figuras 11 e 12).

Um fato que chama atenção é a presença de atividade locomotora não apenas durante a fase de claro (que é bem marcada desde o início até o fim do claro), mas também durante a fase de escuro, tanto nos actogramas quanto nos gráficos em forma de onda. Para a atividade noturna, percebe-se que esta apresenta recorrente durante todos os dias. Este padrão de atividade não é possível observar através dos sensores de infravermelho, utilizado neste estudo e o mais comum para coletar a atividade locomotora diurna do animal.

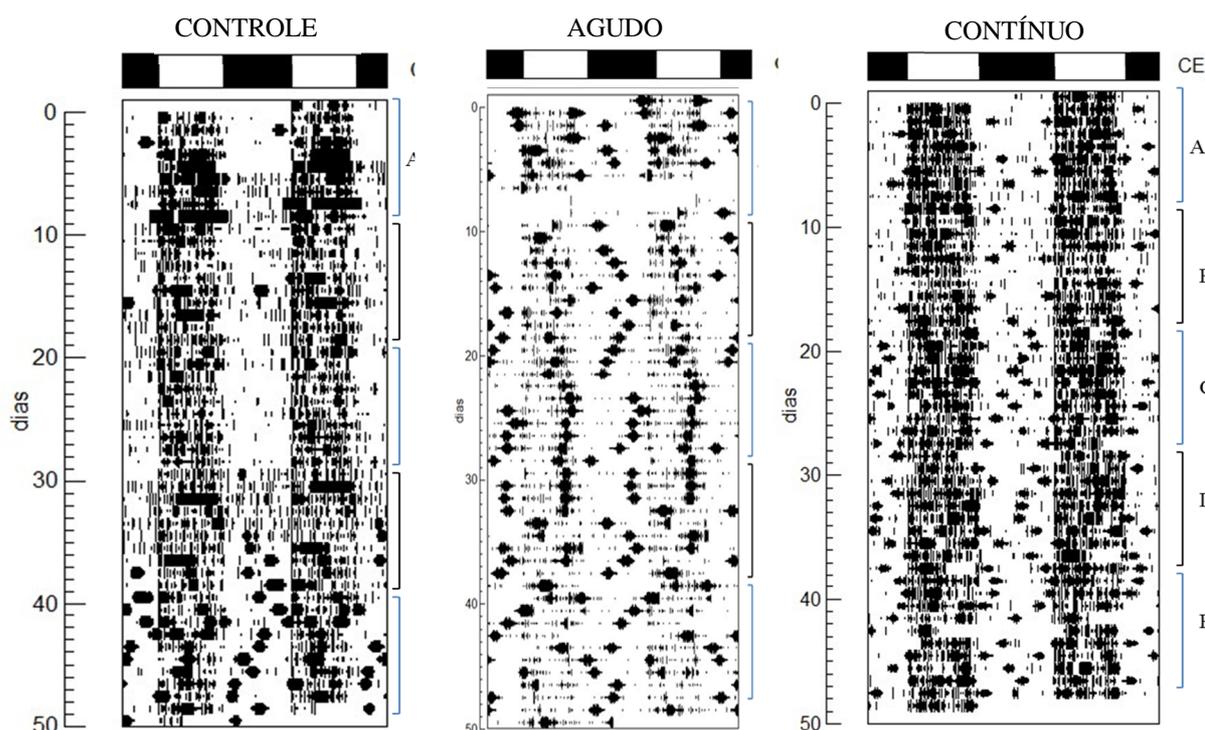


Figura 11: Actogramas dos três grupos experimentais, os quais foram construídos com a utilização dos sensores baseados em giroscópio. Para entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento, os actogramas foram divididos em a) Linha de base 1, b) Linha de base 2, c) Habituação + treinos, d) Administração das substâncias + retreino + teste e e) Pós-experimento.

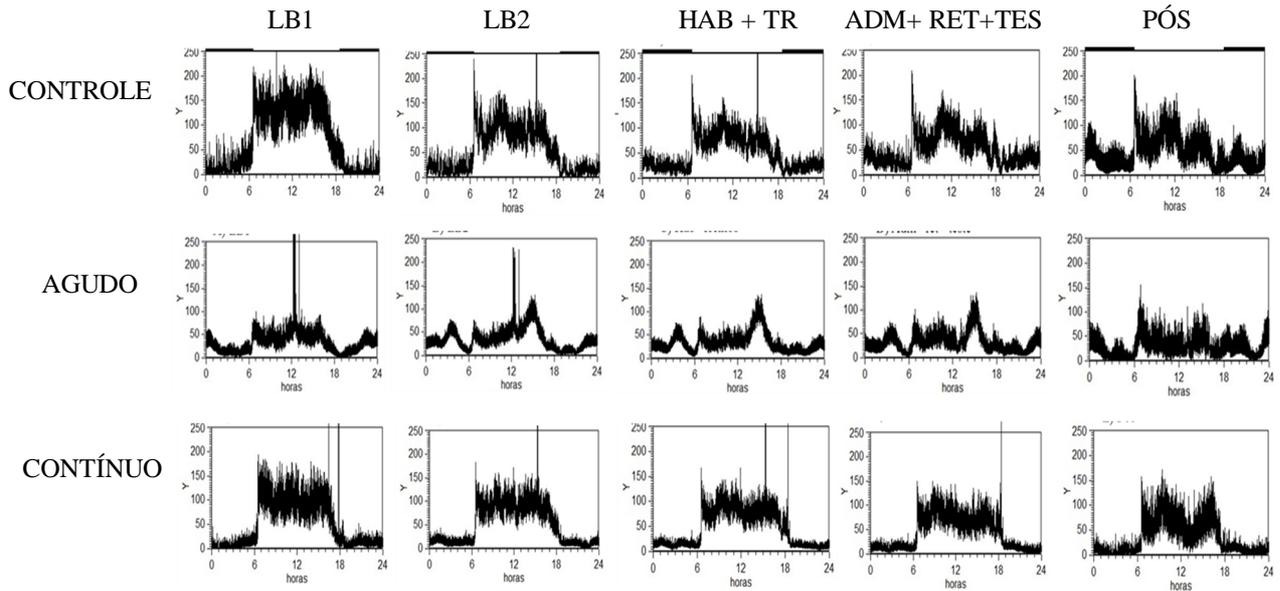


Figura 12: Gráficos em forma de onda dos três grupos experimentais, construídos com a utilização dos sensores baseados em giroscópio. Para o entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento em cada um dos animais, os gráficos em forma de onda foram divididos em Linha de base 1 (LB1), Linha de base 2 (LB2), Habituação + treinos (HAB+TR), Administração das substâncias + re treino + teste (ADM+RET+TES) e Pós-experimento (PÓS).

4.3.2 Média de atividade locomotora para as fases de claro e escuro

Para as duas variáveis que seguem, temos a média de quanto os animais locomoveram-se ao longo das fases experimentais. A média durante o claro mostrou sempre superior quando comparadas a média de atividade locomotora efetuada no escuro, independente de grupos ou fases (teste T dependente, para todas as fases experimentais $p > 0,05$, tabela 3). Além disso, para a média de atividade registrada no claro, observamos que apesar de os saguis do grupo contínuo apresentarem visualmente atividade locomotora maior que os outros dois grupos controle e agudo, durante a administração da cafeína próxima ao horário de sono, estatisticamente essa diferença não é percebida. As únicas diferenças existentes são aquelas encontradas intragrupo para algumas fases do experimento (figura 13 e tabela 4).

Tabela 3: Valores de T e p para as comparações entre os valores da média de atividade no claro e escuro totalizadas através do giroscópio. Em todas as sessões, os saguis movimentaram-se mais no claro em relação ao escuro (Teste T dependente).

	Média claro	Media escuro	Valor T(15)	Valor p
LB1	906070,5	179447,6	2,52	0,023
LB2	386249,0	44345,8	7,45	0,000002
Hab+Tr	859473,4	181424,2	6,78	0,000006
Adm1	88280,75	10433,06	5,57	0,00005
Adm2	99765,88	20846,87	4,15	0,0008
Adm3	115253,9	20945,4	4,31	0,0006
Adm4	77273,19	17237,0	5,33	0,00008
Adm5	69197,81	10665,44	8,31	0,000001
Adm6	72268,75	17963,81	5,27	0,00009
Adm7	84824,56	24965,5	5,32	0,00008
Adm8	93224,0	35106,19	5,44	0,00006
Ret+adm	62196,38	32313,13	2,21	0,043
Teste	86516,88	29233,75	6,98	0,000004
Pos	605219,1	230873,3	7,17	0,000003

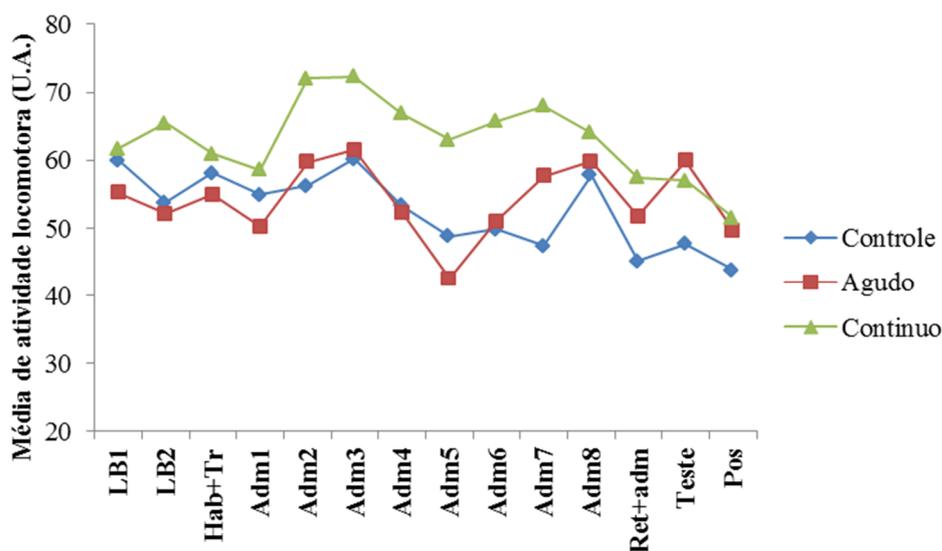


Figura 13: Efeito da cafeína na atividade locomotora no claro para cada fase experimental, registrado através do sensor baseado em giroscópio. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas diferenças intragrupo. (Teste T, $p > 0,05$).

Tabela 4: Efeito da cafeína na atividade locomotora no claro para cada fase experimental. Dados coletados através dos sensores baseados em giroscópio.

	Controle (±DP)	Agudo (±DP)	Contínuo (±DP)
LB1	60,02 ± 25,55	55,14 ± 27,79	61,70 ± 31,01
LB2	53,76 ± 19,89	52,08 ± 19,08	65,47 ± 31,14
Hab+Tr	58,89 ± 0,58	54,93 ± 0,55	60,95 ± 22,61
Adm1	54,94 ± 11,19	50,14 ± 14,85	58,61 ± 23,15
Adm2	56,18 ± 18,34	59,73 ± 13,00	72,04 ± 28,54
Adm3	60,20 ± 32,12	61,52 ± 22,52	72,30 ± 29,63
Adm4	53,29 ± 9,28	52,25 ± 21,06	66,83 ± 28,47
Adm5	48,75 ± 9,80	42,48 ± 9,72	63,02 ± 19,15
Adm6	49,79 ± 11,80	50,93 ± 11,58	65,76 ± 35,30
Adm7	47,37 ± 12,44	57,65 ± 22,11	68,00 ± 28,05
Adm8	57,85 ± 15,03	59,76 ± 12,93	63,98 ± 30,63
Ret+adm	45,07 ± 10,69	51,68 ± 16,26	57,45 ± 28,13
Teste	47,65 ± 12,73	59,92 ± 20,44	56,93 ± 28,25
Pos	43,76 ± 9,06	49,63 ± 19,06	51,49 ± 22,09

Por conseguinte, para a média de atividade locomotora efetuada no escuro, encontramos apenas um indicativo de que para a primeira sessão de administração da cafeína, os indivíduos do grupo contínuo apresentaram atividade locomotora mais elevada do que os outros dois grupos (ANOVA, $F(2,13) = 3,30$, $p \leq 0,06$, figura 14 e tabela 5). Tal fato pode nos remeter a um provável efeito estimulante da cafeína no primeiro dia de administração dessa, a qual aconteceu próximo ao horário habitual de sono para estes primatas. Adicionalmente, diferenças intragrupo são observadas ao longo das fases experimentais (teste T dependente, para todas as fases experimentais $p > 0,05$).

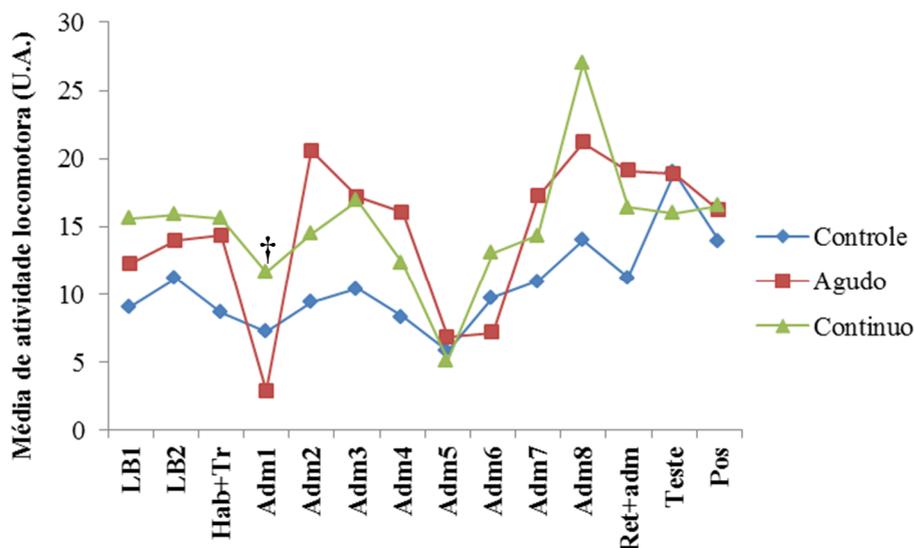


Figura 14: Atividade noturna coletada ao longo das fases experimentais, através dos sensores baseados em giroscópio. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde foi possível observar uma tendência intergrupo, apenas no que diz respeito a primeira sessão de administração da cafeína, onde o grupo contínuo teve atividade locomotora maior se comparado aos grupos controle e agudo (\dagger , ANOVA, $F(2,13) = 3,30$, $p \leq 0,06$). Além disso, diferenças intragrupo foram observadas (teste T dependente, $p \leq 0,05$).

Tabela 5: Atividade noturna coletada ao longo das fases experimentais, através dos sensores baseados em giroscópio.

	Controle (\pm DP)	Agudo (\pm DP)	Contínuo (\pm DP)
LB1	9,06 \pm 4,41	12,29 \pm 5,47	15,63 \pm 5,57
LB2	11,20 \pm 5,44	13,98 \pm 5,51	15,90 \pm 3,29
Hab+Tr	8,64 \pm 3,97	14,32 \pm 6,50	15,63 \pm 5,17
Adm1	7,23 \pm 3,80	2,84 \pm 1,12	11,67 \pm 6,31
Adm2	9,41 \pm 4,34	20,56 \pm 9,52	14,47 \pm 8,98
Adm3	10,38 \pm 4,98	17,15 \pm 6,29	16,91 \pm 9,97
Adm4	8,31 \pm 3,21	16,01 \pm 7,44	12,32 \pm 3,66
Adm5	5,80 \pm 1,68	6,82 \pm 3,29	5,10 \pm 2,07
Adm6	9,74 \pm 3,73	7,143 \pm 2,24	13,07 \pm 5,81
Adm7	10,93 \pm 6,58	17,20 \pm 7,80	14,35 \pm 4,49
Adm8	14,03 \pm 7,76	21,15 \pm 6,39	27,02 \pm 11,07
Ret+adm	11,25 \pm 4,03	19,08 \pm 4,19	16,429 \pm 3,83
Teste	19,00 \pm 9,48	18,88 \pm 7,24	15,98 \pm 7,54
Pos	13,90 \pm 0,32	16,19 \pm 0,33	16,57 \pm 0,320

4.3.3 Somatório da atividade locomotora para as fases de claro e escuro

Assim como para as variáveis relatadas anteriormente, para estas duas também observamos resultados semelhantes, tais como o fato de tanto para as fases de claro como a de escuro avaliadas isoladamente, nós não termos encontrados diferenças significativas entre os três grupos experimentais, apesar de que visualmente os saguis do grupo contínuo terem se mostrado quase sempre com atividade locomotora mais elevada que os demais grupos (fase de claro – figura 15 e tabela 6, fase de escuro - figura 16 e tabela 7). Dentre os resultados intergrupo, o único resultado que nos chama atenção é que no somatório da atividade locomotora durante o escuro tem-se que o grupo contínuo apresentou um indicativo de atividade locomotora mais elevada para o primeiro dia de administração da cafeína, assim como foi encontrado para a média de atividade locomotora realizada na fase de escuro (ANOVA, $F(2,13) = 3,09$, $p \leq 0,06$, figura 16 e tabela 6).

Também é interessante comentar que foram observados resultados muito distintos para cada grupo. Para os saguis do grupo controle, independente da fase experimental, o somatório para o claro foi sempre maior quando comparado ao escuro (teste T dependente, $p > 0,05$). Para os animais do grupo agudo, quase sempre o somatório do claro foi maior que para o escuro, exceto para sessão de retreino seguido da administração aguda da cafeína para estes animais, onde a diferença dos somatórios não ocorreu. E, diferindo do que foi encontrado para os demais, durante a administração da cafeína os saguis no grupo de ingestão contínua tiveram os somatórios de claro significativamente elevados em relação ao escuro apenas nas sessões 5 e 7 de administração. Nas demais sessões que eles ingeriram cafeína, incluindo o retreino, apesar de o somatório do claro ser mais elevado, diferenças estatísticas não foram encontradas.

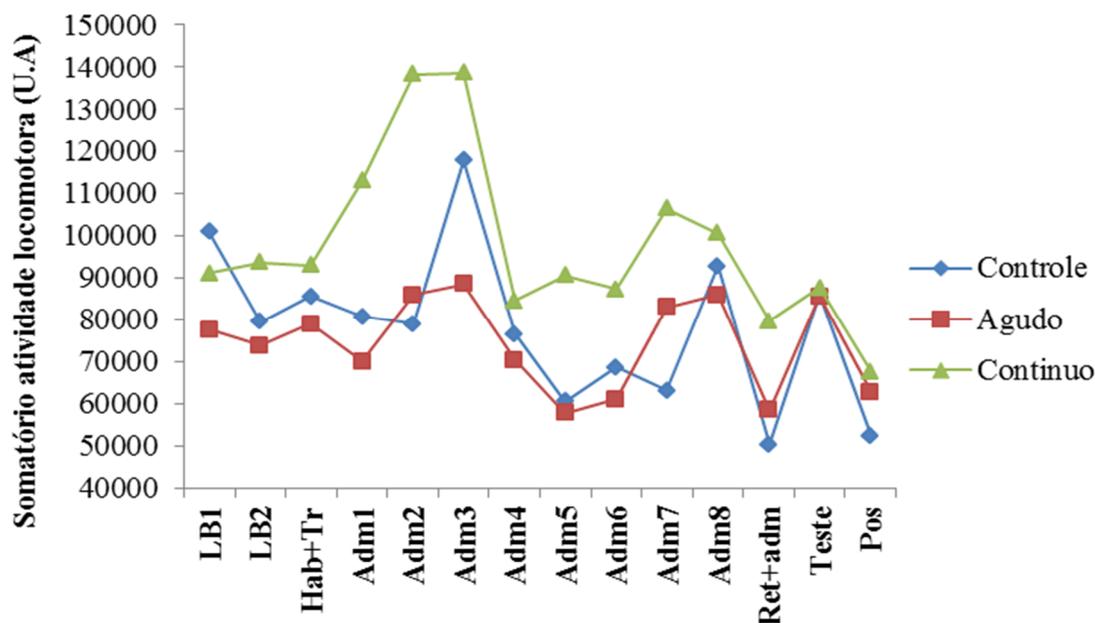


Figura 15: Efeito da cafeína no somatário da atividade locomotora durante o claro, para cada fase experimental. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas diferenças intragrupo. (teste T, $p > 0,05$).

Tabela 6: Efeito da cafeína no somatário da atividade locomotora no claro para cada fase experimental. Dados coletados através dos sensores baseados em giroscópio.

	Controle (\pm DP)	Agudo (\pm DP)	Contínuo (\pm DP)
LB1	101017,42 \pm 50887,27	77698,26 \pm 33145,35	91226,3 \pm 43269,87
LB2	79729,37 \pm 34047,26	74026,24 \pm 15436,30	93872,78 \pm 26997,64
Hab+Tr	85720,05 \pm 9045,15	79099,58 \pm 18281,49	93067,84 \pm 52369,58
Adm1	80904,5 \pm 16117,12	70209,4 \pm 18264,74	113203,6 \pm 52885,77
Adm2	79119,5 \pm 26412,10	86010,8 \pm 18733,51	138296,6 \pm 59437,45
Adm3	117900,17 \pm 46912,20	88630,8 \pm 32440,11	138701,4 \pm 54421,58
Adm4	76743,33 \pm 13357,23	70464,4 \pm 31890,45	84717,8 \pm 36586,65
Adm5	60604 \pm 16306,11	57963,6 \pm 27468,34	90744,6 \pm 27580,49
Adm6	68824,33 \pm 16998,11	61175,6 \pm 16681,65	87495,2 \pm 40835,77
Adm7	63217,5 \pm 29411,42	83014,4 \pm 31836,74	106563,2 \pm 56391,50
Adm8	92905,67 \pm 39879,70	86052 \pm 18626,75	100778 \pm 59576,39
Ret+adm	50500,5 \pm 32372,57	58581,6 \pm 38329,88	79846,2 \pm 38708,46
Teste	86172,17 \pm 41349,29	85707,2 \pm 30276,66	87740,2 \pm 45969,08
Pos	52583,38 \pm 34115,65	62833,78 \pm 15550,86	67736,28 \pm 26385,54

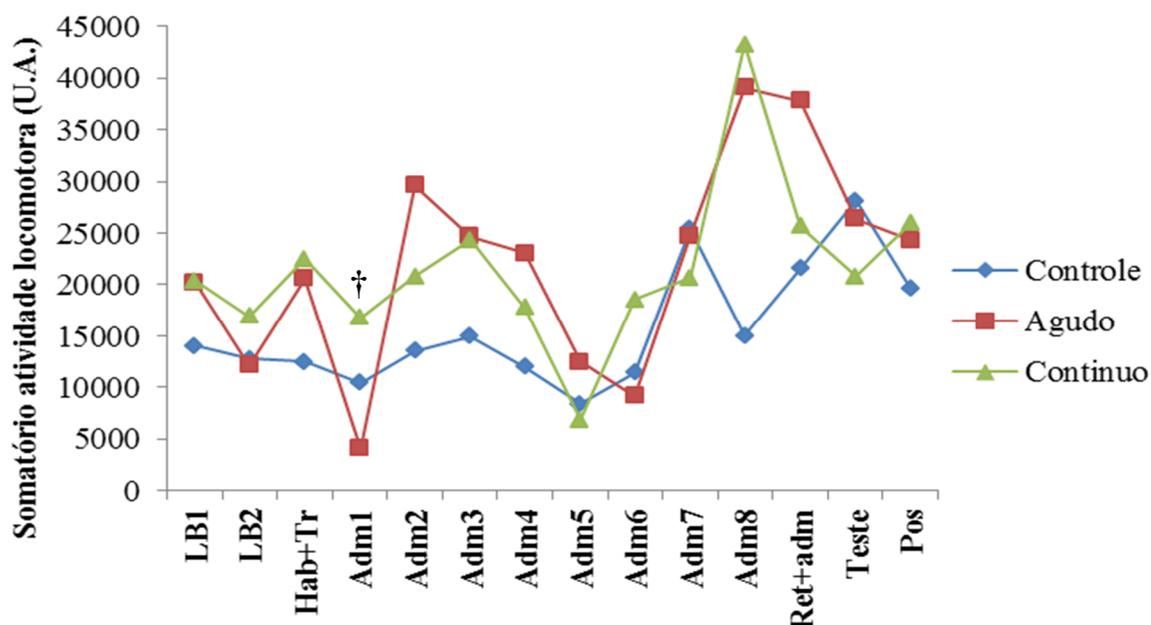


Figura 16: Efeito da cafeína no somatário da atividade locomotora durante o escuro, registrado através do sensor baseado em giroscópio para cada fase experimental. Nesta, temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, onde foi possível observar uma tendência intergrupo, apenas no que diz respeito a primeira sessão de administração da cafeína, onde o grupo contínuo teve atividade locomotora maior se comparado aos grupos controle e agudo (†, $F(2,13) = 3,09$, ANOVA $p \leq 0,06$). Além disso, diferenças intragrupo são observadas (teste T dependente, $p \leq 0,05$).

Tabela 7: Efeito da cafeína no somatário da atividade locomotora no escuro para cada fase experimental, acrescido do erro padrão da amostra. Dados coletados através dos sensores baseados em giroscópio

	Controle (\pm DP)	Agudo (\pm DP)	Contínuo (\pm DP)
LB1	14005,4 \pm 6501,85	20233,66 \pm 11855,97	20383 \pm 10186,12
LB2	12793,22 \pm 3886,11	12134,36 \pm 3698,90	16893,22 \pm 4925,14
Hab+Tr	12446,78 \pm 7836,03	20620,96 \pm 9095,13	22498,68 \pm 9582,29
Adm1	10407,17 \pm 5469,19	4093,6 \pm 1830,71	16803,6 \pm 8465,23
Adm2	13553,5 \pm 6245,02	29607,6 \pm 14403,30	20838,2 \pm 7074,05
Adm3	14955,17 \pm 6447,69	24715,4 \pm 15702,15	24363,6 \pm 14356,29
Adm4	11965,67 \pm 3606,17	23060 \pm 10080,36	17739,6 \pm 5265,49
Adm5	8353,83 \pm 2422,24	12455,8 \pm 5028,71	6855,8 \pm 2960,28
Adm6	11445,5 \pm 6581,85	9166,4 \pm 2403,89	18583,2 \pm 7839,26
Adm7	25372 \pm 13315,27	24771,4 \pm 11227,24	20671,8 \pm 6468,81
Adm8	15005,5 \pm 6997,83	39100,6 \pm 16512,90	43232,6 \pm 21576,52
Ret+adm	21587,33 \pm 10662,93	37839 \pm 16979,38	25658,2 \pm 6605,36
Teste	28169,83 \pm 14008,12	26358,2 \pm 12618,43	20786 \pm 9481,52
Pos	19660,07 \pm 9039,62	24321,96 \pm 10820,08	25965,4 \pm 7758,19

4.4. EFEITO DA CAFEÍNA NO RITMO DE ATIVIDADE-REPOUSO PARA OS SENSORES DE INFRAVERMELHO

Os parâmetros escolhidos para a avaliação da atividade locomotora dos saguis foram:

- 1) Inspeção visual dos dados através de actogramas e gráficos em forma de onda.
- 2) Mesor: valor médio da função cosseno de todos os valores da oscilação para a atividade locomotora. Expresso em unidades arbitrárias (U.A.).
- 3) Amplitude: valor da diferença entre os valores máximo (ou mínimo) e médio (mesor) da curva ajustada de um ritmo biológico qualquer. Expresso em unidades arbitrárias (U.A.).
- 4) Duração da fase ativa: tempo total transcorrido de atividade locomotora efetuada pelo sagui durante a fase de claro. Unidade de medida expressa em horas.
- 5) Início e fim da atividade locomotora: em termos cronobiológicos, estes parâmetros são denominados por ângulo de fase, que nada mais é que a diferença temporal entre a fase de um evento e a fase de outro evento (por exemplo, a diferença entre o despertar e o amanhecer). Neste trabalho em especial, estamos relacionando a atividade locomotora com o acender e apagar das luzes, respectivamente. Unidade de medida expressa em horas.

Além disso, dado ao fato do ritmo de atividade/repouso não obedecer a uma função cosseno, utilizaremos adicionalmente outras quatro variáveis, as quais não são associadas a uma função conhecida e são por tal fato denominadas de variáveis não paramétricas.

- 6) IV – Variabilidade intradiária: Quantifica a frequência de transições entre atividade e repouso a cada hora. Altos valores de IV indicam ocorrência de episódios de sono diurnos e/ou despertares noturnos. Ou seja, esta variável indica a fragmentação deste ritmo de atividade/repouso.

- 7) IS – Estabilidade interdiana: quantifica a sincronização do ritmo ao ciclo de 24 horas. Altos valores de IS indicam que o sujeito está bem sincronizado ao ciclo claro/escuro de 24 horas.

4.4.1 Inspeção visual

Abaixo segue a distribuição da atividade locomotora para os saguis em seus três grupos experimentais, utilizando os sensores de infravermelho para coleta destes dados (figuras 17 e 18. Demais animais verificar o anexo I).

Como mencionado na metodologia, este sensor coleta dados a cada 5 minutos e não possui capacidade de registro dentro da caixa ninho, limitando a coleta da atividade somente na fase ativa. Portanto, o sensor de infravermelho não avalia prováveis atividades locomotoras durante a fase de escuro, o que pode sugerir despertares noturnos, ou alguma atividade noturna decorrente do uso da cafeína. Mas mesmo não podendo notar atividade noturna, é possível verificar atividade locomotora ao longo da fase de claro, para as fases delimitadas A, B, C, D e E.

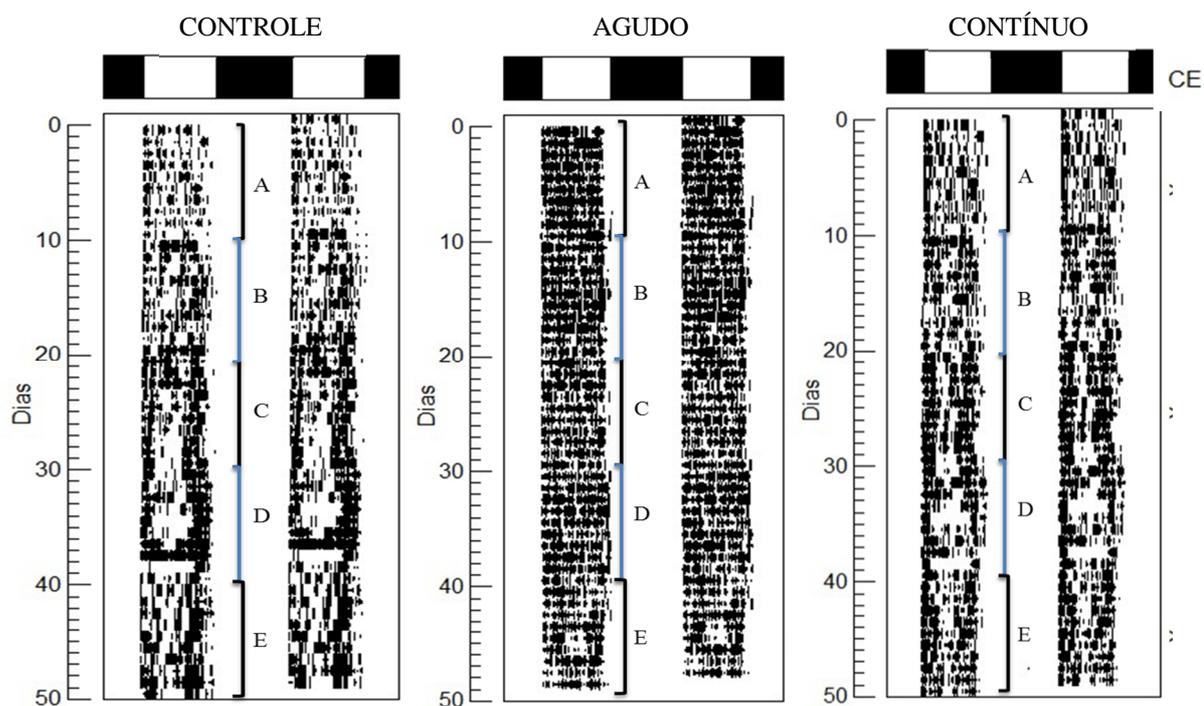


Figura 17: Actogramas de animais representativos dos três grupos experimentais, obtidos pelos sensores de infravermelho. Para entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento, os actogramas foram divididos em a) Linha de base 1, b) Linha de base 2, c) Habituação + treinos, d) Administração das substâncias + retraining + teste e e) Pós-experimento.

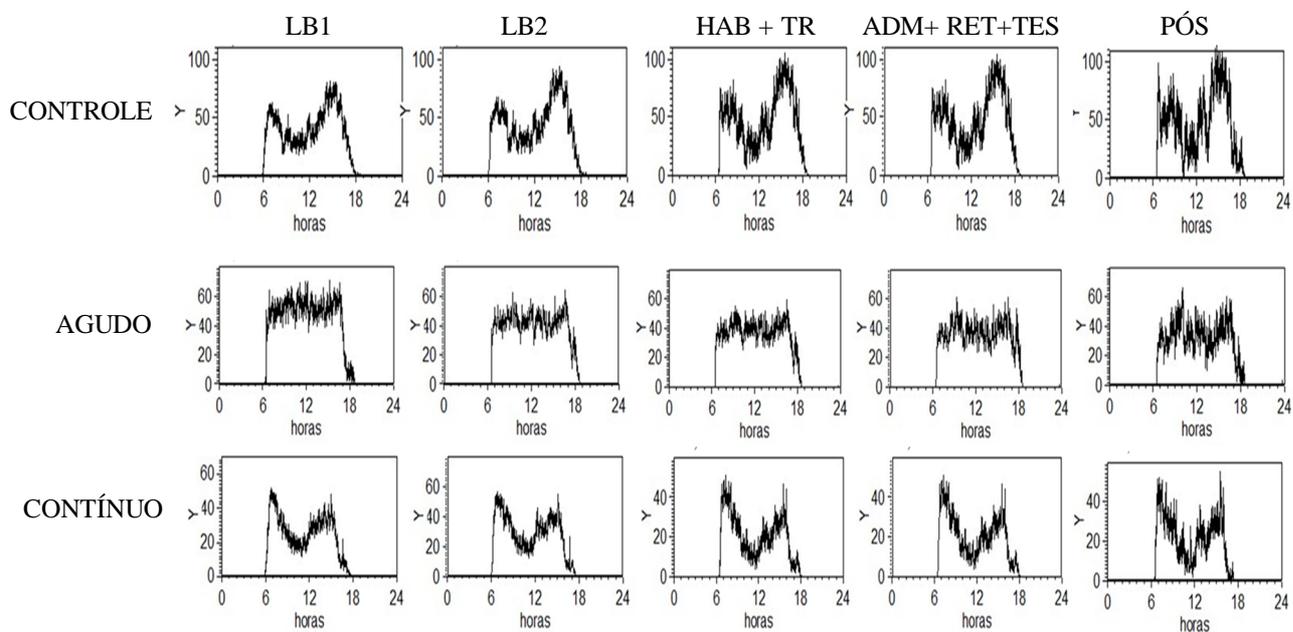


Figura 18: Gráficos em forma de onda dos três grupos experimentais, os quais foram obtidos através dos sensores de infravermelho. Para o entendimento de como se apresenta a atividade locomotora ao longo do experimento em cada um dos animais, os gráficos em forma de onda foram divididos em Linha de base 1 (LB1), Linha de base 2 (LB2), Habituação + treinos (HAB+TR), Administração das substâncias + retraining + teste (ADM+RET+TES) e Pós-experimento (PÓS).

4.4.2 Mesor

Não foram observadas diferenças entre os três grupos experimentais, em relação ao mesor, para atividade locomotora em cada uma das fases (tabela 8). Ainda em relação a este parâmetro, um animal de cada situação experimental foi excluído das análises em grupo, pelo fato destes serem *outliers* (que destoam os dados em relação aos outros animais do mesmo grupo), fato este que poderia mascarar o real resultado exibido. Desta forma, cada um destes saguis tiveram seus dados analisados em separados ao seu grupo experimental.

Tabela 8: Efeito da cafeína na média do mesor e desvio padrão do mesor para cada fase experimental.

	Controle (± DP)	Agudo (± DP)	Contínuo (± DP)	M_controle (± DP)	M_agudo (± DP)	F_contínuo (± DP)
LB1	11,08 ± 3,86	6,83 ± 2,90	13,06 ± 6,83	21,58 ± 5,34	39,61 ± 3,44	24,09 ± 2,14
LB2	10,09 ± 4,74	6,61 ± 3,94	10,46 ± 6,39	20,34 ± 4,96	41,17 ± 4,09	23,34 ± 3,08
Hab+Tr	8,71 ± 4,06	7,36 ± 3,09	9,66 ± 5,08	22,35 ± 5,10	39,33 ± 2,83	19,11 ± 2,37
Adm1	10,09 ± 5,18	7,79 ± 3,62	11,04 ± 3,01	18,91	40,78	16,23
Adm2	10,90 ± 5,14	7,93 ± 3,58	13,07 ± 7,03	21,54	41,46	18,02
Adm3	11,51 ± 6,49	10,74 ± 5,37	16,29 ± 8,44	20,16	42,98	22,09
Adm4	11,10 ± 5,57	9,63 ± 4,87	14,47 ± 6,54	28,75	39,13	24,47
Adm5	10,41 ± 5,21	9,27 ± 4,08	13,74 ± 6,06	23,15	40,98	24,77
Adm6	9,52 ± 4,21	6,52 ± 3,56	11,13 ± 4,26	20,89	41,67	21,08
Adm7	11,08 ± 5,46	7,20 ± 3,54	12,90 ± 5,66	22,52	42,87	19,20
Adm8	9,08 ± 5,42	8,94 ± 3,30	12,61 ± 6,24	29,07	42,25	22,20
Ret+adm	9,86 ± 4,84	8,89 ± 4,29	11,19 ± 5,35	23,69	47,39	22,70
Teste	10,02 ± 4,58	5,91 ± 2,42	7,33 ± 2,20	10,82	42,12	21,46
Pos	7,41 ± 3,31	6,31 ± 3,26	7,70 ± 3,95	24,85 ± 4,29	33,85 ± 5,08	15,83 ± 3,34

Dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo, acrescidos dos dados em separado de cada um dos outliers destes grupos.

4.4.3 Amplitude

Assim como na variável anterior, para a amplitude também foi necessário análise em separado daqueles animais que foram *outliers*, e que distorciam os resultados quando agrupados. De tal forma como no mesor, aqui nesse parâmetro não observamos diferenças estatisticamente significantes para os três grupos experimentais estudados durante as fases experimentais, para os dados obtidos através dos sensores de atividade locomotora por infravermelho (tabela 9).

Tabela 9: Efeito da cafeína na média da amplitude para cada fase experimental, acrescidos dos dados em separado de cada um dos outliers destes grupos.

	Controle	Agudo	Contínuo	M_controle	M_agudo	F_contínuo
LB1	16,13 ± 5,95	11,69 ± 5,08	18,30 ± 5,92	30,92 ± 5,00	59,87 ± 3,54	34,72 ± 7,99
LB2	14,43 ± 4,74	11,34 ± 5,87	18,22 ± 9,01	28,96 ± 4,31	60,99 ± 4,45	32,03 ± 8,32
Hab+Tr	14,54 ± 6,07	9,56 ± 4,83	16,05 ± 4,62	30,07 ± 4,12	58,34 ± 4,17	26,95 ± 8,23
Adm1	13,44 ± 7,50	9,16 ± 4,08	14,31 ± 3,88	23,23	58,75	21,98
Adm2	14,94 ± 7,35	9,65 ± 4,45	16,39 ± 8,99	28,96	62,82	23,28
Adm3	15,12 ± 7,22	13,90 ± 6,41	21,11 ± 11,92	25,68	60,35	29,06
Adm4	15,88 ± 7,76	11,47 ± 5,91	18,10 ± 9,69	37,00	58,83	31,20
Adm5	14,83 ± 7,85	11,88 ± 5,45	17,06 ± 7,09	30,01	59,02	32,33
Adm6	13,53 ± 7,27	5,92 ± 3,30	11,53 ± 5,34	17,90	61,76	28,69
Adm7	15,07 ± 7,98	8,28 ± 4,76	15,23 ± 7,13	25,53	59,72	21,41
Adm8	12,58 ± 5,71	10,86 ± 5,15	15,23 ± 8,35	25,53	59,72	28,92
Ret+adm	13,57 ± 6,83	11,98 ± 7,28	14,79 ± 7,28	49,89	66,84	30,21
Teste	13,80 ± 6,55	7,02 ± 0,98	8,57 ± 4,14	12,62	56,68	27,28
Pos	12,61 ± 5,41	10,56 ± 4,80	10,86 ± 5,39	33,59 ± 7,42	47,42 ± 5,57	22,10 ± 6,01

Dados referentes aos três grupos experimentais, acrescidos dos dados em separado de cada um dos outliers destes grupos. Média e erro padrão da amostra são apresentados.

4.4.4 Duração da fase ativa

Neste item, o qual diz respeito ao tempo (em horas) que o animal passou em vigília dentro do total de 24 horas do ciclo claro/escuro, temos que durante as fases experimentais das linhas de base, habituação e treinos, os animais apresentaram durações semelhantes em sua fase ativa (tabela 10). Durante as sessões de administração da cafeína percebem-se diferenças para aqueles saguis que estão inseridos no grupo que ingeriram cafeína por 9 dias seguidos, sempre próximo à fase de sono. Estes apresentaram maior duração da fase ativa para alguns dos dias da ingestão da cafeína quando comparados aos grupos que receberam substância placebo ou ingeriram a cafeína somente uma vez. (figura 19 e tabela 10 – ANOVA, adm2: $F(2,13)=4,11$, $p \leq 0,05$; adm4: $F(2,13)=3,08$, $p \leq 0,07$; adm5: $F(2,13)=3,11$, $p \leq 0,07$; adm6: $F(2,13)=4,31$, $p \leq 0,05$).

Ademais é importante ressaltar que nas sessões que houve administração das substâncias, os grupos estenderam a duração de tempo que permaneceram ativos, pois a alimentação da tarde foi fornecida após a administração da cafeína ou placebo. Contudo, os saguis que ingeriram a cafeína repetidamente foram os que mais estenderam sua atividade.

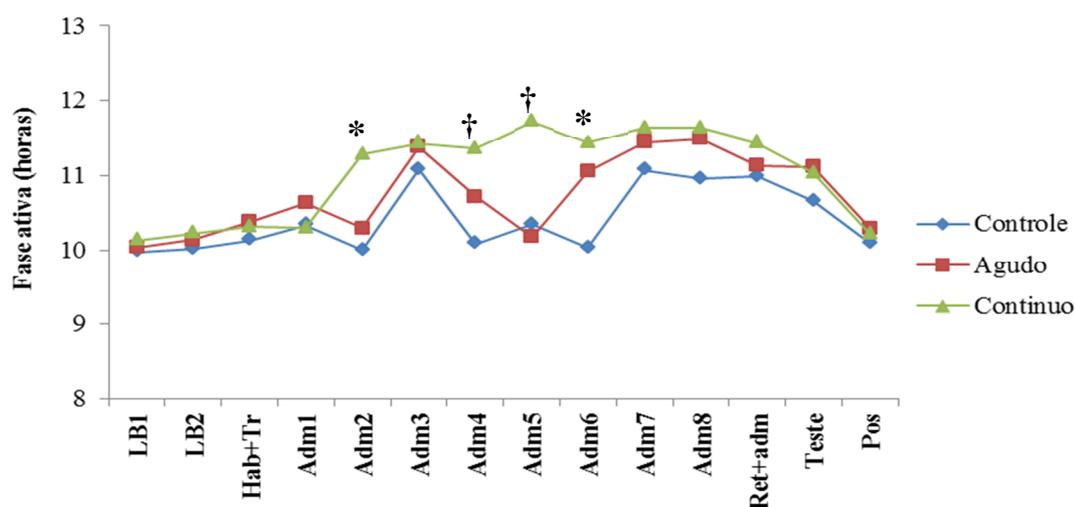


Figura 19: Efeito da cafeína na média da fase ativa para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo. Neste foi possível observar diferenças estatísticas em alguns pontos do experimento (ANOVA uma via seguida por post hoc de Tukey). Diferenças intergrupos * $p \leq 0,05$, † $p \leq 0,07$ – ANOVA, adm2: $F(2,13)=4,11$, $p \leq 0,05$; adm4: $F(2,13)=3,08$, $p \leq 0,07$; adm5: $F(2,13)=3,11$, $p \leq 0,07$; adm6: $F(2,13)=4,31$, $p \leq 0,05$).

Tabela 10: Efeito da cafeína na duração da fase ativa do ciclo atividade-reposo em saguis.

	Controle (±DP)	Agudo (±DP)	Contínuo (±DP)
LB1	9,98 ± 0,21 h	10,04 ± 0,81 h	10,13 ± 0,28 h
LB2	10,01 ± 0,30 h	10,14 ± 0,60 h	10,23 ± 0,54 h
Hab+Tr	10,13 ± 0,20 h	10,38 ± 0,53 h	10,31 ± 0,48 h
Adm1	10,33 ± 0,66 h	10,63 ± 1,93 h	10,30 ± 2,39 h
Adm2	9,99 ± 2,65 h	10,30 ± 4,32 h	11,28 ± 2,27 h
Adm3	11,08 ± 1,91 h	11,38 ± 0,80 h	11,43 ± 0,93 h
Adm4	10,08 ± 2,04 h	10,72 ± 2,19 h	11,37 ± 2,41 h
Adm5	10,35 ± 1,21 h	10,18 ± 1,44 h	11,72 ± 0,72 h
Adm6	10,03 ± 0,44 h	11,06 ± 0,31 h	11,44 ± 0,24 h
Adm7	11,07 ± 3,26 h	11,45 ± 0,58 h	11,63 ± 0,19 h
Adm8	10,96 ± 3,88 h	11,50 ± 2,27 h	11,63 ± 1,93 h
Ret+adm	10,99 ± 2,67 h	11,13 ± 3,47 h	11,43 ± 0,89 h
Teste	10,66 ± 1,95 h	11,12 ± 2,41h	11,03 ± 2,58 h
Pos	10,09 ± 0,44 h	10,30 ± 0,48 h	10,22 ± 0,56 h

4.4.5 Início e fim da atividade locomotora

Para o início da atividade locomotora, é possível observar que independente do grupo, o sistema de infravermelho só é capaz de registro da atividade locomotora no momento que há o acender das luzes, momento este que os saguis retiram-se de suas caixas ninhos para locomoverem-se em suas gaiolas.

Apesar de haver flutuações ao longo das sessões experimentais, não observa-se diferenças entre os grupos estudados para o início da atividade locomotora. (Figura 20 e tabela 11)

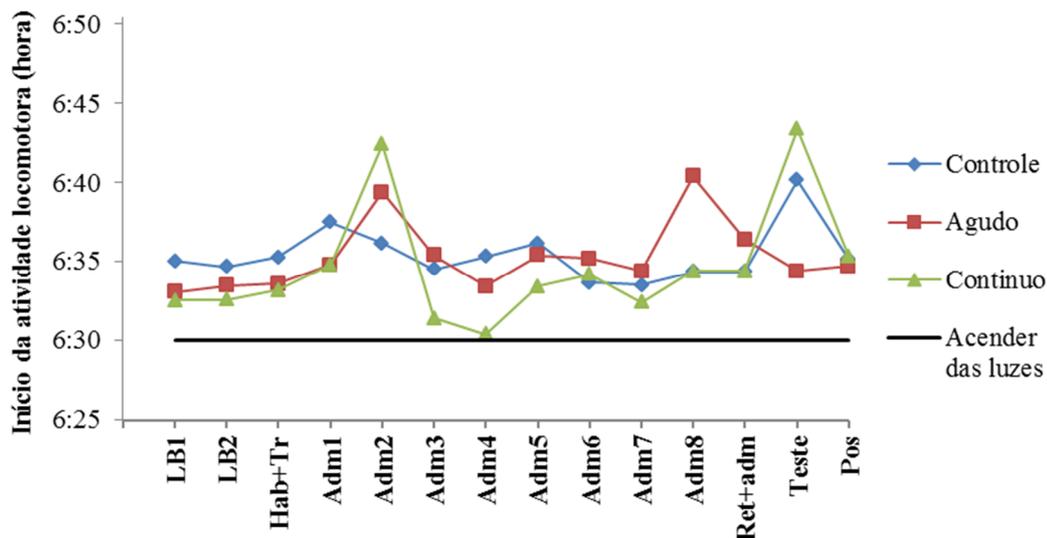


Figura 20: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Tabela 11: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, acrescida de seu erro padrão, para os três grupos experimentais.

	Controle (\pm DP)	Agudo (\pm DP)	Contínuo (\pm DP)
LB1	6:35:03 \pm 1min3s	06:33:02 \pm 4min2s	06:32:32 \pm 2min5s
LB2	06:34:01 \pm 1min9s	06:33:28 \pm 2min39s	06:32:34 \pm 3min11s
Hab+Tr	06:35:16 \pm 2min51s	06:33:35 \pm 2min50s	06:33:11 \pm 6min4s
Adm1	06:37:30 \pm 7min29s	06:34:48 \pm 2min10s	06:34:48 \pm 4min9s
Adm2	06:36:10 \pm 3min43s	06:39:24 \pm 4min9s	06:42:24 \pm 10min26s
Adm3	06:34:30 \pm 1min46s	06:35:24 \pm 2min24s	06:31:24 \pm 2min42s
Adm4	06:35:20 \pm 3min47s	06:33:24 \pm 2min58s	06:30:24 \pm 3min17s
Adm5	06:36:10 \pm 5min49s	06:35:24 \pm 2min24s	06:33:24 \pm 33s
Adm6	06:33:40 \pm 1min2s	06:35:12 \pm 1min49s	06:34:12 \pm 1min6s
Adm7	06:33:40 \pm 1min46s	06:32:24 \pm 2min24s	06:32:24 \pm 3s
Adm8	06:34:20 \pm 2min4s	06:40:24 \pm 8min12s	06:34:24 \pm 2min24s
Ret+adm	06:34:20 \pm 2min4s	06:36:24 \pm 4min2s	06:34:24 \pm 2min53s
Teste	06:44:10 \pm 8min3s	06:34:24 \pm 3min42s	06:43:24 \pm 8min30s
Pos	06:35:10 \pm 51s	06:34:42 \pm 1min58s	06:35:18 \pm 4min56s

Já para o fim da atividade locomotora, da mesma forma que para a variável anterior, só é possível registro de atividade locomotora até o momento que se apagam as luzes, porque no momento em que isso ocorre, todos os animais recolhem-se as suas caixas ninhos e o sensor de infravermelho não consegue mais detectar qualquer movimentação. Dessa maneira, para as sessões que não houve administração das substâncias, os saguis tiveram o fim da atividade locomotora mais antecipada se comparado as sessões que haviam administração (figura 21 e tabela 12). Isso acontece, pois nas sessões de administração da cafeína ou placebo a alimentação é somente fornecida após a ingestão destes, atrasando assim o fim da atividade. Tanto que para alguns animais, é possível observar atividade estendida até próximo do apagar das luzes (às 18h30min). Mesmo assim não conseguimos observar diferenças entre os grupos durante as sessões experimentais. As diferenças apenas aconteceram intragrupo, ao longo de algumas fases experimentais.

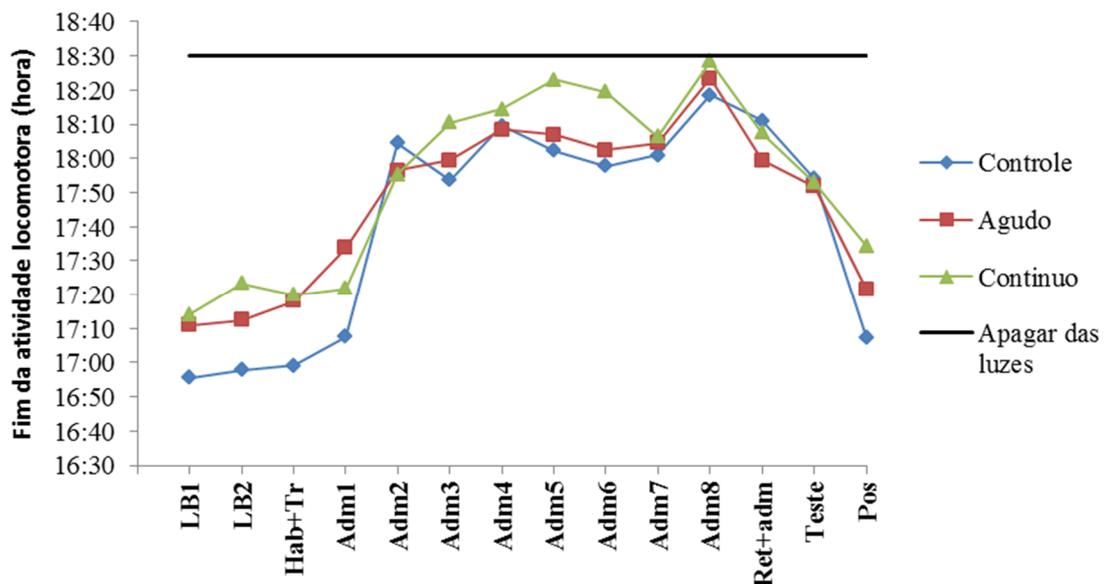


Figura 21: Efeito da cafeína na média do fim da atividade locomotora para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Tabela 12: Efeito da cafeína na média do início da atividade locomotora para cada fase experimental, acrescida de seu erro padrão, para os três grupos experimentais.

	Controle (±DP)	Agudo (±DP)	Contínuo (±DP)
LB1	16:55:33 ± 24min17s	17:11:01 ± 25min37s	17:14:01 ± 13min31s
LB2	16:57:51 ± 19min6s	17:12:28 ± 26min31s	17:23:16 ± 13min38s
Hab+Tr	16:59:04 ± 25min58s	17:18:00 ± 24min35s	17:19:58 ± 17min9s
Adm1	17:07:30 ± 16min1s	17:33:48 ± 24min12s	17:21:48 ± 8min51s
Adm2	18:04:30 ± 21min6s	17:56:24 ± 26min24s	17:55:24 ± 20min9s
Adm3	17:53:40 ± 15min42s	17:59:24 ± 15min57s	18:10:24 ± 17min16s
Adm4	18:09:30 ± 5min1s	18:08:24 ± 5min2s	18:14:24 ± 11min54s
Adm5	18:02:10 ± 19min51s	18:07:00 ± 17min49s	18:23:00 ± 14min35s
Adm6	17:57:40 ± 20min17s	18:02:24 ± 22min12s	11:19:24 ± 19min56s
Adm7	18:01:00 ± 6min18s	18:04:24 ± 18min6s	18:06:24 ± 4min20s
Adm8	18:18:30 ± 16min02s	18:23:24 ± 10min34s	18:28:24 ± 6min39s
Ret+adm	18:11:00 ± 16min36s	17:59:24 ± 13min27s	18:07:24 ± 17min15s
Teste	17:54:00 ± 33min7s	17:51:48 ± 23min13s	17:52:48 ± 25min34s
Pos	17:07:17 ± 28min18s	17:21:31 ± 29min17s	17:34:25 ± 19min31s

4.4.6 IV – Variabilidade intradiária

Os grupos não apresentaram diferenças significativas na avaliação das diferenças intergrupo, (figura 22 e tabela 13). Por conseguinte, as diferenças foram encontradas quando análises aconteceram intragrupo. Um dos primeiros achados é do grupo placebo, o qual mostrou-se homogêneo com relação à distribuição dos valores de IV, e com valores abaixo dos outros dois grupos, o que indica que o ritmo de atividade/repouso destes saguis esteja menos fragmentado ao longo das fases experimentais. Para os animais inseridos no grupo agudo, quando comparadas às duas linhas de base e as demais sessões que não havia administração da cafeína com o retreino seguido da administração aguda da cafeína, esta última sessão possuía quase sempre valores muito mais elevados (Teste T para medidas dependentes. Lb1 x ret+adm: $T(4) = -4,06$, $p = 0,015$; Lb2 x ret+adm: $T(4) = -3,94$, $p = 0,016$;

hab+tr x ret+adm $T(4) = -4,31$, $p = 0,012$). Por fim, os saguis de ingestão contínua da cafeína tiveram valores mais elevados de IV em algumas sessões de ingestão da cafeína e na sessão de teste (tabela 14). Tal fato pode nos remeter à cafeína administrada continuamente agindo de forma a fragmentar o ciclo de atividade/repouso para estes animais em questão.

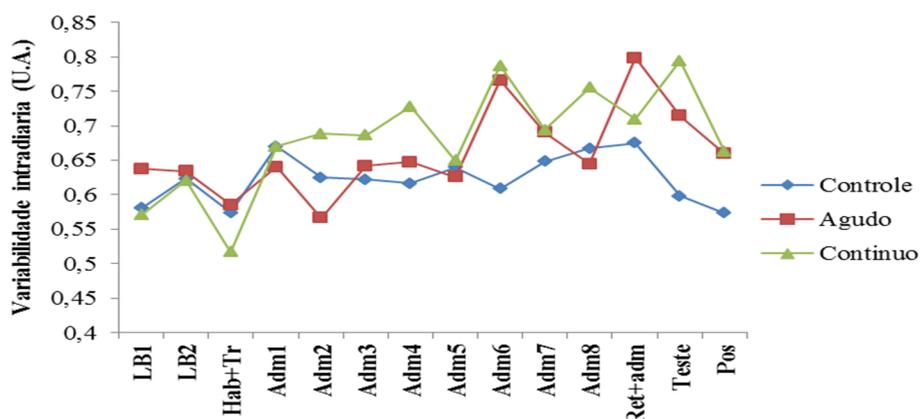


Figura 22: Efeito da cafeína na média da Variabilidade intradiária (IV) para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo.

Tabela 13: Efeito da cafeína na variabilidade intradiária (IV) para cada fase experimental.

	Controle (±DP)	Agudo (±DP)	Contínuo (±DP)
LB1	0,58 ± 0,21	0,64 ± 0,29	0,57 ± 0,16
LB2	0,62 ± 0,24	0,63 ± 0,27	0,62 ± 0,22
Hab+Tr	0,57 ± 0,19	0,59 ± 0,26	0,52 ± 0,09
Adm1	0,67 ± 0,23	0,64 ± 0,29	0,67 ± 0,19
Adm2	0,62 ± 0,20	0,57 ± 0,29	0,69 ± 0,20
Adm3	0,62 ± 0,24	0,64 ± 0,31	0,69 ± 0,28
Adm4	0,62 ± 0,23	0,65 ± 0,27	0,73 ± 0,24
Adm5	0,64 ± 0,20	0,63 ± 0,23	0,65 ± 0,16
Adm6	0,61 ± 0,19	0,77 ± 0,32	0,79 ± 0,23
Adm7	0,65 ± 0,30	0,69 ± 0,25	0,69 ± 0,11
Adm8	0,67 ± 0,31	0,64 ± 0,38	0,76 ± 0,23
Ret+adm	0,68 ± 0,23	0,80 ± 0,33	0,71 ± 0,19
Teste	0,60 ± 0,20	0,71 ± 0,25	0,79 ± 0,23
Pos	0,57 ± 0,19	0,66 ± 0,18	0,66 ± 0,11

Tabela 14: Valores de T e p significativos ($p \leq 0,05$) para os animais inseridos no grupo contínuo, quando analisados os parâmetros de IV.

Condição	Valor T(4)	Valor p
Lb1 x ad5	-2,68	0,048
Lb2 x ad6	-3,65	0,021
Lb2 x ad8	-3,76	0,019
Hab+tr x ad2	-2,70	0,045
Hab+tr x ad4	-2,69	0,049
Hab+tr x ad5	-4,04	0,015
Hab+tr x ad6	-2,65	0,050
Hab+tr x ad7	-2,84	0,046
Hab+tr x ad8	-2,68	0,048
Hab+tr x ret	-2,78	0,041
Hab+tr x teste	-3,00	0,039
Hab+tr x pos	-2,82	0,040

4.4.7 IS – Estabilidade interdiaria

Ao longo das fases experimentais existiram flutuações nos resultados exibidos para cada grupo experimental, que, entretanto, não houveram diferenças significativas entre eles (figura 23 e tabela 15).

Contudo, quando analisadas as diferenças intragrupo, verifica-se que os saguis que ingeriram a cafeína, quer seja nas doses agudas ou contínuas diminuiram a frequência de IS quando comparadas com as demais sessões experimentais que não teve a utilização da cafeína (Teste T para medidas dependentes, $p \leq 0,05$. Agudo: Lb1 x adm+ret, T(4)= 3,12, p= 0,035; Lb2 x adm+ret, T(4)= 2,72, p= 0,047; hab+ tr x adm+ret, T(4)= 4,24, p= 0,013. Contínuo: Lb1 x adm+ret, T(4)= 4,52, p= 0,010; Lb2 x adm+ret, T(4)= 3,90, p= 0,017; hab+tr x adm+ret, T(4)= 3,67, p= 0,021). Outro fato que chama atenção é que para os três grupos experimentais os maiores valores de IS sempre se encontram durante as sessões de habituação

e treinos. Então podemos especular que de alguma forma as sessões de treinos estejam colaborando para o ajuste dos saguis ao ciclo 24h e o protocolo de administração da cafeína esteja contribuindo para uma quebra desse ajuste ao ciclo.

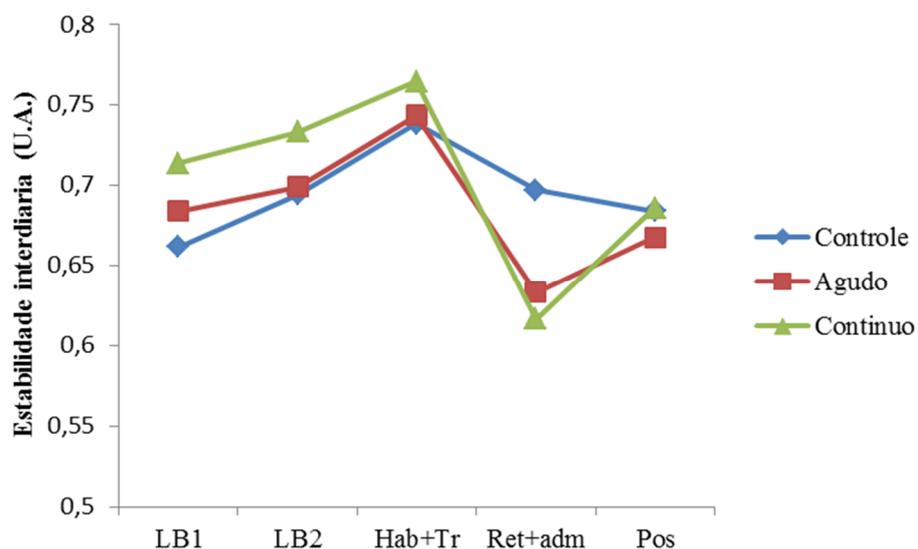


Figura 23: Efeito da cafeína na média da estabilidade interdiária (IS) para cada fase experimental, onde temos os dados referentes aos três grupos experimentais de nosso estudo. Não foi possível observar diferenças intergrupo, apenas intragrupo. Teste T para medidas dependentes. Agudo: Lb1 x adm+ret, $T(4) = 3,12$, $p = 0,035$; Lb2 x adm+ret, $T(4) = 2,72$, $p = 0,047$; hab+tr x adm+ret, $T(4) = 4,24$, $p = 0,013$. Contínuo: Lb1 x adm+ret, $T(4) = 4,52$, $p = 0,010$; Lb2 x adm+ret, $T(4) = 3,90$, $p = 0,017$; hab+ tr x adm+ret, $T(4) = 3,67$, $p = 0,021$

Tabela 15: Efeito da cafeína na média da estabilidade interdiária (IS) para cada fase experimental.

	Controle (±DP)	Agudo (±DP)	Contínuo (±DP)
LB1	0,66 ± 0,16	0,68 ± 0,15	0,71 ± 0,09
LB2	0,69 ± 0,14	0,70 ± 0,13	0,73 ± 0,08
Hab+Tr	0,74 ± 0,09	0,74 ± 0,12	0,76 ± 0,04
Adm+ret	0,70 ± 0,08	0,63 ± 0,16	0,62 ± 0,11
Pos	0,68 ± 0,11	0,67 ± 0,13	0,69 ± 0,05

4.5. APRENDIZAGEM DOS SAGUIS À TAREFA COGNITIVA DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA

Como descrito, a tarefa cognitiva utilizada foi a preferência condicionada pelo lugar, onde os animais devem associar um contexto espacialmente diferente do outro devido a uma experiência agradável, que foi a oferta de alimentos. E os resultados deste tópico detalham como os saguis responderam durante as sessões de habituação, e se aprenderam a tarefa imposta durante os treinos.

Nos dias de habituação foram analisados como os 16 animais interagiram com o aparato e se eles tinham preferência por algum dos contextos. Foi observado que não houve diferença para os contatos físicos, observações realizadas e latência entre os contextos (tabela 16). Isso demonstra que os saguis não possuíam preferência, ou seja, que os contextos eram neutros. Além disso, os animais não apresentaram diferenças na interação com o aparato do primeiro para o segundo dia de habituação.

Tabela 16: Apresentação das variáveis para as sessões de habituação.

		HABITUAÇÃO 1	HABITUAÇÃO 2
		(±DP)	(±DP)
Contato contexto	CR	51s ± 59s	42s ± 44s
	CNR	54s ± 62s	38s ± 58s
Contato atrás do contexto	CR	33s ± 41s	22s ± 31s
	CNR	39s ± 45s	42s ± 72s
Observações	CR	12s ± 13s	17s ± 19s
	CNR	8s ± 9s	20s ± 31s
Latência	CR	111s ± 121s	176s ± 188s
	CNR	68 s ± 122s	152s ± 166s

Após as sessões de habituação, ocorreram os treinos. Nestes verificou-se que os saguis foram capazes de associar o ambiente espacialmente diferente do outro por meio de uma experiência agradável. Esses resultados de aprendizagem são observados através da diminuição na latência para o contexto que há o reforço (figura 24), bem como no aumento nos contatos e observações para com esse ambiente em relação ao contexto não reforçado (Respectivamente figuras 25 e 26, Wilcoxon, $p < 0,05$).

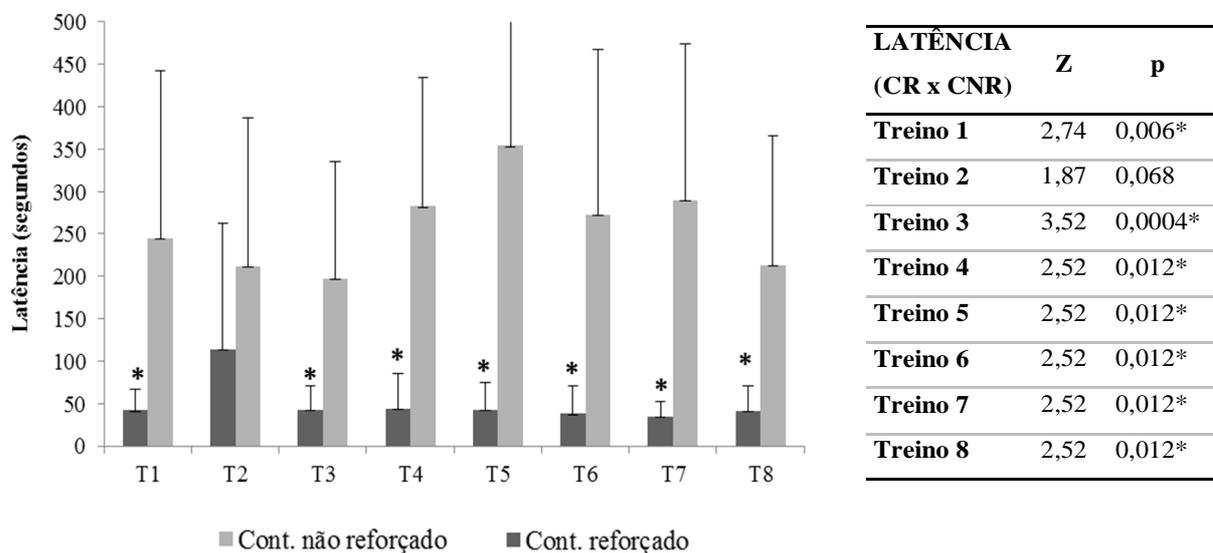
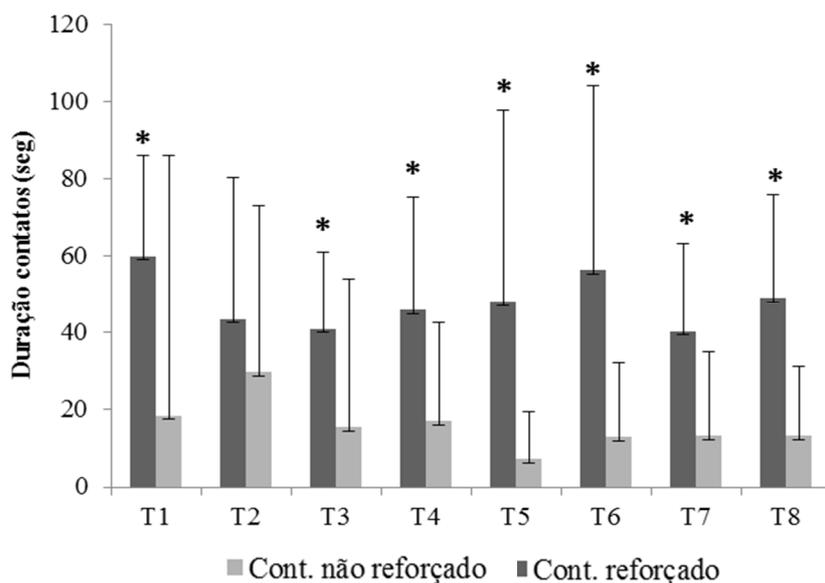
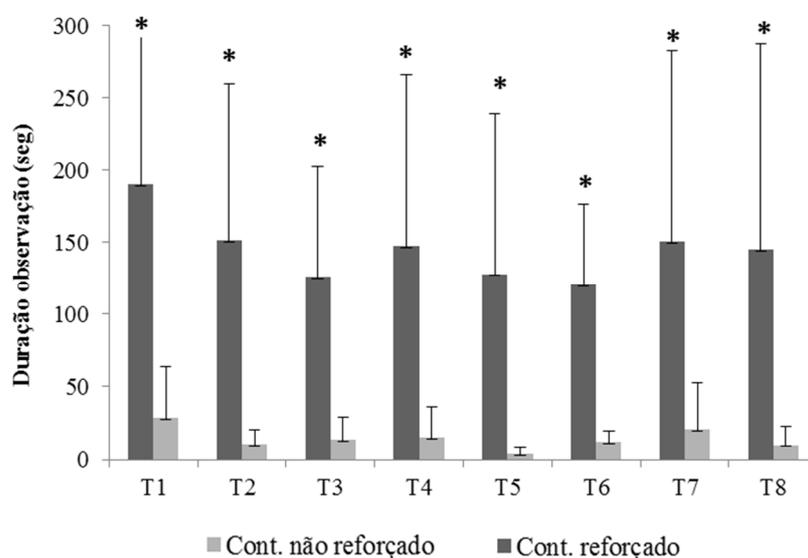


Figura 24: Latência para o primeiro contato com CR e CNR durante os treinos. À esquerda, o gráfico demonstra que os saguis frequentam mais rapidamente o contexto reforçado com alimento (Wilcoxon, $*p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.



CONTATOS (CR x CNR)	Z	p
Treino 1	2,87	0,0041*
Treino 2	0,94	0,349
Treino 3	3,05	0,0023*
Treino 4	3,39	0,0007*
Treino 5	2,91	0,0011*
Treino 6	2,91	0,0011*
Treino 7	2,87	0,0041*
Treino 8	2,87	0,0041*

Figura 25: Duração dos contatos que os saguis realizaram no CR e CNR durante o treino. À esquerda o gráfico demonstra que os saguis permanecem por mais tempo no contexto pareado com a presença de alimento (Wilcoxon, * $p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.



OBSERVAÇÕES (CR x CNR)	Z	p
Treino 1	3,52	0,0004*
Treino 2	3,41	0,0006*
Treino 3	3,52	0,0004*
Treino 4	2,78	0,0012*
Treino 5	2,78	0,0012*
Treino 6	2,78	0,0012*
Treino 7	3,52	0,0004*
Treino 8	3,41	0,0006*

Figura 26: Duração das observações que os saguis fizeram nos CR e CNR durante o treino. À esquerda, o gráfico demonstra que os saguis observam por mais tempo o contexto pareado com a presença de alimento (Wilcoxon, * $p < 0,05$). À direita, os valores de p e Z para cada sessão de treino. Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

4.6. EFEITO DA CAFEÍNA NA EVOCÇÃO DA MEMÓRIA EM SAGUIS

Após os oito dias de administração das substâncias foi possível observar que, assim como nos treinos, durante o retreino os animais apresentaram menor latência para o contexto reforçado do que para o contexto não-reforçado (ANOVA Friedman $F(1,15) = 16,00$, $p=0,000006$), figura 27). E tal efeito independe dos grupos experimentais, pois para os três grupos do estudo a latência permaneceu menor para o CR (Wilcoxon. placebo: $Z= 3,52$, $p=0,0004$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$).

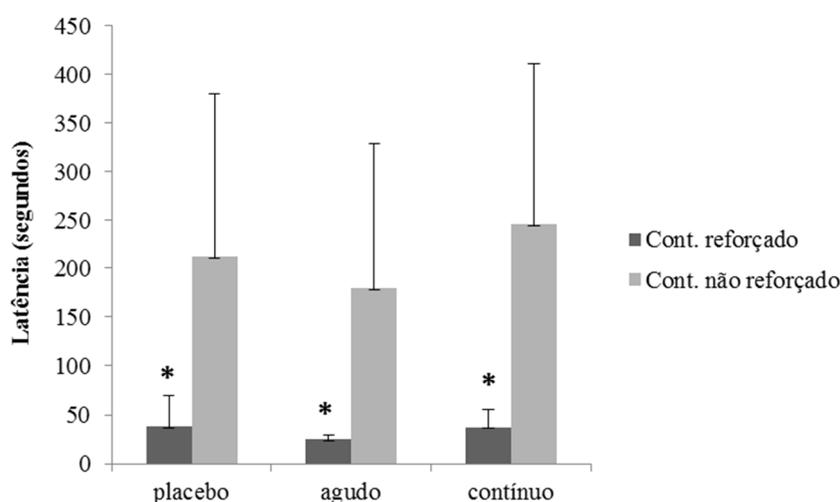


Figura 27: Efeito da cafeína na latência para contato com CR e CNR durante a sessão de retreino. É possível observar os três grupos interagem mais rapidamente no contexto que houve a presença de alimento (Wilcoxon, * $p<0,05$. placebo: $Z= 3,52$, $p=0,0004$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Quanto à duração de contato no retreino (figura 28), verificou-se que os saguis permaneceram por mais tempo em contato com aquele que foi reforçado (ANOVA Friedman, $X^2= 16,00$, $p=0,000006$). E essa diferença estatística é perceptível nos grupos placebo, agudo e contínuo (Wilcoxon. placebo: $Z= 1,99$, $p= 0,047$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$). Da mesma forma que para a duração, a frequência de contatos também foi maior para CR quando comparado a CNR (ANOVA Friedman $X^2= 16,00$, $p=0,000006$).

Para o tempo que os animais passaram observando o contexto reforçado e não reforçado durante a sessão de retreino (figura 29), é possível notar que os animais gastaram mais tempo observando o contexto que foi associado com a presença de alimento (ANOVA Friedman. $X^2= 16,00$, $p=0,000006$). E esta condição independe de qual grupo experimental eles estejam inseridos (Wilcoxon. placebo: $Z=2,20$, $p=0,028$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$).

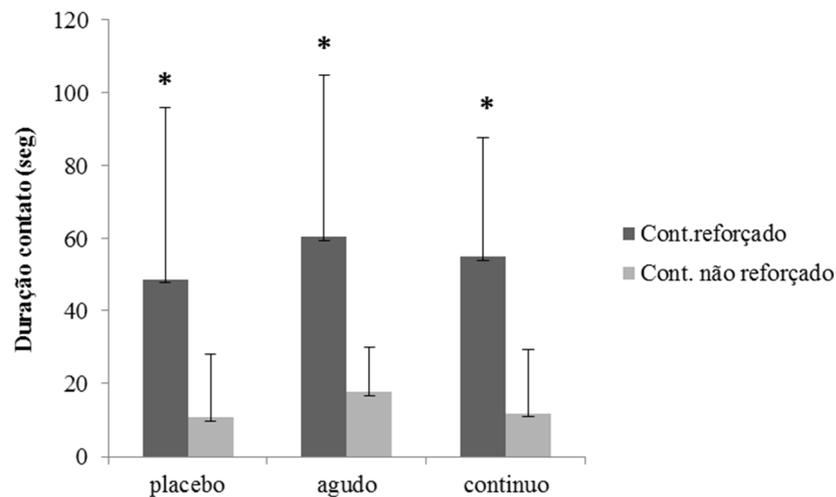


Figura 28: Efeito da cafeína na duração de contatos para o CR e CNR durante a sessão de retreino. Nesta figura verifica-se que os saguis, dos três grupos permanecem por mais tempo em contato com o contexto que foi reforçado (Wilcoxon, $*p<0,05$. placebo: $Z= 1,99$, $p= 0,047$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

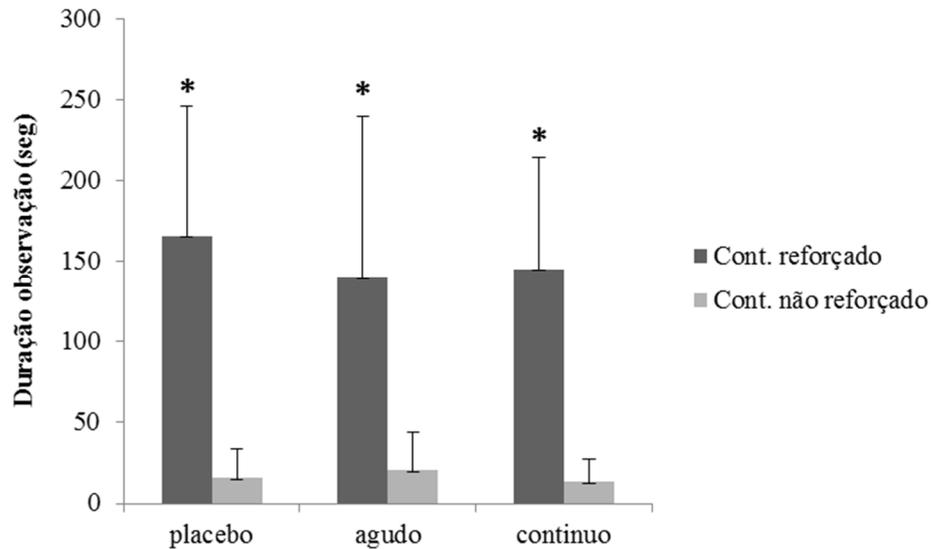


Figura 29: Efeito da cafeína na duração de observações realizadas para o CR e CNR durante a sessão de treino. Nesta observa-se que os saguis dos três grupos observam por mais tempo o contexto que foi reforçado (Wilcoxon, * $p < 0,05$. placebo: $Z=2,20$, $p=0,028$; agudo: $Z= 2,02$, $p=0,043$; contínuo: $Z= 2,02$, $p=0,043$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Passada a sessão de treino, seguida de administração da cafeína ou placebo, chega-se a sessão de teste. Nesta sessão, que não houve a apresentação de reforço em nenhum contexto, é que se avaliou como a ingestão da cafeína modulou o desempenho da memória para os saguis.

Quando analisada a latência (figura 30), foi observado que os saguis que não ingeriram cafeína permaneceram com a latência reduzida para o contexto que havia o reforço (Wilcoxon, $Z= 1,99$, $p=0,046$). Já os saguis que ingeriram agudamente a cafeína, essa relação de latência teve uma tendência estatística (Wilcoxon, $Z= 1,83$, $p=0,063$), sugerindo que estes animais também tendem a distinguir o contexto, e diminuir a latência do ambiente que foi reforçado em relação ao não reforçado. De forma interessante, durante o teste os saguis do grupo contínuo tiveram um resultado oposto aos demais animais: eles tenderam a reduzir a latência para o contexto que não foi reforçado (Wilcoxon, $Z= 1,83$, $p=0,061$). Isto pode

indicar que os saguis de ingestão contínua da cafeína estão com falhas em lembrar qual contexto foi reforçado. Ademais, houve diferenças entre os grupos durante o teste (ANOVA Kruskal-Wallis, $F(2,13)= 6,67$, $p=0,035$), pois os animais do grupo agudo lembraram-se mais rapidamente qual contexto foi reforçado quando comparado aos do grupo contínuo (Mann-Whitney, $Z= -2,40$, $p=0,016$).

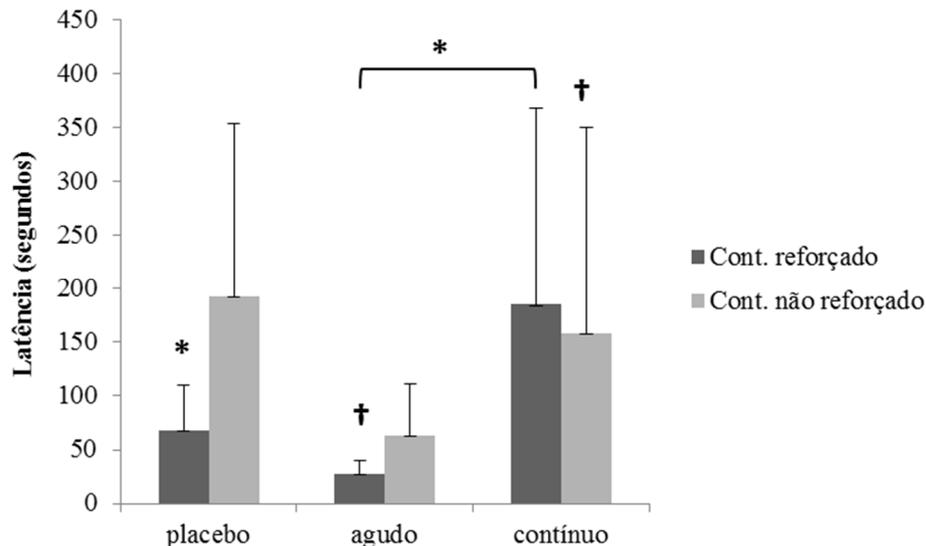


Figura 30: Efeito da cafeína na latência para contato com CR e CNR durante a sessão de teste. Nesta figura é possível observar que apenas o grupo que não ingeriu cafeína diminuiu significativamente a latência para o primeiro contato com o contexto reforçado (Wilcoxon, $*p<0,05$, $Z=1,99$, $p=0,046$). Para o grupo agudo tem-se uma tendência para tal significância (Wilcoxon, $Z=1,83$, $p=0,063$). Diferindo desses resultados, o grupo de ingestão contínua apresentou resultados opostos, com tendência ao primeiro contato com o contexto não reforçado (Wilcoxon, $Z=1,83$, $p=0,061$). Ademais se verificou diferenças entre os grupos, onde o grupo agudo entrou em contato mais rapidamente com CR se comparado ao grupo contínuo (Mann-Whitney, $*p<0,05$, $Z= -2,40$, $p=0,016$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Para a duração de contatos no teste (figura 31), encontramos que os grupos placebo e agudo lembraram-se do contexto que havia sido reforçado, pois permaneceram mais tempo em contato com este ambiente se comparado ao não reforçado (Wilcoxon, placebo: $Z= 1,99$, $p=0,046$; agudo: $Z= 1,97$; $p=0,048$). Para o grupo contínuo essa diferença na interação não foi encontrada. Além disso, foram verificadas diferenças entre os grupos para o CR (Kruskal-

Wallys, $F(2,13)= 6,06$, $p=0,048$). Ao averiguar onde essas diferenças residiam, foi constatado que os saguis dos grupos placebo e agudo interagiram mais com o contexto que havia sido reforçado quando comparados aos animais de ingestão contínua da cafeína (Mann-Whitney, placebo x contínuo: $Z=3,00$, $p=0,035$; agudo x contínuo: $Z= 1,98$, $p=0,047$). Ou seja, a cafeína ingerida continuamente está interferindo no processo de recuperação da memória.

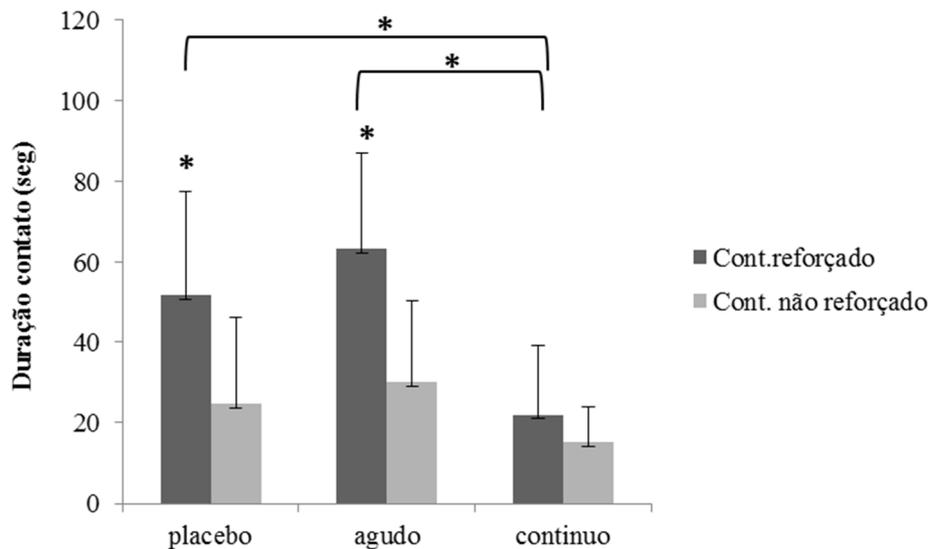


Figura 31: Efeito da cafeína na duração de contatos para CR e CNR durante as sessão de teste. Nesta figura é possível observar que apenas os grupos de ingestão aguda e placebo permaneceram mais em contato com o que contexto que foi reforçado (Wilcoxon, * $p<0,05$. placebo: $Z=1,99$, $p=0,046$; agudo: $Z=1,97$; $p=0,048$). Além disso, as análises entre os grupos demonstraram que estes dois grupos permaneceram mais tempo em contato com CR quando comparados ao grupo de ingestão contínua da cafeína (Mann-Whitney, * $p<0,05$. placebo x contínuo: $Z=3,00$, $p=0,035$; agudo x contínuo: $Z= 1,98$, $p=0,047$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

Por sua vez, nas observações realizadas pelos saguis durante o teste (figura 32), apenas o grupo de animais com ingestão aguda observou significativamente mais o contexto reforçado (Wilcoxon, $Z= 1,02$, $p=0,04$). Nos demais grupos apenas houve tendência a observar mais o CR em detrimento de CNR (Wilcoxon, placebo: $Z= 1,81$, $p=0,0645$ e grupo contínuo: $Z= 1,82$, $p=0,0679$).

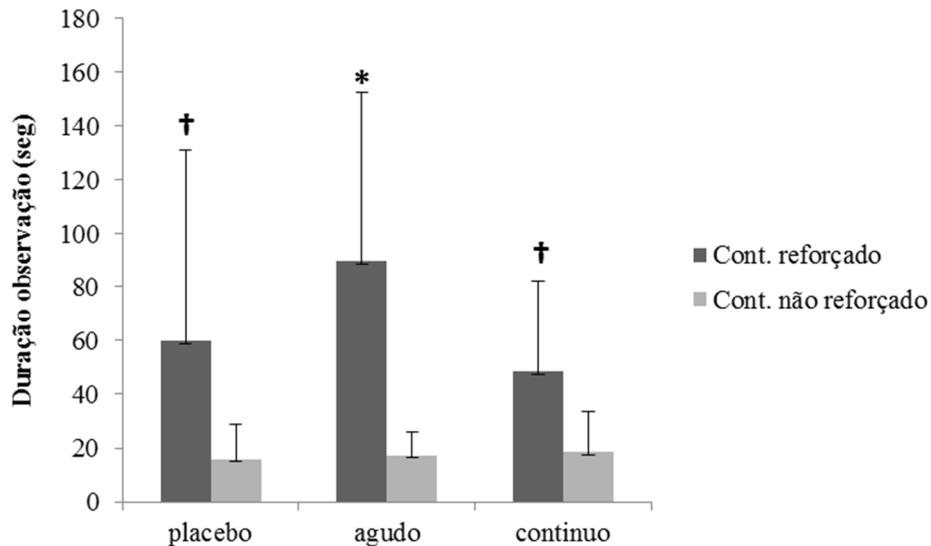


Figura 32: Efeito da cafeína na duração de observações para CR e CNR durante as sessão de teste. Nesta é possível verificar que apenas o grupo de ingestão aguda permaneceu mais tempo observando o contexto reforçado (Wilcoxon, $*p < 0,05$, $Z = 1,02$, $p = 0,04$). Os demais grupos houve apenas tendência estatística para significância (Wilcoxon, placebo: $Z = 1,81$, $p = 0,0645$ e grupo contínuo: $Z = 1,82$, $p = 0,0679$). Z: Teste de Postos com Sinais de Wilcoxon.

5 DISCUSSÃO

Métodos não invasivos para a experimentação animal vem se tornando uma alternativa eficaz para o estudo do comportamento e de suas variáveis fisiológicas. A utilização destes dispositivos não dolorosos agrega ética e bem estar à experimentação animal, e permite, dentro das condições laboratoriais, o sujeito exibir seu comportamento o mais natural possível. Além disso, também proporciona ao pesquisador dados mais consistentes e fidedignos, contribuindo para o avanço das pesquisas biomédicas envolvendo animais não humanos.

Por tal fato, é de bastante relevância para tais estudos biomédicos o emprego desta nova técnica para medição de atividade locomotora. Este sensor baseado em giroscópio foi totalmente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa e é perceptível que ele foi capaz de registrar atividade locomotora com mais detalhamento se comparado aos outros métodos não invasivos, como em nosso estudo, que utilizamos adicionalmente os sensores de infravermelho, que totalizam atividade a cada 5 minutos e não possuem capacidade de registro de atividade locomotora dentro da caixa-ninho. Essa característica conferida ao sensor baseado em giroscópio em ser mais fiel ao mínimo de vibração emitida pelo sagui facilita a identificação não apenas da atividade locomotora, como também do CVS como um todo, trazendo à luz da pesquisa mais indícios de como é o padrão deste ritmo biológico para os saguis em condições normais e de uso de substâncias psicoativas, como a cafeína. Além da acurácia nos dados, este sistema mostra-se como solução de baixo custo para este tipo de avaliação em experimentação, visto que os dispositivos comumente empregados para pesquisas que investigam o CVS são bastante caros e necessitam importação, fato este que demanda tempo para chegar até as instituições de ensino superior no Brasil.

Mas em se tratando dos dados registrados pelos sensores baseados em giroscópio, temos que as variáveis analisadas demonstram o que já esperávamos: serem mais precisas quanto à medição da atividade locomotora, inclusive para aquela atividade acontecida durante o escuro, corroborando para o sagui como um animal de hábitos diurnos, que, contudo possui microdespertares noturnos. Quando observamos esse comportamento do sagui na natureza, vemos que tal característica é importante, pois os microdespertares conferem vigilância e consequente maior chance de sobrevivência a este primata (Sri Kantha & Suzuki, 2006). Tendo em vista que o sagui habita árvores e outros locais não bem protegidos, então estes despertares noturnos permitem que eles consigam esquivar-se de eventuais predadores e fugir

para outros lugares, aumentando suas chances de sobrevivência e dos demais membros do grupo.

Ademais, como já discutido anteriormente, o emprego do uso de sensores baseados em giroscópio permitiu a observação destes despertares noturnos, sem que com isso fosse necessário o uso de técnicas invasivas que causem sofrimento, e que consecutivamente poderiam comprometer o repertório comportamental do sagui. Diversos trabalhos utilizam métodos invasivos para investigação do CVS de saguis, tais como aqueles que empregam a telemetria ou até o implante de eletrodos no cérebro destes pequenos primatas e, portanto conseguem registrar com grandes detalhes o desenrolar de ambas as fases de vigília e sono (Hoffmann et al., 2012). Outras tantas técnicas também existem para o registro do CVS de maneira não invasiva. Algumas incapazes de detalhar a fase de sono, como o registro por sensores de infravermelho, pois não consegue atravessar a caixa ninho e registrar o que se passa lá dentro (Gonçalves et al., 2009); e algumas outras que quando presas próximo ao animal conseguem o registro, mas pelo fato de o animal estar carregando este dispositivo, as vezes pode ser cansativo e doloroso ao animal (Melo et al., 2010). Por isso, o desenvolvimento e aplicação deste sensor baseado em giroscópio permitirá à experimentação animal uma adicional e eficaz vantagem para os pesquisadores do acompanhamento do CVS destes indivíduos de forma não invasiva.

Ainda para o sensor de giroscópio, este dispositivo colaborou também para que visualizássemos um indicativo para diferença (ANOVA, $p \leq 0,06$), que foi encontrada tanto para a média quanto o somatório da atividade locomotora realizada no escuro, para a primeira sessão de administração da cafeína do grupo contínuo. Esta tendência pode nos remeter que, de alguma forma, a cafeína ingerida próximo à fase de sono agiu diminuindo a quantidade de sono, e provocando assim esse aumento de atividade noturna quando comparada aos grupos placebo e de ingestão aguda. Como já sabido e discutido anteriormente na introdução, a

caféina é uma droga psicoestimulante, e, portanto tem efeito de modo a aumentar a vigilância, alerta, atividade locomotora entre outros comportamentos (Ribeiro & Sebastião, 2010; Urry & Landolt, 2014; Ardaís et al., 2014). Contudo, quando ingerida num momento próximo ao repouso, como foi nesse caso para o primeiro dia de ingestão da caféina, o efeito estimulante acarreta em piora na qualidade e quantidade de sono. E tal característica de piora em parâmetros que caracterizam o sono através da ingestão de caféina pode ser verificada em outros estudos realizados tanto em humanos quanto em modelos animais (Schwierin, 1996; Shinomiya et al., 2004; Drapeau et al., 2006; Paterson et al., 2007). Estes estudos demonstram que a ingestão de caféina próxima ao sono bloqueia os receptores para Adenosina do subtipo A1 e A2a, sendo estes uns dos responsáveis pela promoção do sono de ondas lentas.

Por fim, em relação à câmara que registrou o repouso de um dos saguis, temos que em 68,57% dos episódios desta fase os sensores de giroscópio foram capazes de detectar corretamente a movimentação noturna. Os 31,43% restantes em que não houve essa eficácia, provavelmente se deve a dois principais fatores: o primeiro deles deveu-se ao fato de por algum motivo o sensor estar desconectado da fonte de energia e/ou a saída dos dados, não permitindo a coleta dos dados. O segundo fator aconteceu em decorrência de algum sinal anômalo gerado por este sensor, o qual não correspondeu a aquilo que fora registrado pela câmara. Apesar de estes problemas terem ocorrido, não permitindo a total eficácia do dispositivo, acreditamos que ainda assim este seja um bom método para registro não invasivo da atividade locomotora noturna. E, com o aprimoramento decorrente do constante uso destes sensores baseado em giroscópio, com certeza esses índices de erros decairão, o que permitirá cada vez mais confiabilidade deste dispositivo para fins experimentais.

Já para os sensores de infravermelho, eles são dispositivos amplamente utilizados por diversos grupos de pesquisas, com a finalidade também de detecção não invasiva de atividade locomotora, e que é bem documentado e seu uso bem padronizado em vários artigos

científicos (Neto et al., 2008; Gonçalves et al., 2009; Albert et al., 2013). Para o nosso grupo de pesquisa em especial, utilizamos estes sensores para registro de atividade locomotora tanto em saguis quanto para ratos. Para os saguis em especial, estes sensores conseguem detectar muito bem a atividade locomotora durante a fase ativa. Por tal fato, este método já bem discutido e trabalhado nos serviu como método para verificação de atividade diurna.

Apesar de não ser possível o registro de atividade noturna para os sensores de infravermelho, não podemos desmerecer este dispositivo. Os dados obtidos pelos dois sensores se complementam (sendo o sensor de infravermelho melhor para detectar atividade diurna e o sensor baseado em giroscópio melhor para a atividade noturna), e nos permite avaliar com melhor clareza o ciclo de atividade-reposo dos saguis, e como os animais comportam-se quando estão sob efeito da cafeína.

Nos resultados acerca de como os sensores de infravermelho conseguiram detectar o efeito da cafeína na atividade locomotora, vimos que a maioria dos parâmetros utilizados não apresentaram diferenças estatísticas para os três grupos estudados – placebo, agudo e contínuo. Uma possível explicação seria o menor espaço e as condições ambientais utilizadas para a experimentação como fatores que estariam colaborando para uma atividade locomotora menos exacerbada para aqueles animais que ingeriram a cafeína.

Em experimentos no mestrado, onde os saguis foram mantidos em condições seminaturais e com gaiolas maiores das que utilizamos no experimento em voga, utilizamos basicamente o mesmo protocolo experimental de ingestão da cafeína próximo ao horário de sono. Neste trabalho foi demonstrado que existiram diferenças na atividade locomotora durante as sessões experimentais para os grupos que ingeriram ou não a cafeína (Santana, 2009). Aqueles que ingeriram a cafeína quer seja de forma contínua ou aguda apresentaram atividade locomotora acentuada durante a sessão experimental de teste quando confrontadas

com a atividade dos animais que ingeriram apenas a substância placebo. Demonstrando assim o efeito clássico da cafeína como agente psicoestimulante ao menos para os animais mantidos em condições seminaturais.

Quando analisamos como a ingestão de cafeína próximo ao sono atua nas medidas não paramétricas de nosso experimento, IV e IS, temos que estes também foram capazes de revelar significância estatística apenas intragrupo. Apesar disso, os dados encontrados nos fornecem mais indícios que corroboram para cafeína estar agindo nos grupos de modo a perturbar o sono.

Para a variabilidade intradiária – IV, onde valores altos indicam uma maior fragmentação do sono, vimos que estes valores elevados encontram-se justamente no momento de ingestão desta substância para os grupos de saguis experimentados. Já elucidamos aqui que o sagui possui um sono do tipo monofásico, com breves episódios de despertares que são comuns à espécie (Sri Kantha & Suzuki, 2006), que, contudo não abalam o padrão de sono de forma a fragmentar e interferir nessa fase do CVS. Entretanto, ao ingerirem cafeína próximo ao horário de repouso pode ser que esta tenha ação nos mecanismos que inibem a promoção do sono de ondas lentas, via inibição dos receptores para adenosina dos tipos A1 e A2A. Como já falamos na introdução, a adenosina é considerada o principal componente da regulação homeostática do sono (Mackiewicz et al., 2003; Basheer et al., 2004), e, tendo os receptores para adenosina bloqueados pela cafeína, teremos tanto piora da qualidade e quantidade de sono, fato este que já relatamos aqui é ocorrido em modelos animais e humanos. Então sugerimos que o nosso protocolo de administração da cafeína age de forma a fragmentar o ciclo de atividade/repouso para estes animais em questão, servindo à comunidade científica como um estudo a mais que corrobora para a ação da ingestão da cafeína próxima ao sono.

A estabilidade interdiária – IS, da mesma forma que o IV, também foi capaz de levantar a questão de que a cafeína está agindo de modo a provocar os efeitos psicoestimulantes esperados. Verificou-se que os saguis que ingeriram a cafeína, aguda ou continuamente, diminuíram a frequência de IS quando comparadas com as demais sessões que não havia uso da cafeína. E, quanto menores forem os valores para esta variável, mais claro será a observação de desajuste ou quebra do ajuste do animal em relação ao ciclo de 24h (Gonçalves et al. 2014). Ou seja, sugerimos que a cafeína além de fragmentar o sono, consecutivamente ela também faz com que o animal fique menos ajustado ao CVS. Essa relação era de se esperar, pois a fragmentação e pior qualidade do sono mexem e deturpam com uma série de mecanismos fisiológicos que garantem o bom funcionamento do indivíduo como um todo, fazendo com que este não responda satisfatoriamente às demandas impostas diariamente, sendo assim mais demorado o ajuste deste sujeito ao ciclo ambiental de 24h (Gonçalves et al. 2014).

Quando focamos a atenção para os dados comportamentais, importantes considerações devem ser feitas a partir dos resultados encontrados. A primeira delas é a de caracterizar tal tarefa cognitiva como sendo do tipo declarativa ou relacional, pois os saguis estão participando consciente e ativamente no aprendizado da tarefa, quer seja explorando os ambientes a fim de verificar qual deles contém o reforço, quer seja quando aprendida a tarefa estarem mais em contato com o objeto reforçado em relação ao não-reforçado. Essa particularidade de expressão do comportamento em ações e modos diferentes aos da aprendizagem original é o que caracteriza tal memória como declarativa (Eichenbaum, 1999; Morgado Bernal, 2005).

Quanto à discussão dos dados comportamentais, para as habituações os saguis não apresentaram preferência por qualquer um dos dois contextos, pois interagiram de maneira similar para as variáveis apresentadas nos resultados (contato, contato atrás do contexto,

observações e latência). Esses resultados reforçam a ideia 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 sessão de habituação.

Nos treinos demonstrou-se que os saguis se condicionam e aprendem a discriminar a tarefa de preferência condicionada pelo lugar. A aprendizagem foi exemplificada através da diminuição na latência, e o aumento da permanência e observações no contexto reforçado em relação ao não-reforçado. Os achados relatados nos treinos replicam os experimentos de Valentinuzzi et al. (2008) e Santana (2009), os quais utilizaram protocolos parecidos e que também tiveram como sujeitos o *Callithrix jacchus*.

Contudo, estes dois trabalhos citados foram realizados em ambiente seminatural, com os animais mantidos sob condições naturais de iluminação, umidade e temperatura, e em gaiolas individuais maiores que as utilizadas no trabalho vigente (220 cm comprimento x 90 cm largura x 220 cm altura). Diferindo destes, os experimentos conduzidos nesta tese foram realizados em condições controladas de iluminação, umidade e temperatura, e usando gaiolas menores. Apesar dessas diferenças, o componente de aprendizado e memória nos saguis parece que independe do ambiente que o animal está alocado, pois resultados semelhantes de aprendizado foram encontrados em situações de ambiente seminatural e de laboratório. Portanto, a aprendizagem tem papel fundamental em modelar o comportamento destes animais em função das experiências anteriormente vividas, deixando o mesmo mais eficiente e otimizado.

No retreino, não foram observadas diferenças quanto ao desempenho cognitivo da tarefa. Acreditamos que tais resultados entre os grupos experimentais tenham sido similares, 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.

Assim, de maneira inusitada, a cafeína modulou a evocação durante o teste. Para os animais que ingeriram cafeína de forma aguda, esta substância não modulou negativamente a memória dos saguis. O que aconteceu foi que o desempenho dos animais do grupo agudo nos testes não diferiu daqueles do grupo controle. Esse bom desempenho cognitivo do grupo que ingeriu cafeína agudamente corroboram com os achados de vários estudos, seja com humanos ou modelos animais (Griffiths & Woodson, 1988; Riedel & Jolles, 1996; Angelucci et al., 1999). Angelucci et al. em 2002, 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 prejudicaram 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.

Entretanto, apesar de no retreino o grupo que tomou cafeína continuamente ter resultado satisfatório para as variáveis comportamentais, talvez pela presença de comida no aparato experimental, o mesmo não aconteceu no teste. Ao realizarem o teste sem as pistas alimentares eles não foram capazes de responder à tarefa corretamente, provavelmente por não se lembrarem do ambiente reforçado nas sessões anteriores, e por isso não persistiram na

interação com o mesmo. E isso pode ser verificado através das três variáveis exibidas (contato com o contexto, observações e latência). Sugere-se que esse baixo rendimento na execução da tarefa deva-se a provável interferência que a cafeína esteja promovendo no sono e, por conseguinte, na memória. Como fora explicado, a ingestão da cafeína próxima ao sono deixa os indivíduos mais sensíveis aos seus efeitos, pois demoram mais tempo para metabolizá-la (Levy & Zylber-Katz, 1983). Além disso, a cafeína antagoniza os receptores para adenosina A1 e A2a, os quais são conhecidos na promoção do sono de ondas lentas (Acquas et al., 2002). E ao prejudicar o sono de ondas lentas dos saguis, possa ser que ela também prejudique o processo de consolidação para esta tarefa cognitiva que ocorre durante a fase de sono. Então, com essa consolidação prejudicada, provavelmente o reflexo disso é o mau desempenho dos animais durante o teste.

Outro fato que corrobora para especularmos que a cafeína tenha provocado piora na evocação da memória para os animais de ingestão contínua são os dados relativos ao IV e IS, onde estes apresentaram respectivamente, altos e baixos valores quando comparados ao grupo controle (figuras 22 e 23). Resultados tais como encontramos foram também registrados em idosos acometidos com Alzheimer (Swaab, Fliers & Partiman, 1985; Swaab & Hofman, 1994; Huang et al., 2002). Para estes pacientes, os altos valores de IV representaram aumento na fragmentação do ciclo Vigília-Sono, o que teve como consequência um sono menos eficiente (Brromundt et al., 2011), bem como acarretou na redução do desempenho cognitivo (Oosterman et al., 2009). Além disso, estes pacientes apresentaram baixos valores de IS, o qual demonstra frouxa sincronização ao ciclo claro-escuro de 24 h. Portanto, os nossos resultados levam a crer que estes parâmetros de atividade locomotora indicaram que os animais que ingerem cafeína têm maior fragmentação do sono e desajuste ao ciclo atividade-reposo. Assim, a soma destes dois fatores pode interferir nos processos mnemônicos dos saguis, ocasionando o mau desempenho na evocação da tarefa.

Através dos dados desta Tese, podemos também traçar uma íntima relação com o modelo proposto por Borbely em 1982, onde o sono é ativamente controlado e regulado pelos processos circadiano e homeostático. Baseando-se no modelo proposto por Gonçalves et al. (2014), o qual demonstrou o relacionamento do Sistema de Temporização Circadiana, ciclo de atividade-reposo e medidas não-paramétricas IV e IS em humanos, nós adaptamos este modelo e adequamos à realidade do nosso experimento. Nesta perspectiva, relacionamos o componente Circadiano à Estabilidade interdiária – IS, já que esta variável avalia sincronização do indivíduo ao ciclo claro-escuro, com forte influência no Sistema de Temporização Circadiano, com o núcleo supraquiasmático (NSQ) como principal estrutura. Por conseguinte, relacionamos o componente Homeostático à Variabilidade intradiária – IV, pois os resultados do componente homeostático refletem diretamente no quanto o IV pode indicar fragmentação do sono. Sem falar que o próprio IV pode atuar também modulando a resposta do NSQ, com direta ligação ao ciclo Vigiância-Sono.

A partir das relações estabelecidas entre IV e IS com o modelo de regulação do sono proposto por Borbely (1982), sugerimos como a cafeína ingerida continuamente esteja agindo em todos esses fenômenos (figura 33). No experimento em questão, a cafeína não estaria apenas modulando o componente homeostático, por meio do bloqueio dos receptores para adenosina, com posteriores efeitos no sono e memória. Nesse modelo, a cafeína também modularia o componente circadiano, pois os baixos valores de IS encontrados para os animais que ingeriram cafeína indicam que o sujeito não está bem sincronizado ao ciclo claro-escuro de 24h. A interferência no componente Circadiano tem consequência no desajuste no ciclo Vigiância-Sono, com efeitos na cognição, memória e eficiência do sono. Ademais, esta falha em sincronizar-se ao ciclo Vigiância-Sono prejudicaria o componente homeostático, com posterior influência no IV, o que traria como consequências um maior enfraquecimento do NSQ e de suas respostas.

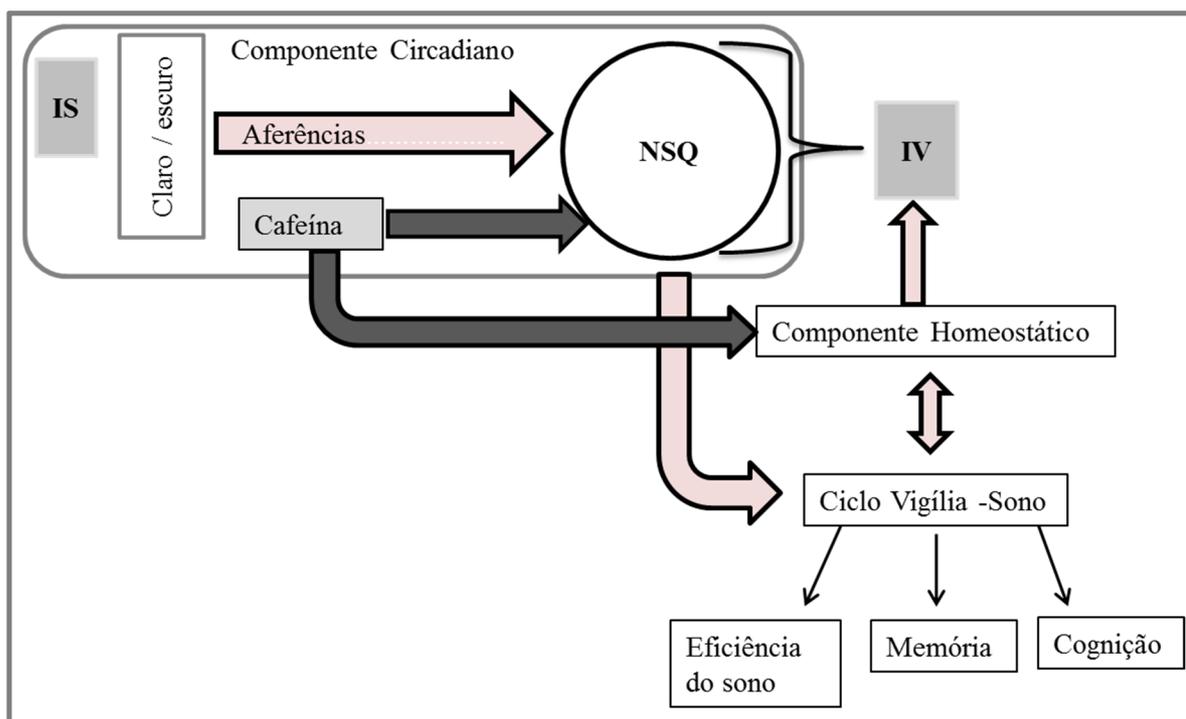


Figura 33: Relação entre o processo de regulação do sono proposto por Borbely (1982), com as variáveis não paramétricas IV e IS, e como todos estes modulam o sono, memória e cognição. Quando a cafeína é introduzida nesse modelo, percebe-se que ela modula tanto o componente homeostático como o circadiano, tendo como consequências prejuízos na eficiência do sono, memória e cognição.

Hipóteses alternativas aos achados encontrados, principalmente àqueles que relataram o déficit na recuperação da memória, podem ser explicadas também pelo efeito ansiogênico que a cafeína poderia provocar no momento do teste. Ao usar continuamente a cafeína durante a administração de substâncias, e no momento do teste não se fazer o uso, pode ser que os saguis tenham apresentado sintomas de abstinência. De acordo com a literatura, os sintomas de abstinência ocorrem cerca de 12 a 24 horas após o último consumo da cafeína (Ferré, 2008), e estes incluem falta de concentração, ansiedade, irritabilidade entre tantos outros sintomas (humanos: Juliano & Griffiths, 2004; animais: Nehlig, 2004). Então, tendo como base esses sintomas, pode-se adicionalmente especular que estes por si só e/ou associados com o efeito da piora na qualidade e quantidade de sono colaboraram para o pior desempenho

na recordação da memória durante o teste para aqueles animais que consumiram cafeína continuamente.

Portanto, a partir do que foi discutido nesta seção, chegamos a sugestões interessantes de como a cafeína pode ter interferido no sono e sistemas de memória desses pequenos primatas. Sugerimos que a cafeína esteja modulando a maquinaria responsável pelo processo de consolidação de memória, a qual é dependente do sono.

6 CONCLUSÕES

A administração da cafeína teve efeitos diferentes na evocação da tarefa para os saguis. O grupo de uso contínuo teve pior desempenho no teste em relação aos animais placebo e agudo. Ademais o grupo de animais que utilizou agudamente a substância teve resultados que não diferiram daqueles apresentados no grupo controle. Portanto, isto sugere que a cafeína agiu no sono e modulou a memória nos saguis, com melhor desempenho para aqueles que ingeriram apenas uma vez, e piores desempenhos na recordação da tarefa para os animais que tomaram continuamente a substância.

Os sensores baseado em giroscópio e o de infravermelho foram capazes de coletar corretamente os dados referentes à atividade locomotora tanto em condições normais ou de ingestão da cafeína. Sem dúvidas que o sensor baseado em giroscópio foi muito mais sensível na detecção de atividade noturna do que o sensor de infravermelho, pois aquele foi capaz de captar esta atividade, que geralmente corresponde aos despertares noturnos. E tal acontecimento é um ponto a mais que corrobora para esta característica da fase de sono em

saguís. Por isso o uso deste sensor necessita ser mais implementado em pesquisas biomédicas, com a finalidade de refinar e melhorar a acurácia deste.

Os sensores de infravermelho também foram de grande valia ao nosso experimento, pois a partir deles avaliamos a atividade locomotora diurna de forma coerente. Ademais conseguimos averiguar parâmetros que indicam se os saguís então bem ajustados ao ciclo de 24h, bem como se há fragmentação do sono ao decorrer das fases experimentais com o uso da cafeína próximo ao sono. Sem falar também que, dada a gama de estudos realizados utilizando-se os sensores de infravermelho, inclusive por nosso grupo, os dados oriundos deste dispositivo serviram para comparar e padronizar o novo dispositivo baseado em giroscópio.

A ingestão de cafeína quando administrada num período antecedente ao sono em saguís-comuns, provoca efeitos diferentes em cada um dos grupos experimentais estudados, em se tratando da atividade locomotora. Apesar de para algumas variáveis nós não termos encontrados diferenças entre os grupos, quando analisamos cada um deles individualmente – placebo, agudo e contínuo – essas diferenças existem. Como por exemplo, o grupo placebo apresenta-se praticamente homogêneo no decorrer das fases experimentais; o grupo agudo apresenta significância estatística geralmente quando ingerem agudamente a cafeína; e o grupo contínuo com dados estatisticamente significantes durante principalmente o primeiro dia de ingestão da cafeína, bem como para outros dias posteriores dessa administração. Tais fatos corroboram e demonstram que a cafeína está agindo de modo a provocar seus efeitos clássicos, como o aumento da atividade locomotora aqui averiguada.

Os saguís responderam satisfatoriamente à tarefa de condicionamento de lugar, seja em condições seminaturais de manutenção, ou mesmo em condições laboratoriais, que foi o caso de nosso estudo. 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.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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*, **27**, 182-193.

Albert, N., da Silva, C., Díez-Noguera, A., Cambras, T. 2013. Different adaptation of the motor activity rhythm to chronic phase shifts between adolescent and adult rats. *Behavioural Brain Research*, **252**, 347-355.

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.

Ardaís, A. P., Borges, M. F., Rocha, A. S., Sallaberry, C., Cunha, R. A., Porciúncula, L. O. 2014. Caffeine triggers behavioral and neurochemical alterations in adolescent rats. *Neuroscience*, **270**, 27-39.

Arnaud, M. J. 1987. The pharmacology of caffeine. In: Progress in Drug Research. (Org. por Sharma, S., Lien, E. J., Saxena, A. K.), Birkhauser Verlag AG. pp. 273-314.

Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., McCarley, R. W. 2004. Adenosine and sleep-wake regulation. *Progress in Neurobiology*, **73**, 379-396.

Bear, M. F., Paradiso, M. A., Connors, B. W. 2008. Neurociências – Desvendando o Sistema nervoso. 3 ed., Porto Alegre: Artmed.

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.
- Borbely, A. A.** 1982. A two-process model of sleep. *Human Neurobiology*; **1**, 195-204.
- 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.
- Castro C. S. S., Menezes A. L., Moreira L. F. S.** 2003. Locomotor activity rhythm in free-ranging common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Biological Rhythms Research*, **34**, 23-30
- 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.
- Cajochen, C., Chellappa, S., Schmidt, C.** 2010. What keeps us awake?-the role of clocks and hourglasses, light, and melatonin. *International review of Neurobiology*, **9**, 57–90.
- 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.
- Cross, N. & Rogers L. J.** 2004. Diurnal cycle in salivary cortisol levels in common marmoset. *Developmental Psychobiology*, **45**, 3, 134-139
- 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.
- Eichenbaum,H.** 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioural Brain Research*, **103**, 123-133.
- Erkert, H. G.** 1989. Characteristics of the circadian activity rhythm in common marmosets (*Callithrix j. jacchus*). *American Journal of Primatology*, **17**, 271-286.
- 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.
- Gonçalves, B. S. B., Adamowicz, T., Louzada, F. M., Moreno, C. R. C., Araujo, J. F.** 2014. A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. *Sleep Medicine Reviews*, (in press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2014.06.002>
- Gonçalves, F., Belísio, A. S., Azevedo, C. V. M.** 2009. Effects of nest box availability on the circadian rhythm of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Folia Primatologica*, **80**, 175-188.
- Griffiths, R. R. & Woodson, P. P.** 1988. Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **29**, 419-427.
- Harrison, Y. & Horne, J. A.** 2000. The impact of sleep deprivation on decision making: A review. *Journal of Experimental Psychology: Applied*, **6**, 236-249.
- Hoffmann, K., Coolen, A., Schlumbohm, C., Meerlo, P., Fuchs, E.** 2012. Remote long-term registrations of sleep-wake rhythms, core body temperature and activity in marmoset monkeys. *Behavioral Brain Research*, **235**, 123-133.
- Hoshino, K.** 2008. Aspectos Filogenéticos do Sono. In: *Medicina e Biologia do Sono* (Org. por Tufik, S.). pp.1-6. Barueri, SP: Manole.
- Huang, Y. L., Liu, R. Y., Wang, Q. S., Van Someren, E. J., Xu, H., Zhou, J. N.** 2002. Age-associated difference in circadian sleep-wake and rest-activity rhythms. *Physiology & Behavior*, **76**, 597-603.
- Juliano L. M. & Griffiths R. R.** 2004. A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology*, **176**, 1-29.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M.** 2003. *Princípios da neurociência*. Barueri: Manole.
- Kleitman, N.** 1987. Introduction: definition of terms. In: *Sleep and Wakefulness*. Pp-3-7. Chicago: *The University of Chicago Press*.
- Landolt, H. P.** 2008. Sleep homeostasis: A role for adenosine in humans? *Biochemical Pharmacology*, **75**, 11, 2070-2079.
- Levy, M. & Zyber-Katz, E.** 1983. Caffeine metabolism and coffee-attributed sleep disturbances. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **33**, 770-775.
- 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.
- McGaugh, J. L.** 2000. Memory—a century of consolidation. *Science*, **287**, 248-251.

- Melo, P. R., Belísio, A. S., Menezes, A. A. L., Azevedo, C. V. M.** 2010. Influence of seasonality on circadian motor activity rhythm in common marmosets during puberty. *Chronobiology International*, **27**, 1420-1437.
- 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 of Medical and Biological Research*. **26**, 741-745.
- Menezes, A. A. L., Moreira, L. F. S., Menna-Barreto, L. S.** 1998. Annual Variation in an Ultradian Component in the Locomotor Activity Rhythm of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *Biological Rhythm Research*, **29**, 5, 556-562.
- Morgado Bernal, I.** 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *CIC Cuadernos de Información y Comunicación*, **10**, 1135-1148.
- Muggleton N. G., Smith A.J., Scott E. A., Wilson S. J., Pearce P. C.** 2005. A long-term study of the effects of diazinon on sleep, the electrocorticogram and cognitive behaviour in common marmosets. *Journal of Psychopharmacology*, **19**, 455–66.
- Nehlig, A.** 2004. Coffee, Tea, Chocolate, and Brain. In: Dependence upon coffee and caffeine: An update. (Org. Nehlig, A.). Londres: *CRC Press*. pp. 133-146.
- Neto, S. P., Carneiro, B. T., Valentinuzzi, V. S., Araújo, J. F.** 2008. Dissociation of the circadian rhythm of locomotor activity in a 22 h light-dark cycle impairs passive avoidance but not object recognition memory in rats. *Physiology Behavior*, **94**, 3, p.523-527.
- Oosterman, J.M., van Someren, E.J., Vogels, R. L., Van Harten, B., Scherder, E. J.** 2009. Fragmentation of the rest-activity rhythm correlates with age-related cognitive deficits. *Journal of Sleep Research*, **18**, 129-135.
- 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.
- Philippens, I. H., Kersten C. J., Vanwersc, R. A., Strijkstra A. M.** 2004. Sleep and sleep EEG spectra in marmoset monkeys. *Sleep-Wake Research Netherlands*, **15**, 49-51.
- Pinto Jr, L. R., & Andersen M. L.** 2012. O sono normal. In: Sono e seus transtornos – Do diagnóstico ao tratamento (Org. por Pinto Jr, L. R). São Paulo: *Atheneu*. pp. 1-14.
- 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.
- Rasch, B. & Born, J.** 2013. About Sleep's Role in Memory. *Physiological Reviews*, **93**, 681-766.

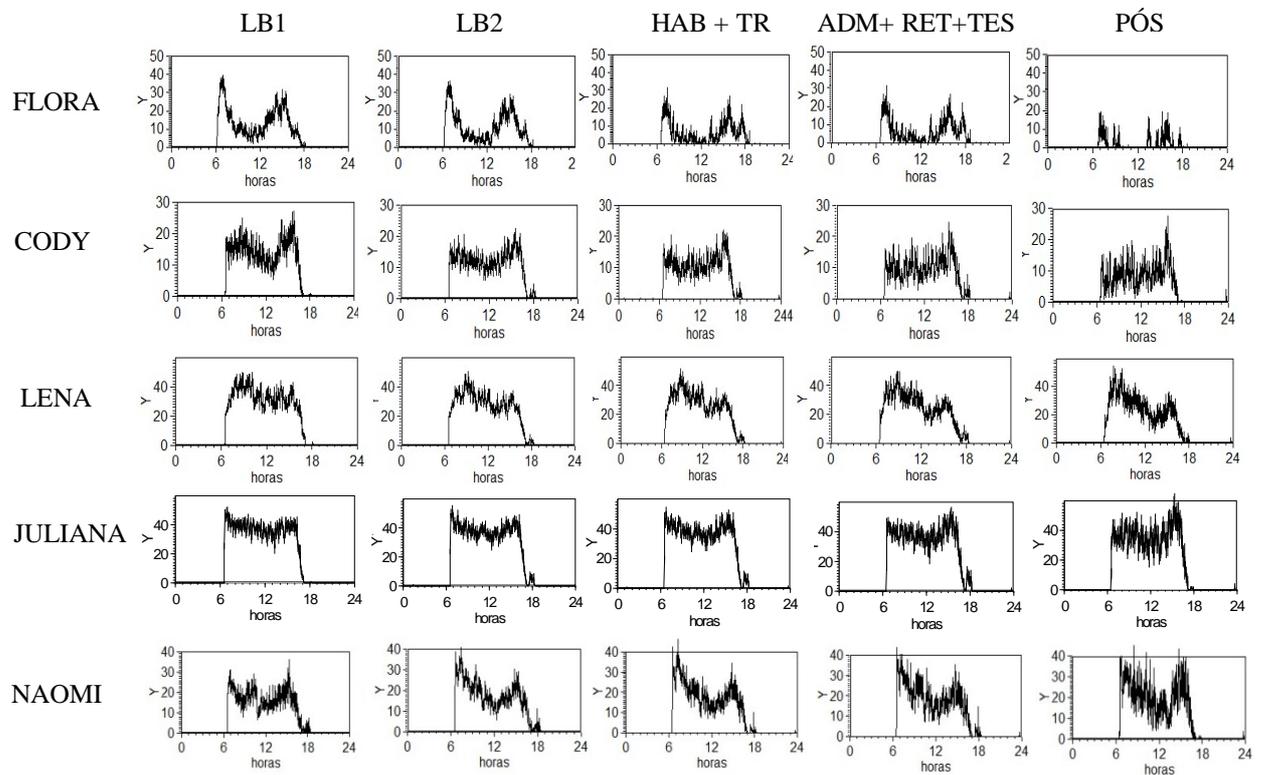
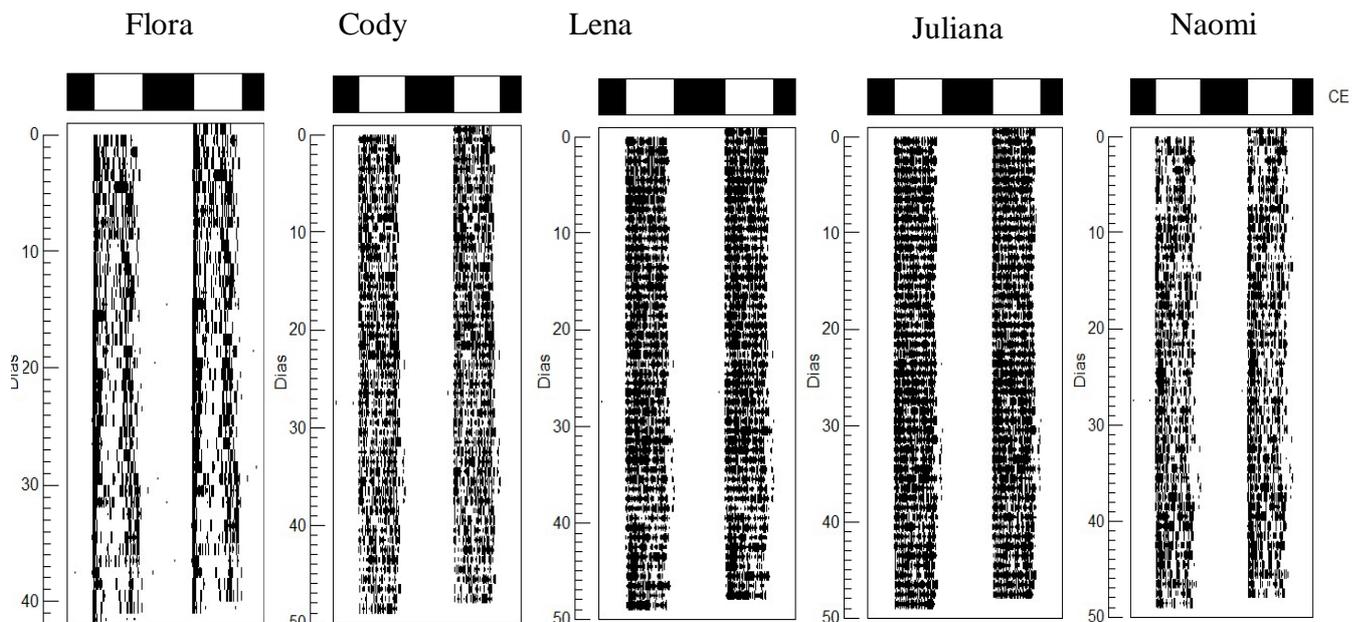
- Ralph, M. R., Ko, C. H., Antoniadis, E. A., Seco, P., Irani, F., Presta, C., McDonald, R.** 2002. The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behavioural Brain Research*, **136**, 179-184.
- Riedel, W. J. & Jolles.** 1996. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. *Drugs and Aging*, **8**, 245-274.
- 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.
- 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.
- Scoville, W. B., Milner, B.** 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **20**, 11-21
- Sebastiao, A. M. & Ribeiro, J. A.** 2009 Adenosine receptors and the central nervous system. In: Handbook of Experimental Pharmacology. (Org. por Wilson, C. N., Mustafa, S. J.). Berlin: Springer, pp; 471-534.
- 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.
- Siegel, J. M.** 2005. Clues to the functions of the mammalian sleep. *Nature*, **27**, 437, 1264-1271.
- Silva, M. M. A., Albuquerque, A. M., Araujo J .F.** 2005. Light-dark cycle synchronization of circadian rhythm in blind primates. *Journal of Circadian Rhythms*, **3**, 10, 1-5.
- Snel J., Lorist M. M.** 2011. Effects of caffeine on sleep and cognition. *Progress in Brain Research*, **190**, 105-117.
- Squire, L. R.** 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, **82**, 3, 171-177.
- Squire, L. R.** 2009. Memory and brain systems: 1969-2009. *The journal of Neuroscience*, **29**, 41, 12711-12716.
- 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.
- Sri Kantha, S., Suzuki, J.** 2006. Sleep quantitation in common marmoset, cotton top tamarin and squirrel monkey by non-invasive actigraphy. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **144**, 203-210.
- 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.

- Swaab, D. F., Fliers, E., Partiman, T. S.** 1985. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Research*, **342**, 37-44.
- Swaab, D. F., Hofman, M. A.** 1994. Age, sex and light: variability in the human suprachiasmatic nucleus in relation to its functions. *Progress in Brain Research*, **100**, 261-265.
- Tulving, E.** 1983. Elements of episodic memory. New York: *Clarendon*.
- Tulving, E.** 1995. Introduction. In: The cognitive neuroscience (Org. por Gazzaniga, M.). Massachusetts: *Massachusetts Institute of Technology*. pp.751-753.
- Urry, E. & Landolt, H. P.** 2014. Adenosine, Caffeine, and Performance: From Cognitive Neuroscience of Sleep to Sleep Pharmacogenetics. In: Current Topics in Behavioral Neurosciences. Alemanha: *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- 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 Vliet, S. A. M., Jongsma, M. J., Vanwersch, R. A. P., Olivier, B., Philippens, I. H.** 2008. Efficacy of caffeine and modafinil in counteracting sleep deprivation in the marmoset monkey. *Psychopharmacology*, **197**, 59-66.

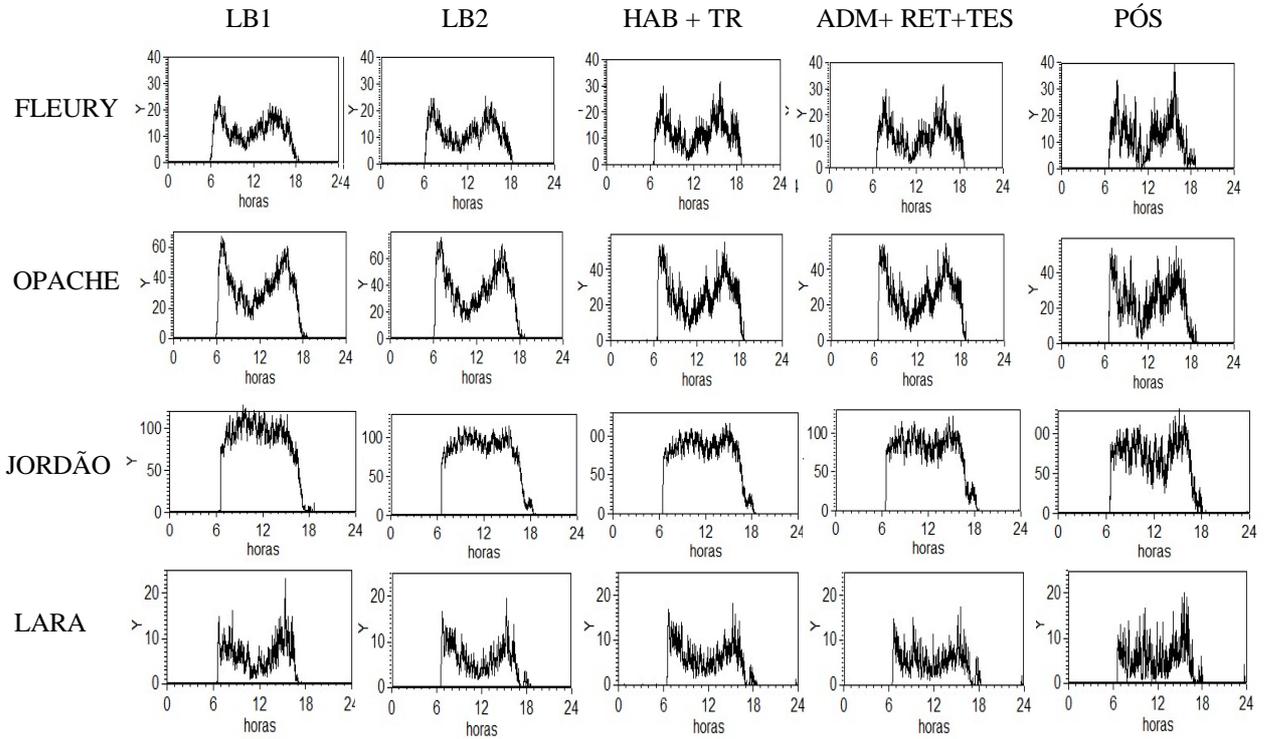
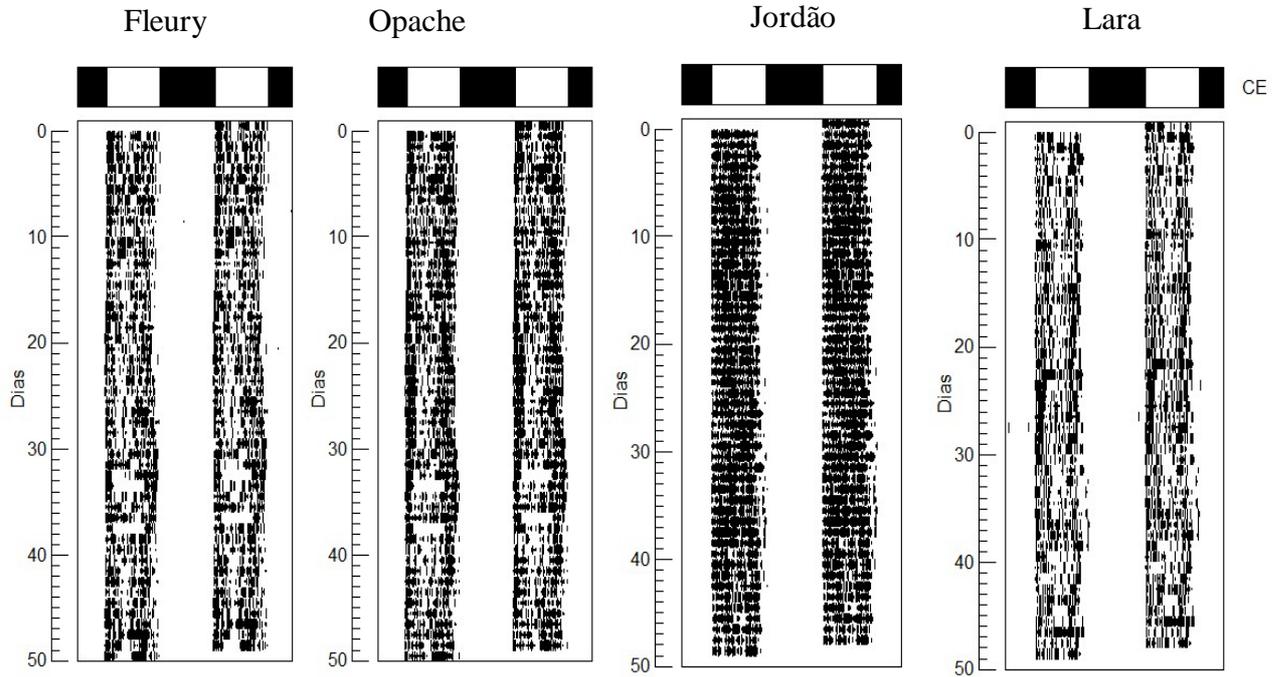
8 ANEXOS

I. Actogramas e gráficos em forma de onda: sensor infravermelho

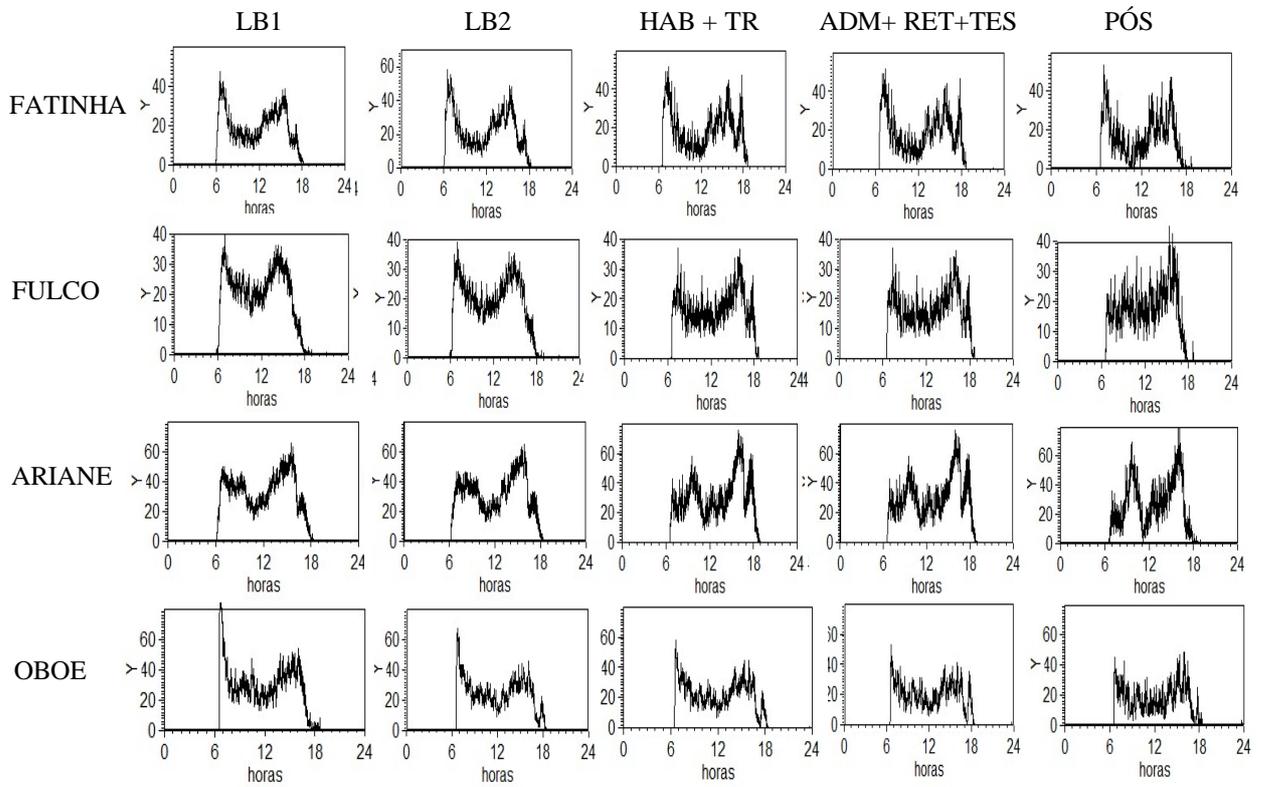
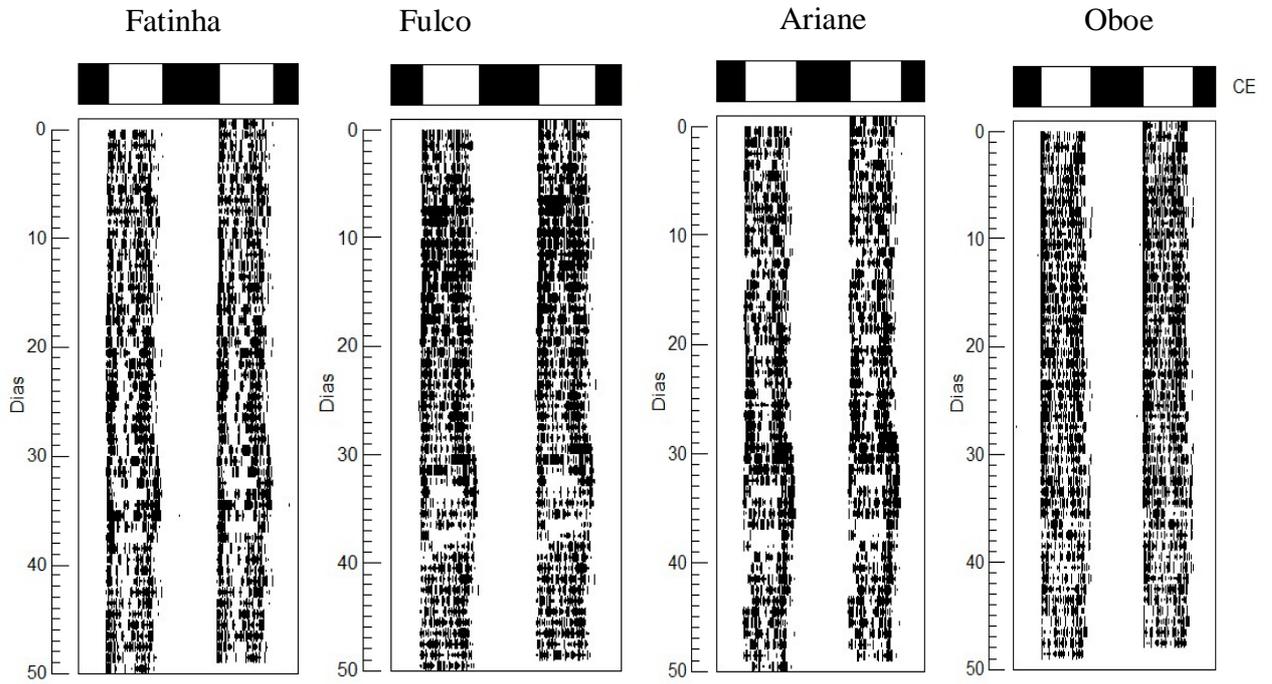
Grupo Placebo



Grupo Agudo



Grupo Contínuo



II. Capítulo de livro

Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Functional Organization of Circadian Timing System of a Diurnal Primate (Marmoset)	
Copyright Year	2014	
Copyright Holder	Springer International Publishing Switzerland	
Author	Family Name	Silva
	Particle	da
	Given Name	Christiane Andressa
	Suffix	
	Division	Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências
	Organization	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
	Address	Natal, RN, 59078-970, Brazil
Author	Family Name	Carijo
	Particle	
	Given Name	Carolina
	Suffix	
	Division	Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências
	Organization	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
	Address	Natal, RN, 59078-970, Brazil
Author	Family Name	Santana
	Particle	
	Given Name	Kathiane
	Suffix	
	Division	Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências
	Organization	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
	Address	Natal, RN, 59078-970, Brazil
Corresponding Author	Family Name	Araujo
	Particle	
	Given Name	John Fontenele
	Suffix	
	Division	Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências

Chapter 6

Functional Organization of Circadian Timing System of a Diurnal Primate (Marmoset)

Christiane Andressa da Silva, Carolina Carrijo, Kathiane Santana, and John Fontenele Araujo

Abstract Today it is recognized that changes in circadian rhythmicity can cause cardiovascular disorders, digestive disorders, and endocrine disorders, as well as psychiatric disorders. Such evidence of the relevance of circadian rhythmicity and the changes of this rhythmicity to human health is generally derived from temporal challenges that the human organism faces in today's society. Thus, knowledge of functional mechanisms of circadian rhythmicity regulation is important so we can clinically intervene in the intrinsic disorders of circadian rhythmicity as well as for its application in medicine, both for diagnosis and at the therapeutic level. The most studied animal models are the rodents, which have nocturnal habits and polyphasic sleep, indicating the need for an animal model that is diurnal and presents monophasic sleep, more similar to humans, such as the marmoset, *Callithrix jacchus*. In this chapter we describe in detail the recent experimental findings produced in our laboratory and reported in the scientific literature, which allow us to propose the marmoset as a potential model for the study of circadian rhythmicity.

6.1 Introduction

The expression of circadian rhythmicity has been demonstrated in all living beings, including prokaryotes and beings that live in environments with no light and dark variation, as in caves. This observation suggests that the expression of rhythmicity was an adaptation because it allows anticipation of recurring environmental events.

The ubiquity of circadian rhythmicity clearly shows that it is a phenomenon relevant to living beings, including humans. We know that the expression of circadian rhythmicity occurs from the cellular level to the behavioral and social levels. In past years molecular mechanisms involved in the control of circadian rhythms have been discovered, including genes and proteins that are essential for generation of this

C.A. da Silva • C. Carrijo • K. Santana • J.F. Araujo (✉)
Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil
e-mail: araujo@cb.ufrn.br

