



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal



Efeito do estresse psicossocial sobre o comportamento alimentar de primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*)

Renata Bezerra Duarte

Brasília
2016

Renata Bezerra Duarte

Efeito do estresse psicossocial sobre o comportamento alimentar de primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*)

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento Animal

Orientadora: Profa. Dra. Marília Barros
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Tomaz

Brasília

2016

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

A Tese:

Efeito do estresse psicossocial sobre o comportamento alimentar de primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*)

Elaborada por: Renata Bezerra Duarte

E aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Animal e homologada pelos membros da banca, como requisito à obtenção do título:

Doutor em Biologia Animal

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Marília Barros (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Valdir Filgueiras Pessoa
Instituto Brasileiro de Neuropsicologia e Ciências Cognitivas

Prof. Dr. Jorge Luis Lopes Zeredo
Universidade de Brasília

Profª Drª Márcia Renata Mortari
Universidade de Brasília

Profª Drª Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Joaquim Pereira Brasil Neto (Suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha mãe Lúcia e a minha pequena

Dafne...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a minha orientadora, a Profa Dra Marilia Barros, por todos os ensinamentos e auxílio constante em todas as fases deste trabalho. Sem dúvidas, meu maior exemplo profissional. Obrigada pela confiança, paciência e dedicação diária.

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Carlos Tomaz, pelas sugestões e críticas sempre construtivas e inteligentes, que contribuíram de forma ímpar para execução de cada etapa experimental.

Ao grupo da Itália: Prof. Dr. Stefano Puglisi-Allegra, Profa. Dra. Antonella Gasbarri, Dr. Enrico Patrono e a Profa. Dra. Rossella Ventura, pelas ideias iniciais do projeto e pelas importantes contribuições e parceria com o nosso grupo de pesquisa.

A todos os estagiários que contribuíram de alguma forma, em diferentes etapas de execução deste trabalho: Augusto Jesus, José Reinaldo Costa, Gabriela Cabral, Stéphanie Mitri, Priscilla Bomfim, Ana Paula Borges, Luma Nogueira, Fernando Magela, Isabela Oliveira, Jordan Soares, Mateus Silva; e em especial à Fernanda Silveira pelo eterno “bom humor”; e à Antônia Arlina César pelo carinho e amizade.

Aos meus parceiros de laboratório, especialmente à Aline Borges e Jonathan Melamed pelas discussões científicas, pelo apoio acadêmico e pelo compartilhamento das broncas e puxões de orelha ao longo dessa jornada. E ao Lucas Pereira pelo carinho e humildade contagiante.

Ao Prof. Dr. Rafael Souto Maior por ter me incentivado a ingressar nessa área. Obrigada pela amizade e boas conversas.

À Profa. Dra Maria Clotilde Henriques Tavares pela convivência harmoniosa ao longo desses anos e por todo ensinamento concedido.

A todos do Laboratório de Neurociências e Comportamento: Natália Gonczarowska, Soraya Lage, Corina Satler, Danilo Teixeira; e em especial às minhas queridas parceiras Rosângela Rodrigues, Patrícia Saletti e Ana Gárcia. Obrigada pelo apoio, pelas conversas e boas risadas ao longo desses anos. Agradeço também com carinho ao Eduardo Gutierrez.

A toda a equipe do Centro de Primatologia UnB: aos veterinários Cecília Dias e Raimundo de Oliveira; aos tratadores Geinaldo da Silva e Almir de Araújo; e à Marili Pascoal. Obrigada por todo suporte nas coletas de dados e bons momentos de descontração.

Aos meus sujeitos experimentais: Pamonha, Perneta, Bijin, Biagio, Sertanejo, Gontijo, Biara, Miro, Valina, Amiga, Feinha, Mimico, Rubi, Bijite, Grecin, Miuxa, Birrento, Valente, Quartz, Lady, Lua, Gora, Miuka, Novata, Novela, Bijano, Bijuli, Noviça, Gordon, Chivas, Gorinda, Gondão, Miguel, Greguel, Janjão, Grelina, Cigano, Grega, Amora, Zorra, Supimpa, Grenal, Gonero e em especial ao Hércules, Amindoim e Bijusta. Meu mais sincero obrigada com muito amor, ética e respeito.

À profa Dra Angélica Amato e à profa Dra Tereza Helena da Costa pelas importantes contribuições no projeto de qualificação.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, em especial à profa. Dra. Carolina Madeira Lucci e às (ex) secretárias Daniele Lara, Ana Paula e Kelly.

Ao senhor Alexis Souto Maior pela confecção dos aparatos experimentais e por toda paciência.

A minha mãe, Lúcia Bezerra Varela, minha maior fonte de inspiração. Obrigada por me ensinar a levantar a cabeça e seguir em frente diante das dificuldades.

A minha irmã, Raissa Bezerra Duarte, que me apoia e me envia sempre as melhores vibrações fraternais. Obrigada por todo companheirismo.

A minha tia querida Salete Varela, meu porto seguro. Obrigada por caminhar ao meu lado e me apoiar em todos os momentos.

Ao Ludovico Migliolo por ter caminhado ao meu lado por uma longa jornada de 10 anos, me apoiando, sendo meu alicerce e meu guia. Obrigada por tudo, sem você nada disso seria possível. Não se derrubam castelos, constroem-se outros.

A minha pequena e amada Dafne Duarte Migliolo, meu anjo da guarda e minha parceira, sem o seu amor de quatro patas nada disso seria possível.

Ao meu pai Mauro Bezerra Duarte (*in memoriam*), pela presença espiritual constante. Que eu consiga ser sempre um motivo de orgulho.

A minha avó materna, Maria Bezerra Varela (*in memoriam*) por está comigo em todos os momentos. Eterna saudade...

A minha tia Lourdes Varela e ao meu tio Gilberto Lira por todo investimento e incentivo.

Ao meu colega Ricardo Eccard da Silva, da ANVISA, pela ajuda em uma das coletas e na troca de informações sobre chocolate.

A minha amiga Fernanda Paulini pela ajuda na fase final de escrita da tese, pelos anos de convivência na representação discente e principalmente pela amizade e momentos divertidos.

Aos meus amigos de Brasília pelo suporte emocional, incentivo e amizade em todos os momentos.

À equipe de fisioterapia por cuidar do meu físico durante as coletas de dados possibilitando a captura dos animais mesmo nos momentos de dificuldade.

À Universidade de Brasília, ao Departamento de Ciências Fisiológicas e ao Laboratório de Neurociências e Comportamento pelo espaço físico.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Sabin pelas análises de sangue.

Por fim, a todos meus guias espirituais! E que assim seja...

*“...Não quero chá
Não quero café
Não quero coca-cola
Me liquei no chocolate
Eu me liquei!
Só quero chocolate
Não adianta vir com guaraná
Prá mim é chocolate
O que eu quero beber...”*

Chocolate! Chocolate! Chocolate!

-O Senhor aceita um cafezinho?

-Não! Eu quero chocolate!”

Tim Maia

“Seja qual for o final, faça ser algo ideal...”

Scalene

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais do comportamento alimentar	1
1.2 Aspectos neurobiológicos do controle do comportamento alimentar	2
1.3 Alterações patológicas do comportamento alimentar	6
1.3.1 Dependência por alimentos (<i>Food addiction</i>)	7
1.3.2 Compulsão Alimentar (<i>Binge-eating disorder</i>)	11
1.4 Influência do Estresse no Comportamento Alimentar	13
1.5 Modelos animais	15
1.5.1 Procedimentos pré-clínicos para estudo da dependência	15
1.5.2 Procedimentos para avaliação experimental do estresse	19
1.6 Primatas não-humanos como modelos animais no estudo da dependência	20
1.6.1 A espécie <i>Callithrix penicillata</i>	21
2.0 RELEVÂNCIA E ORIGINALIDADE	23
3.0 HIPÓTESES	24
4.0 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo geral	25
4.2 Objetivos específicos	25
5.0 MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Aspectos éticos	26
5.2 Sujeitos e condições gerais de alojamento	26
5.3 Procedimento experimental	26
6.0 ESTUDO 1: TESTE DE ISOLAMENTO SOCIAL INVOLUNTÁRIO (ISI)	27
6.1 Sujeitos experimentais	27
6.2 Procedimento experimental	27
6.2.1 Linha de Base	29
6.2.2 Teste de Isolamento Social Involuntário	29
6.3 Análise do Comportamento	29
6.4 Coleta de Sangue e Análise Hormonal	30
6.5. Análise estatística	31
6.6 Resultados	32
6.7 Discussão	34
6.8 Conclusões preliminares	39
7.0 ESTUDO 2: TESTE DE PREFERÊNCIA-POR-LUGAR CONDICIONADA (CPP) À PRESENÇA DE CHOCOLATE	39
7.1 Estudo 2A	40

7.1.1	Sujeitos experimentais	40
7.1.2	Aparato experimental: caixa de preferência-condicionada-por-lugar	40
7.1.3	Alimento teste	41
7.1.4	Procedimento experimental.....	42
7.1.5	Análise do Comportamento.....	44
7.1.6	Análise estatística	44
7.1.7	Resultados	45
7.1.8	Discussão	47
7.1.9	Conclusões preliminares	50
7.2	Estudo 2B	50
7.2.1	Sujeitos experimentais	50
7.2.2	Aparato experimental: caixa de preferência-condicionada-por-lugar	51
7.2.3	Alimentos teste	52
7.2.4	Procedimento experimental.....	52
7.2.5	Análise do Comportamento.....	56
7.2.6	Coleta de Sangue e Análise Hormonal.....	57
7.2.7	Análise estatística	57
7.2.8	Resultados	58
7.2.9	Discussão	62
7.2.10	Conclusões preliminares	66
8.0	ESTUDO 3: TESTE DE CONFLITO CHOCOLATE vs PREDADOR.....	67
8.1	Sujeitos experimentais	67
8.2	Alimento teste	67
8.3	Procedimento experimental.....	67
8.3.1	Habituação.....	69
8.3.2	Exposição ao chocolate	69
8.3.3	Teste de Conflito.....	69
8.4	Análise do Comportamento	70
8.5	Análise Estatística.....	71
8.6	Resultados	71
8.7	Discussão	75
8.8	Conclusões preliminares	79
9.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
10.	REFERÊNCIAS.....	83
11.0	ANEXO I – Declaração de aprovação do Comitê de Ética Animal.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do controle do comportamento alimentar por múltiplos mecanismos neurobiológicos.	2
Figura 2. Cacaueiro (<i>Theobroma cacao</i>)..	11
Figura 3. Indivíduo da espécie <i>Callithrix penicillata</i> (mico-estrela) mantido em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília.....	23
Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 1.	28
Figura 5. Média dos parâmetros comportamentais registrados durante observação na sessão de linha de base, no primeiro e no último dia de ISI e no primeiro e no último dia após re-encontro com o parceiro social.	33
Figura 6. Concentração de cortisol sérico observada 30 min após o início do isolamento social involuntário, no último dia do isolamento e sete dias após o re-encontro com o parceiro social.	34
Figura 7. Fotografia da caixa de CPP – Vista frontal.	41
Figura 8. Fotografia da caixa de CPP evidenciando os dois compartimentos distintos, as portas de acesso lateral e os suportes alimentares.	41
Figura 9. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 2A.	42
Figura 10. Média do número de entradas, tempo de permanência dentro e/ou em contato com o compartimento condicionado da caixa de CPP, assim como a mediana para latência até a primeira entrada.	47
Figura 11. Fotografia da caixa de CPP evidenciando a divisão do aparato em dois compartimentos distintos, separados por uma parede de alumínio retrátil.....	52
Figura 12. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 2B.	54
Figura 13. Vista superior da caixa de CPP evidenciando o acesso de um sujeito aos dois compartimentos laterais, possibilitado pela abertura da porta-retrátil.	55
Figura 14. Tempo de permanência pelos micos nos compartimentos pareados ao chocolate e ração, relação entre o tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste e tempo de forrageio durante condicionamento e relação entre o tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste e o tempo de vigilância na caixa de CPP durante a sessão teste.	60
Figura 15. Quantidade média de alimento consumido, frequência e a duração média de forrageio por sessão, durante a fase de condicionamento.....	61

Figura 16. Concentração de cortisol observada nos micos na linha de base, imediatamente após o isolamento social e sete dias depois da sessão teste .	62
Figura 17. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 3.	69
Figura 18. Localização do estímulo aversivo e do estímulo apetitivo no mesmo compartimento da caixa de CPP.	70
Figura 19. Média do tempo de permanência na área CC1 da caixa de CPP durante a primeira e a sexta sessão de exposição ao chocolate.	72
Figura 20. Média do perfil de forrageio registrado na primeira e sexta sessão de exposição ao chocolate e na sessão teste e consumo de chocolate.	73
Figura 21. Média do tempo de permanência no compartimento com chocolate e no compartimento sem chocolate durante a primeira e a sexta sessão de exposição ao alimento teste e na sessão teste.	74
Figura 22. Média dos parâmetros comportamentais registrados durante a sessão teste. Comportamentos de medo e Comportamentos de observação.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Similaridades comportamentais entre a dependência por substâncias de abuso e a compulsão alimentar.	12
Tabela 2. Resposta comportamental de micos do grupo controle e chocolate após habituação na caixa de CPP.	45
Tabela 3. Resposta de cada grupo experimental no compartimento condicionado da caixa de CPP durante a primeira e a última sessão de condicionamento.	46
Tabela 4. Perfil comportamental de micos observado na caixa de CPP na primeira e na última sessão de habituação e no dia da sessão teste realizada após o condicionamento ao alimento.	58
Tabela 5. Consumo de alimento e perfil de forrageio de cada item testado na primeira e última sessão de condicionamento.....	59
Tabela 6. Perfil comportamental dos micos dos grupos controle e isolado na caixa de CPP durante a primeira e sexta sessões de exposição ao chocolate e no dia da sessão teste.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH:	hormônio adrenocorticotrófico
AgRP:	proteína relacionada ao agouti
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP:	área <i>postrema</i>
ARC:	núcleo arqueado do hipotálamo
CART:	transcrito regulado por cocaína/anfetamina
CC:	compartimento chocolate
CCK:	colecistoquinina
CEUA:	Comissão de Ética no Uso Animal
CONCEA:	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP/UnB:	Centro de Primatologia da Universidade de Brasília
CPP:	<i>conditioned-place-preference</i> (preferência condicionada por lugar)
CRF:	fator de liberação de corticotropina
CTRL:	controle
DA:	dopamina
DSM-V:	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
HPA:	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IAF:	isolamento ambiente familiar
IAN:	isolamento ambiente novo
IBAMA:	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ISI:	isolamento social involuntário
ISO:	grupo isolado
LB:	linha de base
LEPb:	receptor de leptina
MC4:	receptor do tipo 4 para melanocortina
MPCT:	<i>marmoset predator confrontation test</i> (teste confronto com predador)
NPY:	neuropeptídeo Y
NST:	núcleo do trato solitário
POMC:	pró-ópio-melanocortina
PYY:	peptídeo YY
SC:	compartimento sem chocolate
SNC:	Sistema Nervoso Central
SOC:	grupo social
TCAP:	Transtorno de Compulsão Alimentar Periódica
α -MSH:	<i>melanocyte-stimulating-hormone</i> (hormônio estimulante de alfa-melanócitos)

RESUMO

O estresse é um fator que pode contribuir para o desenvolvimento de um comportamento alimentar do tipo compulsivo frente à disponibilidade de alimentos ricos em açúcar, gordura e com potencial hedônico elevado. No entanto, a presença de estímulos aversivos parece inibir o comportamento alimentar. Assim, uma situação de conflito envolvendo a apresentação concomitante a um estímulo apetitivo (alimento altamente palatável) e um estímulo aversivo (modelo de predador) pode ser uma ferramenta útil para estudos de compulsão alimentar em modelos animais. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento alimentar de um primata não-humano diante de um alimento altamente palatável, analisando o efeito de um estresse psicossocial e da presença de um estímulo etologicamente aversivo. Para tanto, micos machos e fêmeas adultos da espécie *Callithrix penicillata* foram submetidos a três estudos. No Estudo 1, buscou-se determinar se um isolamento social involuntário (ISI) de sete dias consecutivos é um fator de estresse nessa espécie. Essa condição induziu um aumento na locomoção e nos comportamentos afiliativos, mas os níveis de cortisol permaneceram constantes. O perfil comportamental, porém, pode ser um indicativo de uma resposta ao estresse. No Estudo 2, micos foram submetidos ao teste de preferência-por-lugar (CPP) condicionada à presença de chocolate. Após sucessivas sessões de condicionamento foram observados um aumento significativo no tempo de permanência e uma diminuição na latência de entrada no compartimento condicionado ao chocolate no dia do teste comparado à fase pré-CPP. Essa resposta de CPP manteve-se presente mesmo 15 dias após o último condicionamento (Estudo 2A). No Estudo 2B os micos consumiram significativamente mais chocolate que ração (alimento neutro com menor valor calórico) e após o condicionamento permaneceram mais tempo no compartimento pareado ao chocolate que antes, sendo que esse último parâmetro apresentou uma correlação positiva com o tempo de forrageio durante o condicionamento. Além disso, durante a sessão teste, a atividade exploratória aumentou e os animais que mais permaneceram no compartimento pareado ao chocolate também foram os mais vigilantes. Nenhuma alteração nos níveis de cortisol foi observada. O Estudo 2 possibilitou, portanto, determinar que o chocolate tem valor hedônico para os micos, podendo induzir comportamentos indicativos de um estado de dependência. Por fim, o Estudo 3 avaliou em um teste de conflito se a presença concomitante de um estímulo aversivo (gato-do-mato taxidermizado) alterava o comportamento alimentar dos micos para o chocolate, e se um estresse psicossocial (ISI) influenciava essa resposta. Na presença do gato e independentemente do ISI, os micos diminuíram o forrageio e consumo de chocolate, assim como o tempo de permanência no compartimento onde os estímulos foram apresentados. Contudo, os animais do ISI demonstraram mais medo frente ao estímulo

aversivo do que o grupo controle, embora ambos tenham o mesmo perfil de observação do gato. Com base nos resultados, concluiu-se que: (1) apenas o consumo repetido de um alimento altamente palatável (chocolate) induziu uma resposta de CPP, a qual durou pelo menos 15 dias; (2) a presença de um estímulo naturalmente aversivo (gato taxidermizado) inibiu a busca e o consumo desse mesmo alimento em animais não privados de comida; e (3) um estresse psicossocial via isolamento social não alterou a inibição do comportamento alimentar dos micos que ocorreu durante o teste de conflito (chocolate vs. predador) e assim, nas condições experimentais do presente estudo, não induziu um perfil de consumo tipo compulsivo nessa espécie de primata não-humano.

Palavras-chave: primata não-humano, compulsão alimentar, isolamento social involuntário, chocolate, predador.

ABSTRACT

Stress is a contributing factor to the development of compulsive-like eating behaviors towards foods with high fat and sugar content, as well as elevated hedonic value. However, aversive stimuli seem to inhibit feeding behavior. Therefore, a conflict situation involving the presence of an appetitive (highly-palatable food) and aversive stimulus (predator model) concomitantly may be a useful experimental tool to study compulsive-like eating patterns in animal models. As such, the present study evaluated the feeding behavior of a nonhuman primate towards a highly-palatable food, analyzing the effects of psychosocial stress and the presence of an ethologically aversive stimulus. Male and female adult marmosets (*Callithrix penicillata*) were submitted to three experimental procedures. In Study 1, it was determined whether a 7-day involuntary social isolation (ISI) constitutes a stress condition in this species. This procedure induced an increase in locomotion and affiliative behaviors, yet cortisol levels remained unaltered. The subjects' behavioral responses are thus possible indicators of a stress response. In Study 2, the marmosets were submitted to a chocolate conditioned-place-preference (CPP) test. After repeated conditioning sessions, a significant increase in the time spent in the chocolate-paired compartment was observed on the test day compared to the pre-CPP phase, as well as a decrease in the latency to first entry in the same locale. This CPP response was still present 15 days after the last conditioning trial (Study 2A). In Study 2B, the marmosets consumed a significantly higher amount of chocolate than chow (neutral and less caloric food) and after the conditioning they spent more time in the chocolate-paired compartment than prior to these trials. The latter parameter was also positively correlated with the time spent foraging during the conditioning phase. Furthermore, on the test trial, exploratory activity increased and the marmosets that had spent more time in the chocolate-paired compartment were also found to be the most vigilant subjects post-CPP. Cortisol levels remained constant throughout this procedure. Study 2 thus indicated that chocolate has a hedonic value for marmosets and may induce addiction-like behaviors. Lastly, Study 3 used a conflict test to determine whether the presence of an aversive stimulus (taxidermized oncilla cat) would alter the marmosets' foraging for chocolate, and if a psychosocial stress (ISI) influences this response pattern. In the presence of the cat stimulus and regardless of having been submitted to an ISI stress, the marmosets decreased foraging and chocolate consumption, as well as the time spent in the compartment where both stimuli were located. However, the subjects that were submitted to the ISI condition demonstrated a higher fear response towards the aversive stimulus than the controls, although both groups observed the cat stimulus equivalently. Based on these results it was concluded that: (1) only the repeated consumption of a highly palatable food (chocolate) induced a CPP response, which in turn lasted for at least 15-days; (2) the presence of a naturally aversive stimulus

(taxidermized cat) inhibited the search and consumption of this same food item by animals that had not been food deprived; (3) psychosocial stress, via social isolation, did not alter the inhibition of feeding behavior that occurred during the conflict test (chocolate vs. predator) and thus, in the experimental conditions presently used, failed to induce a compulsive-type eating behavior in this nonhuman primate species.

Keywords: nonhuman primate, compulsive-like eating, involuntary social isolation, chocolate, predator.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do comportamento alimentar

Todos os organismos devem adquirir nutrientes a partir do seu ambiente natural para assegurar a sua sobrevivência. Em animais, a necessidade de se alimentar tem sido uma das pressões seletivas que impulsionam a evolução de um vasto e complexo repertório de comportamentos alimentares que abrange desde a detecção e captura de alimentos em diversos nichos ecológicos, até a sua ingestão propriamente dita (DOUGLAS e cols., 2005). A ingestão, em particular, deve suprir as necessidades energéticas e nutricionais do organismo (BRANDÃO, 2004).

O alimento fornece calorias na forma de macronutrientes (carboidratos, gorduras e proteínas), assim como micronutrientes necessários (vitaminas e minerais) e água. No processo digestório, o alimento é convertido em pequenas moléculas absorvíveis que entram na corrente sanguínea, interagindo e modificando o ambiente químico do corpo (WOODS e RAMSAY, 2000). Toda vez que o consumo de alimento exceder a demanda energética tem-se o acúmulo de reservas (glicogênio e triglicerídeos) (NELSON e COX, 2005). Por outro lado, no período de jejum, a degradação de glicogênio, triglicerídeos e proteínas musculares é responsável por manter o aporte energético no organismo (MALHEIROS, 2006).

O comportamento de ingestão de alimentos é um processo complexo, caracterizado por uma sequência de eventos que possibilita a digestão de um alimento. Duas categorias comportamentais têm sido bem elucidadas: de um lado, comportamentos que envolvem a busca, localização e aquisição do alimento; e do outro, comportamentos associados com a ação de mastigar e deglutir o alimento. Estes comportamentos são classificados como “apetitivos” e “consumatórios”, respectivamente (*para revisão* BENOIT e TRACY, 2008). De uma forma mais abrangente, uma segunda divisão baseada na relação temporal da ingestão alimentar também tem sido proposta: fase pré-ingestiva ou apetitiva – que envolve todo o repertório comportamental do forrageio que antecede o consumo do alimento; fase consumatória – ingestão *per se* do alimento; e fase pós-ingestiva – após a ingestão do alimento e subsequente saciedade do indivíduo (BENOIT e TRACY, 2008).

Embora historicamente vários estudos sobre o comportamento alimentar tenham sido dominados pelo interesse na regulação energética (GAO e HORVATH, 2007; BELGARDT e BRUNING, 2010), outros processos neurais podem influenciar o comportamento alimentar, tais como a aprendizagem, a memória e a tomada de decisão (HOLLAND e PETROVICH, 2005; BERRIDGE e cols., 2010). Nesse contexto, há dois

sistemas alimentares paralelos bem descritos: um homeostático e sensível ao balanço energético, que se refere à manutenção da estabilidade do estado interno do organismo; e outro hedônico (prazeroso) regido pela palatabilidade e as propriedades reforçadoras do alimento, que pode influenciar a alimentação, sem considerar o balanço energético (LUTTER e NESTLER, 2009; BERTHOUD e cols., 2011; KENNY, 2011).

1.2 Aspectos neurobiológicos do controle do comportamento alimentar

O comportamento alimentar é controlado por um conjunto complexo de mecanismos fisiológicos e psicológicos (BENOIT e TRACY, 2008) que depende da detecção e integração de sinais oriundos do sistema digestório e de reservas energéticas endógenas com diversos fatores ambientais, sociais, emocionais, circadianos e contextuais (STRUBBE e WOODS, 2004; WOODS e cols., 2006). Esses sinais, de uma forma geral, tem como seu principal alvo o Sistema Nervoso Central (SNC) (Figura 1) e interagem de forma a regular a sensação subjetiva de fome/saciedade, a taxa metabólica do organismo e a homeostase das concentrações de glicose circulantes (CARLSON, 2001).

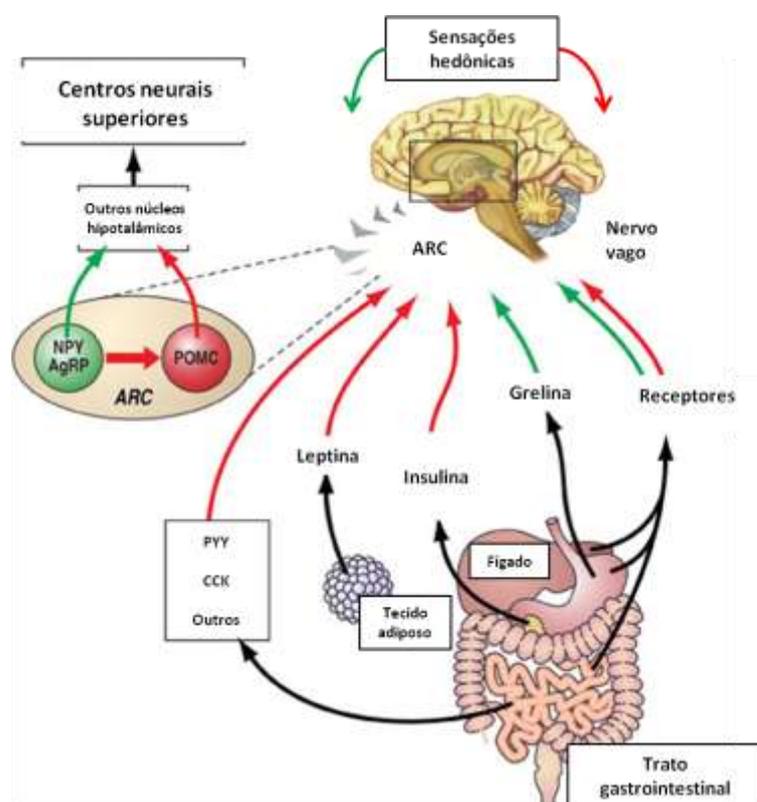


Figura 1. Esquema ilustrativo do controle do comportamento alimentar por múltiplos mecanismos neurobiológicos. Setas vermelhas representam uma diminuição da ingestão de alimento, enquanto as setas verdes representam aumento na ingestão de alimento. ARC – núcleo arqueado do hipotálamo, NPY – neuropeptídeo Y, AgRP - proteína relacionada ao agouti, POMC – pró-ópio-melanocortina,

PYY – peptídeo YY, CCK – colecistoquinina. Imagem modificada. Disponível em <<http://www.scripps.edu/zorrilla/research.html>> Acesso em: 26 de agosto de 2015. Imagem do encéfalo retirada de LENT, 2010.

Portanto, o SNC exerce o principal controle sobre o comportamento alimentar via circuitos que regulam a concentração de vários nutrientes no sangue e nas reservas corporais (SAPER e cols., 2002). Por muitos anos, esse controle foi atribuído a apenas dois grupamentos celulares hipotalâmicos. De um lado, tem-se o hipotálamo lateral, conhecido como o centro da fome, responsável por induzir a ingestão de alimentos (SAPER e cols., 2002). Neurônios nessa região sintetizam e liberam o neuropeptídeo Y e a proteína relacionada ao agouti (AgRP; *agouti-related protein*) (neurônios NPY/AgRP; Figura 1) que induzem um aumento no consumo de alimentos em animais. Uma lesão nesse núcleo resulta em um comportamento de hipofagia (SCHWARTZ e cols., 2000). Por outro lado, o hipotálamo ventromedial, denominado de centro da saciedade, inibe a ingestão de alimentos (SAPER e cols., 2002). Esse núcleo possui neurônios que expressam a pró-opio-melanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína/anfetamina (CART; *cocaine-and-amphetamine-regulated transcript*) (neurônios POMC/CART; Figura 1), proteínas que levam a um menor consumo de alimentos. Uma lesão nesse núcleo resulta em um comportamento de hiperfagia (SCHWARTZ e cols., 2000). Essa atividade antagônica desses núcleos é favorecida pela proximidade dos seus loci gênicos, o que demonstra a evolução do hipotálamo na integração dos sinais relacionados à ingestão de alimento (YOU e AVERY, 2012).

Contudo, sabe-se hoje que vários circuitos neuro-humorais, centrais e periféricos também exercem um importante papel no controle do comportamento alimentar, e conseqüentemente na homeostasia energética do corpo. Na verdade, o SNC não parece estar organizado em centros isolados que controlam funções alimentares específicas, mas sim em amplos circuitos interconectados (BRANDÃO, 2004). Nesse contexto, o balanço entre os diferentes sinais de “fome” e “saciedade” é um fator essencial. Via moléculas sinalizadoras liberadas pelo intestino ou reservas energéticas (ex. tecido adiposo), que se ligam a receptores específicos no SNC, diferentes cascatas de sinalização são ativadas, particularmente no hipotálamo (MURPHY e BLOOM, 2006). Dentro desse, o núcleo arqueado parece atuar como um centro de primeira ordem na integração dos sinais periféricos de fome/saciedade, transmitindo então essas informações para outras regiões hipotalâmicas. Os núcleos lateral, ventromedial e paraventricular recebem projeções do núcleo arqueado e projetam para outras áreas do SNC e periférico, atuando como centros secundários no processamento dos sinais de fome/saciedade (CARLSON, 2001).

Dentre os vários sinais orexigênicos (indutores do apetite), tem-se, por exemplo, a queda da concentração de glicose e/ou ácidos graxos presente no sangue. As

concentrações desses indicadores metabólicos podem ser detectados no SNC e no fígado, sendo que o primeiro monitora apenas a quantidade de glicose disponível, enquanto que o segundo monitora a glicose e os ácidos graxos presente no resto do corpo. O fígado, por sua vez, também transmite essa informação ao SNC, via o nervo vago (CARLSON, 2001; Figura 1).

Outro importante sinal orexigênico é a grelina, um peptídeo secretado principalmente pelo estômago (SMITKA e cols., 2013; Figura 1). Em animais, a concentração de grelina aumenta durante a privação alimentar e cai logo após a passagem do alimento do estômago para o intestino (KOJIMA e cols., 1999), sendo que em humanos seu pico antecede as refeições (CUMMINGS e SHANNON, 2003). Uma vez liberada, a grelina atua sob diversos órgãos e sistemas, incluindo o SNC. Nesse, ela ativa centros neurais do controle do comportamento alimentar de forma indireta – via ativação do nervo vago (DATE e cols., 2002) e/ou atravessando a barreira hematoencefálica (BANKS e cols., 2002; 2008) e se ligando à receptores específicos (GHSR-1A) localizados em diferentes regiões do SNC. A maior densidade desses receptores está em neurônios que expressam NPY/AgRP no núcleo arqueado do hipotálamo (GUAN e cols., 1997; HORVATH e cols., 2001; DATE e cols., 2002). Portanto, a ativação desses neurônios pela grelina induz a liberação de NPY e AgRP, que por sua vez: (1) ativam interneurônios GABAérgicos que inibem neurônios da “saciedade” POMC/CART no mesmo núcleo; (2) ativam (via NPY) os núcleos paraventricular e lateral do hipotálamo, que reduz o gasto de energia e libera outros hormônios envolvidos na sinalização da “fome” (MCH – *melanin-concentrating hormone*; orexina/hipocretina); e (3) antagonizam (via AgRP) o receptor do tipo 4 para melanocortina (MC4) (CARLSON, 2001). Essa ação antagonista no receptor MC4 bloqueia a sinalização de “saciedade” do sistema da melanocortina, o qual será descrito mais abaixo.

Ademais, receptores na língua, no estômago, no intestino delgado e no fígado enviam sinais que ativam a área *postrema* e o núcleo do trato solitário (AP/NST), os quais enviam essas informações orexígenas ao núcleo parabraquial da ponte (CARLSON, 2001; Figura 1). O hipotálamo e o AP/NST no tronco cerebral se interconectam e contribuem para o controle da ingestão alimentar (SCHWARTZ e cols., 2000; MARX, 2003).

Por outro lado, os primeiros sinais de saciedade (anorexigênicos) já parecem ser desencadeados (via o nervo vago) pelo próprio gosto, cheiro e ato de deglutir, seguido de sinais gástricos que indicam a ingestão e digestão de alimentos (ex: distensão estomacal e presença de diferentes tipos de nutrientes, respectivamente; CARLSON, 2001). Constituem em sinais antecipatórios, uma vez que não houve a absorção dos nutrientes, tendo, portanto um efeito transitório (DAVIS e CAMPBELL, 1973). A entrada de alimento no intestino, por sua vez, promove a liberação de colecistoquinina (CCK) e peptídeo YY (PYY) pelo mesmo órgão, os quais contribuem para sinalizar etapas subsequentes do processo digestório (ex:

liberação de bile), assim como contribuem para inibição do comportamento alimentar (Figura 1). O intestino também tem receptores sensíveis à presença de glicose, aminoácidos e ácidos graxos (RITTER e cols., 1992), assim como o fígado sinaliza quando os alimentos estão sendo absorvidos, e conjuntamente contribuem para sensação de saciedade (CARLSON, 2001). Essas informações são enviadas ao SNC via o nervo vago (Figura 1).

Outro importante sinal anorexigênico é a leptina (ZHANG e cols., 1994; FAROOQI e cols., 1999), um peptídeo secretado principalmente por adipócitos contendo triglicerídeos (ZHANG e cols., 1994; Figura 1). Seus níveis circulantes aumentam quando animais estão se alimentando e diminuem no estado de jejum (FREDERICH e cols., 1995; MAFFEI e cols., 1995; AHIMA e cols., 2000), apesar de sua administração exógena não prevenir a obesidade (KALRA e cols., 2003). Uma vez liberada, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e se liga a receptores específicos (LEPb) presentes em várias regiões do SNC, particularmente no núcleo arqueado do hipotálamo (HAKANSSON e cols., 1996; MERCER e cols., 1996; FEI e cols., 1997; BARSH e SCHWARTZ, 2002). A ativação dos receptores LEPb: (1) inibe os neurônios da “fome” NPY/AgRP no mesmo núcleo; e (2) induz a produção de α -MSH (*melanocyte-stimulating-hormone*), a partir da liberação de POMC. O sistema de melanocortina, principalmente via os receptores MC4R para o α -MSH, atua no sentido de aumentar o gasto energético (núcleos paraventricular e ventromedial do hipotálamo) e diminuir a liberação de MCH e orexina/hipocretina, importantes sinalizadores secundários para ingestão de alimentos (SCHWARTZ e cols., 2000; MARX, 2003).

É importante ressaltar que, além dos circuitos homeostáticos descritos acima, outras áreas e mediadores também influenciam o comportamento alimentar. Por exemplo, leptina e grelina influenciam o sistema neural de recompensa, responsável por sensações de prazer (hedônicas), conforme será descrito abaixo em mais detalhes (SHALEV e cols., 2001; FIGLEWICZ, 2003; ABIZAID e cols., 2006). A ativação desse sistema contribui para ingestão de alimentos mesmo sem uma necessidade homeostática, ou seja, em indivíduos saciados (FIGLEWICZ e cols., 2004). Além disso, aspectos do próprio alimento, como palatabilidade, também ativam/inibem esse sistema. Por outro lado, vários sinalizadores periféricos e do SNC modulam áreas relacionadas à memória e aprendizado, influenciando o padrão alimentar futuro (FARR e cols., 2006; MALIK e cols., 2008). Lesões em áreas mnemônicas importantes, como o hipocampo, diminuem a resposta a sinais de fome/saciedade (CLIFTON e cols., 1998).

Portanto, de modo simplificado, o controle do comportamento alimentar parece estar baseado numa rede de interações em três níveis psicobiológicos: (1) os eventos psicológicos (percepção da fome, desejo e sensações hedônicas) e as ações comportamentais (refeição, lanches, ingestão de energia e macronutrientes); (2) os eventos

fisiológicos e metabólicos periféricos; e (3) as interações com os neurotransmissores do SNC (BLUNDELL, 1991; *para revisão* BLUNDELL, 1999; Figura 1).

1.3 Alterações patológicas do comportamento alimentar

Alterações no controle cognitivo, emocional e/ou motivacional são aspectos centrais no desenvolvimento de um comportamento alimentar patológico (FRIEDERICH e cols., 2013). Associado a isso, muitas mudanças no ambiente moderno (ex. aumento na disponibilidade de recursos, menor motivação para busca de alimentos, menor diversidade de nutrientes e maior consumo de alimentos processados) e no estilo de vida moderno exercem uma certa pressão sobre o balanço energético. Devido a essas mudanças no ambiente alimentar, os comportamentos que eram adaptativos sob condições de escassez têm se tornado um fator de risco na sociedade moderna.

A motivação para comer não é apenas controlada por sinais fisiológicos relacionados aos processos metabólicos, mas também é influenciada por fatores ambientais e sociais não relacionados à homeostasia (PETROVICH, 2011). Fatores ambientais, tais como facilitação social (presença de outras pessoas durante o consumo de alimento), tempo de consumo, hora do dia, tamanho do pacote ou prato, cheiro, cor ou ambiente físico podem influenciar na ingestão e escolha do alimento, resultando na ausência de um mecanismo adaptativo apropriado (*para revisão* BASSAREO e DI CHIARA, 1999; STROEBELE e CASTRO, 2004). Estas pistas ambientais adquirem propriedades motivacionais por meio do aprendizado, exercendo forte influência sobre o comportamento alimentar. Assim, podem substituir sinais regulatórios homeostáticos e estimular o indivíduo a comer mesmo no estado saciado ou inibir a alimentação em estados de fome (WEINGARTEN, 1983; PETROVICH e GALLAGHER, 2007; PETROVICH e cols., 2009). A persistência de tais estímulos pode levar ao desencadeamento de distúrbios alimentares, tais como bulimia, compulsão alimentar, anorexia, obesidade.

As características do próprio alimento também favorecem o aumento do seu consumo, tais como cor e sabor mais atrativos e por serem densamente energéticos, industrializados e acessíveis (VOLKOW e WISE, 2005). Sendo assim, a prevalência de distúrbios tem aumentado devido à grande disponibilidade de alimentos altamente palatáveis (GEARHARDT e BROWNELL, 2013). A palatabilidade promove um consumo excessivo de alimento no estado saciado (ALSIO e cols., 2009), quando os sinais de fome não estão ativos, demonstrando a importância do componente hedônico na alimentação independentemente do estado homeostático (OLSZEWSKI e cols., 2009). Nesse contexto, os alimentos chamados de altamente palatáveis são itens calóricos, ricos em gordura e/ou açúcar, que apresentam pouco ou nenhum valor nutricional e mesmo assim são consumidos diariamente como lanches ou refeições (OVASKAINEN e cols., 2006). Seu consumo, na

verdade, muitas vezes excede as necessidades nutricionais do indivíduo (BERTHOUD, 2006).

Alimentos altamente palatáveis apresentam um alto valor hedônico (prazeroso) devido à capacidade de ativar a via dopaminérgica mesocorticolímbica – conhecida como sistema de “recompensa/prazer”. Essa via origina em neurônios da área tegmental ventral do mesencéfalo que projetam para o estriado ventral, incluindo o núcleo accumbens e outras regiões do sistema límbico, como o complexo amigdalóide e o septo, assim como para diferentes áreas corticais pré-frontais (KALES, 1990; JANSEN e VAN DEN HOUT, 1991; DREWNOWSKI e cols., 1992; FELDMAN e cols., 1997; WHITE e GRILO, 2005).

O sistema dopaminérgico tem assim um papel crucial nos processos motivacionais (KALIVAS e NAKAMURA, 1999). O neurotransmissor dopamina (DA) aumenta o ímpeto do indivíduo em obter um estímulo reforçador (KELLEY e BERRIDGE, 2002). Por outro lado, ela não é diretamente responsável pela experiência hedônica do indivíduo, ou seja, ela não influencia na preferência por um determinado alimento palatável (MORTON e cols., 2006). Porém, alguns indivíduos são mais propensos a consumir esse tipo de alimento, podendo exibir uma resposta hedônica elevada (BONGGIANO e cols., 2007). Estudos de neuroimagem em indivíduos obesos têm demonstrado mudanças na expressão de receptores dopaminérgicos similar às mudanças observadas em sujeitos dependentes por drogas de abuso (WANG e cols., 2004; VOLKOW e WISE, 2005; VOLKOW e cols., 2008).

Embora a motivação e a recompensa tenham sido mais estudadas no contexto da dependência por drogas de abuso (WISE, 1996; BERKE e HYMAN, 2000; LAAKSO e cols., 2002; WISE, 2004), em que o sistema de recompensa tem sido associado à emissão de respostas que não tem valor homeostático, recentemente vários estudos têm demonstrado as similaridades fisiológicas e comportamentais com a dependência por alimentos altamente palatáveis.

1.3.1 Dependência por alimentos (*Food addiction*)

O termo “*food addiction*” tem surgido recentemente, no entanto não há uma definição consensual para o seu uso. De forma geral, o termo “*food addiction*” refere-se a ideia de que certos tipos de alimentos – particularmente itens altamente palatáveis – podem ser excessivamente consumidos, independentemente das necessidades fisiológicas do indivíduo e geralmente seguindo um padrão compulsivo. Assim, estudos com modelos animais têm sugerido que o consumo excessivo de alimentos altamente palatáveis pode produzir mudanças fisiológicas e comportamentais semelhantes à dependência por drogas de abuso (AVENA e cols., 2011; CORWIN e cols., 2011; PARYLAK e cols., 2011; HADAD e cols., 2014).

De acordo com o DSM-V (*Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição*), a dependência se caracteriza como sendo um padrão desadaptado do uso de substâncias psicoativas, que induz alterações cognitivas, fisiológicas e comportamentais clinicamente significativas. Essa alteração patológica apresenta como sintomatologia os seguintes aspectos: (1) efeito de tolerância – necessidade de aumento da dose para obter os mesmos efeitos conseguidos anteriormente com doses inferiores ou diminuição dos efeitos com o uso continuado da mesma quantidade de substância; (2) sintomas de abstinência – quando o consumo da substância é reduzido ou suspenso; (3) consumo da substância em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido; (4) desejo persistente ou esforço mal sucedido no controle do uso da substância; (5) aumento no tempo empregado para obter e/ou consumir a substância ou recuperar-se dos seus efeitos; (6) diminuição ou abandono de atividades sociais, ocupacionais ou recreativas devido ao uso da substância; e (7) persistência no consumo apesar das consequências físicas e psicológicas causadas pelo uso da substância (APA, 2013).

Nesse contexto, tem havido um crescente interesse nos comportamentos relacionados a estímulos naturais, tais como o alimento, que se assemelha a um quadro de dependência por substâncias de abuso. Assim, já tem sido sugerido que a dependência por alimentos manifesta-se via desejo intenso em obter o alimento, comportamento hiperfágico, sensação de ansiedade na ausência de ingestão de alimentos palatáveis, risco de recaída, sintomas de retirada e tolerância por determinados alimentos (IFLAND e cols., 2009; PARYLAK e cols., 2011; HONE-BLANCHET e FECTEAU, 2014).

Sob diferentes condições de acesso, alimentos podem produzir mudanças no comportamento por meio de alterações neuroquímicas em áreas cerebrais ligadas à motivação, aprendizado, cognição e tomada de decisão, similar às drogas de abuso (SCHROEDER e col., 2001; LENOIR e cols., 2007; AVENA e cols., 2008; VOLKOW e cols., 2008). Em indivíduos com maior vulnerabilidade, o consumo de grandes quantidades de alimentos (ou drogas de abuso) pode desequilibrar o balanço entre motivação, reforço, aprendizado e circuitos de controle, aumentando o valor reforçador do estímulo e enfraquecendo os circuitos inibitórios (VOLKOW e cols., 2008; VOLKOW e cols., 2011).

A ingestão de alimentos altamente palatáveis e fatores associados, tais como restrição calórica (HAGAN e MOSS, 1997) e estresse (MCINTOSH e cols., 1999; PECORARO e cols., 2004), podem gerar mudanças no sistema de recompensa do cérebro (KELLEY e cols., 2003; BOGGIANO e cols., 2005), via uma ativação similar a que ocorre em resposta a administração de drogas de abuso (DI CHIARA e TANDA, 1997; COLANTUONI e cols., 2001; SPANGLER e cols., 2004). Vale ainda salientar que, além do sistema dopaminérgico, outros sistemas neurotransmissores também contribuem fortemente para o processo de dependência, principalmente associado ao valor de recompensa do alimento e

seu impacto hedônico. Neurotransmissores como a serotonina, o glutamato, o GABA, os opioides e a noradrenalina, exibem um importante efeito modulatório no circuito de recompensa e comportamentos motivados (NESTLER e cols., 2001; KELLEY e cols., 2005; VENTURA e cols., 2008), sugerindo que estímulos farmacológicos e naturais ativam um sistema neural comum (WANG e cols., 2004; VOLKOW e WISE, 2005; BERNER e cols., 2011). Além disso, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) também é alterado no processo de dependência, podendo os hormônios por ele liberado exercer um efeito importante sobre os mecanismos envolvidos em diferentes fases da dependência por drogas ou alimentos (KALIVAS e cols., 1987; LAVICKY e cols., 1993; ARCE e cols., 2010).

1.3.1.1 Alimentos com potencial de causar dependência: chocolate

Alimentos que possuem altos níveis de carboidratos processados, gordura, sal e cafeína exibem forte propriedades reforçadoras (IFLAND e cols., 2009). Dentre esses alimentos, já foi demonstrado que o chocolate exibe potencial de causar dependência em modelos animais (VENTURA e cols., 2007; GHITZA e cols., 2007; CASPER e cols., 2008; DUARTE e cols., 2014).

O chocolate é originário do México onde os povos Maias, Incas e Astecas cultivavam o cacau (*Theobroma cacao* – Figura 2). É produzido por meio de um processo de fermentação das sementes da árvore de cacau. Os grãos são secos, torrados e moídos; o resultado é um chocolate altamente amargo e cheio de gordura. Ao longo do processo de fabricação, o produto intermediário é pressionado para formar uma espécie de “bolo” e alcalinizado para formar o chocolate em pó, que é então homogeneizado com açúcar e manteiga de cacau, e algumas vezes leite, para finalmente formar o chocolate (BRUINSMA e TAREN, 1999). Em suma, ele é fabricado a partir da combinação de massa de cacau, manteiga de cacau e açúcar (PARKER e cols., 2006) e portanto não é um produto natural e depende da combinação de seus constituintes individuais. O chocolate meio amargo, por exemplo, contém os três constituintes principais, o chocolate ao leite contém mais leite e gordura, enquanto o branco é feito apenas com manteiga de cacau, açúcar e leite (PARKER e cols., 2006).

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), chocolate é o “produto obtido com base na mistura de derivados de cacau (*Theobroma cacao* L.), massa (ou pasta ou liquor) de cacau, cacau em pó e/ou manteiga de cacau, com outros ingredientes, contendo, no mínimo, 25% (g/100g) de sólidos totais de cacau. O produto pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados”.

Devido ao seu potencial em causar dependência, várias substâncias psicoativas já foram identificadas como constituintes do chocolate, tais como aminas biogênicas, metilxantinas, ácidos graxos e ligantes de canabinoides (*para revisão* PARKER e cols.,

2006). Entre as aminas biogênicas, as mais notáveis são a tiramina e feniletilamina, que atuam como compostos simpatomiméticos (adrenérgicos) (HURST e cols., 1982). A feniletilamina, particularmente, é um neuromodulador estruturalmente e farmacologicamente similar às catecolaminas e anfetamina (MICHENER e ROZIN, 1994), capaz de potencializar a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica (MICHENER e ROZIN, 1994), além de ser importante na modulação de humor. Seu déficit pode contribuir para a patogênese da depressão (SABELLI e JAVAID, 1995). Dentre as metilxantinas, as mais proeminentes são a cafeína e a teobromina, duas substâncias estimulantes do SNC que competem com a adenosina (neuromodulador inibitório pré-sináptico) e bloqueiam seu receptor causando efeito excitatório (NEHLIG e cols., 1992). Além disso, a cafeína cataliza a liberação de adrenalina e outras catecolaminas da glândula adrenal, contribuindo para o efeito estimulante (McKIM, 1997).

O chocolate contém também dois compostos análogos de anandamida – um neuromodulador cerebral que se liga aos receptores endocanabinoides mimetizando os efeitos das drogas canabinoides derivadas de plantas, como a maconha (DEVANE e cols., 1992). Tais compostos presentes no chocolate são capazes de se ligar diretamente aos receptores canabinoides ou indiretamente aumentar os níveis de anandamida no cérebro. O possível efeito na elevação nos níveis de anandamida poderia intensificar as propriedades sensoriais do chocolate, contribuindo para o aparecimento do desejo intenso ou influenciar na ação de outros componentes farmacológicos (cafeína, teobromina) para produzir uma sensação transiente de “bem-estar” (DI TOMASO e cols., 1996).

Assim o chocolate pode interagir com diferentes sistemas de neurotransmissores (*para revisão* PARKER e cols., 2006). Embora seja constituído de diferentes substâncias psicoativas, a grande quantidade de açúcar e gordura presentes na sua composição por si já estão relacionadas com o potencial de dependência desse alimento.



Figura 2. Cacaueiro (*Theobroma cacao*). (Figuras retiradas respectivamente dos sites: <http://ulceet.com/site134.php> e http://www.tropicalfruitnursery.com/fruitproducts_c1.htm). Acesso em: 21 de outubro de 2015.

1.3.2 Compulsão Alimentar (*Binge-eating disorder*)

O consumo excessivo de alimentos altamente palatáveis pode contribuir ainda para o surgimento de comportamentos alimentares compulsivos (CORWIN e cols., 1998; COLANTUONI e cols., 2001). Então, vários fatores fisiológicos, neuroquímicos e comportamentais contribuem para caracterizar a compulsão alimentar como um tipo de dependência (AVENA e cols., 2008, 2009).

A compulsão alimentar é caracterizada por episódios discretos de consumo rápido e excessivo de alimento, não necessariamente devido à fome ou necessidades metabólicas (BROWNLEY e cols., 2007; DAVIS e cols., 2007). Especificamente, o Transtorno de Compulsão Alimentar Periódica (TCAP; *binge-eating disorder*) é um dos transtornos mais observados na obesidade (ADAMI e cols., 1995; MATOS e cols., 2002; PETRIBU e cols., 2006). No entanto, esse distúrbio foi apenas incluído recentemente no DSM-V como sendo uma nova categoria de transtornos alimentares, não necessariamente ligado à obesidade.

De acordo com o DSM-V, o TCAP pode ser precisamente definido como episódios recorrentes de comer significativamente mais alimentos, em um curto período de tempo, do que a maioria das pessoas consumiria em situações similares, com episódios marcados pela falta de controle e ausência de sinais fisiológicos de fome. Os indivíduos que apresentam TCAP exibem pelo menos três das seguintes características: (1) comer bem mais rápido do que o normal; (2) comer até sentir algum desconforto; (3) ingerir uma grande quantidade de alimento mesmo sem apresentar sinais fisiológicos de fome; (4) comer sozinho por exibir sentimentos de vergonha devido à quantidade de comida que está ingerindo; e (5) sentir-se enojado, deprimido e culpado após ter comido (APA, 2013). Tais

características apresentam similaridades com a dependência por substâncias de abuso (Tabela 1).

A constante busca pela perda de peso via programas de dieta alimentares tem sido um dos fatores que exerce efeito sobre o aparecimento de um comportamento compulsivo. A monotonia da dieta tem demonstrado um aumento do número e da intensidade dos episódios de compulsão (PELCHAT e SCHAEFER, 2000; POLIVY e cols., 2005) em que nota-se que os alimentos fortemente desejados são aqueles excluídos das dietas (HILL, 2007). O desejo intenso parece ser provocado pela privação sensorial, sendo que a redução do consumo pode reforçar a busca por alimentos preferidos (PELCHAT, 1997).

De forma geral, O TCAP é causado por uma interação entre fatores genéticos e ambientais (ZANDIAN e cols., 2007; KAYE, 2008), incluindo o estresse crônico. Esse último, por exemplo, é capaz de gerar uma hiperatividade do sistema neural de recompensa, resultando na ingestão excessiva de alimentos altamente palatáveis (ADAM e EPEL, 2007). Dentre os indivíduos que apresentam TCAP existe uma alta prevalência de comorbidade com diferentes distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade, depressão e farmacodependência (SWANSON e cols., 2011).

Tabela 1. Similaridades comportamentais entre a dependência por substâncias de abuso e a compulsão alimentar.

Sintomas de comorbidade	Farmacodependência	Compulsão Alimentar
Escalonamento do uso	Consumo da substância em maior quantidade ou por um período mais longo do que o pretendido	Consumir uma grande quantidade de alimento sem sinais fisiológicos de fome
Perda do controle	Desejo persistente ou esforço mal sucedido no controle do uso da substância	Sensação de falta de controle durante os episódios de compulsão; não se consegue parar ou controlar o quanto está comendo
Consequências sociais	Diminuição de atividades sociais, ocupacionais ou recreativas devido ao uso da substância	Comer sozinho pelo sentimento de vergonha pela quantidade consumida
Angústia pessoal	Persistência no consumo da substância apesar das consequências físicas e psicológicas	Sentir-se enojado, deprimido e culpado após comer excessivamente

* Tabela adaptada do artigo Smith e Robins, 2013.

1.4 Influência do Estresse no Comportamento Alimentar

A resposta ao estresse em mamíferos é mediada via sistema nervoso simpático, concomitantemente à ativação do eixo HPA, além de envolver mudanças nos mecanismos imunológicos, endócrinos e neurais (MCEWEN, 2007; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

O eixo HPA é um dos mais importantes sistemas adaptativos do organismo, possibilitando que o mesmo responda às situações de estresse e desafios (MCEWEN e STELLAR, 1993; MCEWEN, 1998). Três hormônios, em particular, são usados como indicadores dos níveis de estresse: o fator de liberação de corticotropina (CRF), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o cortisol (ou corticosterona, dependendo da espécie). Então, uma das estratégias do organismo em resposta ao estresse envolve o aumento nas concentrações dos hormônios associados ao eixo HPA. Por outro lado, em condições não estressantes, esses hormônios têm um importante papel na manutenção da homeostasia e do balanço energético do organismo (SAPOLSKY e cols., 2000; MENDONÇA-FURTADO, 2006)

Qualquer estímulo, físico ou fisiológico, que cause um aumento na atividade do eixo HPA é identificado como um estressor. Com base no período de exposição a um agente estressor e considerando a propensão de cada indivíduo, há um aumento mensurável na liberação de CRF por neurônios especializados no núcleo paraventricular do hipotálamo, que subsequentemente induz a liberação de ACTH pela hipófise anterior, culminando com a estimulação da glândula adrenal e liberação de glicocorticoides pela sua região cortical (SAPOLSKY e cols., 2000; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009).

Dentre os glicocorticoides, o cortisol é o principal indicador de estresse. Relacionado ao comportamento alimentar, o cortisol tem sido visto como um fator de motivação à ingestão de alimento na ausência de necessidades calóricas. Indivíduos que exibem uma resposta elevada ao cortisol, induzida por estresse agudo, consomem mais alimentos ricos em açúcar e gordura (EPEL e cols., 2001; RUTTERS e cols., 2009). TATARANNI e cols (1996) demonstraram ainda que doses terapêuticas de glicocorticoides induzem à obesidade, um efeito relacionado à habilidade dos mesmos agirem diretamente ou indiretamente na regulação central do apetite.

A capacidade de regulação do eixo HPA se dá pelo mecanismo de retroalimentação negativa, possibilitando que o organismo responda de forma aguda à demanda energética, enquanto minimiza a longo prazo altas concentrações de corticosteroides que podem ter consequências deletérias ao organismo (SAPOLSKY e cols., 2000). Esta alça de *feedback* negativo é ativada após a elevação de glicocorticoides circulantes e impede mais estimulação do eixo HPA via ativação de receptores localizados no hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal medial, e glândula hipófise (JONES e cols., 1977; MAHMOUD e cols.,

1984; SAPOLSKY e cols., 1984; DIORIO e cols., 1993; RADLEY e cols., 2008). É importante mencionar que os receptores de glicocorticoides também podem ser encontrados fora do eixo HPA, como é o caso do hipocampo. Esse exerce forte influência na liberação de corticosteroides. Corroborando essa ideia, já foi demonstrado que ratos idosos exibem uma perda de receptores de glicocorticoides no hipocampo e assim exibem uma resposta incompleta ao estresse (SAPOLSKY e cols., 1986).

Contudo, após ajuste homeostático, as concentrações hormonais tendem a voltar ao seu nível normal, enquanto que comportamentos (estereotipados) persistem por mais tempo (SCHAPIRO e cols., 1993). Com isso, faz-se necessário a utilização tanto da resposta endócrina, quanto a comportamental, para uma análise mais completa da resposta ao estresse. Além disso, a atividade do eixo HPA é influenciada por uma ritmicidade circadiana, caracterizada por picos de concentração hormonal na corrente sanguínea no início da fase de atividade do animal e uma queda nos mesmos, durante a fase inativa/reposo (KALSBECK e cols., 1996).

A ativação aguda do eixo HPA, em resposta ao estresse, promove a sobrevivência do organismo via adaptações fisiológicas e comportamentais. No entanto, a exposição ao estresse crônico e a superestimulação do eixo HPA podem resultar em alterações fisiológicas com efeitos prejudiciais e distúrbios metabólicos, incluindo a obesidade (BLACK, 2006; MCEWEN, 2007).

Em consonância com o exposto, o eixo HPA tem sido associado ao controle do metabolismo e liberação de neurotransmissores em várias regiões cerebrais, facilitando o direcionamento adequado de recursos energéticos para promover a sobrevivência após o estresse (KYROU e TSIGOS, 2007; MCEWEN, 2007; DALLMAN, 2010; BOWERS e cols., 2012).

A regulação do apetite, a ingestão do alimento e a escolha da dieta estão intimamente relacionadas à percepção e resposta ao estresse (OLIVER e WARDLE, 1999; GIBSON, 2006; MORRISON, 2009; DALLMAN, 2010). A ligação entre estresse e comportamento alimentar é reforçada pela sobreposição de circuitos neurais e pelo envolvimento dos mesmos neuropeptídeos (BOWERS e cols., 2012; MANIAM e MORRIS, 2012). Em humanos e animais, o estresse exerce um impacto significativo na ingestão de alimento, podendo promover perturbações metabólicas (OLIVER e WARDLE, 1999; GIBSON, 2006; BLOCK e cols., 2009; DALLMAN, 2010; MANIAM e MORRIS, 2012) e/ou desencadeamento de quadros de obesidade e transtornos alimentares (GLUCK e cols., 2004).

De fato, um aumento nos níveis de estresse tem sido associado a um aumento na motivação pelo consumo de alimentos altamente palatáveis e calóricos (OLIVER e cols., 1999; EPEL e cols., 2001). Alguns indivíduos exibem um comportamento hiperfágico

induzido por estresse, enquanto outros apresentam hipofagia; no entanto, todos aumentam o consumo de alimentos altamente palatáveis e densamente calóricos (GIBSON, 2006; DALLMAN, 2010). Corroborando tal premissa, alguns estudos demonstraram que o estresse crônico aumenta o consumo de alimentos altamente palatáveis (DALLMAN e cols., 2003), como também precipita o desenvolvimento de um comportamento alimentar compulsivo (HAGAN e cols., 2003).

Após a ingestão desse tipo de alimento, as respostas indicativas de estresse parecem ser reduzidas. Propõe-se que a ingestão de alimentos densamente energéticos diminui os efeitos negativos associados ao estresse crônico (“*comfort eating*”; DALLMAN e cols, 2003). Isso pode ser atribuído à capacidade do estresse gerar uma hiperatividade do sistema neural de recompensa. Estudos desta natureza são de suma importância para elucidar a ligação entre as vias de estresse e o desequilíbrio do comportamento alimentar, o que culmina com o desencadeamento de distúrbios alimentares. De fato, vários fatores têm sido propostos na patogênese das desordens alimentares (ZANDIAN e cols., 2007; KAYE, 2008), como vulnerabilidade, exposição ao estresse e restrição calórica (CASPER e cols., 2008).

1.5 Modelos animais

1.5.1 Procedimentos pré-clínicos para estudo da dependência

Diferentes procedimentos envolvendo modelos animais vêm sendo desenvolvidos no âmbito dos distúrbios alimentares (CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; LE MERRER e STEPHENS, 2006; AVENA e cols., 2008; COCCURELLO e cols., 2009). Esse tipo de pesquisa permite que estudos experimentais sejam conduzidos, evitando uma gama de limitações éticas e metodológicas atreladas às pesquisas com humanos (MELLO e MENDELSON, 1997).

O processo de dependência é bastante complexo, o que acaba impondo certos limites no estudo das suas diversas facetas. Diferentes testes são empregados para estudo de dependência em animais, no entanto não existe um único teste que contemple todos os aspectos observados no processo de dependência, seja por drogas de abuso ou por alimentos altamente palatáveis. Por isso, cada teste busca verificar ao menos um dos aspectos observados em humanos.

Como estratégia para estudo de dependência/compulsão alimentar em animais, busca-se explorar estímulos precursores que geram distúrbios alimentares em humanos (por exemplo: dieta, exposição a alimentos altamente palatáveis, estresse) na tentativa de provocar respostas comportamentais e/ou fisiológicas similares (HAGAN e cols., 2002;

HAGAN e cols., 2003; CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; BOGGIANO e cols., 2005; CHANDLERLANEY e cols., 2007).

Uma das características consideradas no âmbito da dependência é o uso compulsivo da droga de abuso mantido apesar das consequências aversivas (APA, 2000; DEROUCHE-GAMONET e cols., 2004). Postula-se que a inclusão de estímulos aversivos em modelos de dependência serve para balancear a busca pela droga, gerando um conflito interno no usuário (BARNEA-YGAEL e cols., 2012). Em humanos, por exemplo, episódios de procura pela droga envolve um conflito entre o desejo pelos efeitos positivos obtidos com a droga de abuso e as consequências aversivas do seu uso. Quando as consequências aversivas superam os efeitos desejáveis da droga, as tentativas de abstinência tendem a ocorrer (EPSTEIN e cols., 2006; PELLOUX e cols., 2007). Após exposição à pistas contextuais associadas à droga e sob abstinência, o desejo intenso de consumi-la pode levar o indivíduo à recaída (VOLKOW e cols., 2006; VOLKOW e cols., 2010).

Sabe-se que o comportamento apetitivo para recompensas naturais também é rapidamente suprimido por um estímulo ambiental aversivo (BOUTON e BOLLES, 1980; KILLCROSS e ROBBINS, 1997; KEARNS e cols., 2002). Já foi demonstrado que, em condições normais, estímulos aversivos podem inibir a busca descontrolada por alimentos altamente palatáveis (VANDERSCHUREN e EVERITT, 2004). No entanto, quando essa busca ou ingestão persiste, mesmo diante de uma consequência aversiva, caracteriza-se então um quadro de comportamento compulsivo (DEROCHE-GAMONET e cols., 2004; VANDERSCHUREN e EVERITT, 2004; LATAGLIATA e cols., 2010).

Partindo dessa premissa, os modelos de conflito são válidos para verificar a exibição de comportamentos que envolvem *drives* motivacionais opostos. Tais modelos tem sido extensivamente usados como modelo de ansiedade em animais e para caracterização de agentes ansiolíticos (MILLAN, 2003; MILLAN e BROCCO, 2003). Embora haja inúmeras versões do paradigma de conflito (GELLER e SEIFTER, 1960; VOGEL e cols., 1971; COOPER e cols., 2007), a ideia básica é criar uma situação conflitante entre o comportamento apetitivo associado à recompensa e a presença do estímulo ou consequência aversiva associada à punição, em que o indivíduo escolhe entre se aproximar da recompensa e/ou se afastar do estímulo.

O equilíbrio entre os comportamentos de “aproximação” ou a “esquiva/afastamento” é importante para sobreviver com os desafios do ambiente. A esquiva serve como estratégia para se proteger de ameaças tais como predador, dor ou qualquer estímulo aversivo que ameace a integridade do indivíduo. Já o comportamento de aproximação ajuda na obtenção de recompensas tais como alimentos, recursos e suporte social (*para detalhes ver* MILLAN, 2003; McNAUGHTON e CORR, 2004; WILLIAMS e GORDON, 2007). Um desequilíbrio nesses comportamentos resulta em tomadas de decisão pouco ideais e, em casos

extremos, na expressão de psicopatologias (DEPUE e IACONO, 1989; UROSEVIC e cols., 2008; AUPPERLE e PAULUS, 2010). O valor reforçador da recompensa e o potencial de ameaça do estímulo podem influenciar na tomada de decisão (CABANAC, 1985; HADDON e KILLCROSS, 2006), fazendo com que o animal, em algumas situações, exiba comportamentos biologicamente perigosos (SUDAKOV e cols., 2013). É importante destacar ainda que o estímulo aversivo pode não gerar as mesmas respostas em diferentes indivíduos (DEROCHE-GAMONET e cols., 2004).

A maioria dos estudos envolvendo situações de conflito optam pela utilização de estímulos aversivos condicionados (ex. choque elétrico leve – GELLER e SEIFTER, 1960; VOGEL e cols., 1971; DEROCHÉ-GAMONET e cols., 2004; COOPER e cols., 2007; PELLOUX e cols., 2007). Porém, esse tipo de estímulo requer um tempo para o treinamento dos sujeitos e a necessidade de privação de água ou alimento e/ou uso do choque. Além disso, testes controle são necessários para avaliar o efeito da influência de diversas variáveis motivacionais (fome, sede, nocicepção) nos processos de aprendizagem e memória, ao invés do efeito do tratamento experimental *per se*.

Por outro lado, a utilização de estímulos não-condicionados possui um maior grau de validade ecológica e são menos susceptíveis ao efeito de diferentes variáveis (RODGERS, 2010). Sob esse ponto de vista, a utilização de estímulos naturalmente aversivos (por exemplo, modelo de predador) nos testes de conflito pode ser uma opção viável para favorecer a exibição de um amplo repertório comportamental diante de um cenário mais naturalístico.

BARROS e cols (2000) desenvolveram um novo modelo etológico para estudo do medo e da ansiedade em primatas não-humanos denominado de Teste de Confronto com Predador (*Marmoset Predator Confrontation Test* – MPCT). Esse emprega como estratégia a exposição a predadores taxidermizados (ex. *Felis tigrinal* gato-do-mato) para induzir respostas de medo e ansiedade em calitriquídeos (BARROS e cols., 2000; BARROS e cols., 2001; BARROS e cols., 2004; DACIER e cols., 2006; BARROS e cols., 2008; CAGNI e cols., 2011). Em roedores, modelos etológicos que envolvem interação presa-predador também tem sido amplamente utilizado em estudos de ansiedade (GRIEBEL e cols., 1996; BLANCHARD e cols., 1998, 2003; GUIMARÃES-COSTA e cols, 2007). Nesse contexto, a indução de um conflito envolvendo um estímulo com potencial reforçador (alimento altamente palatável) *versus* um estímulo aversivo (modelo de predador taxidermizado) pode ser uma ferramenta útil para estudos de dependência/compulsão alimentar.

Outras alternativas também podem ser empregadas no estudo dos distúrbios alimentares utilizando modelos animais. É preciso considerar, em outra vertente, que humanos e animais exibem preferências individuais a certos locais, não apenas devido às características sensoriais do local, mas também a eventos que estão associados a esses

mesmos ambientes. Esses eventos associados podem alterar a resposta comportamental como resultado de um processo de aprendizado e memória (HUSTON e cols., 2013). Sob esse ponto de vista, vale destacar o uso do teste de preferência-condicionada-por-lugar (*conditioned-place-preference* – CPP), que é amplamente empregado para o estudo da dependência.

O teste de CPP tem se tornado uma alternativa para avaliar o efeito reforçador de uma variedade de drogas (e alimentos) com potencial de causar dependência (FIGLEWICZ e cols., 2004; WANG e cols., 2004; TZSCHENTKE, 2007; CHABRAWI e BARROS, 2011; MORALES e cols., 2012) e em estudos com diferentes espécies (CUNNINGHAM e cols., 2006; TZSCHENTKE, 2007; KAUN e cols., 2011). É baseado no processo de condicionamento pavloviano clássico, em que estímulos originalmente neutros adquirem propriedades motivacionais após serem apresentados repetidamente com estímulos incondicionados, tais como drogas de abuso (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006) e alimentos altamente palatáveis (LATAGLIATA e cols., 2010). Consequentemente, o estímulo neutro (agora já condicionado) adquire um “valor reforçador” que leva o indivíduo a buscá-lo ou preferi-lo (BARDO e BEVINS, 2000), estabelecendo uma relação entre o potencial reforçador do estímulo e as pistas do ambiente (HUSTON e cols., 2013). Várias características do estímulo, tais como cor, textura, forma ou cheiro podem ser usadas para obtenção de um condicionamento contextual (BARDO e BEVINS, 2000).

Uma grande vantagem do teste de CPP é a possibilidade de avaliar tanto o efeito reforçador do estímulo, seja esse natural ou farmacológico (TZSCHENTKE, 2007), assim como os efeitos aversivos de um tratamento (LAMMEL e cols., 2012; LEMOS e cols., 2012). Além disso, diversos outros fatores favorecem o uso do CPP como ferramenta experimental, tais como: simplicidade, baixo custo, necessidade de poucas sessões de pareamento, dispensa de procedimentos cirúrgicos prévios, realização da sessão teste na ausência do efeito do estímulo incondicionado (droga/alimento), possibilidade de medir diferentes aspectos comportamentais do animal, tais como locomoção e vigilância (BARDO e BEVINS, 2000) e sua aplicabilidade em diversos modelos animais (POMERANTZ e cols., 1992; HUGHES e cols., 1995; BARDO e BEVINS, 2000; MUELLER e STEWART, 2000). Portanto, o uso do teste de CPP e do teste de conflito consiste em ferramentas alternativas e viáveis em estudos da dependência (alimentar).

Alguns estudos discutem ainda sobre diferenças cruciais observadas nos distúrbios alimentares em humanos e em animais. Em alguns casos em humanos têm-se sentimentos subjetivos de angústia e perda de controle (ENGEL e cols., 2007; STEIN e cols., 2007), os quais são difíceis de serem demonstrados claramente em animais (CORWIN e BUDALEVIN, 2004). Dessa forma, a natureza subjetiva do estado emocional em humanos parece ser de fato um fator limitante para simulação de um distúrbio alimentar em modelos animais.

Porém, nesse contexto, o estresse é uma importante ferramenta (MATHES e cols., 2009). Em humanos, o estresse aumenta o potencial de reforço dos alimentos que são comumente consumidos e está associado ao início de episódios compulsivos (GREENO e WING, 1994; STICE, 2001; GOLDFIELD e cols., 2007). Portanto, modelos animais que investiguem alterações da ingestão alimentar induzida por estresse podem fornecer valiosas informações sobre a base biológica da compulsão/dependência alimentar (MATHES e cols., 2009).

1.5.2 Procedimentos para avaliação experimental do estresse

Vários modelos animais de estresse vêm sendo empregados na tentativa de induzir alterações no eixo HPA, dentre os quais temos: a privação de alimento, exposição ao frio, choque nas patas, pinçada na cauda, contenção física, exposição a um membro dominante da mesma espécie e o isolamento social (*para revisão*, MCEWEN e STELLAR, 1993).

O teste de ISI tem sido considerado como uma fonte potencial de estresse, medo e ansiedade em animais (SMITH e cols., 1998) e tem sido usado em estudos de estresse crônico e nos que visam compreender a gênese da depressão e distúrbios emocionais (HEIDBREder e cols., 2000; MIURA e cols., 2002; BRENES SÁENZ e cols., 2006; GÜNTHER e cols., 2008).

No teste de ISI, os animais são privados de manter contato visual, tátil, auditivo e/ou olfatório com o seu parceiro/grupo. Sabe-se assim que o isolamento social de longo prazo ou a separação dos membros do grupo pode causar disfunção homeostática e prejudicar a saúde do indivíduo (SMITH e cols., 2011), desencadeando respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse. Em alguns protocolos experimentais, os animais são removidos do seu grupo social para um novo ambiente, demonstrando que só a mudança no ambiente social pode ser uma fonte estresse (SCHAPIRO e cols., 1998; BLANCHARD e cols., 2001; OLSSON e WESTLUND, 2007).

Alterações no repertório comportamental são observadas em animais mantidos isolados. Ratos, por exemplo, exibem hiperatividade locomotora (SAHAKIAN e cols., 1977; GENTSCH e cols., 1982; HEIDBREder e cols., 2000; ELLIOT e GRUNBERG, 2005). Nesta perspectiva, a locomoção pode ser vista como um padrão indicativo de estresse.

Em primatas não-humanos, SMITH e cols (1998) demonstraram que o ISI gera um aumento imediato na emissão de vocalizações de afiliação e na locomoção, assim como na liberação de hormônios glicocorticoides. Outros estudos demonstram que primatas removidos do seu grupo social exibem hiperatividade do eixo HPA por um período de sete dias (GUST e cols., 1993) ou um aumento imediato de glicocorticoides (GENARO e cols., 2004; ARCE e cols., 2010).

Mudanças no padrão alimentar também têm sido observadas em resposta ao isolamento social. De fato, em macacos *rhesus*, o isolamento social e alterações de

hierarquia induziram mudanças nas concentrações de cortisol que se correlacionaram à escolha de dietas mais calóricas (ARCE e cols., 2010). Da mesma forma, uma exposição contínua a um estressor psicossocial em fêmeas subordinadas de *rhesus* resultou em uma ingestão excessiva de alimentos ricos em açúcar e gordura (MICHOPoulos e cols., 2012). Ademais, DALLMAN (2010) observou que alimentos altamente palatáveis reduziram a cascata de resposta ao estresse, diminuindo a concentração de cortisol circulante.

1.6 Primatas não-humanos como modelos animais no estudo da dependência

A maioria dos estudos pré-clínicos utiliza roedores como modelo animal para investigar o processo de dependência, seja por drogas ou alimentos (PUHL e cols., 2011; CORWIN e BABBS, 2012). Sem dúvida, experimentos com roedores são de suma importância e tem dado inúmeras contribuições para o entendimento atual dos mecanismos neurais que subsidiam o processo de dependência. Porém, estudos com primatas não-humanos têm sido empregado com maior frequência em abordagens neurofarmacológicas e comportamentais (VALENTINUZZI e cols., 2008; ARCE e cols., 2010; CHABRAWI e BARROS, 2011; MELAMED e cols., 2013).

O uso de primatas não-humanos favorece a generalização dos resultados para humanos, já que os aspectos filogenéticos, a organização morfofuncional e os aspectos comportamentais e neuroquímicos são mais próximos do que qualquer outro modelo animal (HACIA e cols., 1998; PIGGOTT e cols., 1999; WEERTS e cols., 2007). A homologia genética entre primatas não-humanos e humanos é em torno de 95%, dependendo da espécie estudada (HACIA e cols., 1998). Além disso, o cérebro de primatas não-humanos apresentam todas as subdivisões do córtex pré-frontal vistas no cérebro humano (CARMICHAEL e PREUSS, 1994; PREUSS 1995).

Primatas, em geral, apresentam uma grande diversidade de sistemas sociais (ISBELL e YOUNG, 2002) e com isso são mais vulneráveis ao estresse psicossocial, exibindo também respostas similares a humanos (NORCROSS e NEWMAN, 1999; PRYCE e cols., 2005; FERRAZ e cols., 2011). É importante ressaltar ainda que, estudos em cativeiro apresentam vantagens comparados aos estudos de campo, por permitir o controle de variáveis específicas e evitar, dentro de certos limites, modificações ambientais como o que ocorre em condições naturais.

Por outro lado, utilizar primatas como sujeitos experimentais requer uma série de cuidados, de forma a assegurar resultados confiáveis e reprodutíveis em pesquisas biomédicas. A fim de evitar anormalidades comportamentais e/ou fisiológicas, faz-se necessário observar as necessidades específicas das espécies em termos de dieta, tipo de alojamento, espaço físico e oportunidades para reprodução e interações sociais. Outros aspectos também precisam ser considerados, como o estresse provocado por

procedimentos de manejo, a higiene, a consanguinidade, exames periódicos do estado de saúde, dentre outros (ANDRADE e cols., 2002).

A utilização de primatas do Novo Mundo, que exibem pequeno a médio porte, é uma vantagem que se reflete no seu baixo custo de manutenção em cativeiro e no bom índice de reprodução, requerendo pequenos espaços de manutenção e um custo inferior se comparado a outras espécies de primatas (CASTRO, 2007).

1.6.1 A espécie *Callithrix penicillata*

Os indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (Hershkovitz, 1977; Ordem: Primates; Família: Callitrichidae; Gênero: *Callithrix* – mico-estrela; Figura 3) têm sido estabelecidos como sujeito experimental em investigações biomédicas, comportamentais e neuropsicofarmacológicas (BARROS e TOMAZ, 2002). São primatas pequenos, que apresentam tufo pré-auriculares longos e negros, em forma de pincel. A coloração da pelagem é um misto de cinza, vermelho e amarelo, e exibem uma característica mancha branca na testa em formato de estrela, derivando então o seu nome popular (De VIVO, 1991; AURICCHIO, 1995). São animais diurnos e predominam nos biomas do Cerrado e da Caatinga (RYLANDS, 2000).

Com relação aos seus hábitos alimentares, são animais onívoros, exibindo uma estratégia generalista na obtenção de recursos (RYLANDS e FARIAS, 1993). Se alimentam de uma grande variedade de matéria vegetal (exsudatos/goma; sementes, flores, frutos, néctar) e animal (artrópodes, moluscos, filhotes de aves e mamíferos, anfíbios e pequenos répteis) (FERRARI e LOPES FERRARI, 1989; VILELA e FARIA, 2002). O forrageamento por frutos ocorre mais na estação chuvosa e a goma constitui a maior parte da alimentação vegetal na estação seca, de acordo com a disponibilidade dos recursos no ambiente (COIMBRA-FILHO, 1992).

Morfologicamente, apresentam dentes incisivos especializados na perfuração da casca de árvores gumíferas, estimulando a saída de exsudatos que lhes servem como fonte de carboidrato, cálcio e proteína (FERRARI e LOPES FERRARI, 1989). No entanto, devido ao gasto energético ser alto para extração de goma, há uma preferência por frutos quando esses estão disponíveis (RYLANDS e FARIAS, 1993). A dieta de micos é enriquecida com grande quantidade de insetos também. Segundo TEOBORGH (1983), animais de pequeno porte são mais ágeis e possuem maior capacidade para capturar presas que ficam expostas na superfície das folhas.

Dentro da hierarquia do gênero *Callithrix*, fêmeas exibem uma preferência por acesso a itens alimentares escassos e preferidos (TARDIF e RICHER, 1981; BOX, 1997). Já foi descrito em cativeiro que, fêmeas de *Callithrix jacchus* consomem uma maior quantidade de alimento e realizam a defesa do recurso contra machos adultos (MICHELS, 1998).

Os calitriquídeos exibem diferentes sistemas sociais entre monogamia, poliginia e poliandria (ABBOTT e cols., 1993). Vivem em grupos familiares estendidos de 3 a 15 indivíduos, incluindo um casal reprodutor com descendentes e/ou familiares de diferentes faixas etárias (STEVENSON e RYLANDS, 1988). Dentre os comportamentos mais expressivos nos calitriquídeos, destaca-se o afiliativo, caracterizado pela proximidade, marcação ou catação do parceiro; sendo considerado de grande significância devido ao forte vínculo entre os parceiros (EVANS, 1983).

Alguns estudos têm demonstrado similaridades entre humanos e indivíduos do gênero *Callithrix* em respostas comportamentais ao estresse, tais como separação mãe-infante (PRYCE e cols, 2004; 2005); separação do par heterossexual (JOHNSON e cols., 1996; LEÃO, 2001; NORCROSS e NEWMAN, 1999); mudanças ambientais (ROCHA, 2010); mudanças na alimentação e de parceiros de viveiro (FERRAZ e cols., 2011). Além disso, exibem similaridades anatômicas e funcionais de regiões do sistema nervoso envolvidas na resposta ao estresse e a patologias relacionadas (HONESS e MARIN 2006). Sob essa perspectiva, SOUSA e cols (2002) demonstraram que indivíduos do gênero *Callithrix* submetidos a um estressor físico, podem exibir respostas autonômicas e endócrinas ao estresse e modificar seus perfis comportamentais. Desse modo, os calitriquídeos constituem um bom modelo em estudos de estresse psicossocial e ambiental (NORCROSS e NEWMAN, 1999, SOUSA e cols., 2002; MANSFIELD, 2003; GALVÃO-COELHO e cols., 2008).

É preciso considerar ainda que calitriquídeos apresentam um tamanho corporal pequeno e com isso tornam-se susceptíveis a uma ampla gama de potenciais predadores, incluindo aves de rapina, serpentes e felídeos (EMMONS, 1987; HEYMANN, 1987, 1990). O elevado risco de predação tem exercido uma pressão seletiva sobre o seu repertório comportamental (CAINE, 1993; HART, 2007) e contribuído para a expressão de estratégias anti-predatórias na espécie, tais como: seleção de locais para dormir, dormir em grupos e formação de grupos mistos de diferentes espécies, presença de sentinelas, vocalizações específicas para predador e altas taxas de vigilância (FERRARI e LOPES FERRARI, 1990; PERES, 1993; HEYMANN, 1995; SAVAGE e cols., 1996; HARDIE e BUCHANAN-SMITH, 1997). Portanto, este primata constitui também um modelo experimental para estudos de respostas relacionadas à defesa induzida por predador, visto que sofrem altas taxas de predação entre os primatas (CHENEY e WRANGHAM, 1987).

Ainda nesse contexto, vários estudos demonstraram com sucesso a utilização da espécie *Callithrix penicillata* na investigação de respostas fisiológicas e comportamentais à drogas de abuso e a diferentes fármacos (BARROS e cols., 2003; MELLO e cols., 2005; DE SOUZA SILVA e cols., 2006; BARROS e cols., 2007; LIMA e cols., 2008; SILVA e cols., 2008; MELAMED e cols., 2013).

Com base no conjunto de fatores descritos acima, e considerando que o estresse crônico aumenta o consumo de alimentos palatáveis (DALLMAN e cols., 2003) e antecipa a compulsão alimentar (HAGAN e cols., 2003), primatas não-humanos, especificamente da espécie *Callithrix penicillata*, podem constituir um bom modelo para o estudo da dependência e de distúrbios alimentares.



Figura 3. Indivíduo da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) mantido em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (Foto: Aline Borges).

2.0 RELEVÂNCIA E ORIGINALIDADE

O aumento da prevalência de distúrbios alimentares constitui um problema grave na nossa sociedade. A ausência de hábitos alimentares saudáveis, associada à facilidade de acesso, diminuição do custo e aumento do consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura contribui para o aumento na prevalência das desordens alimentares (VOLKOW e WISE, 2005). Ademais, a elevada sensibilidade ao estresse cotidiano tem sido associada com o

aumento na busca e ingestão excessiva de alimentos altamente palatáveis, o que torna o indivíduo vulnerável ao aparecimento de distúrbios metabólicos.

Diante das limitações de estudos com humanos, contribuições significativas para estabelecer a relação entre os efeitos neuroquímicos, comportamentais e neuroendócrinos resultantes do consumo excessivo de alimentos altamente palatáveis poderão ser obtidas via modelos animais e, em particular, com primatas não-humanos. A importância de sua utilização recai na possibilidade de uma melhor generalização para os humanos dos resultados obtidos com primatas, do que com base em outras espécies (KING e cols., 1988; WEERTS e cols., 2007). Além disso, o desenho experimental proposto neste trabalho não só reproduziu com mais fidedignidade aspectos importantes da dependência/compulsão alimentar visto em humanos, como também nunca foram avaliados em uma espécie de primata não-humano.

3.0 HIPÓTESES

Com base no referencial teórico descrito acima, o presente estudo se baseou nas seguintes hipóteses:

a) o isolamento social é um fator gerador de estresse em primatas não-humanos da espécie *Callithrix penicillata* (micos-estrela);

b) alimentos altamente palatáveis são capazes de induzir um comportamento de CPP em micos-estrela;

c) a apresentação de um estímulo etologicamente aversivo inibe a busca e ingestão de alimentos altamente palatáveis por parte dos micos;

d) animais sob condição de estresse (psicossocial) mantêm um comportamento de busca e ingestão de alimentos altamente palatáveis, mesmo na presença de um estímulo aversivo.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento de busca e ingestão de alimentos altamente palatáveis em indivíduos adultos de uma espécie de primata não-humanos (micos-estrela; *Callithrix penicillata*), analisando o efeito de um estresse psicossocial e da presença de um estímulo etologicamente aversivo.

4.2 Objetivos específicos

a) Analisar as respostas comportamentais e as concentrações de cortisol sérico em micos-estrela adultos submetidos a um período de sete dias consecutivos de isolamento social involuntário (estresse psicossocial) – teste de ISI;

b) Avaliar se alimentos altamente palatáveis tem o potencial de induzir um quadro indicativo de dependência nos micos-estrela, similar ao que ocorre para drogas de abuso, via o estabelecimento de um comportamento de preferência-por-lugar condicionado à presença de chocolate – teste de CPP;

c) Verificar o efeito da presença de um estímulo naturalmente aversivo (modelo de predador) no perfil de busca e consumo de um alimento altamente palatável (chocolate) nos micos-estrela – teste de conflito;

d) Determinar se a exposição prévia a um estresse psicossocial (isolamento social involuntário) altera a resposta comportamental dos micos-estrela no teste de conflito;

e) Estabelecer pela primeira vez em uma espécie de primata não-humano o uso do teste de conflito como ferramenta no estudo dos mecanismos neuropsicobiológicos da compulsão (e dependência) por alimentos, assim como o uso do mico-estrela como modelo experimental nesse tipo de procedimento.

5.0 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Anexo I). Todos os preceitos éticos estipulados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) foram observados. O uso dos animais experimentais está de acordo com a lei Auroca (nº11.794), que regulamenta a experimentação animal no Brasil. O estudo foi realizado com animais mantidos em cativeiro no plantel permanente do Centro de Primatologia/UnB, que é credenciado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) como criadouro de primatas para fins científicos (Registro IBAMA, 1/53/1999/000006-2).

5.2 Sujeitos e condições gerais de alojamento

Em todas as etapas experimentais deste estudo foram utilizados animais adultos (>18 meses), de ambos os sexos, da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela). Os animais foram mantidos no CP/UnB em viveiros padrão (1 m de comprimento x 2 m de largura x 2 m de altura) e sob condições naturais de temperatura, umidade e luminosidade. As condições de alojamento estavam de acordo com as normas e regulamentos do IBAMA. A alimentação padrão foi fornecida uma vez ao dia, às 07:00 h da manhã, e as sobras retiradas às 17:30 h. A dieta consistiu em frutas, legumes, sementes e proteína (peito de frango cozido, ovos cozidos e/ou larvas de tenebre). Água e ração para primatas estavam disponíveis *ad libitum*, exceto quando mencionado. Vale ressaltar que todos os indivíduos utilizados nesse estudo se encontravam em boas condições de saúde, com peso mínimo para inclusão de 250g, conforme avaliação e acompanhamento mensal do médico veterinário do CP/UnB. Todos os animais foram pesados ao longo de cada estudo.

5.3 Procedimento experimental

O trabalho foi dividido em três estudos, conforme segue abaixo. A metodologia, os resultados e a discussão desses dados serão apresentados individualmente e em sequência para cada estudo.

- a) Estudo 1: Teste de Isolamento Social Involuntário;
- b) Estudo 2: Teste de Preferência-por-Lugar Condicionada à Presença de Chocolate;
- c) Estudo 3: Teste de Conflito Chocolate vs Predador.

6.0 ESTUDO 1: TESTE DE ISOLAMENTO SOCIAL INVOLUNTÁRIO (ISI)

Esse primeiro estudo teve como objetivo verificar se um isolamento social (involuntário), por um período de sete dias consecutivos, gera mudanças comportamentais e hormonais indicativas de estresse nos micos-estrela.

6.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 14 animais adultos, machos e fêmeas. Os sujeitos não foram privados de água e alimento em nenhuma etapa desse estudo e tiveram acesso livre a sua dieta regular, conforme descrita anteriormente. Os animais foram divididos em dois grupos, baseados no peso e na idade: Grupo Social (SOC: n=6; 3 machos e 3 fêmeas); Grupo Isolado (ISO: n=8; 4 machos e 4 fêmeas). O grupo SOC foi composto por dois pares heterossexuais (macho-fêmea) e um par homossexual (macho-macho), enquanto o grupo ISO foi formado por três casais macho-fêmea e um par fêmea-fêmea.

6.2 Procedimento experimental

O procedimento foi dividido em três fases, conforme esquema (Figura 4). Todas as etapas experimentais foram realizadas entre 13:30 e 17:00 h. Em cada dia de observação, os sujeitos foram testados/observados em uma ordem aleatória.

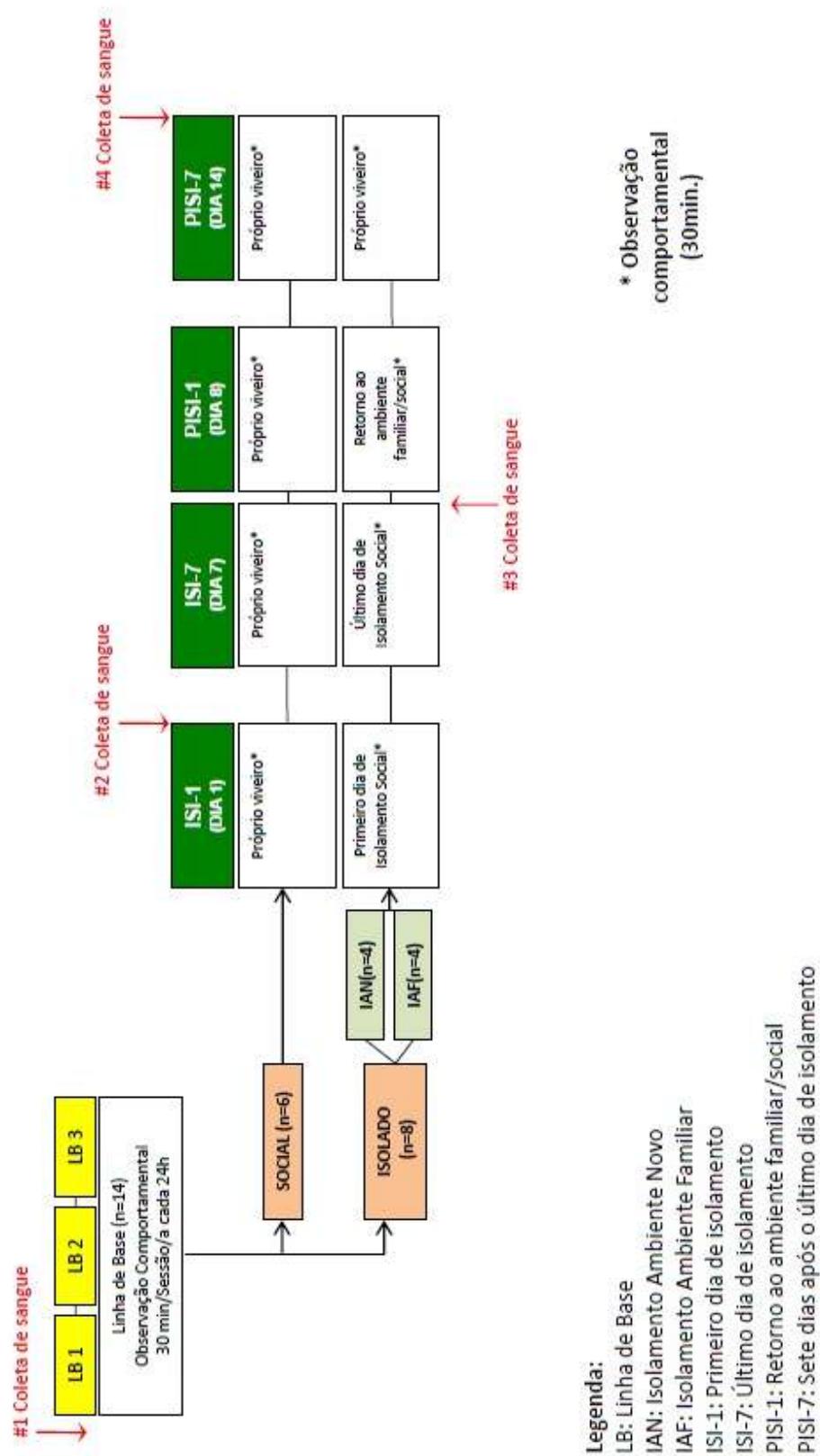


Figura 4. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 1.

6.2.1 Linha de Base

A primeira fase teve por objetivo observar o repertório comportamental dos indivíduos em seu viveiro de moradia e habituá-los à presença do experimentador. Consistiu em três sessões de observação comportamental, de 30 min cada, para cada sujeito, utilizando o método de animal focal com registro contínuo (ALTMANN, 1974). Nessas sessões não houve nenhuma manipulação experimental, sendo todos os grupos observados nos seus próprios viveiros de moradia e em sua condição social normal/padrão (aos pares) (Fase 1).

6.2.2 Teste de Isolamento Social Involuntário

A segunda e a terceira fase tiveram por objetivo avaliar as respostas comportamentais e hormonais dos micos-estrela submetidos a um ISI. Os animais do grupo ISO foram subdivididos em: Isolamento Ambiente Novo (IAN; n=4) – que foram removidos do seu viveiro de moradia e alocados em um novo viveiro padrão (ambiente novo); e Isolamento Ambiente Familiar (IAF; n=4) – com a saída do parceiro, os animais desse grupo foram mantidos isolados no seu próprio viveiro de moradia (ambiente familiar).

O ISI foi realizado por um período de sete dias consecutivos e durante essa fase os animais do grupo IAN e IAF não tiveram contato visual e tátil com o seu parceiro, contudo o contato auditivo e olfatório foi possível (Fase 2). Após esse período de isolamento, os animais do grupo IAN foram recolocados no ambiente familiar, junto com o seu respectivo parceiro social (do grupo IAF) e iniciou-se um intervalo de sete dias pós-ISI (Fase 3). Todos os animais do grupo SOC permaneceram no seu próprio viveiro e com o seu parceiro social pelos mesmos períodos durante todas as fases experimentais (Fase 2 e 3).

Foram realizadas quatro sessões de observação comportamental, de 30 min cada, para ambos os grupos: (1) uma no primeiro dia da Fase 2 (ISI-1), realizada imediatamente após o início do isolamento para os animais do grupo ISO; (2) uma no último dia da Fase 2 (dia 7, ISI-7); (3) uma no primeiro dia da Fase 3 (pós-ISI1), realizada imediatamente após o retorno ao ambiente familiar/social para os animais do grupo ISO; e (4) uma no último dia da Fase 3 (pós-ISI7, sete dias após à reunião). Os micos do grupo SOC permaneceram em seus próprios viveiros de moradia durante todo o estudo, mas foram observados nos mesmos dias que o grupo ISO.

6.3 Análise do Comportamento

Com o auxílio do programa de análises comportamentais Etholog® (OTTONI, 2000), dois observadores previamente treinados (com confiabilidade inter-observador de 95%) registraram os seguintes parâmetros comportamentais em cada sessão de 30 min: 1)

atividade locomotora: tempo em movimento dentro do viveiro; 2) *long call*: vocalização de contato social; 3) vigilância: duração da varredura contínua ou outros movimentos visíveis da cabeça, enquanto o animal permaneceu parado; 4) comportamentos afiliativos: frequência de proximidade ao parceiro (estar em uma distância < 5 cm do parceiro), catação do parceiro (movimentos repetitivos precisos e lentos da mão ou da boca na pele do parceiro) e/ou marcação do parceiro (esfregar a região anogenital no parceiro). Os comportamentos mensurados foram baseados em etogramas de calitriquídeos (STEVENSON e RYLANDS, 1988) e estudos similares realizados anteriormente (BARROS e TOMAZ, 2002).

Para cada parâmetro analisado, os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos e o erro padrão da média (+epm). Para fins de comparação, foi calculada a média aritmética das três sessões realizadas na linha de base, gerando um único valor – a sessão ISI-0 (controle).

6.4 Coleta de Sangue e Análise Hormonal

Foram coletadas quatro amostras de 1,0 mL, ao longo do estudo: (1) antes dos procedimentos experimentais (LB, linha de base); (2) 30 min após o início do período de ISI (ISI-1); (3) no dia 7 do período de isolamento (ISI-7); e (4) 7 dias após o reencontro com o parceiro social (pós-ISI7). O período de realização das coletas foi entre 13:30 e 17:00 h, sempre no mesmo horário para evitar o efeito da variação circadiana de cortisol (COE e LEVINE, 1995).

Para cada coleta de sangue, o sujeito foi capturado imediatamente após os 30 min da observação comportamental e levado para uma sala de procedimento localizada adjacente ao pavilhão de moradia dos calitriquídeos. O sujeito foi capturado diretamente no viveiro em que estava, com auxílio de um puçá e luvas de couro, e levado à sala de procedimento. O animal foi então anestesiado com isofluorano (Fluorane[®]) por via inalatória, com auxílio de um vaporizador universal. Uma vez que os movimentos voluntários cessaram e a respiração visivelmente estabilizou, 1,0 mL de sangue foi obtido por punção da veia femoral, por um médico veterinário do CP/UnB. Após o efeito da anestesia (1-2 min), o indivíduo foi levado de volta ao viveiro em que estava alojado e monitorado pelos próximos 15-30 min.

A amostra de sangue foi imediatamente colocada em um tubo de 4 mL com ativador de coagulação e mantida resfriada até seu processamento inicial. As mesmas foram então centrifugadas a 3.000 rpm, por 5 min, à temperatura ambiente e o sobrenadante (soro) coletado e congelado à -20°C até sua análise. O soro foi analisado posteriormente para a determinação da concentração sérica de cortisol (diluído a um fator de 1:50 – LIMA e cols, 2008; kits diluentes L2M1Z - Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA) com uso de kits comerciais (L2KCO6; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA) para ensaio

imunoenzimático por quimioluminescência (*chemiluminescence enzyme-immunoassay*) do sistema automatizado IMMULITE 2000®. A sensibilidade do ensaio de cortisol foi de 0,20 ng/dL, e o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio foram de 9,4% e 7,4%, respectivamente. Toda a dosagem de cortisol foi realizada em parceria com o Laboratório Sabin® (Distrito Federal).

A concentração sérica de cortisol foi calculada como um percentual observado na linha de base (LB), considerada como 100%. A duração total de cada coleta (i.e., tempo gasto desde a entrada no viveiro para captura do indivíduo até o fim da venipuntura) foi registrada para verificar alguma possível influência do procedimento no conteúdo hormonal. Em média, o tempo requerido para obtenção das amostras ($3,3 \pm 0,2$ min) estava dentro da faixa previamente descrita na literatura, por não influenciar significativamente as concentrações de cortisol em micos (SALTZMAN e cols., 1994). É importante ressaltar também que o anestésico isoflurano pode alterar as concentrações de cortisol em animais e humanos, no entanto este efeito só é significativo durante um procedimento de exposição a longo prazo (>30 min) (NISHIYAMA e cols., 2005; ZARDOOZ e cols., 2010).

6.5. Análise estatística

Como não houve diferença estatística entre os grupos IAN e IAF, para todos os parâmetros analisados (dados não apresentados), foi considerado para fins de análise um único grupo - grupo isolado (ISO: IAN + IAF). Os dados referentes a machos e fêmeas também foram analisados juntos, uma vez que não houve diferença significativa entre os gêneros (dados não apresentados). Foram analisadas então possíveis diferenças entre os grupos experimentais (social e isolado) e entre as sessões dentro de um mesmo grupo (LB; ISI-1; ISI-7; pós-ISI1; pós-ISI7).

A concentração de cortisol sérico e os dados comportamentais (locomoção, *long call*, comportamentos afiliativos e vigilância) foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*), sendo o 'grupo' o fator independente e a 'sessão' a variável dependente. Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$. Para a análise do comportamento afiliativo, os dados das sessões ISI-1 e ISI-7 do grupo SOC foram excluídos para possibilitar uma comparação direta entre os grupos. A concentração de cortisol (em $\mu\text{g/dL}$) foi correlacionada com o tempo requerido para obtenção da amostra de sangue pelo cálculo de coeficiente de correlação de Pearson.

6.6 Resultados

Para a atividade locomotora, foi observado que o grupo ISO, ao ser isolado (ISI-1), aumentou significativamente o tempo de locomoção comparado à sua sessão de linha de base (grupo: $F_{1,12}=2,07$, $p=0,18$; sessão: $F_{4,48}=3,04$, $p<0,05$; interação: $F_{4,48}=2,95$, $p<0,05$; Figura 5). Esta resposta diminuiu no último dia do período de ISI, não diferindo mais da linha de base ou do grupo SOC. O padrão de atividade locomotora do grupo SOC permaneceu constante ao longo do experimento e foi semelhante ao grupo ISO nas sessões de linha de base e na última sessão de pós-ISI.

Com relação à frequência de emissão de vocalização do tipo *long call*, os indivíduos do grupo ISO passaram mais tempo vocalizando imediatamente após serem isolados (ISI-1) e depois do reencontro (pós-ISI1) com o seu parceiro social, quando comparado aos valores da LB. No entanto, este padrão não foi estatisticamente significativo (grupo: $F_{1,12}=2,79$, $p=0,12$; sessão: $F_{4,48}=1,23$, $p=0,31$; interação: $F_{4,48}=2,95$, $p=0,27$; Figura 5). Os animais do grupo SOC, por sua vez, emitiram baixas e constantes vocalizações *long call* durante todo o período do estudo.

Para o comportamento de vigilância, foi visto que os indivíduos de ambos os grupos gradualmente diminuíram o tempo de vigilância, atingindo um nível de significância na sessão pós-ISI1 (reunião) em comparação com a LB (grupo: $F_{1,12}=0,75$, $p=0,40$; sessão: $F_{4,48}=3,14$, $p<0,05$; interação: $F_{4,48}=0,89$, $p=0,48$; Figura 5).

Foi observado ainda um aumento significativo na frequência de comportamentos afiliativos quando os animais do grupo ISO foram reunidos com o seu parceiro social, comparado a frequência inicial observada na LB (grupo: $F_{1,12}=2,19$, $p=0,16$; sessão: $F_{2,24}=3,38$, $p<0,05$; interação: $F_{2,24}=6,74$, $p<0,05$; Figura 5). O grupo SOC, por sua vez, exibiu uma baixa frequência de comportamentos afiliativos ao longo do estudo, tendo-se valores similares ao grupo ISO na sessão LB e pós-ISI7.

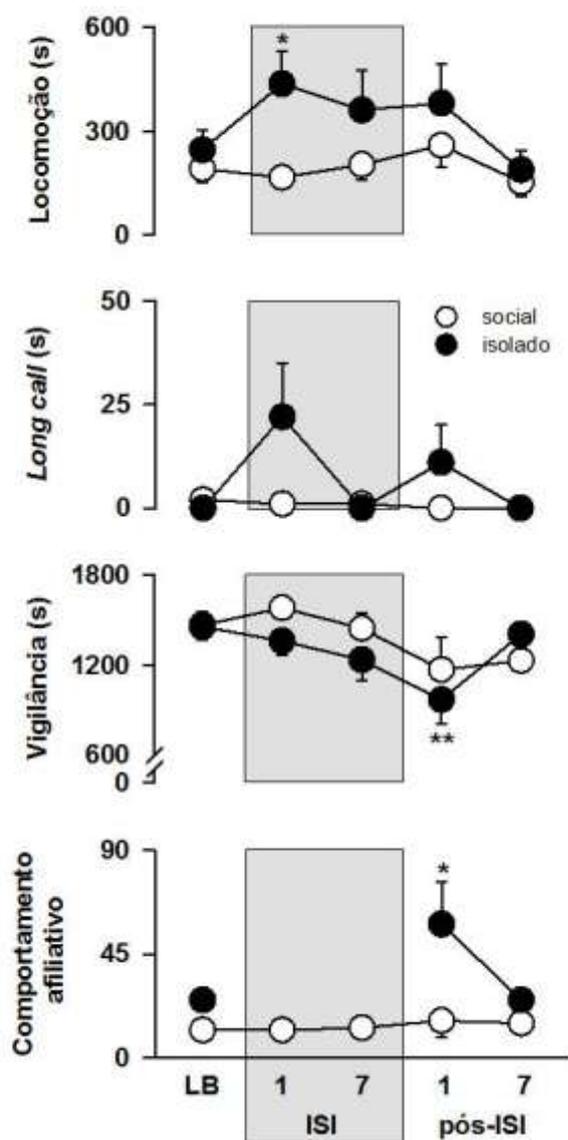


Figura 5. Média (\pm e.p.m) dos parâmetros comportamentais registrados durante os 30 min de observação na sessão de linha de base (LB), no primeiro e no último dia de ISI e no primeiro e no último dia após re-encontro com o parceiro social (pós-ISI). Superior: atividade locomotora (em segundos); média superior: long call (em segundos); média inferior: vigilância (em segundos); inferior: comportamentos afiliativos (frequência). Grupo social (n=6); grupo isolado (n=8). O grupo social permaneceu em seu próprio viveiro durante todo o estudo. * $p < 0,05$ vs LB para o grupo isolado; ** $p < 0,05$ vs LB para ambos os grupos.

Em termos da concentração de cortisol, não foram verificadas diferenças significativas entre as sessões, grupos experimentais e/ou interação sessão vs grupo (grupo: $F_{1,12}=0,02$, $p=0,89$; sessão: $F_{3,36}=0,76$, $p=0,48$; interação: $F_{3,36}=0,47$, $p=0,63$; Figura

6). Em média, o tempo requerido para obtenção das amostras foi de $3,3 \pm 0,2$ min, o que está dentro da faixa limite esperada para não alterar os níveis hormonais do eixo HPA. Além disso, a concentração de cortisol não se correlacionou com o tempo requerido para coleta de qualquer uma das amostras de sangue (amostra LB: $r=-0,23$, $p=0,46$; amostra ISI-1: $r=0,06$, $p=0,85$; amostra ISI-7: $r=-0,04$, $p=0,90$; amostra pós-ISI7: $r=-0,25$, $p=0,38$).

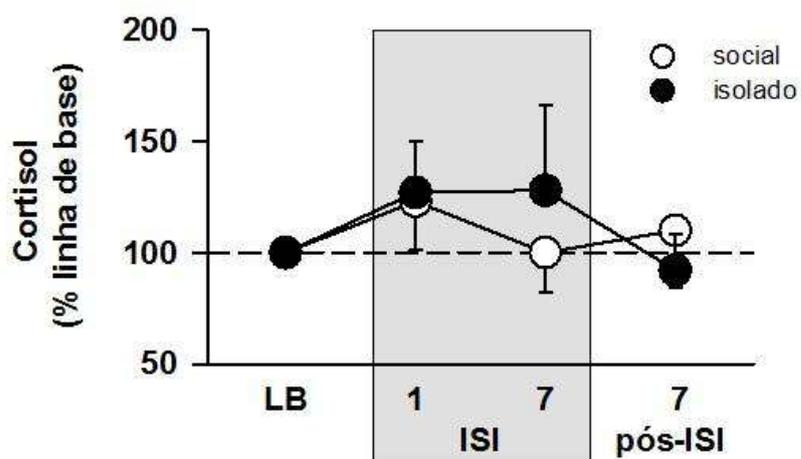


Figura 6. Concentração de cortisol sérico (média \pm e.p.m. - expressa como % da linha de base – LB) observada 30 min após o início do isolamento social involuntário (ISI1), no último dia do isolamento (ISI7) e sete dias após o re-encontro com o parceiro social (pós-ISI7), nos animais do grupo social ($n=6$) e grupo isolado ($n=8$). O grupo social foi mantido no seu viveiro durante todo o estudo.

6.7 Discussão

No presente estudo, os animais do grupo ISO, aumentaram significativamente o tempo de locomoção ao serem isolados, mas diminuíram essa resposta no último dia do período de isolamento. A atividade locomotora é um índice comportamental não-invasivo de estresse em micos e fornece um indicativo de agitação no animal, o que pode reduzir o seu bem-estar (SMITH e cols., 1998; BASSET e cols., 2003). Um aumento na atividade locomotora em resposta a diferentes estressores também tem sido observada em outras espécies de primatas (MENDOZA e MASON, 1986; LEVINE e cols., 1993; HENNESSY e cols., 1995; HEIDBREder e cols., 2000; BASSET e cols., 2003). Ademais, roedores também exibem hiperatividade locomotora em resposta ao isolamento social (BAKSHI e GEYER, 1999; HEIDBREder e cols., 2000). KAUSHAL e cols (2012) demonstraram que camundongos socialmente isolados exibem um aumento da atividade locomotora, comparado a camundongos pareados em sua própria gaiola. Outros estudos também demonstraram que o isolamento produz comportamentos de ansiedade em roedores em

uma variedade de testes comportamentais (LUKKES e cols, 2009a; LUKKES e cols, 2009b).

Portanto, o aumento da atividade locomotora em micos neste estudo pode ser um indicativo de estresse em resposta ao ISI. Esse aumento pode ser produzido por diversos fatores, incluindo a separação do parceiro (LEVINE e cols., 1993), a novidade (HENNESSY e cols., 1995) e a exploração do ambiente novo (HEIDBREder e cols, 2000). SMITH e cols (1998) evidenciaram que indivíduos da espécie *Callithrix kuhli*, mantidos isolados em um ambiente novo, exibem níveis elevados de locomoção. Vale ressaltar que, neste estudo metade dos indivíduos do grupo isolado foi submetido ao estresse ambiental (IAN), embora não tenha sido verificado uma diferença significativa entre os grupos (IAN e IAF) em resposta ao novo ambiente (*dados não apresentados*).

A separação involuntária de micos do seu grupo familiar ou coespecífico pode provocar uma resposta comportamental caracterizada por uma alta produção de vocalizações do tipo *long call* (EPPLÉ, 1968; POOK, 1978; JONES e cols., 1993; NEWMAN, 1995). Já tem sido demonstrado em micos cativos a emissão de *long calls* em um contexto territorial, bem como após separação dos membros do grupo, em resposta ao isolamento social (STEVENSON e RYLANDS, 1988; NORCROSS e NEWMAN, 1993; YAMAGUCHI e cols., 2010). Conforme já descrito na literatura, neste estudo, os animais que foram isolados passaram mais tempo vocalizando imediatamente após o isolamento e depois do reencontro com o parceiro social, embora este perfil não tenha sido estatisticamente significativo.

Alguns fatores influenciam a emissão de vocalização em primatas, tais como o ambiente social, a maturação física e a fisiologia reprodutiva (NORCROSS e NEWMAN, 1997). Em adultos, a resposta à separação do seu coespecífico pode depender da intensidade de ligações afiliativas entre os membros do grupo (MENDONZA e MASON, 1986; MENDONZA e cols., 1991). A vocalização intragrupo é particularmente emitida por animais reprodutores e pareados, enquanto que adultos não-pareados e juvenis raramente produzem este subtipo vocal (SNOWDON e cols., 1986). Por outro lado, devido ao isolamento aumentar os riscos de predação em micos, a vocalização facilita o reencontro com o parceiro ou grupo social e, portanto, vocalizações de isolamento são emitidas por micos de todas as idades e ambos os sexos após separação social (EPPLÉ, 1968; NORCROSS e NEWMAN, 1993).

A eventual supressão de vocalizações do tipo *long call* durante o isolamento pode vir a ter um caráter adaptativo. Animais que não vocalizam passam a conservar mais energia e ser menos susceptíveis ao ataque de predadores (HENNESSY, 1997). Contudo, vale ressaltar que, para alguns pesquisadores, o estresse induzido por um ISI pode não estar relacionado ao número de vocalização (COE e cols., 1978, 1983; LEVINE e cols., 1993; *porém vide* GUNNAR e cols., 1980; HENNESSY, 1997). Os resultados do presente estudo

não demonstraram uma relação significativa entre o isolamento social e a frequência de *long call*, embora os animais do grupo ISO tenham vocalizado aparentemente mais no primeiro dia de isolamento e após o reencontro. Diferenças entre os grupos utilizados neste estudo (gênero, idade, interação afiliativa) e o número de sujeitos podem ter influenciado esse resultado.

O risco de predação parece exercer uma importante pressão seletiva que influencia alguns aspectos da ecologia comportamental de primatas neotropicais (CAINE, 1993). Calitriquídeos, devido ao seu tamanho corporal pequeno, são altamente susceptíveis a potenciais predadores (HART, 2007) e, por isso, esses indivíduos exibem altos níveis basais de vigilância (FERRARI e LOPES FERRARI, 1990; NUNES e cols., 2010).

GOSSELIN-ILDARI e KOENIG (2012) demonstraram em *Callithrix jacchus* que, indivíduos em um grupo pequeno são mais vigilantes que aqueles em grupos médios ou grandes, corroborando a ideia de que indivíduos em grupos grandes estão seguros. Considerando um outro cenário ecológico nas condições de cativeiro, em que todos os indivíduos do estudo são mantidos apenas com o seu parceiro social, conforme esperado, os animais do grupo ISO ao retornarem à presença do parceiro social, diminuíram os níveis de vigilância já que possivelmente diminuiu-se os riscos de predação no seu ambiente de moradia e talvez a presença do parceiro atenuou os efeitos aversivos do estresse (GALVÃO-COELHO e cols., 2012). Porém, curiosamente, a diminuição da vigilância foi similar ao grupo SOC, o que talvez possibilite inferir que o perfil de vigilância não foi influenciado *per se* pela fase de isolamento social.

De acordo com HIRSCH (2002), é difícil distinguir a função ou o alvo da vigilância em primatas, uma vez que, além de compor um amplo repertório anti-predação (HARDIE e BUCHANAN-SMITH, 1997; SMITH e cols., 2004; BARROS e cols., 2008; STOJAN-DOLAR e HEYMANN, 2010), a vigilância atua em diversos componentes, como no monitoramento social, na busca de fontes de alimentos, na defesa do grupo ou do parceiro social e na vigilância maternal, impedindo infanticídio (BALDELLOU e HENZI 1992; TREVES e cols., 2003; KUTSUKAKE, 2007). Não está claro, portanto, qual fator gerou essa diminuição de vigilância nos grupos e nas sessões experimentais no presente estudo. É preciso considerar ainda que os parâmetros comportamentais de locomoção e vigilância são registrados de forma mutuamente exclusivas e já tem sido evidenciada uma correlação negativa entre vigilância e locomoção nesta espécie (BARROS e cols., 2004).

Neste estudo, os animais mantidos isolados aumentaram significativamente a frequência de comportamentos afiliativos após o reencontro com o seu parceiro social, em comparação com a frequência inicialmente observada na LB. Nesse contexto, SMITH e cols (1998) também demonstraram que, indivíduos da espécie *C. kuhli* passam mais tempo em proximidade com o parceiro quando são retornados de um período de isolamento em um

novo ambiente. Similarmente fêmeas de *C. kuhli*, após um período de 7h de separação, buscam mais proximidade com os seus parceiros sociais (FRENCH e cols., 2007). Além disso, indivíduos da espécie *C. geoffroyi* também exibem níveis aumentados de comportamentos afiliativos após isolamento social (SMITH e cols., 2011). Outros estudos também demonstraram um aumento do comportamento de busca por proximidade durante o reencontro com um parceiro social em primatas, após diferentes períodos de separação (SHEPHERD e FRENCH,1999; FRENCH e cols., 2007). Esse aumento parece visar estabelecer novos laços sociais e/ou promover um mecanismo de lidar com o ambiente social instável (FRENCH, 2007), o que está de acordo com o resultado obtido no presente estudo. Estudos com roedores também demonstraram ocorrer um aumento de comportamento afiliativos e interação social após um período de isolamento (SHIMOZURU e cols., 2008; LIEBERWIRTH e cols., 2012). Ratos isolados mostram uma preferência condicionada por lugar para uma gaiola associada com um coespecífico, sugerindo que a restrição da experiência social pode tornar as interações sociais mais reforçadoras (DOUGLAS e cols.,2004). Nesse sentido, sabe-se que a presença de um coespecífico conhecido pode ter um efeito ansiolítico, eliminando o estresse e diminuindo os níveis de ansiedade encontrado em animais socialmente isolados (KIKUSUI e cols, 2006; DEVRIES e cols., 2007; FRENCH e cols., 2012).

A avaliação de uma resposta ao estresse é melhor compreendida utilizando uma combinação de fatores fisiológicos e comportamentais, os quais podem ser úteis como indicadores de bem-estar, uma vez que o comportamento nem sempre é uma demonstração clara da condição fisiológica do sujeito (MASON e MENDL, 1993; DUNCAN e FRASER, 1997; NORCROSS e NEWMAN, 1999). Além das mudanças comportamentais já descritas, vários estudos demonstram alterações fisiológicas em resposta ao isolamento (CACIOPPO e cols., 2015).

No presente estudo, não foram verificadas alterações significativas nos níveis de cortisol em resposta ao ISI. Diferentemente dos resultados obtidos aqui, já foi demonstrado que o isolamento social pode induzir mudanças fisiológicas indicativas de estresse em micos (JOHNSON e cols.,1996; SMITH e FRENCH, 1997; SMITH e cols.,1998; NORCROSS e NEWMAN, 1999; CROSS e cols., 2004; SMITH e cols.,2011; GALVÃO-COELHO e cols., 2012; CININI e cols., 2014), em outras espécies de primatas (MENDOZA e MASON, 1986; SAPOLSKY e cols.,1997; LYONS e cols.,1999) e em roedores (CASTRO e MATT, 1997; DRONJAK e cols., 2004; FERLAND e SCHRADER, 2011; GARRIDO e cols., 2012; MCNEAL e cols., 2014). No entanto, corroborando o presente estudo, macacos de cheiro (*Saimiri* sp.) também não exibiram alterações de cortisol após 1 h de isolamento social (MENDOZA e MASON, 1986). Por outro lado, no mesmo estudo, indivíduos do gênero *Callicebus* demonstraram um aumento na concentração de cortisol durante a

separação, comparado aos níveis de linha de base. Em roedores, um período de isolamento agudo (isolamento único por 1h ou isolamento por 1h diária durante 4 semanas) resultou em um aumento nas concentrações de corticosterona, enquanto um isolamento crônico por 4 semanas não afetou o perfil plasmático desse hormônio (POURNAJAFI-NAZARLOO e cols., 2011). Nota-se que indivíduos da mesma espécie ou de espécies distintas podem reagir de diferentes formas a situações de estresse e fatores como gênero, tempo de isolamento, tipo de estressor, parentesco com o par social, experiência prévia com o contexto e interpretação cognitiva devem ser considerados em situações de resposta ao estresse (BOCCIA e cols.,1995; POURNAJAFI-NAZARLOO, e cols., 2011; GALVÃO-COELHO e cols.,2012).

É preciso considerar ainda que micos exibem naturalmente altas concentrações de corticosteroides circulantes e manifestam um estado de resistência aos glicocorticoides como parte de seu estado fisiológico normal, diminuindo a capacidade de resposta do tecido alvo para cortisol (YAMAMOTO e cols.,1977; CHROUSOS e cols.,1982). Diante de tal premissa, supõem-se que devido à alta concentração no estado basal, a mensuração de um aumento nos níveis de cortisol em resposta a um agente estressor possa ser menos evidente.

Embora as concentrações de cortisol sejam amplamente utilizadas para avaliar respostas ao estresse em animais (GUST e cols.,1994; SALTZMAN e cols.,1994), a obtenção de uma amostra de sangue por punção venosa requer a captura, a contenção e o isolamento temporário do animal, o que por sua vez pode aumentar a atividade do eixo HPA ou mascarar às respostas a tratamentos experimentais (CROCKETT e cols.,1993; HENNESSY e cols.,1995). Vários estudos realizados em micos optam por outros métodos de mensuração de cortisol, como a dosagem na urina, fezes ou saliva (SMITH e FRENCH, 1997; BASSET e cols.,2003; RUKSTALIS e FRENCH, 2005; CROSS e ROGERS, 2006; SMITH e cols., 2011; GALVÃO-COELHO e cols., 2012). No entanto, no presente estudo, não foi verificada uma correlação entre tempo de obtenção da amostra de sangue e a concentração de cortisol, o que corrobora a ideia de que a coleta não foi *per se* um fator limitante. Ademais, já tem sido demonstrado que primatas se adaptam às condições de estresse e que estímulos que inicialmente geravam um aumento nas concentrações de cortisol, após exposições repetidas deixam de gerar um efeito devido à familiarização e adaptação (CLARKE, 1991; CROCKETT e cols.,1993).

Com base no exposto, é preciso destacar que os sujeitos experimentais do presente estudo são periodicamente submetidos rotinas de manejo do plantel do CP/UnB, incluindo coleta de sangue, mudanças de ambiente (viveiro) e separação/introdução em outros grupos sociais. Tais aspectos podem ter contribuído para uma habituação fisiológica ao ISI e consequentemente à manutenção da concentração de cortisol observada. Portanto, uma

dissociação entre as respostas comportamentais e fisiológicas é frequentemente observada em estudos de estresse, demonstrando que o comportamento não é sempre uma indicação clara da condição fisiológica do sujeito e vice-versa (HENNESSY, 1985; NORCROSS e NEWMAN, 1999; HENNESSY e col., 2008), conforme observado neste estudo.

6.8 Conclusões preliminares

1) O ISI induziu alterações no perfil de locomoção nos e comportamentos afiliativos dos micos, sendo possíveis indicadores comportamentais de uma resposta ao estresse;

2) Os níveis de vigilância diminuíram gradativamente, em ambos os grupos, sugerindo que esse efeito pode ter ocorrido independentemente do ISI sendo testado;

3) O ISI também não induziu mudanças na concentração de cortisol circulante, conforme relatado em outros primatas;

4) Conclui-se, portanto, que micos-estrela submetidos ao teste de ISI, por sete dias consecutivos, exibiram mudanças comportamentais indicativas de estresse, os quais não foram acompanhados de alterações nas concentrações de cortisol, indicando uma possível dissociação entre as respostas comportamentais e fisiológicas.

7.0 ESTUDO 2: TESTE DE PREFERÊNCIA-POR-LUGAR CONDICIONADA (CPP) À PRESENÇA DE CHOCOLATE

O segundo estudo teve como objetivo avaliar as propriedades reforçadoras da ingestão de chocolate em micos-estrela via o teste de CPP. De forma geral, buscou determinar se o chocolate é um alimento com potencial de causar dependência em micos, para posteriormente ser utilizado como estímulo reforçador no Estudo 3. Para tanto, foram realizados dois protocolos, com os seguintes objetivos específicos:

a) **Estudo 2A:** Avaliar se micos adquirem uma preferência-por-lugar condicionada à presença de chocolate e se essa resposta persiste após um período de 24h e 15 dias.

b) **Estudo 2B:** Verificar se micos exibem uma resposta de preferência-por-lugar condicionada à presença de um alimento altamente palatável e calórico (chocolate) vs um alimento com baixo valor calórico (ração).

7.1 Estudo 2A

7.1.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 14 animais adultos (7 machos e 7 fêmeas). A dieta padrão foi fornecida normalmente a todos os sujeitos. Porém, para padronizar a latência desde a última ingestão de comida entre os sujeitos, o alimento foi retirado de cada viveiro 2h antes dos animais serem submetidos às sessões de condicionamento (*vide* procedimento abaixo). Água foi disponibilizada *ad libitum* e a dieta padrão foi fornecida diariamente após o término da observação comportamental. Todas as etapas experimentais foram realizadas entre 13:30 e 17:00 h, sob condições naturais de luminosidade, temperatura e umidade.

7.1.2 Aparato experimental: caixa de preferência-condicionada-por-lugar

Foi utilizada uma caixa de CPP, que consistiu em uma arena retangular (60cm x 30cm x 30cm), suspensa a 1,5m do chão sob suporte metálico (Figura 7). A parede frontal (60cm x 30cm) foi feita de vidro 4mm e os demais lados de alumínio. A caixa foi dividida em dois compartimentos de tamanho idêntico (30cm x 30cm x 30cm), separados por uma parede de alumínio fixa: um deles tinha a cor branca com pisos e paredes lisas (compartimento branco), enquanto o outro era preto com piso e paredes de textura ondulada (compartimento preto). Cada compartimento tinha uma porta lateral retrátil que possibilitou a entrada e a saída do aparato, não havendo comunicação interna entre eles. Além disso, um prato de aço inox (9cm de diâmetro – suporte alimentar) foi encaixado em um orifício no piso de cada compartimento, próximo à parede oposta à porta retrátil (Figura 8). Sete caixas idênticas de CPP foram construídas para cada díade testada e colocadas dentro do viveiro com a parede de vidro voltada para o corredor interno do pavilhão dos micos, possibilitando a observação e registro do comportamento.



Figura 7. Fotografia da caixa de CPP – Vista frontal. (Foto: Aline Borges).



Figura 8. Fotografia da caixa de CPP evidenciando os dois compartimentos distintos (branco e preto), as portas de acesso lateral e os suportes alimentares. (Foto: Aline Borges).

7.1.3 Alimento teste

Durante a fase de condicionamento (*vide* procedimento abaixo), foi fornecido como reforço alimentar 50 g de chocolate ao leite, cortados em pequenos pedaços de tamanho similar (Lacta®; 131 kcal (5,24kcal/g) – Gordura: 7g; Carboidratos: 15g; Proteínas: 1,5g).

7.1.4 Procedimento experimental

O procedimento foi dividido em três fases consecutivas, conforme esquema apresentado em seguida (Figura 9).

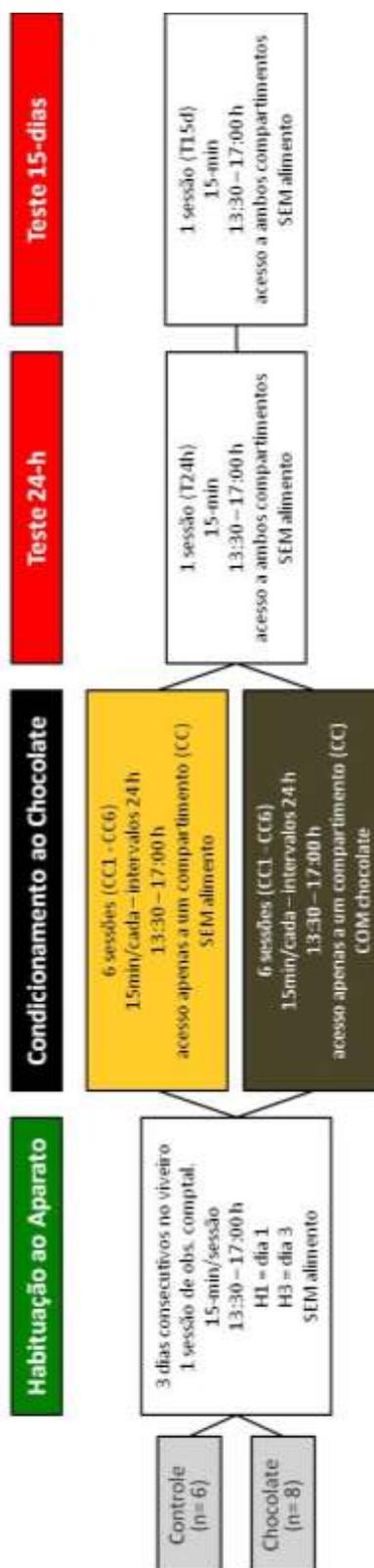


Figura 9. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 2A.

7.1.4.1 Habituação ao aparato

O objetivo desta fase foi habituar os micos à caixa de CPP e avaliar qualquer preferência natural a um dos compartimentos do aparato antes das sessões de condicionamento. Para tanto, a caixa de CPP foi colocada inicialmente dentro do viveiro e cada díade teve acesso livre por 24 h a todo o aparato experimental, durante dois dias consecutivos. No dia 03, uma sessão de 15 min de observação comportamental foi realizada (sessão pré-CPP) e posteriormente a porta lateral de acesso de cada compartimento foi fechada até a próxima sessão. Durante essa fase nenhum reforço alimentar foi fornecido.

7.1.4.2 Condicionamento ao chocolate

O objetivo desta fase foi induzir um comportamento de preferência-por-lugar condicionado à presença de um alimento altamente palatável (chocolate). Esta fase teve início 24 h após a última sessão de habituação.

Cada díade foi aleatoriamente designada a um dos dois grupos experimentais:

- a) Grupo Controle (CTRL; 3 machos e 3 fêmeas)

- b) Grupo Chocolate (CHOCO; 4 machos e 4 fêmeas)

Nesta fase, os sujeitos foram submetidos durante seis dias consecutivos (C1-C6) a uma sessão diária de condicionamento de 15 min. Nessas sessões tiveram acesso a apenas um dos compartimentos da caixa de CPP, enquanto que o compartimento oposto foi mantido fechado durante todo o experimento. Metade dos pares foi aleatoriamente condicionada ao compartimento branco e metade ao compartimento preto. Os sujeitos de um mesmo viveiro foram condicionados simultaneamente e ao mesmo compartimento. Antes do início de cada sessão comportamental, um observador experiente entrou no viveiro e abriu a porta do compartimento condicionado pré-estabelecido. Além disso, ele disponibilizou 50 g de chocolate no suporte alimentar de inox, para os animais do grupo CHOCO. Apesar do mesmo procedimento ter sido adotado para os animais do grupo CTRL, nenhum alimento foi de fato fornecido. Imediatamente após a saída do observador do viveiro, teve-se início uma sessão de 15 min. Ao final desse intervalo, o observador entrou novamente no viveiro, retirou o alimento restante e fechou a porta do compartimento condicionado. Entre as sessões, os micos não tiveram acesso ao interior da caixa de CPP.

7.1.4.3 Teste

Esta fase teve como objetivo determinar o estabelecimento de uma preferência pelo compartimento previamente condicionado à presença do chocolate e avaliar se essa

possível resposta persiste após um período de 24 h e 15 dias. Para tanto, cada indivíduo foi submetido a uma sessão teste realizada 24 h (T24h) e 15 dias (T15d) após a última sessão de condicionamento. Nessas sessões, de 15 min, cada sujeito teve livre acesso aos dois lados do aparato, similar ao procedimento já descrito na fase de habituação (sessão 7.1.4.1). Vale ressaltar que nesta fase nenhum reforço alimentar foi fornecido.

7.1.5 Análise do Comportamento

Os sujeitos foram testados em ordem randômica em todas as sessões e cada par foi observado simultaneamente, tendo seus comportamentos registrados individualmente por dois observadores previamente treinados (confiabilidade inter-observador de 95%).

Os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados via o programa de análises comportamentais Any-Maze (Stoelting Co., EUA) durante a sessão pré-CPP, C1, C6, T24h e T15d: (1) frequência e duração dentro/em contato com a superfície superior de cada compartimento; (2) latência até a primeira entrada no compartimento condicionado; e (3) duração e frequência de forrageio (buscar, manipular e/ou ingerir chocolate). O primeiro parâmetro foi registrado como uma variável única, baseado em um estudo similar prévio (MONCLARO e cols., 2014), em que os sujeitos utilizaram a superfície superior do compartimento como uma continuidade da superfície interna. A quantidade de chocolate consumida, em gramas, por cada díade também foi mensurada nas sessões C1 e C6, e posteriormente convertida em kcal.

7.1.6 Análise estatística

Para cada parâmetro analisado, os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). Os dados referentes ao comportamento de machos e fêmeas foram analisados juntos, uma vez que não foi observada diferenças significativas entre os gêneros. Os dados foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mixed design two-way ANOVA*). Para as sessões de habituação, “grupo” foi usado como fator independente e “compartimento” como a variável dependente, enquanto para as demais análises “grupo” e “sessão” foram as variáveis independente e dependente, respectivamente. Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados referentes à latência foram previamente log-transformados devido a uma distribuição não-normal e os resultados foram expressos como mediana e intervalos interquartis (IQR). Para o grupo chocolate, a duração e a frequência do forrageio individual, assim como a quantidade de chocolate consumida pela díade (kcal/par), foi analisada via teste *t* para amostras pareadas (C1 vs C6). O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$.

7.1.7 Resultados

Na fase de habituação (sessão pré-CPP) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, os compartimentos ou interação grupo vs compartimento para nenhum dos parâmetros analisados (frequência – grupo: $F_{1,13}= 1,89$, $p=0,19$, compartimento: $F_{1,13}=0,19$, $p=0,67$, interação: $F_{1,13}=0,05$, $p=0,83$; tempo gasto – grupo: $F_{1,13}=0,05$; $p=0,83$, compartimento: $F_{1,13}=0,68$, $p=0,43$, interação: $F_{1,13}=0,30$; $p=0,59$; latência para primeira entrada (para dados transformados em \log_{10} – grupo: $F_{1,13}=0,34$, $p=0,57$, compartimento: $F_{1,13}=0,01$, $p=0,92$, interação: $F_{1,13}=3,05$, $p=0,11$ – Tabela 2).

Tabela 2. Resposta comportamental de micos do grupo controle e chocolate após habituação na caixa de CPP.

Parâmetro	Grupo Experimental	
	Controle	Chocolate
<i>Frequência (média ± epm)</i>		
compartimento branco	6±1	8±2
compartimento preto	6±1	9±1
<i>Tempo gasto dentro/em contato (s; média±epm)</i>		
compartimento branco	49±15	40±12
compartimento preto	53±16	59±9
<i>Latência para primeira entrada (s; mediana e IQR)</i>		
compartimento branco	62 (38-84)	65 (23-188)
compartimento preto	163 (60-379)	28 (12-79)

Durante o condicionamento, o tempo de permanência dentro/em contato com o compartimento condicionado diferiu significativamente entre os grupos ($F_{1,13}=13,59$, $p=0,003$), mas nenhum efeito significativo foi evidenciado entre as sessões (C1 vs C6) ou interação sessão vs grupo (sessão: $F_{2,13}=0,20$, $p=0,73$; interação: $F_{2,13}=0,11$, $p=0,81$; Tabela 3). Para o grupo chocolate, os níveis individuais de forrageio e a quantidade de chocolate consumida pelo par (em kcal) não diferiu entre a sessão C1 e C6 (frequência: $t_7= 1,68$, $p= 0,14$; duração: $t_7=1,90$, $p=0,10$; consumo: $t_3=0,15$, $p=0,88$; Tabela 3).

Tabela 3. Resposta (média±EPM) de cada grupo experimental no compartimento condicionado da caixa de CPP durante a primeira e a última sessão de condicionamento.

Parâmetro	Grupo	Condicionamento	
		1	6
Tempo gasto (s)	Controle	70±23	67±19
Tempo gasto (s)	Chocolate	299±63	245±40 ^a
Frequência de forrageio individual	Chocolate	8±2	5±1
Duração de forrageio (s)	Chocolate	206±60	118±20
Consumo chocolate (kcal/par)	Chocolate	10±2	11±4

^a p<0,05 vs. tempo gasto pelo grupo controle

Após o condicionamento, o tempo de permanência dentro/em contato com o compartimento condicionado nas sessões testes (T24h e T15d) aumentou significativamente apenas no grupo chocolate, quando comparado a sessão pré-CPP (sessão: $F_{2,13}=4,62$, $p=0,03$; grupo: $F_{1,13}=4,31$, $p=0,06$; interação grupo vs sessão: $F_{2,13}=5,55$, $p=0,02$; Figura 10). A latência para a primeira entrada no compartimento condicionado, em ambas as sessões teste, diminuiu no grupo chocolate comparado com a sua sessão pré-CPP, no entanto esta diferença não foi significativa (sessão: $F_{2,13}=1,40$, $p=0,27$; grupo: $F_{1,13}=2,70$, $p=0,12$; interação grupo vs sessão: $F_{2,13}=1,32$, $p=0,29$; Figura 10). Diferenças significativas não foram observadas para o grupo controle. Com relação à frequência de entrada, o grupo chocolate exibiu uma frequência de entrada dentro/em contato com o compartimento condicionado significativamente maior do que o grupo controle ($F_{1,13}=10,92$, $p=0,006$; Figura 10). Entretanto, esta diferença foi observada em todas as sessões, sem nenhum efeito significativo de interação grupo vs sessão ($F_{2,13}=6,16$, $p=0,11$). Já os animais do grupo controle mantiveram um perfil constante ao longo do estudo.

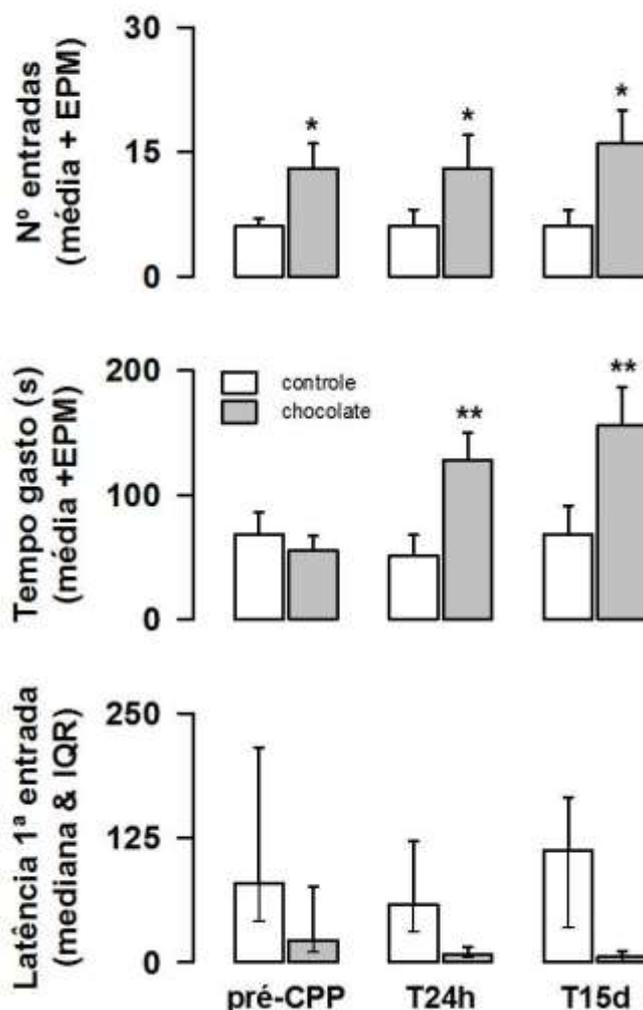


Figura 10. Média (\pm epm) do número de entradas (superior), tempo de permanência (em segundos; meio) dentro e/ou em contato com o compartimento condicionado da caixa de CPP, assim como a mediana (e intervalo interquartil – IQR) para latência até a primeira entrada (em segundos; inferior) no mesmo contexto, para os micos do grupo controle (n=6) e chocolate (n=8) durante a sessão de habituação (pré-CPP) e em cada sessão teste realizadas 24h (T24h) e 15 dias (T15d) após o condicionamento. *p<0,05 controle vs chocolate; **p<0,05 vs sessão pré-CPP do grupo chocolate.

7.1.8 Discussão

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, compartimentos ou interação grupo vs compartimentos em nenhum dos parâmetros observados no período de habituação. Esse perfil está evidenciado pela similaridade entre os grupos em termos do tempo de permanência dentro/em contato com cada um dos compartimentos, na frequência de entrada e na latência até o primeiro acesso. Com base no exposto, pode-se inferir que os micos não demonstraram ter uma preferência inicial

pronunciada por um dos compartimentos da caixa de CPP. Dessa forma, foi possível verificar que o efeito do tratamento (alimento) não foi influenciado pela exposição a um ambiente novo ou um efeito de novidade.

Durante o condicionamento, os animais do grupo CHOCO ficaram mais tempo no compartimento condicionado do que os animais do grupo CTRL, no entanto nenhum efeito significativo foi observado entre as sessões (C1 e C6) ou interação grupo vs sessão. Ademais, a taxa de forrageio e a quantidade de chocolate consumida não diferiu ao longo do condicionamento. Dessa forma pode-se inferir que os micos que tiveram acesso ao chocolate permaneceram motivados por esse alimento ao longo de todo o estudo, o que minimiza a possibilidade de interferência no efeito de CPP observado, seja por mudanças ao longo do tempo de exposição ou por um efeito de novidade. Vale ressaltar ainda que os animais não foram privados de alimento, então a busca pelo chocolate no momento da sessão ocorreu voluntariamente e em um ambiente (físico e social) familiar, minimizando as condições de estresse (MONCLARO e cols., 2014). Comer pode reduzir a sensação de fome, mas comer um alimento altamente palatável no estado saciado é um comportamento motivado e aprendido, e não uma necessidade homeostática (GREENO e cols., 2000). Porém, é necessário considerar que o regime de restrição alimentar parcial (de 2 horas no presente estudo) pode levar a um aumento no valor motivacional de um determinado alimento (CARR, 2002).

No presente estudo, o consumo repetido de chocolate em um ambiente específico induziu uma resposta de preferência condicionada para este local. Essa resposta comportamental foi demonstrada nos animais do grupo CHOCO que aumentaram o tempo de permanência dentro/em contato com o compartimento condicionado nas sessões testes (T24h e T15d), quando comparado com a sessão pré-CPP. Além disso, a latência até a primeira entrada no compartimento pareado com o chocolate, em ambas as sessões testes, diminuiu quando comparada aos níveis basais, embora não tenha atingido valores significativos. A latência tem sido considerada como uma medida da resposta imediata do indivíduo a esse tipo de protocolo experimental (VALENTINUZZI e cols., 2008; MONCLARO e cols., 2014). Por fim, os animais do grupo CHOCO exibiram uma maior frequência de entrada/contato com o compartimento condicionado do que o grupo CTRL. Porém, esta diferença foi observada em todas as sessões, o que demonstra que a diferença basal no parâmetro de frequência já era inerente aos animais que foram aleatoriamente designados ao grupo CHOCO, independentemente da fase de condicionamento.

Embora o chocolate já tenha sido descrito como um alimento com potencial reforçador em roedores (SCHROEDER e cols., 2001; VENTURA e cols., 2007, 2008; LA MELA e cols., 2010; LATAGLIATA e cols., 2010; DICKSON e cols., 2012; ORSINI e cols., 2013), este é o primeiro estudo a demonstrar esse efeito em um primata não-humano.

Embora outros itens alimentares já tenham sido utilizados como reforço no paradigma de CPP com micos (VALENTINUZZI e cols., 2008; MONCLARO e cols, 2014). Nesse contexto, as propriedades orosensoriais do chocolate (gosto, aroma, textura; *revisado em* BRUINSMA e TAREN, 1999), o conteúdo de açúcar, gordura e os vários agentes psicoativos (BRUINSMA e TAREN, 1999 e PARKER e cols., 2006) parece contribuir diretamente ou via aprendizado pós-ingestivo para suas propriedades hedônicas.

Dentre os componentes do chocolate, a feniletilamina (0,4 a 6,6 $\mu\text{g/g}$) é uma substância neuromoduladora capaz de potencializar a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica (PATERSON e cols., 1990; MICHENER e ROZIN, 1994; SABELI e JAVAID, 1995). O sistema dopaminérgico tem um papel chave nos processos motivacionais (KALIVAS E NAKAMURA, 1999) e a dopamina aumenta a probabilidade de ocorrer uma resposta de comportamento de busca por um estímulo reforçador (KELLEY e BERRIDGE, 2002). O aumento na transmissão dopaminérgica, por sua vez, é considerado um evento essencial para o desenvolvimento da dependência (KENNA e cols., 2007). Na verdade, várias outras substâncias com propriedades psicoativas também estão presentes no chocolate como, por exemplo, a cafeína, a treobomina e tiraminas (PARKER e cols., 2006). Assim, o chocolate pode interagir com diversos sistemas neurotransmissores (incluindo dopamina, serotonina e endorfinas), que por sua vez contribuem para o apetite e a ativação do sistema neural de recompensa.

Após 15 dias da última sessão de condicionamento, período em que nenhuma manipulação experimental foi realizada, a resposta de CPP ao chocolate se manteve. O tempo gasto dentro/em contato com o compartimento pareado ao chocolate foi significativamente maior, comparado a sessão pré-CPP e sendo equivalente ao perfil observado após 24h. A expressão de uma resposta de CPP é, portanto, dependente de um processo de memória e de aprendizado (HUSTON e cols., 2013).

De acordo com KRUIDHOF e cols (2012), a formação de uma memória é um processo plástico que, ao invés de refletir apenas a capacidade de um animal aprender uma tarefa, é dependente do valor da recompensa. Assim, a consolidação de uma memória de longo prazo é energeticamente mais custosa do que uma memória de curta duração, não sendo vantajosa para recompensas com baixo valor motivacional (MERY e KAWECKI, 2005). Portanto, recompensas com alto valor podem levar a formação de memórias de longa duração. Sob esse ponto de vista vale ressaltar que neste estudo os animais exibiram uma resposta de CPP 24 h depois da última sessão de condicionamento (T24h) e essa resposta perdurou 15 dias após o condicionamento (T15d), exibindo um efeito mnemônico duradouro, mesmo seguido de inúmeras sessões de extinção. Tal efeito é similar ao observado com drogas de abuso, em que ao longo do tempo, as pistas ambientais e o contexto são capazes de estimular memórias relacionadas à droga, induzindo o indivíduo à fissura e recaída

(SHAHAM e cols., 2003; VOLKOW e cols., 2006). Em roedores, por exemplo, já foi demonstrada uma resposta de CPP duradoura para anfetamina (uma semana - SCHROEDER e PACKARD, 2003), morfina (até 12 semanas - MULLER e cols., 2002) e para cocaína (4 a 6 semanas - MUELLER e STEWART 2000; ZHANG e cols., 2002). Os processos neurais envolvidos nesse tipo de resposta são pouco explorados e não há nenhum estudo que demonstre esse efeito utilizando o teste de CPP para alimento como estímulo reforçador.

7.1.9 Conclusões preliminares

(1) Micos que receberam chocolate durante o condicionamento aumentaram significativamente o tempo de permanência no compartimento pareado a esse alimento nos dias de teste (24h e 15 dias), comparado à sessão pré-CPP;

(2) A frequência de entrada/contato com o compartimento condicionado foi maior no grupo CHOCO, comparado ao grupo CTRL, no entanto em ambos os grupos se manteve constante em todas as fases do estudo;

(3) O forrageio individual e a quantidade de chocolate consumida pelo par não diferiu entre a sessão C1 e C6;

(4) Este foi o primeiro estudo a evidenciar que o chocolate é um alimento altamente palatável com potencial de causar dependência e a induzir um efeito duradouro na memória associativa em micos, semelhante ao que ocorre com drogas de abuso.

7.2 Estudo 2B

Após verificar que micos exibem uma resposta de preferência por lugar condicionada ao chocolate, um alimento altamente palatável e calórico (Estudo 2A), buscou-se avaliar se essa resposta de CPP é específica para esse tipo de alimento ou para qualquer tipo de item (por exemplo: ração com baixo valor calórico e menos palatabilidade).

7.2.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 6 indivíduos adultos (3 machos e 3 fêmeas). Os animais tiveram acesso livre à água e dieta padrão (fruta + ração), porém o alimento foi retirado 2 h antes dos procedimentos experimentais para padronizar a latência de última ingestão, conforme já citado no estudo 2A (seção 7.1.1). Todas as etapas experimentais foram realizadas entre 13:30 e 17:00 h.

7.2.2 Aparato experimental: caixa de preferência-condicionada-por-lugar

Foi utilizada uma caixa de CPP adaptada de um estudo de dependência realizado anteriormente em micos-estrela (BARROS e cols., 2013). No presente estudo, essa caixa consistiu em uma arena retangular (120 cm x 60 cm x 35 cm), suspensa a 1 m do chão, que foi dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais (60 cm x 60 cm x 35 cm). A caixa de CPP tinha três paredes e um piso feito de chapa de metal, enquanto que a quarta parede e o teto foram confeccionados de vidro transparente. Os dois compartimentos estavam separados por uma parede de alumínio retrátil (60 cm x 35 cm) (Figura 11).

Para cada compartimento, havia uma porta de acesso independente, possibilitando a entrada/saída do sujeito. Essas portas estavam localizadas na parede de metal oposta a de vidro e deslizavam no sentido lateral, ao longo da parede de metal, permitindo sua abertura e fechamento. Além disso, cada compartimento tinha diferentes estímulos visuais e táteis: um deles tinha o piso e paredes de textura ondulada com um padrão de listras diagonais pretas e brancas (exceto a parede de vidro) e o outro tinha piso e paredes lisas e de coloração toda branca.

Em cada um dos compartimentos foi acoplado um prato de aço inoxidável (9 cm de diâmetro) para disponibilização do alimento. Cada prato foi posicionado próximo à parede de vidro, no canto oposto do seu ponto de entrada. Para cada sujeito foi designado dois pratos específicos, uma para cada tipo de alimento fornecido.

Além disso, uma única antecâmara quadrada (*hall* de entrada – 15 cm x 10 cm x 35 cm) foi acoplada a caixa de CPP, em frente a ambas as portas de entrada/saída dos compartimentos. O acesso ao *hall* de entrada se dava por uma porta do tipo-guilhotina localizada em sua porção posterior, em que se acoplava uma caixa-transporte (35 cm x 20 cm x 23 cm). Essa caixa-transporte foi feita de alumínio, tendo uma porta tipo-guilhotina que se acopla diretamente na porta de acesso de entrada/saída do aparato. Esta caixa possibilitava o transporte dos indivíduos dos seus viveiros moradia até a sala de experimento.

A observação e o registro das sessões foram realizados via um circuito interno de filmagem, composto por duas câmeras digitais. Uma câmera foi instalada a aproximadamente 1 m acima do aparato (vista superior) e a outra localizada a 1,5 m de distância da parede de vidro do aparato (vista frontal). Ambas foram conectadas diretamente a um computador portátil (*laptop*) localizado em uma sala adjacente à de experimento. A localização dos animais dentro do aparato foi rastreada de forma automatizada (via a câmera de vista superior) usando o programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA).

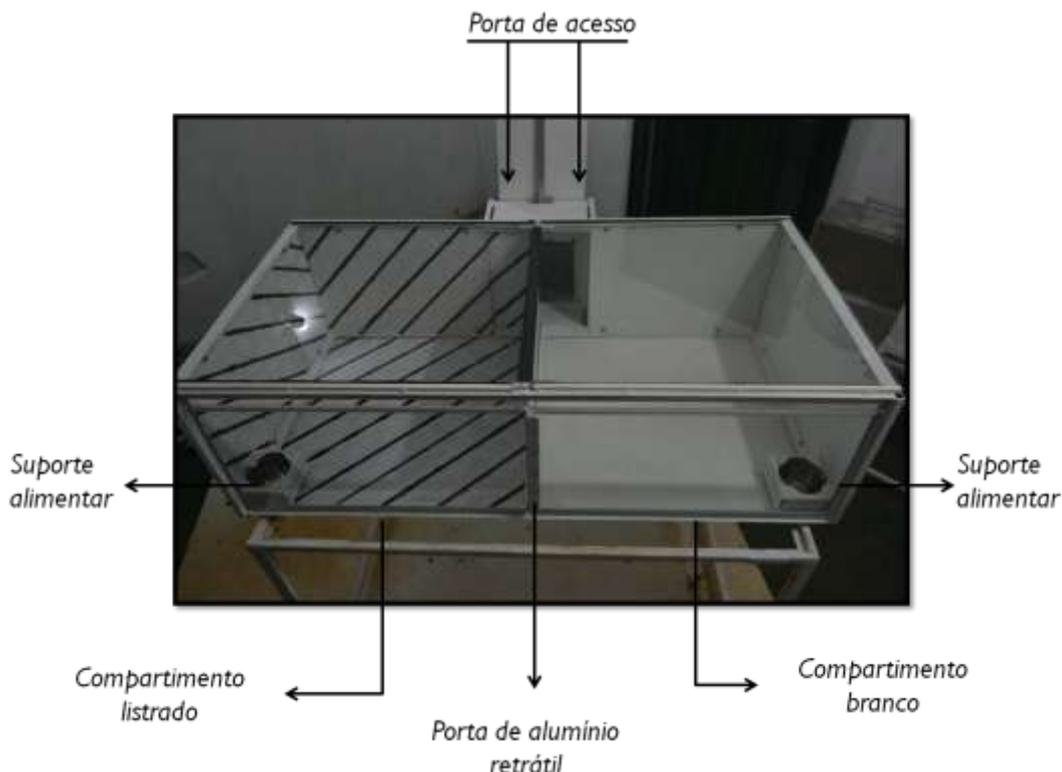


Figura 11. Fotografia da caixa de CPP evidenciando a divisão do aparato em dois compartimentos distintos (listrado e branco), separados por uma parede de alumínio retrátil (Foto: Aline Borges).

7.2.3 Alimentos teste

De acordo com o procedimento experimental (descrito abaixo), foram fornecidos como recompensa alimentar:

- Alimento neutro com baixo valor calórico: Ração (Purina Cat Chow®, Nestlé, Ribeirão Preto, Brasil). Informações nutricionais: 3,87 kcal/g: 0,0 g carboidratos, 0,09 g gordura, 0,31 g proteína e 0,04 g fibra. Esta consistiu na mesma ração utilizada diariamente na dieta padrão dos micos.

- Alimento altamente palatável com alto valor calórico: Gotas de chocolate (Chipshow, Harald®, São Paulo, Brasil). Informações nutricionais: 5,32 kcal/g: 0,64 g carboidratos, 0,29 g gordura, 0,04 g proteína e 0,03 g fibra.

Ambos os tipos de alimentos apresentavam tamanhos equivalentes e a quantidade fornecida em cada sessão, para cada indivíduo, foi de 50g.

7.2.4 Procedimento experimental

O procedimento foi dividido em três fases consecutivas conforme esquema experimental (Figura 12). Para todas as fases, cada sessão consistiu em capturar o sujeito

em seu viveiro de moradia, com auxílio de um puçá, e colocá-lo na caixa-transporte. O animal foi então levado à sala de experimento e liberado no *hall* de entrada da caixa CPP, iniciando assim uma sessão de 15 min. Transcorrido esse intervalo, o animal foi levado de volta ao seu viveiro de moradia, via caixa-transporte, e o aparato limpo com álcool 70% antes de iniciar uma nova sessão com outro indivíduo. A ordem com que os sujeitos foram testados variou aleatoriamente a cada dia. Todos os animais foram testados apenas uma vez por dia e as sessões realizadas em intervalos de 24 h.

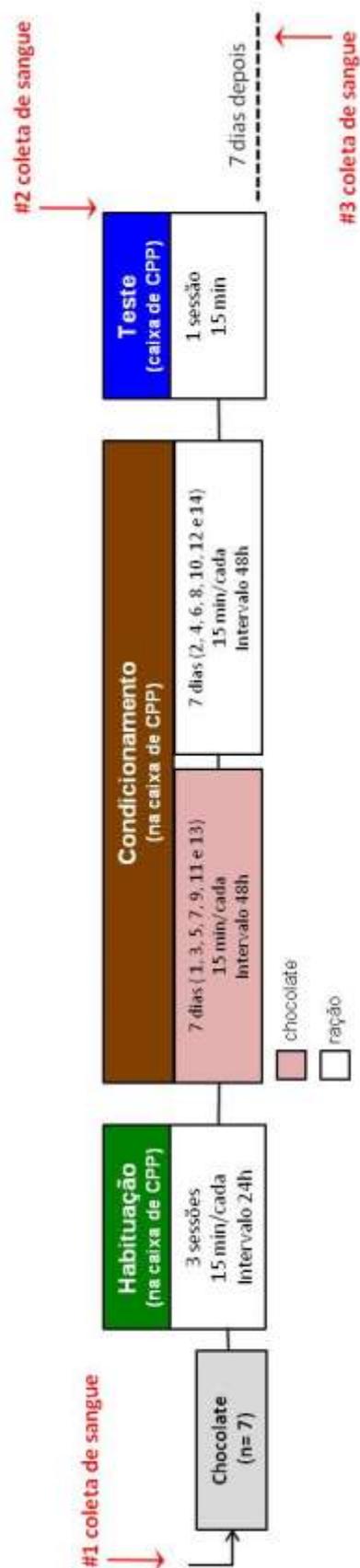


Figura 12. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 2B.

7.2.4.1 Habituação ao aparato

Esta fase teve como objetivo habituar os indivíduos à caixa de CPP, bem como avaliar qualquer preferência natural a um dos compartimentos do aparato. Para tanto, cada indivíduo foi submetido a uma sessão diária de 15 min de habituação a caixa de CPP, durante três dias consecutivos (H1, H2, H3). Durante cada sessão, o animal não teve acesso ao *hall* de entrada, já que a porta foi imediatamente fechada a partir do momento que o animal entrava em um dos compartimentos. No entanto, a porta retrátil que une os dois compartimentos laterais foi mantida semiaberta (abertura de 20 cm), possibilitando que o animal tivesse acesso livre aos dois lados do aparato (Figura 13). Nenhum alimento foi fornecido nessa fase.

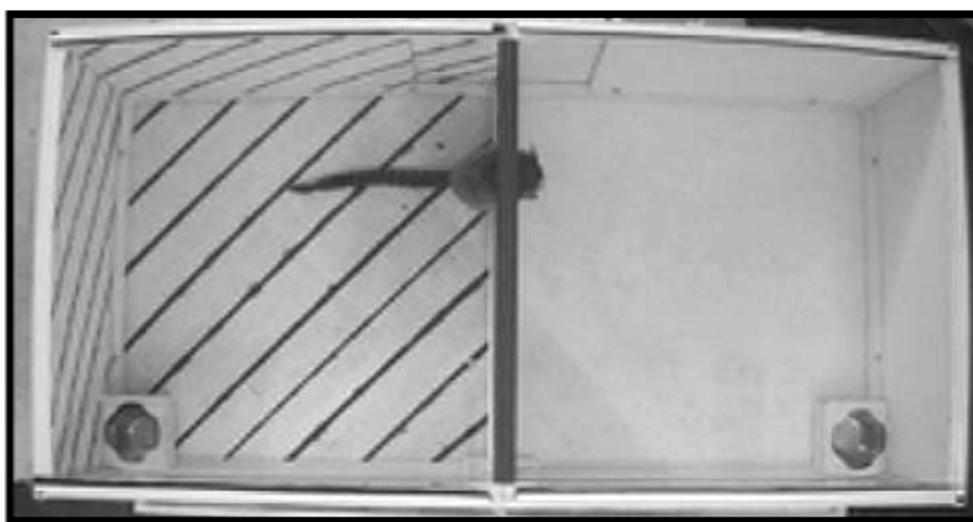


Figura 13. Vista superior da caixa de CPP evidenciado o acesso de um sujeito aos dois compartimentos laterais, possibilitado pela abertura da porta-retrátil.

7.2.4.2 Condicionamento ao alimento

O objetivo desta fase foi induzir uma resposta de preferência condicionada-por-lugar associada à presença de um alimento altamente palatável e calórico (chocolate) e/ou um alimento com baixo valor calórico e menos palatável (ração). Esta fase teve início 24 h após a última sessão de habituação.

Os sujeitos foram aleatoriamente submetidos a uma sessão diária de condicionamento por 15 min na caixa de CPP, durante 14 dias consecutivos. Cada mico, em dias alternados, teve acesso apenas ao compartimento branco ou listrado. Nos dias ímpares (dias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13) 50 g de chocolate foi fornecido em um dos compartimentos (compartimento pareado ao chocolate – CC), enquanto que nos dias pares (dias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14) 50 g de ração foi fornecida no compartimento oposto (compartimento pareado a

ração – CR). Um dos compartimentos foi aleatoriamente e *a priori* designado como sendo o CC, enquanto o outro foi considerado como sendo o CR. Metade dos animais foi condicionada ao chocolate no compartimento branco e ração no listrado e a outra metade condicionada ao chocolate/ração no compartimento oposto. Essa designação permaneceu a mesma durante todo o experimento. Portanto, o chocolate e a ração foram fornecidos em dias alternados, de acordo com o esquema de acesso a cada um dos compartimentos da caixa de CPP descrito acima. Em todas as 14 sessões, a porta retrátil que conecta ambos os compartimentos foi mantida fechada, possibilitando o acesso a apenas um dos lados do aparato.

7.2.4.3 Teste

Esta fase teve como objetivo determinar a expressão de um comportamento de preferência pelo compartimento condicionado à presença do chocolate e/ou ração. Para tanto, cada indivíduo foi submetido a uma única sessão teste, realizada 24 h após a última sessão de condicionamento. Nessa sessão, de 15 min, cada sujeito teve livre acesso aos dois lados do aparato, similar ao procedimento já descrito na fase de habituação (sessão 7.2.4.1). Vale ressaltar que nesta fase nenhum reforço alimentar foi fornecido.

7.2.5 Análise do Comportamento

Para cada sessão experimental, o software Anymaze (Stoelting Co., EUA) registrou automaticamente, via o sistema de câmeras, a velocidade e a distância total percorrida pelos micos na caixa de CPP (índice de atividade locomotora), bem como o tempo de permanência em cada um dos compartimentos. Um observador previamente treinado (confiabilidade intra-observador 95%) fez o registro manual das seguintes categorias comportamentais: (1) Vigilância: duração e frequência de varredura contínua ou outros movimentos visíveis de cabeça enquanto o animal permaneceu parado; (2) Exploração: frequência de *cheirar/lamber* qualquer parte do aparato e/ou *head cock* (mover a cabeça do lado para o outro); e (3) Forrageio: frequência e duração de busca, manipulação e ingestão do alimento (chocolate ou ração). Conforme citado no Estudo 2A, os comportamentos mensurados foram baseados em etogramas de calitriquídeos (STEVENSON E RYLANDS, 1988) e estudos prévios nessa espécie (BARROS e cols., 2004; CAGNI e cols., 2012). Os níveis de locomoção, vigilância e exploração foram usados como indicadores comportamentais de ansiedade (BARROS e cols., 2004).

A quantidade de chocolate e ração consumida em kcal em cada sessão de condicionamento foi calculada, baseada na quantidade ingerida em gramas. Como a quantidade consumida de chocolate/ração e o comportamento de forrageio foram

constantes ao longo da fase de condicionamento, foi calculado para cada alimento o consumo e o forrageio médio nestas sete sessões.

7.2.6 Coleta de Sangue e Análise Hormonal

Foram coletadas três amostras de 1,0 mL de sangue: (1) antes do procedimento comportamental (linha de base; LB); (2) imediatamente após a sessão teste (pós-teste, PT0); e (3) sete dias após a sessão teste (PT7). Todas as amostras foram obtidas na presença do veterinário do CP-UnB, entre às 13:00 e 17:00 h. A amostra PT0 foi coletada imediatamente após a sessão teste de cada sujeito e as amostras LB e PT7 foram coletadas no mesmo horário do dia em que as sessões comportamentais foram realizadas. Na primeira e última coleta (LB e PT7), os animais foram capturados diretamente no seu viveiro de moradia com o auxílio de um puçá e levados para uma sala de procedimentos. Na sessão PT0, os animais foram capturados no seu viveiro de moradia e via caixa de transporte foram conduzidos até a caixa de CPP para realização da sessão experimental. Após 15 min de observação comportamental, os micos foram levados até a sala de procedimentos para a coleta de sangue. Para a coleta e análise hormonal, os animais (e as amostras consequentemente obtidas) foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente (*vide* sessão 6.4). Em média, o tempo requerido para obtenção das amostras foi de $3,5 \pm 0,4$ min, um intervalo dentro da faixa previamente descrita por não influenciar o resultado da dosagem (SALTZMAN e cols., 1994).

7.2.7 Análise estatística

Para cada parâmetro analisado, os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+epm). O teste *t* para amostras pareadas foi utilizado para as seguintes análises: (1) diferença no padrão de exploração, atividade locomotora e vigilância entre a primeira (H1) e a última (H3) sessão de habituação; (2) comparação entre o tempo de permanência em cada compartimento antes do condicionamento (sessão H3); (3) diferença na quantidade de alimento consumido e no comportamento de forrageio entre a primeira e a última sessão de condicionamento para cada um dos itens alimentares; (4) comparação entre os dois tipos de alimentos testados em termos de consumo médio e taxa de forrageio por sessão; (5) diferenças em comportamentos indicativos de ansiedade observados antes (sessão H3) e após o condicionamento ao alimento (sessão teste); e (6) peso corporal mensurado antes e após o procedimento experimental. O tempo de permanência dos micos em cada compartimento, antes e após o teste de CPP, foi analisado usando uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas, utilizando como fatores “compartimento” (CC e CR) e “fase experimental” (pré e pós CPP).

Para a análise de cortisol plasmático, uma ANOVA de uma via para medidas repetidas (*one-way repeated measures ANOVA*) foi usada para determinar possíveis diferenças significativas entre as amostras (LB x PT0 x PT7). Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey.

Ademais, via cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, o tempo de permanência no compartimento pareado ao chocolate (CC) durante a sessão teste foi correlacionado com: (1) a quantidade média de chocolate consumida por sessão, neste compartimento; (2) o tempo médio de forrageio por sessão nesse mesmo compartimento; (3) os níveis de locomoção e vigilância pré-CPP (H3) e cortisol (amostra LB); e (4) os níveis de vigilância, exploração e atividade locomotora pós-CPP (sessão teste) e cortisol (amostras PT0 e PT7). Usando o mesmo teste, a concentração de cortisol vista em cada amostra foi correlacionada com o tempo requerido para a coleta de sangue. O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$.

7.2.8 Resultados

Quando os micos foram inicialmente expostos a ambos os compartimentos da caixa de CPP, na ausência de qualquer alimento, as mudanças nas respostas comportamentais não foram significativas quando comparada a primeira e a última sessão de habituação (H1 x H3; distância percorrida: $t_5 = -0,74$, $p = 0,50$; velocidade média: $t_5 = -1,28$, $p = 0,26$; vigilância: $t_5 = -0,12$, $p = 0,91$; exploração: $t_5 = -1,23$; $p = 0,28$; Tabela 4). Os sujeitos também não demonstraram uma preferência inicial por nenhum dos compartimentos do aparato experimental visto que na última sessão de habituação, diferenças significativas entre o tempo de permanência no compartimento CC e CR não foram observadas (Figura 14).

Tabela 4. Perfil comportamental de micos observado (média±EPM) na caixa de CPP na primeira (H1) e na última sessão de habituação (H3) e no dia da sessão teste realizada após o condicionamento ao alimento.

Comportamento	Sessão Experimental		
	H1	H3	Teste
Distância percorrida (em metros)	32±5	41±10	34±6
Velocidade média (m/s)	0,03±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01
Duração de vigilância (s)	441±51	450±56	501±38
Frequência de exploração	22±2	33±7	50±6 ^a

^a $p < 0.05$ Teste vs. H3 para exploração

Durante as sessões de condicionamento, a quantidade de alimento consumido (em kcal) e os níveis de forrageio não diferiram significativamente entre a primeira e a última sessão (Ração – consumo: $t_5=1,91$, $p=0,11$; frequência de forrageio: $t_5=0,70$, $p=0,51$; duração de forrageio: $t_5=-0,25$, $p=0,81$; Chocolate – consumo: $t_5=1,14$, $p=0,31$; frequência de forrageio: $t_5=-0,86$, $p=0,43$; duração de forrageio: $t_5=-0,11$, $p=0,91$; Tabela 5). Entretanto, a quantidade média de chocolate ingerida em kcal por sessão foi significativamente maior do que a quantidade de ração ($t_5=2,53$, $p<0,04$; ração: $0,8\pm0,4$, chocolate: $1,2\pm0,4$, média \pm e.p.m. em gramas/sessão; Figura 15), mesmo que o padrão de forrageio para ambos os grupos tenha sido equivalente (frequência: $t_5=1,30$, $p=0,25$; duração: $t_5=1,00$, $p=0,36$; Figura 15).

Tabela 5. Consumo de alimento e perfil de forrageio (média \pm EPM) de cada item testado na primeira e última sessão de condicionamento.

Parâmetro	Sessão de Condicionamento	
	1	7
<i>Ração</i>		
Consumo em kcal (em gramas)	2,7 \pm 1,2 (0,7 \pm 0,3)	1,6 \pm 0,7 (0,4 \pm 0,2)
Frequência de forrageio	14 \pm 3	15 \pm 4
Duração de forrageio (s)	88 \pm 15	98 \pm 33
<i>Chocolate</i>		
Consumo em kcal (em gramas)	10,3 \pm 5,0 (1,9 \pm 0,9)	6,3 \pm 3,1 (1,2 \pm 0,6)
Frequência de forrageio	13 \pm 219	17 \pm 5
Duração de forrageio (s)	138 \pm 38	143 \pm 35

Na sessão teste, novamente sem a presença do item alimentar, o tempo de permanência no compartimento CC aumentou significativamente comparado à última sessão de habituação, enquanto que no compartimento CR houve uma diminuição (fase experimental: $F_{1,5}=10,96$, $p<0,05$; tipo de alimento: $F_{1,5}=1,30$, $p=0,31$; interação fase x alimento: $F_{1,5}=3,41$, $p=0,12$; Figura 14). O tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste teve uma correlação positiva com a média do tempo de forrageio durante as sessões de condicionamento ($r=0,86$, $p<0,05$; Figura 14). Nenhum efeito foi observado quando o mesmo parâmetro foi correlacionado com a média da quantidade de alimento consumida por teste no compartimento CC durante o condicionamento ($r=0,74$, $p=0,10$).

Considerando os comportamentos indicativos de ansiedade registrados antes e após o condicionamento, um efeito significativo foi visto apenas para atividade exploratória. Esta resposta aumentou significativamente após o condicionamento comparado aos níveis observados na habituação (H3 x sessão teste; exploração: $t_5 = -5,36$, $p < 0,05$; distância: $t_5 = 0,63$, $p = 0,56$; velocidade: $t_5 = 0,56$, $p = 0,60$; vigilância: $t_5 = -1,40$, $p = 0,22$; Tabela 4). O nível de vigilância pós-CPP teve uma correlação positiva com o tempo de permanência no compartimento CC no dia do teste, enquanto que nenhuma correlação foi vista para os demais comportamentos indicativos de ansiedade (vigilância: $r = 0,81$, $p = 0,05$; distância: $r = -0,40$, $p = 0,32$; velocidade: $r = -0,42$, $p = 0,40$; exploração: $r = -0,77$, $p = 0,07$; Figura 14). Por fim, o tempo de permanência no compartimento CC não foi correlacionado aos níveis iniciais (H3) de nenhum dos comportamentos indicativos de ansiedade mensurados na linha de base (distância: $r = -0,13$, $p = 0,80$; vigilância: $r = 0,69$, $p = 0,13$; exploração: $r = -0,64$, $p = 0,18$).

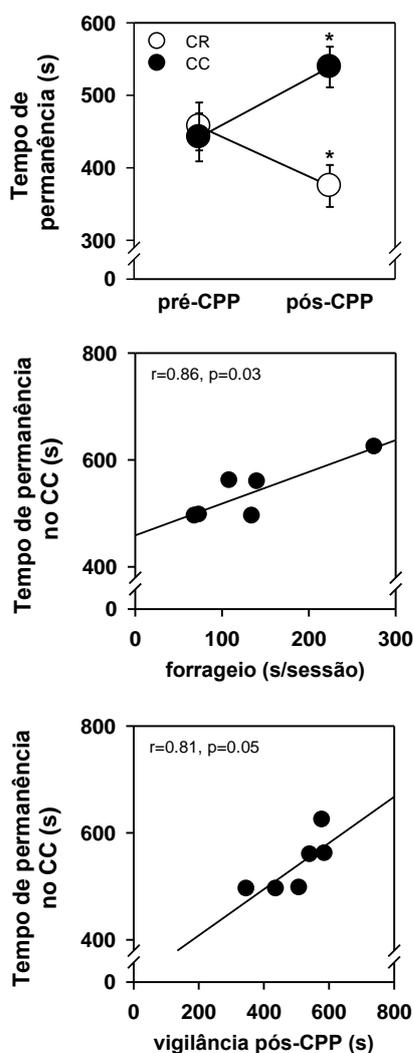


Figura 14. Superior. Tempo de permanência pelos micos (média \pm epm) nos compartimentos pareados ao chocolate (CC) e ração (CR) da caixa de CPP antes (pré-CPP; sessão 3 da habituação) e após

(pós-CPP; sessão teste) eles consumirem os respectivos itens alimentares no compartimento condicionado. *Meio*: Relação entre o tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste (em segundos) e tempo de forrageio durante as sessões de condicionamento (em segundos/sessão). *Inferior*: Relação entre o tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste (em segundos) e o tempo de vigiância na caixa de CPP durante a sessão teste (em segundos). n=6; *p<0,05 vs níveis pré-CPP.

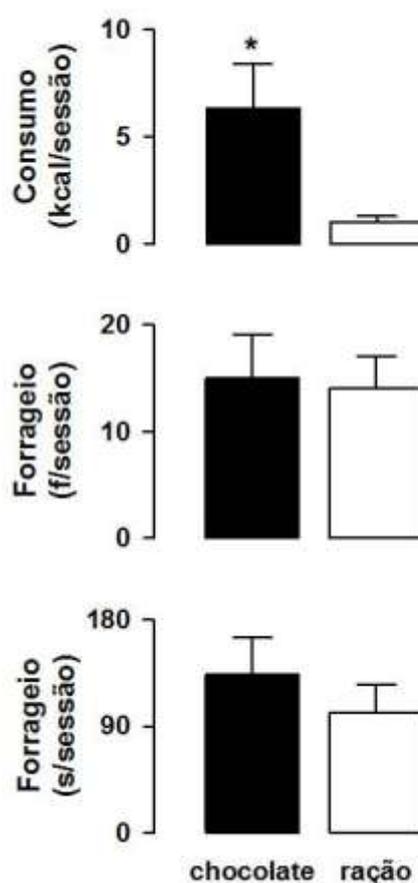


Figura 15. Quantidade média (\pm epm) de alimento consumido (em kcal/sessão; superior), assim como a frequência (meio) e a duração (em segundos; inferior) média de forrageio por sessão, durante a fase de condicionamento. Para cada parâmetro foi calculado o valor médio dos dados observados nas sete sessões de 15-min cada. Em dias alternados, o chocolate foi fornecido no compartimento CC e a ração no compartimento oposto CR. n=6; *p<0,05 chocolate vs ração.

A concentração de cortisol permaneceu constante durante todo o experimento ($F_{2,5}=1,36$, $p=0,30$; Figura 16) e a concentração média basal foi similar ao já descrito para micos (LB: $144,00 \pm 24\mu\text{g/dL}$; PRYCE e cols., 2002; LIMA e cols., 2008). Nenhuma correlação foi observada com relação ao tempo requerido para obtenção das amostras de sangue (LB - $r=0,22$, $p=0,67$; PT0 - $r=-0,70$, $p=0,12$; PT7 - $r=-0,75$, $p=0,10$). Em média, as

amostras de sangue foram obtidas em $3,5 \pm 0,4$ min. Além disso, a concentração de cortisol nas amostras PT0 e PT7 não se correlacionaram ao tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste (PT0), e o tempo de permanência no compartimento CC não teve relação com a concentração de cortisol na linha de base ($r = -0,28$, $p = 0,60$). Em termos de peso corporal, não foram detectadas diferenças significativas entre os valores observados antes e após o procedimento experimental ($t_5 = 0,87$, $p = 0,42$; peso inicial: 331 ± 14 , peso final: 322 ± 11 , média \pm e.p.m. em gramas).

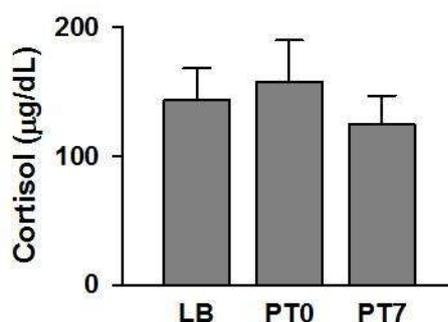


Figura 16. Concentração de cortisol plasmático (média \pm e.p.m.) observada nos micos antes dos procedimentos experimentais (LB), imediatamente após a sessão teste (PT0) e sete dias depois da sessão teste (PT7); $n = 6$.

7.2.9 Discussão

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas no perfil comportamental dos micos na fase pré-CPP, quando nenhum item alimentar foi fornecido. Embora mudanças comportamentais na atividade locomotora, comportamento exploratório e vigilância fossem esperadas como indicativos de habituação (PRUT e BELZUNG, 2003, BARROS e cols., 2004; KLIETHERMES, 2005), esses comportamentos se mantiveram constantes entre a primeira e última sessão de habituação. No entanto, um resultado similar foi observado nos estudos de BARROS e cols. (2004, 2007) para essa mesma espécie. Vale ressaltar que todos os sujeitos empregados no presente estudo eram animais já habituados à manipulações experimentais e que já haviam participado anteriormente de outros estudos no CP-UnB. Os micos também não exibiram uma preferência inicial significativa para nenhum dos compartimentos do aparato experimental. Diferenças significativas entre o tempo de permanência no compartimento CR e CC não foram observadas na última sessão de habituação, o que favorece avaliar o efeito do tratamento sem interferências basais.

Durante as sessões de condicionamento, a quantidade de alimento consumida e o perfil de forrageio (frequência e duração) não diferiram ao longo das sessões experimentais,

indicando que os animais mantiveram o mesmo padrão motivacional para ambos os itens alimentares durante todo o experimento e utilizaram estratégias similares de forrageio independentemente do alimento fornecido. Vale ressaltar que os animais não foram privados da alimentação regular, exceto 2 h antes do início das sessões experimentais para tentar padronizar a latência de última ingestão. A quantidade média de chocolate consumida (em kcal) por sessão foi significativamente maior do que a de ração, mesmo que os animais tenham exibido um perfil de forrageio similar para os dois alimentos. Portanto, a procura, a manipulação e/ou o sabor do alimento, ao invés do número de calorias per se, pode ser um aspecto chave desse tipo de reforço alimentar no teste de CPP por alimento em primatas não-humanos, correspondendo ao que é observado em roedores (FIGLEWICZ e cols., 2001).

Após o consumo repetido de um alimento altamente palatável, calórico e rico em açúcar e gordura (chocolate), realizado de forma alternada com um alimento de menor valor calórico e palatabilidade, os micos desenvolveram uma resposta de preferência condicionada por lugar onde o primeiro item foi disponibilizado. Durante a sessão teste, o tempo de permanência no compartimento CC aumentou significativamente comparado aos níveis pré-CPP observados durante a última sessão de habituação, enquanto que esse mesmo parâmetro no compartimento CR diminuiu. O tempo de permanência no compartimento CC durante a sessão teste apresentou uma correlação positiva com o tempo de forrageio por sessão e não com a quantidade de alimento consumida, indicando que os animais que passaram mais tempo forrageando durante o condicionamento ficaram mais tempo no compartimento pareado ao chocolate no dia do teste. Ademais, a quantidade média de chocolate consumida foi significativamente maior do que a quantidade de ração. Portanto, baseado nesses resultados, o chocolate parece induzir uma resposta de CPP em micos no presente estudo, similar ao que já foi observado em roedores utilizando o mesmo paradigma (SCHROEDER e cols., 2001; VENTURA e cols., 2007, 2008; LA MELA e cols., 2010; LATAGLIATA e cols., 2010; DICKSON e cols., 2012; ORSINI e cols., 2013).

Em humanos, o chocolate é um dos alimentos mais desejados (*craving-inducing foods*), particularmente entre as mulheres (OSMAN e SOBAL, 2006). Suas propriedades orosensoriais positivas (i.e. sabor, aroma e textura, *revisado em* PARKER e cols., 2006), seu alto conteúdo de açúcar e gordura e/ou seus constituintes psicoativos (BRUINSMA e TAREN, 1999; SMITH e cols., 2004; PARKER e cols., 2006; NASSER e cols., 2011) ativa os circuitos neurais relacionados ao processo de ingestão e à recompensa, sendo que ambos contribuem para as propriedades hedônicas classicamente atribuída a esse tipo de alimento (BRUINSMA e TAREN, 1999).

Ao contrário do que foi visto para o chocolate, uma resposta de CPP não foi observada para ração, um alimento mais neutro com menor valor calórico. Os indivíduos

buscam alimentos densamente calóricos para maximizar o estoque de energia para preparar o organismo para períodos de fome (GEARHARDT e cols., 2009). Então, o consumo desse tipo de alimento pode não estar associado apenas às propriedades reforçadoras ou à uma predisposição individual, mas a uma característica ancestral inata (PAI e cols., 2014).

Nem todos os alimentos estão implicados no desenvolvimento de um quadro de dependência (ERLANSON-ALBERTSSON, 2005). Alimentos ricos em açúcar, gordura, sal e aqueles densamente calóricos tendem a ter um maior potencial para causar dependência do que alimentos tradicionais, visto que frequentemente são uma combinação de ingredientes sintéticos (AVENA e GOLD, 2011a, 2011b), costumam ser desenvolvidos artificialmente e possuem menos fibras e proteínas que os alimentos naturais, o que pode aumentar o seu valor hedônico (GEARHARDT e cols., 2011; MONTEIRO e cols., 2011, PAI e cols., 2014). Por outro lado, os alimentos com alto valor nutricional possuem uma concentração de carboidratos, gorduras e sódio balanceada com outros nutrientes essenciais para saúde. Animais que consomem uma dieta altamente calórica (*high fat*) comem mais do que o necessário para satisfazer suas necessidades energéticas (MORALES e cols., 2012) e a dieta atua como reforço positivo (MORGAN e SIZEMORE, 2011). Por outro lado, alimentos neutros, com baixo valor calórico e que fazem parte da dieta habitual, podem suprir apenas as necessidades metabólicas do organismo sem um forte componente hedônico. De acordo com PELCHAT e SCHAEFER (2000), o consumo de determinados tipos de alimentos compensa o *craving* (desejo intenso), enquanto outros alivia a sensação subjetiva de fome.

Ratos submetidos à uma escolha entre sacarose ou ração exibem episódios de *binge* (episódios compulsivos) pela sacarose ao invés da ração (AVENA e cols., 2008). Porém, o inverso já foi observado, sendo que ratos consumiram em maior quantidade um alimento com baixa densidade calórica comparado a um alimento com alto valor calórico (BERNER e cols., 2008; BOCARSLY e cols., 2011). ORSINI e cols. (2014) demonstraram ainda que ratos aumentam o consumo de ração comparado ao consumo de alimentos altamente palatáveis, porém neste estudo especificamente os animais estavam sob um protocolo de administração de anfetamina, o que pode ter influenciado tal escolha.

Estudos com humanos demonstraram ainda que participantes geralmente relatam gostar mais de alimentos doces, ricos em gordura, em relação aos alimentos menos gordurosos (FINLAYSON e cols., 2007). Associado a isso, técnicas de imagens tem demonstrado maior ativação de áreas neurais, tais como córtex pré-frontal medial e dorsolateral, produzida por exposição a alimentos altamente calóricos comparado aos estímulos com baixo valor calórico (KILLGORE e cols., 2003). Ademais, alimentos altamente palatáveis podem produzir mudanças na sinalização dopaminérgica no cérebro (BELLO e HAJNAL, 2010).

Por outro lado, sob condições experimentais específicas – como estresse, acesso restrito e restrição calórica – alimentos menos palatáveis e com baixo valor calórico podem induzir comportamentos indicativos de um estado de dependência (ex., ZOMBECK e cols., 2008). CORWIN e GRIGSON (2009) sugeriram que alimentos altamente palatáveis não apresentam essencialmente um potencial de dependência, mas ao longo de várias semanas sob um protocolo de alimentação restrito, eles podem gerar comportamentos associados a um quadro de dependência. Regimes de alimentação restritos e alimentos ricos em açúcar e gordura podem induzir um comportamento alimentar do tipo compulsivo em roedores (AVENA e cols., 2008; CORWIN e cols., 2011) e primatas (FOLTIN, 2006), similar ao padrão de ingestão escalonada observado com drogas de abuso. Embora tenham sido submetidos a um acesso restrito (15 min; dias alternados) por vários dias, os micos do presente estudo mantiveram um consumo constante para os dois tipos de alimentos ao longo das sessões e, portanto, não exibiram um comportamento alimentar do tipo compulsivo. O número de exposições (dias x semanas), o tempo de acesso (15 min x 30 min) e/ou o programa de alimentação (dias alternados x 2-3vezes/semana) podem ter sido fatores metodológicos que contribuíram para os resultados observados no presente estudo.

O estresse é outro fator importante que pode regular a ingestão de alimentos e/ou contribuir para a expressão de comportamentos relacionados à dependência (ADAM e EPEL, 2007). Abster-se de consumir alimentos ricos em açúcar e gordura, intencionalmente ou involuntariamente, leva a um estado de humor negativo em humanos (ex., chocolate – BRUINSMA e KAREN, 1999) e induz a liberação de cortisol pelo eixo HPA, que por sua vez pode contribuir para o *craving* e a dependência (ADAM e EPEL, 2007; VOLKOW e cols., 2013). Um aumento nos níveis de estresse tem sido associado a uma maior motivação para consumir alimentos altamente palatáveis e calóricos (OLIVER e cols., 1999; EPEL e cols., 2001). Após a ingestão desse tipo de alimento, as respostas indicativas de estresse parecem ser reduzidas. DALLMAN e cols. (2003) propuseram que a ingestão de alimentos densamente energéticos diminui os efeitos negativos associados ao estresse (“*comfort eating*”).

No presente estudo, as concentrações de cortisol permaneceram constantes ao longo das sessões experimentais. Entretanto, dentre os comportamentos analisados, a atividade exploratória aumentou significativamente após o condicionamento ao alimento, comparado aos níveis pré-CPP. Esse comportamento tem sido associado à níveis de ansiedade em micos (BARROS e cols., 2004). Cabe ressaltar que, durante a sessão teste, os micos que exibiram uma maior resposta de CPP ao chocolate foram os mais vigilantes, uma vez que o nível de vigilância pós-CPP apresentou uma correlação positiva com o tempo de permanência no compartimento CC no dia do teste. Porém, nenhuma outra correlação foi

vista para os demais comportamentos indicativos de ansiedade e para as concentrações de cortisol.

A ausência de um reforço alimentar no dia da sessão teste – particularmente o chocolate – pode ter induzido uma resposta de ansiedade aguda nos micos. Embora primatas não-humanos pareçam aprender a prever a disponibilidade de recompensas alimentares (MONCLARO e cols., 2014), semelhante a outros animais (ANTLE e SILVER, 2009) e humanos (OTT e cols., 2011), uma dissociação entre respostas comportamentais e hormonais ao estresse/ansiedade (NORCROSS e NEWMAN, 1999) e à dependência (CAGNI e cols., 2012) tem sido descrita.

Sabe-se que o consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura induz *per se* neuroadaptações no eixo HPA (COTTONE e cols., 2009; MARTIRE e cols., 2014) e que este por sua vez exerce um controle regulatório sob diferentes comportamentos apetitivos, tanto via manutenção do controle hedônico ou alterando a sensibilidade de diferentes tipos de recompensa (HILDEBRANDT e GREIF, 2013).

Os resultados do presente estudo precisam ser interpretados com cautela, uma vez que o cortisol não foi medido durante a fase de condicionamento ao alimento, na tentativa de minimizar o desconforto repetido da punção venosa nos sujeitos experimentais e evitar a coleta de sangue em curtos intervalos de tempo. Por outro lado, a concentração de cortisol não foi correlacionada ao procedimento de coleta de sangue, e as concentrações obtidas foram similares às observadas anteriormente em micos (PRYCE e cols., 2002).

7.2.10 Conclusões preliminares

(1) Os micos não demonstraram uma preferência inicial por um dos compartimentos, indicando o efeito *per se* dos diferentes alimentos testados;

(2) Apenas o chocolate induziu uma resposta de CPP nos micos, uma vez que o tempo de permanência no compartimento CC aumentou significativamente, comparado com os níveis pré-CPP;

(3) A quantidade de alimento consumida e o perfil de forrageio mantiveram-se constantes ao longo do estudo, no entanto mais chocolate foi consumido por sessão do que ração;

(4) Os animais que passaram mais tempo forrageando durante o condicionamento ficaram mais tempo no compartimento pareado ao chocolate no dia do teste;

(5) A atividade exploratória aumentou significativamente após o condicionamento ao chocolate e os animais que permaneceram mais tempo no comportamento pareado ao

chocolate exibiram maiores níveis de vigilância. Porém as concentrações de cortisol se mantiveram constantes.

(6) Portanto, o consumo repetido de um alimento altamente palatável e rico em açúcar e gordura (chocolate) foi mais propenso a ser excessivamente consumido por micos, a induzir uma resposta de preferência condicionada-por-lugar e a gerar comportamentos indicativos de ansiedade na sua ausência.

8.0 ESTUDO 3: TESTE DE CONFLITO CHOCOLATE vs PREDADOR

Esse terceiro estudo teve como objetivo estabelecer o comportamento alimentar dos micos por um alimento altamente palatável e com potencial de gerar dependência (estabelecido no Estudo 2) diante da presença concomitante de um estímulo naturalmente aversivo (modelo de predador; Teste de Conflito), e o efeito que a exposição prévia a um estresse psicossocial (estabelecido no Estudo 1) exerce nesse comportamento, podendo assim se estabelecer um perfil alimentar do tipo compulsivo.

8.1 Sujeitos experimentais

Foram utilizados 14 micos-estrela adultos (7 machos e 7 fêmeas). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (CTRL; n=8) e grupo isolado (ISI; n=8). Água e alimento estavam disponíveis *ad libitum*, exceto quando indicado no procedimento experimental descrito abaixo. Todas as etapas experimentais foram realizadas entre 13:30 e 17:30 h.

8.2 Alimento teste

Foi fornecido como reforço alimentar 50 g de chocolate ao leite, cortados em pequenos pedaços com tamanhos similares (Lacta®).

8.3 Procedimento experimental

O procedimento foi dividido em três fases, conforme esquema (Figura 17).

- a) Habituação
- b) Exposição ao chocolate
- c) Teste de Conflito

Antes do início de cada sessão experimental, cada animal foi capturado em seu viveiro de moradia, com auxílio de um puçá, e colocado na caixa-transporte, sendo levado à sala de experimento e liberado no *hall* de entrada da caixa CPP (descrito na seção 7.2.2), iniciando assim uma sessão de 10 min. Após esse período, o sujeito foi levado de volta ao seu viveiro de moradia, via caixa-transporte, e o aparato limpo com álcool 70% antes de iniciar uma nova sessão. A ordem com que os sujeitos foram testados variou aleatoriamente a cada dia. Todos os animais foram testados apenas uma vez por dia e as sessões realizadas em intervalos de 24 h.

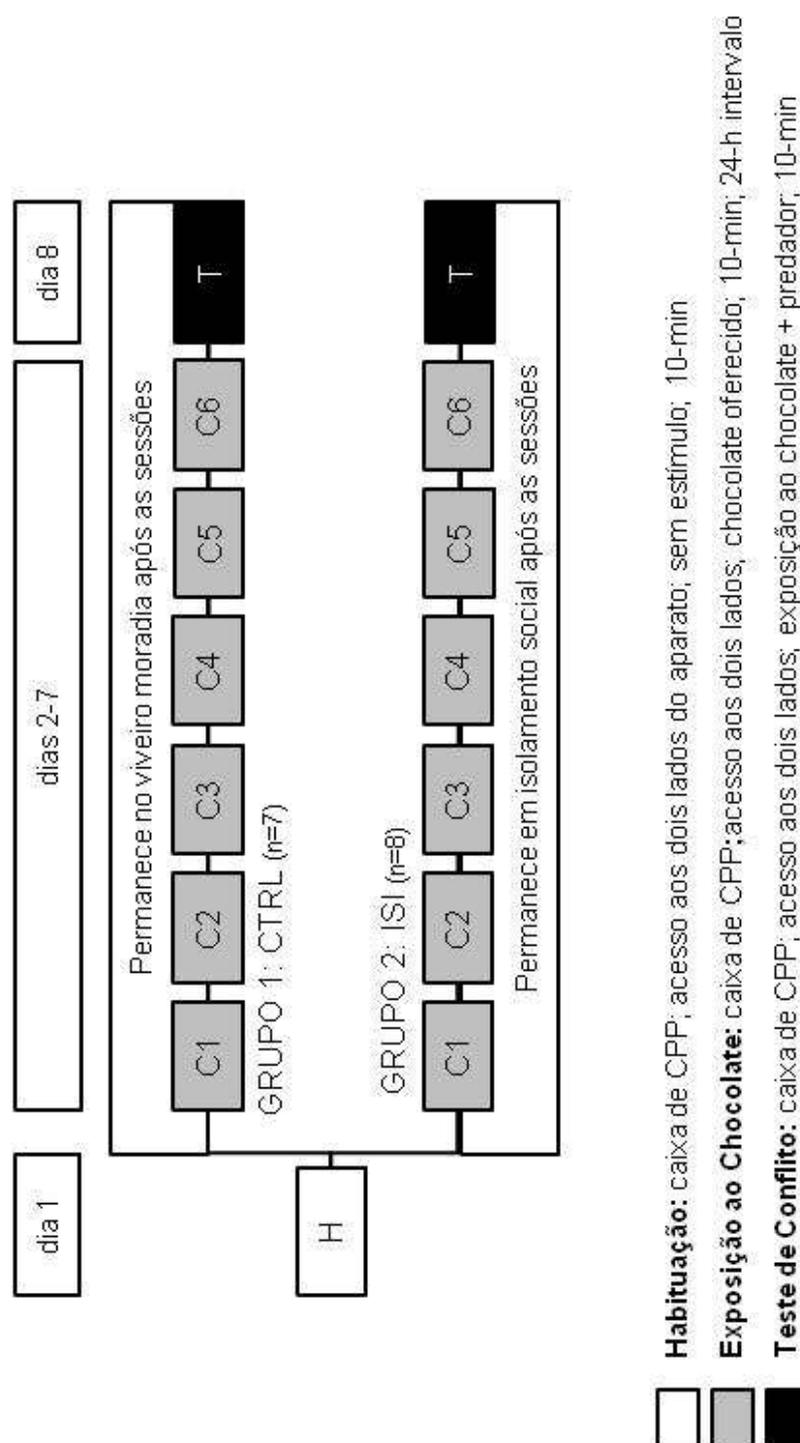


Figura 17. Representação esquemática do procedimento experimental adotado no Estudo 3.

8.3.1 Habituação

Essa primeira fase teve por objetivo habituar os indivíduos ao aparato do CPP. Para tanto, no dia 1, os animais do grupo CTRL e ISI foram levados até à caixa de CPP para uma sessão de 10 min. Durante esse intervalo, os animais tiveram acesso livre aos dois lados do aparato experimental, sem a presença de nenhum estímulo. Transcorrido o tempo de sessão, os indivíduos pertencentes ao grupo ISI foram separados dos seus respectivos parceiros sociais. Para isso, metade do grupo foi alocada em um novo viveiro padrão por sete dias consecutivos (i.e., o restante do procedimento) e durante esse período não tiveram contato visual e tátil com o parceiro. Com a retirada do seu parceiro, a outra metade permaneceu isolada no seu ambiente familiar. Os micos pertencentes ao grupo CTRL permaneceram na sua condição social familiar em seus próprios viveiros de moradia.

8.3.2 Exposição ao chocolate

Essa fase teve como objetivo induzir o consumo de chocolate em um dos compartimentos específicos da caixa de CPP. Para tanto, nos dias 2-7, todos os micos foram submetidos a uma sessão de 10min de exposição ao chocolate no aparato experimental, independentemente do seu grupo experimental, totalizando seis sessões. Em cada sessão, os sujeitos tiveram acesso livre aos dois compartimentos da caixa de CPP (porta central mantida aberta, *vide seção 7.2.2*). No entanto, o chocolate foi fornecido no suporte alimentar de apenas um dos compartimentos, enquanto o prato de inox no compartimento oposto ficou vazio. Metade dos sujeitos (de ambos os grupos) receberam chocolate no compartimento branco e o restante no compartimento listrado, sendo essa designação mantida durante todo o experimento. Ao final da sessão, o animal foi levado de volta ao viveiro em que estava (ambiente familiar ou novo) via caixa-transporte.

8.3.3 Teste de Conflito

Nesta fase o objetivo foi verificar se a presença de um estímulo naturalmente aversivo (modelo de gato taxidermizado – espécie: *Leopardus tigrinus*) no compartimento contendo um alimento altamente palatável (chocolate) inibe ou não a busca e/ou consumo de estímulo apetitivo. Para isso, no dia 8, os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma sessão de 10 min na caixa de CPP. O chocolate ao leite foi ofertado novamente no mesmo compartimento em que foi previamente fornecido, seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima. No lado oposto, o prato de aço inox permaneceu vazio. Concomitantemente, o estímulo aversivo foi colocado próximo ao suporte alimentar onde o

chocolate foi disponibilizado. Vale ressaltar que o estímulo aversivo foi colocado do lado de fora do aparato experimental, sendo separado do suporte alimentar apenas pelo vidro frontal transparente da caixa de CPP (Figura 18). Após o término da sessão teste, os animais do grupo CTRL e ISI foram levados de volta ao seu viveiro de moradia e convívio com o seu parceiro social (fim do isolamento para os animais do grupo ISI).



Figura 18. Localização do estímulo aversivo (modelo de gato) e do estímulo apetitivo (prato inox contendo chocolate) no mesmo compartimento da caixa de CPP, separados apenas pelo vidro frontal transparente do aparato.

8.4 Análise do Comportamento

Os parâmetros comportamentais foram registrados via o programa de análises comportamentais Any-Maze (Stoelting Co., EUA). As seguintes categorias comportamentais foram registradas manualmente por um observador previamente treinado (confiabilidade intra-observador 95%) durante as sessões 1 e 6 de exposição ao chocolate e na sessão teste (T): 1) atividade locomotora: tempo, em segundos, se movimentando dentro do aparato experimental; 2) vigilância: duração de varredura contínua ou outros movimentos visíveis de cabeça enquanto o animal permaneceu parado; 3) exploração: duração de cheirar, lamber ou manipular qualquer parte do aparato; 4) forrageio: duração da busca, manipulação e/ou ingestão/consumo do alimento; 5) comportamentos de medo: *tsik-tsik* - duração de emissão desse tipo de vocalização de alarme e *swaying* - duração de movimentos laterais, pendulares e repetitivos do corpo enquanto o animal permaneceu sentado; 6) comportamentos de observação: olhar direto - frequência de movimento rápido direcionado ao estímulo aversivo (gato taxidermizado) e *head-cock*: frequência de movimentos repetitivos da cabeça de um lado para o outro ao longo do eixo longitudinal do corpo,

direcionado ao estímulo aversivo; e 7) proximidade ao estímulo apetitivo: tempo de permanência dentro do quadrante onde o chocolate foi disponibilizado (quadrante CC1), na caixa de CPP. O tempo de permanência em cada compartimento também foi mensurado (compartimento chocolate – CC vs compartimento sem chocolate – SC).

8.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média dos valores e o erro padrão da média (+epm) para cada um dos parâmetros analisados. Como não foi observada diferença no comportamento dos machos e das fêmeas neste estudo, os dados foram analisados juntos. A atividade locomotora, a vigilância, a exploração, o forrageio/consumo e a proximidade ao estímulo (CC1) foram analisados via uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mix design two-way ANOVA*). O “grupo” foi usado como fator independente e a “sessão” como variável dependente. Quando resultados significativos foram obtidos, as análises foram seguidas pelo teste *post hoc* de Tukey. Os dados referentes às categorias “observação” e “medo” foram analisados via teste t para amostras independentes (CTRL vs ISI). O tempo de permanência em cada compartimento, para cada grupo, foi analisado usando uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas, em que o “compartimento” foi o fator independente e a “sessão” a variável dependente. O nível de significância adotado em todos os testes foi de $p \leq 0,05$.

8.6 Resultados

Na primeira sessão de exposição ao chocolate (S1), os animais do grupo CTRL apresentaram um padrão de atividade locomotora significativamente maior que a dos animais do grupo ISI, mas não foram observadas diferenças significativas entre as sessões e nem uma interação entre os fatores sessão vs grupo (sessão: $F_{2,22}=0,40$, $p=0,59$; grupo: $F_{1,11}=8,43$, $p=0,01$; sessão x grupo: $F_{2,22}=0,21$, $p=0,71$ – Tabela 6). Ainda, em ambos os grupos experimentais, houve uma diminuição na duração da vigilância da última exposição ao chocolate (S6) para o dia do teste de conflito. No entanto, diferenças entre os grupos e uma interação grupo vs sessão não foram observadas (sessão: $F_{2,24}=5,22$, $p=0,01$; grupo: $F_{1,12}=0,97$, $p=0,34$; sessão x grupo: $F_{2,24}=2,10$, $p=0,15$ – Tabela 6). Por fim, houve uma diminuição significativa no tempo de exploração na sessão teste, quando comparado a sessão S1, tanto no grupo controle quanto isolado (sessão: $F_{2,24}=7,37$, $p=0,01$; grupo: $F_{1,12}=2,39$, $p=0,14$; sessão x grupo: $F_{2,24}=0,41$, $p=0,87$ - Tabela 6).

Tabela 6. Perfil comportamental (média \pm EPM) dos micos dos grupos controle (CTRL) e isolado (ISI) na caixa de CPP durante a primeira (S1) e sexta (S6) sessões de exposição ao chocolate e no dia da sessão teste (T).

Comportamento	Sessão Experimental		
	S1	S6	T
<i>Grupo CTRL</i>			
Locomoção	39 \pm 6 ^a	30 \pm 5	36 \pm 7
Vigilância	370 \pm 26	361 \pm 39 ^b	294 \pm 23
Exploração	42 \pm 14 ^c	15 \pm 5	6 \pm 2
<i>Grupo ISI</i>			
Lomoção	23 \pm 3	23 \pm 5	23 \pm 2
Vigilância	361 \pm 35	427 \pm 34 ^b	359 \pm 29
Exploração	85 \pm 35 ^c	35 \pm 7	24 \pm 7

^a $p < 0,05$ CTRL vs ISI; ^b $p < 0,05$ S6 vs T; ^c $p < 0,05$ S1 vs T

Considerando o tempo de permanência na área CC1 (local na caixa de CPP onde o chocolate foi disponibilizado) ao longo das seis sessões de exposição ao alimento teste, não foram observadas diferenças significativas entre as sessões e entre os grupos experimentais (sessão: $F_{1,12}=3,01$, $p=0,10$; grupo: $F_{1,12}=0,0001$, $p=0,98$). No entanto, foi detectado um efeito de interação sessão vs grupo ($F_{1,12}=6,76$, $p=0,02$). Essa interação demonstra que o perfil de resposta dos sujeitos diferiu ao longo do tempo (sessões) e de acordo com o grupo experimental (Figura 19). Dessa forma, o grupo CTRL passou mais tempo na área CC1 na sessão 6 que na primeira, enquanto que os animais isolados permaneceram mais tempo nesse mesmo ponto na sessão 1 do que na última.

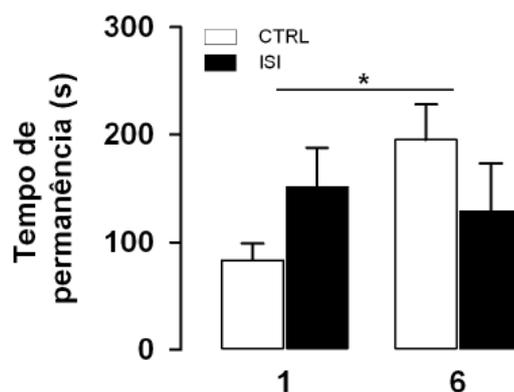


Figura 19. Média (\pm e.p.m.) do tempo de permanência (em segundos) na área CC1 da caixa de CPP (quadrante onde foi disponibilizado o chocolate), durante a primeira (1) e a sexta (6) sessão de

exposição ao chocolate. Barras brancas: grupo controle (CTRL; n=8); Barras pretas: grupo isolado (ISI; n=8). * $p < 0,05$ interação sessão vs grupo.

Os micos de ambos os grupos experimentais passaram menos tempo forrageando durante a sessão teste, comparado aos níveis observados nas sessões 1 e 6 de exposição apenas ao chocolate ($F_{2,24} = 13,68$, $p = 0,001$ – Figura 20). Nenhuma diferença entre os grupos e um efeito de interação entre os fatores foi observada (grupo: $F_{1,12} = 0,99$, $p = 0,33$; sessão vs grupo: $F_{2,24} = 2,36$, $p = 0,11$). Um perfil similar foi observado com relação ao consumo de chocolate, uma vez que em ambos os grupos houve uma redução significativa na quantidade de chocolate ingerida no dia do teste, comparado com as sessões 1 e 6 de exposição apenas ao alimento (sessão: $F_{2,24} = 6,75$, $p = 0,006$; grupo: $F_{1,12} = 0,02$, $p = 0,88$; sessão vs grupo: $F_{2,24} = 0,22$, $p = 0,78$ – Figura 20).

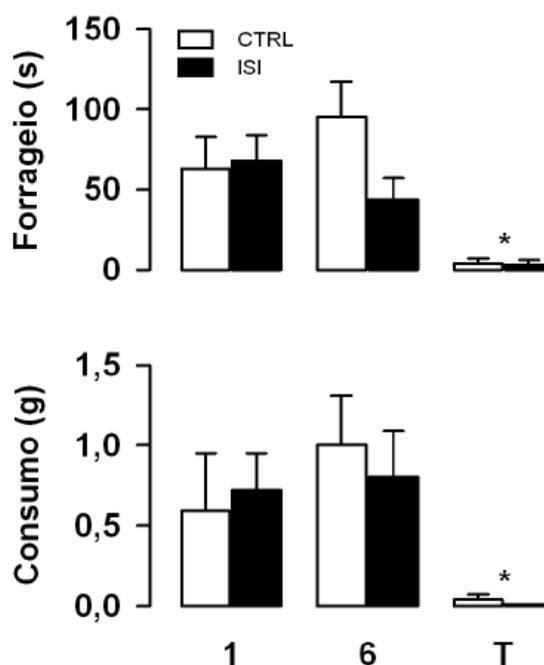


Figura 20. Média (\pm e.p.m) do perfil de forrageio registrado na primeira (1) e sexta sessão (6) de exposição ao chocolate e na sessão teste (T). Superior: Tempo de forrageio (em segundos); Inferior: Consumo de chocolate (em gramas). Barras brancas: grupo controle (CTRL; n=8); Barras pretas: grupo isolado (ISI; n=8). * $p < 0,05$ T vs 1 e 6.

Na sessão teste, os micos de ambos os grupos experimentais permaneceram significativamente mais tempo no compartimento SC que no CC, sendo que esse perfil diferiu significativamente do que foi demonstrado pelos animais nas sessões 1 e 6 de exposição ao chocolate, em que a permanência em ambos os lados do aparato foi

equivalente (Grupo CTRL – sessão: $F_{2,12}=5,35$, $p=0,04$; compartimento: $F_{1,6}=14,12$, $p=0,009$; sessão vs compartimento: $F_{2,12}=23,96$, $p=0,0001$; Grupo ISI – sessão: $F_{2,12}= 1,11$, $p=0,33$; compartimento: $F_{1,6}=6,00$, $p=0,05$; sessão vs compartimento: $F_{2,12}=10,64$, $p=0,003$; Figura 21).

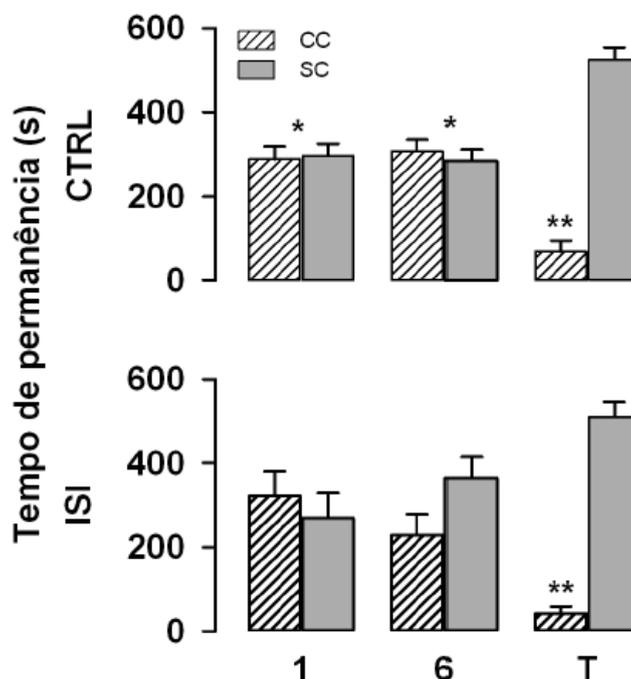


Figura 21. Média (\pm e.p.m.) do tempo de permanência no compartimento com chocolate (CC; barras listradas) e no compartimento sem chocolate (SC; barras cinzas) durante a primeira (1) e a sexta (6) sessão de exposição ao alimento teste e na sessão teste (T) pelos grupos controle (CTRL; $n=8$; Superior) e isolado (ISI; $n=8$; Inferior). * $p<0,05$ vs sessão T; ** $p<0,05$ vs SC.

Na sessão teste, os animais mantidos sob isolamento social exibiram significativamente mais respostas de medo em resposta a presença do gato que os animais do grupo CTRL ($t_{12}=-1,92$, $p=0,002$ – Figura 22). Contudo, o nível de observação do predador por parte dos micos foi equivalente entre os dois grupos experimentais ($t_{12}=0,81$, $p=0,80$ – Figura 22).

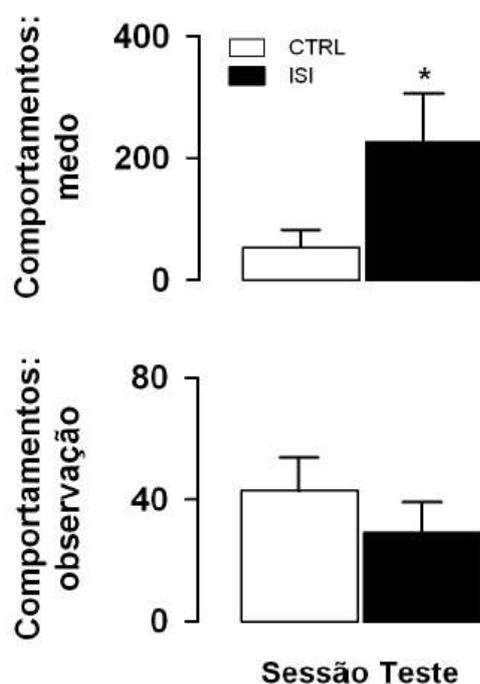


Figura 22. Média (\pm e.p.m.) dos parâmetros comportamentais registrados durante a sessão teste. Superior: Comportamentos de medo (duração de tsik-tsik + swaying); Inferior: Comportamentos de observação (frequência de olhar direto + head-cock). Barras brancas: grupo controle (CTRL; n=8); Barras pretas: grupo isolado (ISI; n=8). * $p < 0,05$.

8.7 Discussão

Analisando o perfil comportamental de micos ao longo do experimento, observou-se que os micos que permaneceram no viveiro com o parceiro social se locomoveram mais na primeira sessão de exposição ao chocolate, comparado aos animais sob condição de isolamento social. Apesar desse resultado diferir do que foi observado no Estudo 1 (seção 6.6.1.1), quando os micos mantidos isolados se locomoveram mais no primeiro dia de isolamento, a presença do alimento altamente palatável (chocolate) nessa sessão pode ter contribuído para essa divergência. Uma menor atividade locomotora também já foi observada em resposta ao isolamento em outros estudos (LEVINE e cols., 1993; SMITH e cols., 1998). Além disso, para ambos os grupos, o padrão de locomoção se manteve constante quando na presença do modelo de predador sugerindo que, independentemente do estresse psicossocial, esse parâmetro não foi influenciado por situação experimental de estresse de predação. Nesse contexto, BARROS e cols (2004) e CAGNI e cols. (2011) também demonstraram que a atividade locomotora de micos não foi alterada devido a um confronto com um predador. Durante a avaliação de risco frente a um estímulo aversivo, comportamentos estritamente não-defensivos (locomoção, exploração, catação, interação

social) podem ser inibidos (BLANCHARD e cols., 1998; MAESTRIPIERI e cols., 1992; BRAMLEY E WASS 2001), embora há relatos em calitriquideos de um aumento na locomoção, vocalização e *mobbing* durante confrontos com predadores (CAINE, 1998; BARROS e cols., 2002).

Com relação ao comportamento de vigilância, tanto o grupo CTRL quanto ISI diminuíram o tempo de vigilância no dia do teste (chocolate vs predador), comparado a última sessão de exposição ao chocolate (S6). No entanto, a vigilância parece aumentar em resposta a uma ameaça potencial afim de facilitar a detecção e evitar o predador (FERRARI E LOPES FERRARI, 1990; CAINE, 1996,1998; HARDIE E BUCHANAN-SMITH, 1997; KOENIG, 1998; BARROS e cols., 2004; BARROS e cols., 2008). Em micos, a vigilância faz parte de um importante e complexo repertório comportamental anti-predação (CAINE, 1993). Por outro lado, DACIER e cols (2006) observaram que micos aumentaram a taxa de vigilância após a exposição a um predador taxidermizado, mas não durante o confronto com o estímulo. Os autores sugeriram que tal fato pode ser devido ao aumento de outras respostas comportamentais durante o confronto e não necessariamente implica dizer que os micos não foram vigilantes sob esta circunstância. Tal argumento pode ser aplicado para o presente estudo, uma vez que os micos diminuíram o tempo de vigilância durante o teste de conflito. Ainda considerando os parâmetros comportamentais, em ambos os grupos, menos tempo foi dedicado a exploração na sessão teste, comparado a primeira sessão de exposição ao chocolate. Isso pode ser decorrente de um processo de habituação ao longo do experimento, independentemente do tipo de sessão realizada. Estudos em micos já demonstraram uma diminuição na atividade de exploração após conflitos com predador (BARROS e cols., 2000; BARROS e cols., 2004).

No presente estudo, os micos foram submetidos ao um conflito “chocolate vs predador”, para determinar se os animais – sob uma condição de estresse psicossocial ou não – buscavam/consumiam chocolate (estímulo apetitivo) mesmo na presença de um estímulo aversivo (modelo de gato-do-mato taxidermizado). Durante a fase de exposição apenas ao chocolate (sessões 1 e 6), os animais mudaram seu perfil de ocupação da área CC1 (onde o estímulo apetitivo foi disponibilizado), de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam. O grupo CTRL aumentou o tempo de permanência na área do chocolate na sessão 6, comparada a S1, enquanto que os que foram mantidos isolados reduziram o tempo de permanência nessa mesma área da primeira para a sexta sessão. Esse resultado demonstrou que os grupos apresentaram um perfil distinto de resposta ao estímulo apetitivo. No entanto, novos estudos se fazem necessários para analisar os fatores que induziram essa mudança no perfil de ocupação da área onde o chocolate foi fornecido.

Em termos do forrageio e consumo, observou-se em ambos os grupos um menor nível desses parâmetros no dia do teste, comparado às sessões em que apenas chocolate

foi fornecido (S1 e S6). Portanto, o comportamento alimentar dos micos por um item altamente palatável foi inibido pela presença de um potencial predador, independentemente de estar ou não sob uma situação de estresse psicossocial (isolamento social). Estímulos aversivos podem, de fato, inibir a busca descontrolada por alimentos desse tipo (VANDERSCHUREN e EVERITT, 2004), enquanto que o estresse crônico já foi demonstrado aumentar o seu consumo (DALLMAN e cols., 2003; ARCE e cols., 2010; MICHPOULOS e cols., 2012). No caso da busca ou ingestão de alimentos ricos em açúcar e gordura permanecer, mesmo diante de uma consequência aversiva, caracteriza-se um quadro de comportamento alimentar do tipo compulsivo (DEROCHE-GAMONET e cols., 2004; VANDERSCHUREN e EVERITT, 2004; LATAGLIATA e cols., 2010). De fato, LATAGLIATA e cols (2010) demonstraram que o estresse crônico (restrição alimentar, no referido estudo) manteve a busca e ingestão de chocolate apesar da presença de um estímulo aversivo (choque nas patas). Porém, no presente estudo, o estresse por isolamento social não induziu tal perfil comportamental esperado. Estímulos relacionados a predação são ecologicamente relevantes para a sobrevivência de um animal e consequentemente induzem respostas similares às aquelas exibidas nos contextos naturais (CALVO-TORRENT e cols., 1999). Dessa forma, a decisão comportamental da espécie em abster-se do forrageio enquanto há um estímulo potencialmente perigoso no ambiente parece ser a melhor estratégia de sobrevivência, uma vez que a atividade de forrageio desvia a atenção para estímulos ambientais diversos e aumenta o risco de predação (NUNES e cols., 2010).

Em micos, o risco de predação exerce uma forte influência sobre o repertório comportamental (CAINE, 1993). Similar ao resultado obtido no presente estudo, CAGNI e cols (2011) demonstraram que calitriquideos (*C. penicillata*) diminuem o tempo de forrageamento após uma sessão de 5 min de exposição a um modelo de serpente. Da mesma forma e na mesma espécie, BORGES (2015) demonstrou uma diminuição na ingestão de bala de banana após uma exposição a um modelo de serpente. Um outro estudo realizado em micos, evidenciou uma diminuição na atividade de forrageio em indivíduos da espécie *C.geoffroy* em resposta à exposição a um predador aéreo (coruja) (CAINE, 1998). Por outro lado, camundongos submetidos a um estresse crônico com um predador consumiram mais sacarose que os animais controles (BURGADO e cols., 2014), embora tenha sido demonstrado em outro estudo que camundongos submetidos a uma exposição crônica a um predador diminuem os níveis de ingestão de sacarose (CALVO-TORRENT e cols., 1999).

De acordo com BLANCHARD e BLANCHARD (1988), este padrão comportamental denominado de “avaliação de risco” analisa a probabilidade do risco em comparação ao valor da recompensa, ou seja, adquirir a recompensa ou evitar o risco de predação. Em

resposta aos sinais de perigo, cada espécie expressa uma avaliação de risco típica que é designada por seleção natural a reconhecer as características específicas de predadores, exigindo uma resposta de confronto rápida (SHUHAMA e cols., 2007). Diante disso, os micos no presente estudo exibiram um comportamento de inibição na busca e no consumo do estímulo apetitivo devido à presença do modelo de predador.

Foi observado também que, no dia do teste, os animais de ambos os grupos permaneceram menos tempo no compartimento com o estímulo que nas sessões anteriores, sugerindo um comportamento de evitar a área onde o predador estava. O teste de conflito consiste em avaliar a tomada de decisão de aproximar de uma recompensa e/ou afastar de uma ameaça concomitante. A resposta apresentada pode variar entre indivíduos dependendo da percepção do valor da recompensa e do potencial de ameaça (DEROCHE-GAMONET e cols., 2004; HADDON e KILLCROSS, 2006). Micos evitam se aproximar de potenciais predadores ou de áreas onde eles tenham sido anteriormente encontrados (HAYNES E SNOWDON, 1990; BARROS e cols., 2000; TELLO e cols., 2002; BARROS e cols., 2004; CAGNI e cols., 2011). Este padrão também já foi observado em confrontos de micos com humanos (CAREY e cols., 1992) e em roedores (BLANCHARD e cols., 2003).

Algumas situações experimentais de conflito envolvem privação de água e/ou comida. Nesse caso, a necessidade de se explorar a área, mesmo na presença de um estímulo aversivo torna-se premente, uma vez que ambos estímulos envolvem a sobrevivência do animal (*para detalhes ver* BLANCHARD e BLANCHARD, 1988). No presente estudo os animais não foram privados e, embora tenha sido demonstrado o valor hedônico do chocolate em micos (DUARTE e cols., 2014), o gato-do-mato é um forte estímulo predatório nessa espécie (BARROS e cols., 2000). Com isso, os animais costumam superestimar o risco (THORSON e cols., 1998), uma vez que o custo de se perder uma recompensa é pequeno frente a sua sobrevivência. Portanto, nas condições experimentais do presente estudo, evitar o predador foi um comportamento estratégico.

Embora os grupos tenham respondido de forma similar no teste de conflito – diminuindo o forrageio e o consumo de chocolate e o tempo de permanência no compartimento CC – o padrão de resposta de medo ao estímulo aversivo diferiu. Os animais mantidos isolados por sete dias consecutivos exibiram uma maior resposta de medo ao gato (i.e., *tsik-tsik* e *swaying*) que os animais controle. Vale ressaltar que todos os animais visualizaram o estímulo aversivo de forma semelhante, visto que não houve diferença entre os grupos em termos dos comportamentos de observação (i.e., olhar direto e *head-cock*).

Em espécies sociais, a presença do parceiro e/ou grupo social influencia as respostas ao estresse (STANTON e cols., 1985; MENDOZA e cols., 1991; GRIGNARD e cols., 2000; DACOSTA e cols., 2004; KAISER e cols., 2007; GUZMAN e cols., 2009; CUENYA e cols., 2012; GONZÁLEZ e cols., 2013; KIYOKAWA e cols., 2014; KIYOKAWA e

cols., 2014b). Esse fenômeno, conhecido como “*social buffering*”, é a presença de um coespecífico exercendo uma função de suporte social e regulando negativamente a magnitude e a duração da resposta do eixo HPA, minimizando assim o efeito do estímulo estressor (RUKSTALIS E FRENCH, 2005; *para revisão* HENNESSY e cols., 2009).

De fato, em ratos, a presença de um coespecífico diminuiu a resposta de estresse frente a um predador ou pistas associadas ao mesmo (BOWEN e cols., 2013). Em primatas, VOGT e cols (1981) demonstraram que macacos-de-cheiro alojados individualmente exibiram um aumento na atividade da glândula adrenal quando expostos a um modelo de serpente, comparado a indivíduos em grupos sociais estáveis. Nessa mesma espécie, um condicionamento aversivo (luz-choque) aumentou os níveis de cortisol quando os animais foram testados sozinhos, mas a resposta diminuiu na presença do parceiro social e retornou a níveis basais quando vários parceiros estavam presentes (STANTON e cols., 1985). Ademais, YOUNG e cols (2014) demonstraram que indivíduos da espécie *Macaca sylvanus* que apresentavam fortes laços sociais tinham níveis fecais de cortisol mais altos ao serem expostos a eventos estressantes que aqueles com ligações mais fracas. Em humanos, um estudo de neuroimagem demonstrou que o parceiro romântico pode diminuir a ativação neural a um estímulo ameaçador (COAN e cols., 2006).

No presente estudo, a ausência do parceiro social durante os sete dias de isolamento pode ter potencializado a subsequente resposta de medo ao estímulo aversivo, uma vez que o isolamento *per se* já é um fator de estresse em micos. No entanto, é preciso lembrar que durante a sessão de exposição ao estímulo aversivo (teste de conflito), todos os animais estavam sozinhos no aparato. Portanto, novos estudo que incluam inclusive dosagens dos níveis circulantes de cortisol se fazem necessários para melhor elucidar o efeito do isolamento social na resposta de medo a um estímulo naturalmente aversivo, como um modelo de predador.

8.8 Conclusões preliminares

(1) Durante a situação de conflito, ambos os grupos diminuíram a quantidade de chocolate consumida e o tempo de forrageio, de permanência no compartimento onde os estímulos apetitivo e aversivo foram apresentados, de vigilância e de exploração;

(2) Os animais controles e isolados exibiram diferentes perfis de ocupação da área onde o chocolate foi disponibilizado ao longo das sessões experimentais. Enquanto o grupo CTRL aumentou o tempo de permanência da sessão S1 para S6, o grupo isolado tendeu a exibir uma resposta inversa;

(3) Os animais mantidos isolados socialmente exibiram uma resposta de medo maior ao gato do que o grupo controle, embora ambos tenham exibido um perfil similar de observação ao estímulo aversivo;

(4) Portanto, um estresse psicossocial não induziu um comportamento alimentar do tipo compulsivo em micos, diante do conflito chocolate vs predador.

9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a avaliar o comportamento de busca e ingestão de chocolate (um alimento altamente palatável) em indivíduos adultos de uma espécie de primata não-humanos (mico-estrela; *Callithrix penicillata*), analisando o efeito de um estresse psicossocial e da presença de um estímulo naturalmente aversivo.

Cada estudo possibilitou elucidar diferentes aspectos envolvidos nos mecanismos neuropsicobiológicos que subsidiam a dependência por alimentos e demonstrar o efeito do estresse na busca e ingestão de alimentos ricos em açúcar e gordura. No Estudo 1 foi possível concluir que micos submetidos a um ISI, por sete dias consecutivos, exibiram mudanças comportamentais indicativas de estresse, embora não tenham sido acompanhadas por alterações no perfil hormonal do cortisol, conforme já relatado na literatura. No entanto, as mudanças comportamentais observadas – como aumento da atividade locomotora, aumento da frequência de comportamentos afiliativos e diminuição do tempo de vigília após reunião – demonstram que os indivíduos reagiram a ausência/presença do parceiro social, corroborando o uso do modelo de ISI como fator gerador de estresse psicossocial na espécie *Callithrix penicillata*. Os resultados obtidos no Estudo 1 possibilitaram a escolha do fator de estresse que foi utilizado nas etapas subsequentes.

A realização do Estudo 2 corroborou a escolha do chocolate como alimento altamente palatável e com potencial efeito reforçador a ser incluído nos demais testes experimentais. Na primeira parte desse estudo, especificamente, foi verificado pela primeira vez que o chocolate é um alimento com potencial de causar dependência e a induzir um efeito duradouro na memória associativa relacionada a um alimento em micos (DUARTE e cols., 2014), semelhante ao que ocorre com drogas de abuso. De fato, no dia do teste, os animais aumentaram o tempo de permanência no compartimento pareado ao chocolate e diminuíram a latência até a primeira entrada no mesmo, comparado à fase pré-CPP. Foi visto também que a resposta de CPP dos micos se mantém até pelo menos 15 dias após o último condicionamento, evidenciando o efeito mnemônico para um estímulo natural e sugerindo que recompensas de alto valor podem levar a formação de memórias de longo

prazo. O chocolate já tinha sido descrito como um alimento com potencial reforçador em roedores (DICKSON e cols., 2012; ORSINI e cols., 2013; VENTURA e cols., 2008), porém o referido estudo foi o primeiro a demonstrar esse efeito em um primata não-humano. Na segunda parte foi possível corroborar os resultados vistos anteriormente e demonstrar ainda que o chocolate é mais propenso a ser excessivamente consumido por micos e a gerar comportamentos indicativos de ansiedade na sua ausência, comparado com um alimento de menor valor calórico e palatabilidade (ração - DUARTE e cols., 2015). Nesse estudo, os micos consumiram significativamente mais chocolate que ração e passaram a permanecerem mais tempo no compartimento pareado ao chocolate que antes do condicionamento, além de haver uma correlação positiva entre o tempo de forrageio durante o condicionamento e o de permanência no compartimento CC durante a sessão teste. Além disso, houve um aumento na atividade exploratória após condicionamento ao chocolate e nos animais que permaneceram mais tempo nesse compartimento foi visto maiores níveis de vigilância. Porém, as concentrações de cortisol se mantiveram constantes. Vale destacar a dificuldade em se obter, via coleta sanguínea, alterações no perfil de cortisol em diferentes etapas deste trabalho, para esta espécie. Talvez o emprego de coleta de saliva ou urina pudesse auxiliar na obtenção de resultados distintos.

Após a escolha do teste de ISI como fator de estresse psicossocial em micos (Estudo 1) e do chocolate como alimento com potencial de causar dependência/compulsão (Estudo 2), o Estudo 3 foi realizado para avaliar o efeito que um estresse psicossocial tem sobre o comportamento alimentar de uma espécie de primata não-humano. Nesta etapa buscou-se criar uma situação de conflito entre se aproximar para obtenção de estímulo apetitivo (chocolate) e se esquivar para se proteger de um estímulo naturalmente aversivo (modelo de predador). Em roedores, por exemplo, já foi descrito que animais submetidos a um estresse crônico mantiveram a busca e a ingestão do chocolate apesar da presença de um estímulo aversivo (LATAGLIATA e cols., 2010), evidenciado assim um comportamento alimentar do tipo compulsivo. No entanto, o valor reforçador do estímulo apetitivo e o potencial de ameaça do estímulo aversivo podem influenciar a tomada de decisão (CABANAC, 1985; HADDON e KILLCROSS, 2006). Desse modo, no Estudo 3, os micos submetidos a um estresse psicossocial não exibiram um comportamento alimentar do tipo compulsivo, uma vez que, durante a situação de conflito, diminuíram o tempo de forrageio, o consumo de chocolate e o tempo de permanência no compartimento onde os estímulos foram apresentados. Cabe ressaltar, porém, que os animais submetidos ao isolamento social exibiram uma maior resposta de medo ao estímulo aversivo do que o grupo controle, embora ambos tenham exibido um perfil similar de observação do modelo de predador. Novos estudos devem ser realizados para verificar se houve efeito de *social buffering* que

amenizasse as respostas de medo/ansiedade dos animais mantidos com o parceiro social ao longo do experimento.

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, comparado com os resultados em roedores (LATAGLIATA e cols., 2010), pode-se afirmar que o estresse psicossocial não induziu um comportamento alimentar do tipo compulsivo. No entanto, é preciso considerar alguns fatores que podem ter influenciado esse resultado e que merecem novas investigações:

a) o estímulo escolhido (gato-do-mato taxidermizado), do ponto de vista evolutivo e ecológico, apresenta um potencial de ameaça que compromete a sobrevivência do animal influenciando na escolha durante conflito, diferentemente do estímulo de choque elétrico (estímulo aversivo) que geralmente é utilizado em roedores e nos paradigmas de condicionamento utilizados;

b) os micos foram submetidos ao isolamento social como um fator de estresse, enquanto roedores foram submetidos à restrição calórica; no entanto sabe-se que a restrição pode levar a um aumento no valor motivacional de um alimento em potencial (CARR, 2002). Talvez a sensação fisiológica de “fome” também deva ser considerada nesse tipo de estudo que envolve comportamento alimentar;

c) no presente protocolo houve um conflito entre os tipos de estresse que influenciam no comportamento alimentar: os animais foram submetidos tanto a um estresse que pode culminar com o aparecimento de um comportamento hiperfágico (isolamento social), como a um estresse que pode inibir *per se* o comportamento alimentar (presença do predador).

Vale ressaltar ainda que a escolha de estímulos naturalísticos favorece a exibição de comportamentos mais próximos dos observados na natureza. Estudos de comportamento alimentar devem levar em consideração ainda a características da espécie do sujeito experimental e as variações individuais entre os sujeitos. Abordagens que tracem diferenças entre gêneros também favorece o entendimento dos mecanismos subjacentes aos distúrbios alimentares observados em humanos. Diante do exposto, modelos animais, principalmente primatas não-humanos, favorecem o entendimento de processos neurobiológicos no âmbito de estudos comportamentais.

10. REFERÊNCIAS

Abbott DH, Barrett J, George LM. Comparative aspects of the social suppression of reproduction in female marmosets and tamarins, In: Rylands, A. B. *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behavior and Ecology*, Oxford University Press: 152-163, 1993.

Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschop MH, Gao XB, Horvath TL. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 3229-39, 2006.

Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavioral* 91: 449-58, 2007.

Adami GF, Gandolfo P, Bauer B, Scopinaro N. Binge eating in massively obese patients undergoing bariátrica surgery. *International Journal of Eating Disorders* 17: 45-50, 1995.

Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21: 263–307, 2000.

Alsio J, Pickering C, Roman E, Hulting AL, Lindblom J, Schioth HB. Motivation for sucrose in sated rats is predicted by low anxiety-like behavior. *Neuroscience Letters* 454:193–197, 2009.

Altamann J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour* 48:227-267, 1974.

Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Disponível: SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

Antle MC, Silver R. Neural basis of timing and anticipatory behaviors. *European Journal of Neuroscience* 30:1643-9, 2009.

APA - Associação Norte-Americana de Psiquiatria. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*, 4ª edição. Washington D.C. 2000.

APA - Associação Norte-Americana de Psiquiatria. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*, 5ª edição. Washington D.C. 2013.

Arce F, Novick I, Mandelblat Y, Vaadia E. Neuronal Correlates of Memory Formation in Motor Cortex after Adaptation to Force Field. *Journal of Neuroscience* 30: 9189-9198, 2010.

Aupperle RL, Sullivan SS, Melrose AJ, Paulus MP, Stein MB. A reverse translational approach to quantify approach avoidance conflict in humans. *Behavior Brain Research* 225: 455–463, 2011.

Auricchio P. *Primatas do Brasil*. São Paulo, Terra Brasilis, 168p, 1995.

Avena NM, Bocarsly ME, Hoebel BG, Gold MS. Overlaps in the nosology of substance abuse and overeating: The translational implications of “food addiction”. *Current Drug Abuse Reviews* 4:133–139, 2011.

Avena NM, Gold MS. Food and addiction - sugars, fats and hedonic overeating. *Addiction* 106:1214–1215, 2011a.

Avena NM, Gold MS. Variety and hyperpalatability: are they promoting addictive overeating? *The American Journal of Clinical Nutrition* 94:367–368, 2011b.

Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence of sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32: 20-39, 2008.

Avena NM. The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite* 55: 734-737, 2010.

Bakshi VP, Geyer MA. Ontogeny of isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating in rats. *Physiology and Behavior* 67:385–385, 1999.

Baldellou M, Henzi SP. Vigilance, predator detection and the presence of supernumerary males in vervet monkey troops. *Animal Behaviour* 43:451–461, 1992.

Banks WA, Burney BO, Robinson SM. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 29: 2061–2065, 2008.

Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood–brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302: 822–827, 2002.

Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our understanding of preclinical reward. *Psychopharmacology* 153: 31-43. 2000.

Barnea-Ygael N, Yadid G, Yaka R, Ben-Shahar O, Zangen A. Cue-induced reinstatement of cocaine seeking in the rat ‘conflict model’: Effect of prolonged home-cage confinement. *Psychopharmacology (Berl)* 219: 875–883, 2012

Barros M, Alencar C, De Souza Silva MA, Tomaz C. Changes in experimental conditions alter anti-predator vigilance and sequence predictability in captive marmosets. *Behavioural Processes* 77: 351–356, 2008.

Barros M, Boere V, Huston JP, Tomaz C. Measuring fear and anxiety in the marmoset (*Callithrix penicillata*) with a novel predator confrontation model: effects of diazepam. *Behavioral Brain Research* 108: 205-211; 2000.

Barros M, Boere V, Mello Jr EL, Tomaz C. Reactions to potential predators in captive-born marmosets (*Callithrix penicillata*). *Internacional Journal of Primatology* 23:443–54, 2002.

Barros M, De Souza Silva MA, Huston JP, Tomaz C. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after Exply induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78: 357-367, 2004.

Barros M, Dempster EL, Illott N, Chabrawi S, Maior RS, Tomaz C, de Souza Silva MA, Huston JP, Mill J, Müller CP. Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addiction Biology (Print)* 18: 452-454, 2013.

Barros M, Giorgetti M, Souto AAV, Vilela G, Santos K, Vila Boas N, Tomaz C. Persistent anxiety-like behavior in marmosets following a recent predatory stress condition: Reversal by diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86: 705-711; 2007.

Barros M, Mello EL, Huston JP, Tomaz C. Behavioral effects of buspirone in the marmoset employing a predator confrontation test of fear and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 68: 255-262, 2001.

Barros M, Mello Jr EL, Maior RS, Müller CP, Souza Silva MA, Carey RJ, Huston JP, Tomaz C. Anxiolytic-like effects of the selective 5-HT1A receptor antagonist WAY 100635 in non-human primates. *European Journal Pharmacology* 482: 197-203; 2003.

Barros M, Tomaz C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26: 187-201, 2002.

Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics* 3: 589–600, 2002.

Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *European Journal of Neuroscience* 11:4389-97, 1999.

Bassett L, Buchanan-Smith HM, McKinley J. Effects of training on stress-related behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in relation to coping with routine husbandry procedures. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 6: 221-233, 2003.

Belgardt BF, Bruning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212:97–113, 2010.

Bello NT, Hajnal A. Dopamine and binge eating behaviors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 97:25–33, 2010.

Benoit SC, Tracy AL. Behavioral controls of food intake. *Peptides* 29: 139-147, 2008.

Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25: 515-532, 2000.

Berner LA, Avena NM, Hoebel BG. Bingeing, self-restriction, and increased body weight in rats with limited access to a sweet-fat diet. *Obesity* 16: 1998–2002, 2008.

Berner LA, Bocarsly ME, Hoebel BG, Avena NM. Pharmacological interventions for binge eating: lessons from animal models, current treatments, and future directions. *Current Pharmaceutical Design* 17: 1180-1187, 2011.

Berridge KC, Ho CY, Richard JM, DiFeliceantonio AG. The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Research* 1350: 43–64, 2010.

Berthoud HR, Lenard NR, Shin AC. Food reward, hyperphagia, and obesity. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 300: 1266–1277, 2011.

Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14:197–200, 2006.

Berthoud HR. Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiology & Behavior* 91: 486–498, 2007.

Black P. The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type I. *Medical Hypotheses* 67: 879–891, 2006.

Blanchard DC, Markham C, Yang M, Hubbard D, Madarang E, Blanchard RJ. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. *Behavioral of Neuroscience* 117: 360–368, 2003.

Blanchard R, McKittrick CR, Blanchard DC. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior* 73:261–271, 2001.

Blanchard RJ, Blanchard DC. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology* 39: 43-68, 1988.

Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, McKittrick C, McEwen B, Blanchard DC. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiology and Behavior* 63:561–9, 1998.

Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ. Psychosocial stress and change in weight among US adults. *American Journal of Epidemiology* 170:181-92, 2009.

Blundell JE. Pharmacological approaches to appetite suppression. *Trends in Pharmacological Sciences* 12:147–57, 1991.

Blundell JE. The control of appetite: basic concepts and practical implications. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 129:182–8, 1999.

Bocarsly ME, Berner LA, Hoebel BG, Avena NM. Rats that binge eat fat-rich food do not show somatic signs or anxiety associated with opiate-like withdrawal: implications for nutrient-specific food addiction behaviors. *Physiology and Behavior* 104:865-72, 2011.

Boccia ML, Laudenslager ML, Reite ML. Individual differences in macaques' responses to stressors based on social and physiological factors: implications for primate welfare and research outcomes. *Laboratory Animals* 29: 250–257, 1995.

Boggiano MM, Chandler PC, Viana JB, Oswald KD, Maldonado CR, Wauford PK. Combined dieting and stress evoke exaggerated responses to opioids in binge-eating rats. *Behavioral Neuroscience* 119: 1207–1214, 2005.

Bonggiano MM, Artiga AI, Pritchett CE, Chandler-Laney PC, Smith ML, Eldridge AJ. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: an animal model of lean vs obese binge-eating and obesity with and without binge-eating. *International Journal of Obesity* 31: 1357–1367, 2007.

Borges AC. Efeitos do acesso intermitente a alimentos altamente palatáveis no comportamento alimentar e nas respostas induzidas pela cocaína em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*). Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Bouton ME, Bolles RC. Conditioned fear assessed freezing and by the suppression of three different baselines. *Animal Learning Behavioral* 8: 429, 1980.

Bowen MT, Kevin RC, May M, Staples LG, Hunt GE, McGregor IS. Defensive aggregation (huddling) in *Rattus norvegicus* toward predator odor: individual differences, social buffering effects and neural correlates. *PLoS ONE* 8: e68483, 2013.

Bowers ME, Choi DC, Ressler KJ. Neuropeptide regulation of fear and anxiety: implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y. *Physiology & Behavior* 107:699–710, 2012.

Box HO. Foraging strategies among male and female marmosets and tamarins (*Callitrichidae*): new perspectives in an underexplored area. *Folia Primatologica* 68: 296-306, 1997.

Bramley GN, Wass JR. Laboratory and field evaluation of predator odors as repellents for kiore (*Rattus exulans*) and ship rats (*R. rattus*). *Journal of Chemical Ecology* 27: 1029–1047, 2001.

Brandão ML. As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 223p., ISBN 85-12-40630-5, 2004.

Brenes Saenz JC, Villagra OR, Trias JM. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research* 169: 57-65, 2006.

Brownley KA, Berkman ND, Sedway JA, Lohr KN, Bulik CM. Binge eating disorder treatment: a systematic review of randomized controlled trials. *International Journal of Eating Disorders* 40: 337–348, 2007.

Bruinsma K, Taren DL. Chocolate: Food or drug? *Journal of the American Dietetic Association* 99: 1249-1256, 1999.

Burgado J, Harrell CS, Eacret D, Reddy R, Barnum CJ, Tansey MG, Miller AH, Wang H, Neigh GN. Two weeks of predatory stress induces anxiety-like behavior with co-morbid depressive-like behavior in adult male mice. *Behavioural Brain Research* 275: 120–125, 2014.

Cabanac M. Strategies adopted by juvenile lizards foraging in a cold environment. *Physiological Zoology* 58: 262-271, 1985.

Cacioppo JT, Cacioppo S, Capitanio JP, Cole SW. The neuroendocrinology of social isolation. *Annual Review of Psychology* 66: 733-67, 2015.

Cagni P, Komorowski M, Melo GC, Lima T, Barros M. Diazepam-induced decrease in anxiety-like behaviors of marmoset monkeys exposed to a novel open-field. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 100: 518–521, 2012.

Cagni P, Sampaio AC, Ribeiro NB, Barros M. Immediate, but no delayed, behavioral response to a snake model by captive black tufted-ear marmosets. *Behavioural Processes* 87: 241–245, 2011.

Caine NG. Cutting costs in response to predatory threat by Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *American Journal of Primatology* 46: 187-196, 1998.

Caine NG. Flexibility and co-operation as unifying themes in *Saguinus* social organization and behavior: role of predation pressures. In: Rylands, A.B. (ed.), *Marmosets and Tamarins: Systematics, Behavior, and Ecology*. Oxford University Press, New York, 200–219, 1993.

Caine NG. Foraging for animal prey by outdoor groups of Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *Internacional Journal of Primatology* 17: 933–945, 1996.

Calvo-Torrent A, Brain PF, Martinez M. Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology & Behavior* 67:189–196, 1999.

Carey GJ, Costall B, Domeney AM, Jones DNC, Naylor RJ. Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 42: 143-153, 1992.

Carlson NR. Ingestive behavior: eating. Cap 13. In: *Physiology of behavior*, 7a. ed. Allyn and Bacon: New York. 392-442, 2001.

Carmichael ST, Price JL. Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology* 346: 366–402, 1994.

Carr K.D. Augmentation of drug reward by chronic food restriction: behavioral evidence and underlying mechanism. *Physiology & Behavior* 76: 353-64, 2002.

Casper RC, Sullivan EL, Tecott L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology* 199: 313-329, 2008.

Castro WL, Matt KS. Neuroendocrine correlates of separation stress in the Siberian dwarf hamster (*Phodopus sungorus*). *Physiology and Behavior* 61: 477–84, 1997.

Chabrawi SM, Barros M. Conditioned Place Preference: a new experimental procedure to evaluate mechanisms of drugs abuse in nonhuman primates. *Neurobiologia* 74: 159-170, 2011.

Chandler-Laney PC, Castaneda E, Viana JB, Oswald KD, Maldonado CR, Boggiano MM. A history of human-like dieting alters serotonergic control of feeding and neurochemical balance in a rat model of binge-eating. *International Journal of Eating Disorders* 40: 136–142, 2007.

Chappell AM, Carter E, McCool BA, Weiner JL. Adolescent rearing conditions influence the relationship between initial anxiety-like behavior and ethanol drinking in male long evans rats. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 37: 394–403, 2013.

Cheney DL, Wrangham RW. Predation: In: Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT. (eds). *Primate societies*. Chicago: Chicago University Press, 227-239, 1987.

Chrousos GP, Renquist D, Brandon D, Eil C, Pugeat M, Vigersky R, Cutler GB Jr, Loriaux DL, Lipsett MB. Glucocorticoid hormone resistance during primate evolution: Receptor mediated mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 2036-2040, 1982.

Cinini SM, Barnabe GF, Galvao-Coelho N, Medeiros MA, Perez-Mendes P, Sousa MB, Covolan L, Mello LE. Social isolation disrupts hippocampal neurogenesis in young non-human primates. *Frontiers in Neuroscience* 8: 45, 2014.

Clarke AB. Individual variation in responsiveness to environmental change. In: H.O.Box (ed.), *Primate responses to environmental change*, Chapman and Hall, London, 91-110, 1991.

Clifton PG, Vickers SP, Somerville EM. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience* 112: 502-11, 1998.

Coan JA, Schaefer HS, Davidson RJ. Lending a hand: social regulation of the neural response to threat. *Psychological Science* 17: 1032-1039, 2006.

Coccorello R, Damato FR, Moles A. Chronic social stress, hedonism and vulnerability to obesity: Lessons from Rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33: 537–550, 2009.

Coe CL, Levine S. Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey. *American Journal of Primatology* 35: 283-292, 1995.

Coe CL, Mendoza SP, Davidson JM, Smith ER, Dallman MF, Levine S. Hormonal response to stress in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroendocrinology* 26: 367-377, 1978.

Coe CL, Smith ER, Mendoza SP, Levine S. Varying influence of social status on hormone levels in male squirrel monkeys. In: H.D. Steklis and A.S. Kling (eds.), *Hormones, Drugs and Social Behavior in Primates*. Spectrum Publications, New York, 7-32, 1983.

Cohen S, Wills TA. Stress, social support, and the buffering hypothesis. *Psychological Bulletin* 98: 310-357, 1985.

Coimbra-Filho AF. Apontamentos sobre *Callithrix aurita* (E. Geoffroy, 1812) um sagui pouco conhecido (Callithricidae, Primates) In: Mello MT. *A primatologia no Brasil*. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Primatologia 3: 145-158, 1992.

Colantuoni C, Schwenker J, Mccarthy J, Rada P, Ladenheim L, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG. Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport* 12: 3549–3552, 2001.

Cooper A, Barnea-Yagael N, Levy D, Shaham Y, Zangen A. A conflict rat model of cue-induced relapse to cocaine seeking. *Psychopharmacology* 194: 117–125, 2007.

Corwin RL, Avena NM, Boggiano MM. Feeding and reward: Perspectives from Three Rat Models of Binge Eating. *Physiology and Behavior* 25: 87-97, 2011.

Corwin RL, Babbs RK. Rodent models of binge eating: are they models of addiction? *ILAR Journal* 53: 23–34, 2012.

Corwin RL, Buda-Levin A. Behavioral models of binge-type eating. *Physiological and Behavioral* 82: 123-130, 2004.

Corwin RL, Grigson PS. Symposium overview—Food addiction: Fact or fiction? *Journal of Nutrition* 139: 617-619, 2009.

Corwin RL, Wojnicki FH, Fisher JO, Dimitriou SG, Rice HB, Young MA. Limited access to a dietary fat option affects ingestive behavior but not body composition in male rats. *Physiology and Behavioral* 65: 545-553, 1998.

Cottone P, Sabino V, Steardo L, Zorrilla EP. Consummatory, anxiety-related and metabolic adaptations in female rats with alternating access to preferred food. *Psychoneuroendocrinology* 34: 38-49, 2009.

Crockett CM, Bowers CL, Sackett GP, Bowden DM. Urinary cortisol responses of longtailed macaques to five cage sizes, tethering, sedation, and room change. *American Journal of Primatology* 30: 55–74; 1993.

Cross N, Pines MK, Rogers LJ. Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioural stress. *American Journal of Primatology* 62: 107– 114, 2004.

Cross N, Rogers LJ. Mobbing vocalizations as a coping response in the common marmoset. *Hormones and Behavior* 49: 237-245, 2006.

Cuenya L, Fosachea S, Mustaca A, Kamenetzky G. Effets of isolation in adulthood on frustration and anxiety. *Behavioural Processes* 90: 155-160, 2012.

Cummings DE, Shannon MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Archives of Surgery* 138: 389-96, 2003.

Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature Protocols* 1: 1662–1670, 2006.

Dacier A, Maia R, Agostinho DP, Barros M. Rapid habituation of scan behavior in captive marmosets following brief predator encounters. *Behavioural Processes* 71: 66–69, 2006.

DaCosta AP, Leigh AE, Man MS, Kendrick KM. Face pictures reduce behavioral, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep, *Proceedings of the Royal Society of Lond B* 271: 2077–2084, 2004.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugeuro KD, Manalo S. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11696–701, 2003.

Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 21: 159–165, 2010.

Date Y, Murakami N, Toshinai K, Nijjima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123: 1120–1128, 2002.

Davis C, Levitan RD, Kaplan AS, Carter J, Reid C, Curtis C, Patte K, Kennedy JL. Dopamine transporter gene (DAT1) associated with appetite suppression to methylphenidate in a case-control study of binge eating disorder. *Neuropsychopharmacology* 32: 2199–2206, 2007.

Davis JD, Campbell C. Peripheral control of meal size in the rat: Effect of sham feeding on meal size and drinking rate. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 83: 379-387, 1973.

de Sousa Silva MA, Mello Jr EL, Müller CP, Jocham G, Maior RS, Huston JP, Tomaz C, Barros M. The tachykinin NK3 receptor antagonist SR142801 blocks the behavioral effects of cocaine in marmoset monkeys. *European Journal of Pharmacology* 536: 269-278, 2006.

de Vivo, Mário. Taxonomia de *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callithricidae, primates). Fundação Biodiversitas para Conservação da Diversidade Biológica; Belo Horizonte – MG 70-98, 1991.

Depue RA, Iacono WG. Neurobehavioral aspects of affective disorders. *Annual Reviews in Psychology* 40: 457–492, 1989.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305: 1014-1017, 2004.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949, 1992.

DeVries AC, Craft TK, Glasper ER, Neigh GN, Alexander JK. 2006 Curt P. Richter award winner: Social influences on stress responses and health. *Psychoneuroendocrinology*, 32: 587- 603, 2007.

Di Chiara G, Tanda G. Blunting of reactivity of dopamine transmission to palatable food: a biochemical marker of anhedonia in the CMS model? *Psychopharmacology (Berlin)* 134: 351–353, 1997.

Di Tomaso E, Beltramo M, Piomelli D. Brain cannabinoids in chocolate. *Nature* 382: 677-678, 1996.

Dickson SL, Shirazi RH, Hansson C, Bergquist F, Nissbrandt H, Skibicka KP. The glucagon-like peptide 1 (GLP-1) analogue, exendin-4, decreases the rewarding value of food: a new role for mesolimbic GLP-1 receptors. *The Journal of Neuroscience* 32: 4812-4820, 2012.

Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate cortex) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Journal of the Neuroscience* 13: 3839-3847, 1993.

Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP. Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Developmental Psychobiology* 45: 153-162, 2004.

Douglas SJ, Dawson-Scully K, Sokolowski MB. The neurogenetics and evolution of food-related behavior. *Trends in Neurosciences* 28: 644-652, 2005.

Drewnowski A, Krahn DD, Demitrack MA, Nairn K, Gosnell BA. Taste responses and preferences for sweet high-fat foods: evidence for opioid involvement. *Physiology and Behavior* 51: 371–9, 1992.

Dronjak S, Gavrilović L, Filipović D, Radojčić MB. Immobilization and cold stress affect sympathoadrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology and Behavior* 81: 409–415, 2004.

Duarte RBM, Patrono E, Borges AG, César AAS, Tomaz C, Ventura R, Gasbarri A, Puglisi-Allegra S, Barros M. Consumption of a highly palatable food induces a lasting place-conditioning memory in marmoset monkeys. *Behavioural Processes* 107: 163–166, 2014.

Duncan IJH, Fraser D. Understanding animal welfare. In M. C. Appleby & B. O. Hughes (Eds.), *Animal welfare*. Wallingford, England: CAB, 19–31, 1997.

Elliott BM, Grunberg NE. Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female *Sprague–Dawley* rats. *Behavioural Brain Research* 165: 187–196, 2005.

Emmons L. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20: 271–283, 1987.

Engel SG, Boseck JJ, Crosby RD, Wonderlich SA, Mitchell JE, Smyth J, Miltenberger R, Steiger H. The relationship of momentary anger and impulsivity to bulimic behavior. *Behavior Research and Therapy* 45: 437–447, 2007.

Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26: 37–49, 2001.

Epple G. Comparative studies on vocalization in marmoset monkeys (Hapalidae). *Folia Primatologica* 8: 1–40, 1968.

Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y. Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. *Psychopharmacology (Berlin)* 189: 1–16, 2006.

Erlanson-Albertsson, C. Appetite regulation and energy balance. *Acta Pædiatrica* 94: 40–41, 2005.

Evans S. The pair-bond of the Common Marmoset, *Callithrix jacchus*: an experimental investigation. *Animal Behaviour* 31: 651–658, 1983.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England Journal of Medicine* 341: 879–884, 1999.

Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27: 1420–5, 2006.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7001–7005, 1997.

Feldman RS, Meyes JS, Quenzer LF. Principles of neuropsychopharmacology. McGraw-Hill, 1997.

Ferland CL, Schrader LA. Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response. *Neuroscience Letters* 489: 154–58, 2011.

Ferrari SF, Lopes Ferrari MA. A re-evaluation of the social organisation of the callitrichidae, with reference to the ecological differences between genera. *Folia Primatologica* 52: 132-147, 1989.

Ferrari SF, Lopes Ferrari MA. Predator avoidance behavior in buffer headed marmosets (*Callithrix flaviceps*). *Primates* 31: 323-338, 1990.

Ferraz MC, Matos AVR, Moraes LF, Orsi RO. Ação da própolis sobre as proteínas do soro e aspectos hematológicos em *Callithrix* sp. submetidos ao estresse em cativeiros. *Veterinária e Zootecnia* 18: 70-80, 2011.

Figlewicz DP, Bennett J, Evans BS, Kaiyala K, Sipols AJ, Benoit SC. Intraventricular Insulin and Leptin Reverse Place Preference Conditioned With High-Fat Diet in Rats. *Behavioral Neuroscience* 118: 479–487, 2004.

Figlewicz DP, Higgins MS, Ng-Evans SB, Havel PJ. Leptin reverses sucrose-conditioned place preference in food-restricted rats. *Physiology and Behavior* 73: 229-234, 2001.

Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: Expanding the CNS roles of insulin and leptin. *American Journal of Physiology* 284: 882–892, 2003.

Finlayson G, King N, Blundell JE. Liking vs. wanting food: Importance for human appetite control and weight regulation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31: 987–1002, 2007.

Foltin RW. Effects of sibutramine on the appetitive and consummatory aspects of feeding in non-human primates. *Physiology and Behavior* 87: 280 – 286, 2006.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *National Medical* 1: 1311-4, 1995.

French JA, Fite JE, Jensen HA, Oparowski KM, Rukstalis M, Fix H. Treatment with CRH-1 antagonist antalarmin reduces behavioral and endocrine responses to social stressors in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *American Journal of Primatology* 69: 877–89, 2007.

French JA, Smith AS, Gleason AM, Birnie AK, Mustoe A, Korgan A. Stress reactivity in young marmosets (*Callithrix geoffroyi*): Ontogeny, stability, and lack of concordance among co-twins. *Hormones and Behavior* 61: 196–203, 2012.

Friederich HC, Wu M, Simon JJ, Herzog W. Neurocircuit Function in Eating Disorders. *Internacional Journal of Eating Disorders* 46: 425–432, 2013.

Galvão-Coelho NL, Silva HPA, Leão AC, Sousa MBC. Common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a potential animal model for studying psychological disorders associated with

high and low responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Reviews in the Neuroscience* 19: 187–201, 2008.

Galvão-Coelho NL, Silva HPA, Sousa MBC. The Influence of Sex and Relatedness on Stress Response in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 74: 819–827, 2012.

Gao Q, Horvath TL. Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annual Review of Neuroscience* 30: 367–398, 2007.

Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, Cordero I, Antón M, Giné E, Santos A, Del Arco A, Segovia G, Mora F. Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission* 120: 829–43, 2012.

Gearhardt AN, Brownell KD. Can Food and Addiction Change the Game? *Biol Psychiatry* 73: 802-803, 2013.

Gearhardt AN, Corbin WR, Brownell KD. Food Addiction An Examination of the Diagnostic Criteria for Dependence. *Journal of Addiction Medicine* 3: 1-7, 2009.

Gearhardt AN, Grilo CM, DiLeone RJ, Brownell KD, Potenza MN. Can food be addictive? Public health and policy implications. *Addiction* 106: 1208 –1212, 2011.

Geller I, Seifter J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia (Berlim)* 1: 482-492, 1960.

Genaro G, Schmidek WR, Franci CR. Social condition affects hormone secretion and exploratory behavior in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37: 833-840, 2004.

Gentsch C, Linschneir M, Driscoll P, Feer H. Differential hormonal and physiological response to stress in Roman high and- low avoidance rats. *Physiology and Behavior* 28: 258-263, 1982.

Ghitza UE, Nair SG, Golden SA, Gray SM, Uejima JL, Bossert JM, Shaham Y. Peptide YY3-36 Decreases Reinstatement of High-Fat Food Seeking during Dieting in a Rat Relapse Model. *The Journal of Neuroscience* 27: 11522–11532, 2007.

Gibson LE. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiology and Behavioral* 89: 53-61, 2006.

Gluck ME, Geliebter A, Hung J, Yahav E. Cortisol, hunger, and desire to binge eat following a cold stress test in obese women with binge eating disorder. *Psychosomatic Medicine* 66: 876–81. 2004.

Glynn LM, Christenfeld N, Gerin W. Gender, social support, and cardiovascular responses to stress, *Psychosomatic Medicine* 61: 234–242, 1999.

Goldfield GS, Adamo KB, Rutherford J, Legg C. Stress and the relative reinforcing value of food in female binge eaters. *Physiology and Behavior* 93: 579–587, 2007.

González M, Averós X, de Heredia IB, Ruiz R, Arranz J, Estevez I. The effect of social buffering on fear responses in sheep (*Ovis aries*). *Applied Animal Behaviour Science* 149: 13–20, 2013.

Gosselin-Ildari AD, Koenig A. The Effects of Group Size and Reproductive Status on Vigilance in Captive *Callithrix jacchus*. *American Journal of Primatology* 74: 613–621, 2012.

Greeno CG, Wing RR, Shiffman S. Binge antecedents in obese women with and without binge eating disorder. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 68: 95–102, 2000.

Greeno CG, Wing RR. Stress-induced Eating. *Psychological Bulletin* 115: 444–464, 1994.

Griebel G, Blanchard DC, Blanchard RJ. Predator-elicited flight responses in *Swiss – Webster* mice: an experimental model of panic attacks. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 20: 185 – 205, 1996.

Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 48: 23–29, 1997.

Guimarães-costa R, Guimarães-Costa MB, Pippa-Gadioli, L, Weltson A, Ubiali WA, Paschoalin-Maurin T, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Laure CJ, Coimbra NC. Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: Behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. *Journal of Neuroscience Methods* 165: 25–37, 2007.

Gunnar MR, Gonzalez CA, Levine S. The role of peers in modifying behavioral stress and pituitary-adrenal response to a novel environment in year-old rhesus monkeys. *Physiology & Behavior* 25: 795–798, 1980.

Gunther L, Liebscher S, Jahkel M, Oehler J. Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in group- and isolation-housed mice. *European Journal of Pharmacology* 593: 49–61, 2008.

Gust DA, Gordon TP, Brodie AR, McClure HM. Effect of a preferred companion in modulating stress in adult female rhesus monkeys. *Physiology and Behavior* 53: 681–684, 1994.

Gust DA, Gordon TP, Hambright MK, Wilson ME. Relationship between social factors and pituitary-adrenocortical activity in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hormones and Behavior* 27: 318–331, 1993.

Hacia JG, Makalowski W, Edgemon K, Erdos MR, Robbins CM, Fodor SP, Brody LC, Collins FS. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 18:155–158, 1998.

Hadad NA, Knackstedt LA. Addicted to palatable foods: comparing the neurobiology of *Bulimia Nervosa* to that of drug addiction. *Psychopharmacology* 231: 1897–1912, 2014.

Haddon JE, Killcross S. Both motivational and training factors affect response conflict choice performance in rats. *Neural Networks* 19: 1192-1202, 2006.

Hagan MM, Chandler PC, Wauford PK, Rybak RJ, Oswald KD. The role of palatable food and hunger as trigger factors in an animal model of stress induced binge eating. *International Journal of Eating Disorders* 34: 183-197, 2003.

Hagan MM, Moss DE. Persistence of binge-eating patterns after a history of restriction with intermittent bouts of refeeding on palatable food in rats: implications for bulimia nervosa. *International Journal of Eating Disorders* 22: 411-20, 1997.

Hagan MM, Wauford PK, Chandler PC, Jarrett LA, Rybak RJ, Blackburn K. A new animal model of binge eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiology & Behavior* 77: 45-54. 2002.

Hakansson ML, Hulting AL, Meister B. Expression receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus - mouse hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 8: 733-735, 1996.

Hardie S, Buchanan-Smith H. Vigilance in Single- and Mixed-Species Groups of Tamarins (*Saguinus labiatus* and *Saguinus fuscicollis*). *International Journal of Primatology* 18: 217-234, 1997.

Hart D. Predation on primates: a biogeographical analysis. In: Gursky, S., Nekaris, K.A.I. (eds.), *Primate Anti-predator Strategies*. Springer, New York, 27-62, 2007.

Hayes SL, Snowdon CT. Predator recognition in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *American Journal of Primatology* 20: 283-291; 1990.

Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedo G, Feldon J, Moran MC, Nelson P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100: 749-68, 2000.

Hennessy MB, Kaiser S, Sachser N. Social buffering of the stress response: Diversity, mechanisms, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30: 470-482, 2009.

Hennessy MB, Mendoza SP, Mason WA, Moberg GP. Endocrine sensitivity to novelty in squirrel monkeys and titi monkeys: species differences in characteristic modes of responding to the environment. *Physiology & Behavior* 57: 331-338, 1995.

Hennessy MB, Zate R, Maken DS. Social buffering of the cortisol response of adult female guinea pigs. *Physiology and Behavior* 93: 883-888, 2008.

Hennessy MB. Effects of surrogate-rearing on the infant squirrel monkey. In: Rosenblum LA, Coe CL, eds *Handbook of Squirrel Monkey Research*. New York: Plenum Publishing Company: 149-168, 1985.

Hennessy MB. Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 21: 11-29, 1997.

Heymann EW. A field observation of predation on a moustached tamarin (*Saguinus mystax*) by a anaconda. *International Journal of Primatology* 8: 193-195, 1987.

Heymann EW. Reactions of wild tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis*, to avian predators. *International Journal of Primatology* 11, 327–337, 1990.

Heymann EW. Sleeping habits of tamarins. *Saguinus mystax* e *Saguinus fuscicollis* (Mammalia; Primates; Callitrichidae), in north-eastern Peru. *Journal of Zoology (London)*, 237: 211-226; 1995.

Hildebrandt T, Greif R. Stress and addiction. *Psychoneuroendocrinology* 38: 1923-1927, 2013.

Hill AJ. The psychology of food craving. *The Proceedings of the Nutrition Society* 66: 277–285, 2007.

Hirsch BT. Social monitoring and vigilance behavior in brown capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52: 458–464, 2002.

Holland P, Petrovich G. A neural systems analysis of the potentiation of feeding by conditioned stimuli. *Physiology and Behavior* 86: 747–761, 2005.

Holst DV. The concept of stress and its relevance for animal behavior, *Advances in the Study of Behavior* 27: 1–131, 1998.

Hone-Blanchet A, Fecteau S. Overlap of food addiction and substance use disorders definitions: Analysis of animal and human studies. *Neuropharmacology* 85: 81-90, 2014.

Honess PE, Marin CM. Behavioural and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 30: 390–412, 2006.

Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance. A hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142: 4163–4169, 2001.

Hughes RA, Baker MR, Rettig KM. Cocaine-conditioned place preference in young precocial domestic fowl. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 3: 105–111, 1995.

Hurst WJ, Martin RA, Zoumas BL, Tarka SM. Biogenic amines in chocolate — a review. *Nutrition Reports International* 26: 1081–1086, 1982.

Huston JP, de Souza Silva MA, Topic B, Müller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends in Pharmacological Sciences* 34: 162-166, 2013.

Ifland JR, Preuss HG, Marcus MT, Rourke KM, Taylor WC, Burau K. Refined food addiction: a classic substance use disorder. *Medical Hypotheses* 72: 518-526, 2009.

Isbell LA, Young TP. Ecological models of female social relationships in primates: similarities, disparities, and some directions for future clarity. *Behaviour* 139: 177-202, 2002.

Jansen A, Van den Hout M. On being led into temptation. 'Counterregulation' of dieters after smelling a 'preload'. *Addictive Behaviors* 5: 247-253, 1991.

Johnson AW. Eating beyond metabolic need: how environmental cues influence feeding behavior. *Trends in Neurosciences* 36: 101-109, 2013.

Johnson EO, Kamilaris TC, Carter CS, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. The behavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biological Psychiatry* 40: 317-337, 1996.

Jones B, Harris D, Catchpole C. The stability of the vocal signature in phee calls of the common marmoset *Callithrix jacchus*. *American Journal of Primatology* 31: 67–75, 1993.

Jones MT, Hillhouse EW, Burden JL. Dynamics and mechanics of corticosteroid feedback at the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Journal of Endocrinology* 73: 405–417, 1977.

Kaiser S, Harderthauer S, Sachser N, Hennessy MB. Social housing conditions around puberty determine later changes in plasma cortisol levels and behavior. *Physiology and Behavior* 90: 405–411, 2007.

Kales EF. Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology and Behavior* 48: 837–840, 1990.

Kalivas PW, Duffy P, Latimer LG. Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 242: 757-763, 1987.

Kalivas PW, Nakamura M. Neural systems for behavioral activation and reward. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 223-227, 1999.

Kalra SP, Bagnasco M, Otukonyong EE, Dube MG, Kalra PS. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regulatory Peptides* 111: 1-11, 2003.

Kalsbeek A, Drijfhout WJ, Westerink BHC, Van Heerikhuize JJ, Van Der Woude T, Van Der Vliet J, Buijs RM. GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin. *Neuroendocrinology* 63: 69 –78, 1996.

Kaun KR, Azanchi R, Maung Z, Hirsh J, Heberlein UA *Drosophila* model for alcohol reward. *Nature Neuroscience* 14: 612–619, 2011.

Kaushal N, Nair D, Gozal D, Ramesh V. Socially Isolated Mice Exhibit a Blunted Homeostatic Sleep Response to Acute Sleep Deprivation Compared to Socially Paired Mice. *Brain Research* 1454: 65–79, 2012.

Kaye W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiology and Behavior*, 94: 121-135, 2008.

Kearns DN, Weiss SJ, Panlilio LV. Conditioned suppression of behavior maintained by cocaine self-administration. *Drug & Alcohol Dependence* 65: 253–261, 2002.

Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology and Behavior* 86: 773–795, 2005.

Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of Neuroscience* 22: 3306-3311, 2002.

- Kelley AE, Will MJ, Steininger TL, Zhang M, Haber SN. Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure) alters striatal enkephalin gene expression. *European Journal of Neuroscience* 18: 2592–2598, 2003.
- Kenna GA, Nielsen DM, Mello P, Schiesl A, Swift RM. Pharmacotherapy of Dual Substance Abuse and Dependence. *CNS Drugs, New Zealand*, 21: 213-237, 2007.
- Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron* 69: 664–679, 2011.
- Kikusui T, Winslow JT, Mori Y. Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society B London* 361: 2215–2228, 2006.
- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdale. *Nature* 388: 377-380, 1997.
- Killgore WDS, Young AD, Femia LA, Bogorodzki P, Rogowska J, Yurgelun-Todd DA. Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. *NeuroImage* 19: 1381–1394, 2003.
- King FA, Yarbrough CJ, Anderson DC, Gordon TP, Gould KG. Primates. *Science* 240 : 1475-1482, 1988.
- Kiyokawa Y, Hiroshima S, Takeuchi Y, Mori Y. Social buffering reduces male rats' behavioral and corticosterone responses to a conditioned stimulus. *Hormones and Behavior* 65: 114–118, 2014b.
- Kiyokawa Y, Honda A, Takeuchi Y, Mori Y. A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behavioural Brain Research* 267: 189–193, 2014a.
- Kliethermes CL. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 837-850, 2005.
- Koenig A. Visual scanning by common marmosets (*Callithrix jacchus*): functional aspects and the special role of adult males. *Primates* 39: 85–90, 1998.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Letters to Nature* 402: 656-660, 1999.
- Kruidhof HM, Pashalidou FG, Fatouros NE, Figueroa IA, Vet LEM, Smid HM, Huigens ME. Reward Value Determines Memory Consolidation in Parasitic Wasps. *PLoS ONE*, 7: e39615, 2012.
- Kutsukake N. Conspecifics influences on vigilance behavior in wild chimpanzees. *Internacional Journal of Primatology* 28: 907–918, 2007.
- Kyrou I, Tsigos C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Hormone and Metabolic Research* 39: 430–438, 2007.
- La Mela I, Latagliata EC, Patrono E, Puglisi-Allegra S, Ventura R. Olfactory priming reinstates extinguished chocolate-induced conditioned place preference. *Appetite* 54: 237–40, 2010.

Laakso A, Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG. Experimental genetic approach to addiction. *Neuron* 36: 213-228, 2002.

Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491: 212–217, 2012.

Latagliata EC, Patrono E, Puglisi-Allegra S, Ventura R. Food seeking in spite of harmful consequences is under prefrontal cortical noradrenergic control. *BMC Neuroscience*: 11: 1-15, 2010.

Lavicky J, Dunn AJ. Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 60: 602-612. 1993.

Le Merrer J, Stephens DN. Food-induced behavioral sensitization, its cross-sensitization to cocaine and morphine, pharmacological blockade, and effect on food intake. *Journal of Neuroscience* 26: 7163-7171, 2006.

Leão AC. Variação hormonal e comportamental em sagüi comum (*Callithrix jacchus*), durante as fases de formação, separação e reunião do par heterossexual. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

Lemos JC, Wanat MJ, Smith JS, Reyes BAS, Hollon NG, Van Bockstaele EJ, Chavkin C, Phillips PEM. Severe stress switches CRF action in the nucleus accumbens from appetitive to aversive. *Nature* 490: 402–406, 2012.

Lenoir M, Serre F, Cantin L, Ahmed SH. Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS ONE* 2: e698, 2007.

Lent R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência. Atheneu Editora, 848p, 2010.

Lepore SJ, Matta Allen KA, Evans GW. Social support lowers cardiovascular reactivity to an acute stressor, *Psychosomatic Medicine* 55: 518–524, 1993.

Levine, S.; Wiener, S.G.; Coe, C. L. Temporal and social factors influencing behavioral and hormonal responses to separation in mother and infant squirrel monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 297–306, 1993.

Lieberwirth C, Liu Y, Jia X, Wang Z. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. *Hormones and Behavior* 62: 357-66, 2012.

Lima D, Spíndola DB, Dias LO, Tomaz C, Barros M.. Effects of acute systemic cocaine administration on the cortisol, ACTH and prolactin levels of black tufted-ear marmosets. *Psychoneuroendocrinology* 33: 321–327, 2008.

Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Hormones and Behavior* 55: 248–256, 2009a.

Lukkes JL, Summers CH, Scholl JL, Renner KJ, Forster GL. Early-life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience* 158: 845–855, 2009b.

Lutter M, Nestler EJ. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *Journal of Nutrition* 139: 629-32, 2009.

Lyons DM, Wang OJ, Lindley SE, Levine S, Kalin NH, Schatzberg AF. Separation induced changes in squirrel monkey hypothalamic–pituitary–adrenal physiology resemble aspects of hypercortisolism in humans. *Psychoneuroendocrinology* 24: 131–142, 1999.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155-1161, 1995.

Mahmoud SN, Scaccianoce S, Scraggs PR, Nicholson SA, Gillham B, Jones MT. Characteristics of corticosteroid inhibition of adrenocorticotropin release from the anterior pituitary gland of the rat. *Journal of Endocrinology* 102: 33 – 42, 1984.

Malheiros SVP. Integração metabólica nos períodos pós-prandial e de jejum- um resumo. *Revista Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular* n.1, ISSN: 1677-2318, 2006.

Malik S, McGlone F, Bedrossian D, Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metabolism* 7: 400-409, 2008.

Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behavior. *Neuropharmacology* 63: 97-110, 2012.

Mansfield K. Marmoset model commonly used in biomedical research. *Comparative Medicine* 53: 383-392, 2003.

Martire SI, Maniam J, South T, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ. Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behavioral Brain Research* 265: 132-41, 2014.

Marx J. Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* 299: 846-849, 2003.

Mason G, Mendl M. Why is there no simple way of measuring animal welfare? *Animal Welfare* 2: 301–319, 1993.

Maestripieri D, Martel FL, Nevison CM, Simpson MJA, Keverne EB. Anxiety in rhesus monkey infants in relation to interactions with their mother and other social companions. *Developmental Psychobiology* 24: 571– 581, 1992.

Mathes WF, Kimberly A, Brownley KA, Mo X, Bulik CM. The biology of binge eating. *Apetite* 52: 545- 553, 2009.

Matos MIR, Aranha LS, Faria AN, Ferreira SRG, Bacaltchuck J, Zanella MT. Binge eating disorder, anxiety, depression and body image in grade III obesity patients. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 24: 165-169, 2002.

McCool BA, Chappell AM. Early social isolation in male long-evans rats alters both appetitive and consummatory behaviors expressed during operant ethanol self-administration. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 33: 273–282, 2009.

McEwen BS, Stellar E. Stress and the individual – Mechanisms Leading to Disease. *Archives of Internal Medicine* 153: 2093-2101, 1993.

McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiological Reviews* 87: 873–904, 2007.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *The New England Journal of Medicine* 338: 171–179, 1998.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short and long periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Developmental Brain Research* 113: 97–106, 1999.

McKim, W. A. *Drugs and Behavior: An Introduction to Behavioral Pharmacology*. NJ: Prentice Hall, 1997.

McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 285–305, 2004.

McNeal N, Scotti ML, Wardwell J, Chandler DL, Bates SL, Larocca M, Trahanas DM. Disruption of social bonds induces behavioral and physiological dysregulation in male and female prairie voles. *Autonomic Neuroscience* 180: 9–16, 2014.

Melamed JL, de Souza Silva MA, Tomaz C, Müller CP, Huston JP, Barros M. Sensitization of hypervigilance effects of cocaine can be induced by NK3 receptor activation in marmoset monkeys. *Drug and Alcohol Dependence* 128: 155– 160; 2013.

Mello Jr EL, Maior RS, Carey RJ, Huston JP, Tomaz C, Müller CP. Serotonin_{1A}-receptor antagonism blocks psychostimulant properties of diethylpropion in marmosets (*Callithrix penicillata*). *European Journal of Pharmacology* 511: 43-52, 2005.

Mello NK, Mendelson JH. Cocaine's effects on neuroendocrine systems: clinical and preclinical studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 57: 571-599, 1997.

Mendonça-Furtado O. *Uso de ferramentas como enriquecimento ambiental para macacos-prego (Cebus apella) cativos_Dissertação Mestrado, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2006.*

Mendonza SP, Lyons DM, Saltzman W. Sociophysiology of squirrel monkeys. *American Journal of Primatology* 23:37-54, 1991.

Mendoza SP, Mason W. A. Parenting within a monogamous society. In: J.G. Else and P.C. Lee (eds.), *Primate Ontogeny, Cognition and Social Behavior*. Cambridge University Press, Cambridge, 255-266, 1986.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localisation of leptin receptor mRNA and the long form slice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridisation. *FEBS Letters* 387: 113–116, 1996.

Mery F, Kawecki TJ. A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 308: 1148–1148, 2005.

Michels AM. Sex differences in food acquisition and aggression in captive common marmosets. *Primates* 39: 549-556, 1998.

Michener W, Rozin P. Pharmacological versus sensory factors in the satiation of chocolate craving. *Physiology and Behavior* 56: 419-422, 1994.

Michopoulos V, Moore C, Wilson MW. Psychosocial stress and diet history promote emotional feeding in female rhesus monkeys. *animal models of eating disorders* 74: 109-125, 2012.

Millan MJ, Brocco M. The Vogel conflict test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines. *European Journal of Pharmacology* 463: 67-96, 2003.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology* 70: 83–244, 2003.

Miura H, Qiao H, Ohta T. Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress. *Brain Research* 926: 10-17, 2002.

Monclaro AV, Sampaio AC, Ribeiro NB, Barros M. Time-of-day effect on a food-induced conditioned place preference task in monkeys. *Behavioural Brain Research* 259: 336– 341, 2014.

Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, de Castro IR, Cannon G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutrition* 14: 5-13, 2011.

Morales L, Del Olmo N, Valladolid-Acebes I, Fole A, Cano V, Merino B, Stucchi P, Ruggieri D, López L, Alguacil LF, Ruiz-Gayo M. Shift of Circadian Feeding Pattern by High-Fat Diets Is Coincident with Reward Deficits in Obese Mice. *PLoS ONE* 7: 1-7, 2012.

Morgan D, Sizemore GM. Animals models of addiction: fat and sugar. *Current Pharmaceutical Design* 17: 1168-1172, 2011.

Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochimica et Biophysica Acta* 1792: 401–408, 2009.

Morton GJ, Cummings DE, Baskins DG, Barsh GS, Schwartz MV. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 21: 289-95, 2006.

Mueller D, Stewart J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behavioural Brain Research* 115: 39-47. 2000.

Muller CP, de Souza Silva MA, DePalma G, Tomaz C, Carey RJ, Huston JP. The selective serotonin_{1A}-receptor antagonist WAY 100635 blocks behavioral stimulating effects of cocaine but not ventral striatal dopamine increase. *Behavioural Brain Research* 134: 337-346, 2002.

Murphy KG, Bloom SR. Review Article Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444: 854-859, 2006.

Nasser JA, Bradley LE, Leitzsch JB, Chohan O, Fasulo K, Haller J, Jaeger K, Szulanczyk B, Del Parigi A. Psychoactive effects of tasting chocolate and desire for more chocolate. *Physiology and Behavior* 104: 117-21, 2011.

Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*, 17, 139-170, 1992.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed., Freeman and Company, New York, 2005.

Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. Ed. McGraw-Hill, New York, 2001.

Newman JD. Vocal ontogeny in macaques and marmosets: convergent and divergent lines of development. In: Zimmerman, E.; Newman, J. D.; Jurgens, U. (eds.) *Current topics in primate vocal communication*. New York: Plenum Press., 73-97, 1995.

Nishiyama T, Yamashita K, Yokoyama T. Stress hormone changes in general anesthesia of long duration: isoflurane-nitrous oxide vs. sevoflurane-nitrous oxide anesthesia. *Journal of Clinical Anesthesia* 17: 586-591, 2005.

Norcross JL, Newman JD. Context and sex-specific differences in the acoustic structure of common marmoset (*Callithrix jacchus*) phee calls. *American Journal of Primatology* 30: 37-54, 1993.

Norcross JL, Newman JD. Effects of Separation and Novelty on Distress Vocalizations and Cortisol in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 47: 209-222, 1999.

Norcross JL, Newman JD. Social context affects phee call production by nonreproductive common marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 43: 135-146, 1997.

Nunes DM, Gonçalves Jr I, Emille N, Barros M. Bimodal temporal organization of specific vigilance behaviors in captive black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*). *Behavioural Processes* 84: 629-631, 2010.

Oliver G, Wardle J. Perceived effects of stress on food choice. *Physiology and Behavior* 66: 511-515, 1999.

Olsson AS, Westlund K. More than numbers matter: the effect of social factors on behaviour and welfare of laboratory rodents and non-human primates. *Applied Animal Behaviour Science* 103: 229-254, 2007.

Olszewski PK, Shaw TJ, Grace MK, Hoglund CE, Fredriksson R, Schioth HB, et al. Complexity of neural mechanisms underlying overconsumption of sugar in scheduled feeding: involvement of opioids, orexin, oxytocin and NPY. *Peptides* 30: 226-233, 2009.

Orsini C, Bonito-Oliva A, Montanari C, Conversini D, Cabib S. Partial extinction of a conditioned context enhances preference for elements previously associated with cocaine but not with chocolate. *Physiology and Behavior* 120: 1–10, 2013.

Orsini CA, Ginton G, Shimp KG, Avena NM, Gold MS, Setlow B. Food consumption and weight gain after cessation of chronic amphetamine administration. *Appetite* 78C: 76–80, 2014.

Osman JL, Sobal J. Chocolate cravings in American and Spanish individuals: biological and cultural influences. *Appetite* 47: 290-301, 2006.

Ott V, Friedrich M, Prilop S, Lehnert H, Jauch-Chara K, Born J, Hallschmid M. Food anticipation and subsequent food withdrawal increase serum cortisol in healthy men. *Physiology and Behavior* 103: 594-9, 2011.

Otoni EB. EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 32: 446-449, 2000.

Ovaskainen ML, Reinivuo H, Tapanained H, Hannila ML, Korkohen T, Pakkala H. Snacks as an elemental of energy intake and food consumption. *European Journal of Clinical Nutrition* 60: 494–501, 2006.

Pai N, Vella S, Richardson K. Is food addiction a valid phenomenon through the lens of the DSM-5? *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 48: 216-218, 2014.

Parker G, Parker I, Brotchie H. Mood state effects of chocolate. *Journal of Affective Disorders* 92: 149–159, 2006.

Parylak SL, Koob GF, Zorrilla EP. The dark side of food addiction. *Physiology & Behavioral* 104: 149-156, 2011.

Paterson IA, Juorio AV, Boulton AA. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? *Journal of Neurochemistry* 55: 1827-1837, 1990.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145: 3754–3762, 2004.

Pelchat ML, Schaeffer S. Dietary monotony and food cravings in young and elderly adults. *Physiology and Behavior* 68: 353– 359, 2000.

Pelchat ML. Food cravings in young and elderly adults. *Appetite* 28: 103– 113, 1997.

Pelloux Y, Everitt BJ, Dickinson A. Compulsive drug seeking by rats under punishment: effects of drug taking history. *Psychopharmacology* 194: 127–137, 2007.

Peres CA. Anti-predation benefits in a mixed-species group of Amazonian tamarins. *Folia Primatologica* 61: 61–76, 1993.

Petribu K, Ribeiro ES, Oliveira FMF, Braz CIA, Gomes MLM, Araujo D E, Almeida NCN, Albuquerque PC, Ferreira MNL. Transtorno da Compulsão Alimentar Periódica em Uma População de Obesos Mórbidos Candidatos a Cirurgia Bariátrica do Hospital Universitário

Oswaldo Cruz, em Recife – PE. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 50: 901- 908, 2006.

Petrovich GD, Gallagher M. Control of food consumption by learned cues: a forebrain-hypothalamic network. *Physiology and Behavioral* 91: 397-403, 2007.

Petrovich GD, Ross CA, Mody P, Holland PC, Gallagher M. Central but not basolateral amygdala is critical for control of feeding by aversive conditioned cues. *Journal of Neuroscience* 29: 15205–15212, 2009.

Petrovich GD. Learning and the motivation to eat: Forebrain circuitry. *Physiology and Behavior* 104, 582–589, 2011.

Piggott MA, Marshall EF, Thomas N, Lloyd S, Court JA, Jaros E, Costa D, Perry RH, Perry EK. Dopaminergic activities in the human striatum: rostrocaudal gradients of uptake sites and of D1 and D2 but not of D3 receptor binding or dopamine. *Neuroscience* 90: 433–445, 1999.

Polivy J, Coleman J, Herman CP. The effect of deprivation on food cravings and eating behavior in restrained and unrestrained eaters. *International Journal of Eating Disorders* 38: 301–309, 2005.

Pomerantz SM, Wertz I, Hepner B, Wasio L, Piazza I. Cocaine-induced conditioned place preference in rhesus monkeys. *Society of Neuroscience (Abstracts)* 18: 1572, 1992.

Pook AGA. Comparison between the reproduction and parental behaviour of the Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) and of the true marmosets (*Callitrichidae*). In: Rothe H, Wolters HJ, Hearn JP, (eds.) *Biology and behaviour of marmosets, proceedings of the marmoset workshop, Göttingen, W-Germany, September 2-5, 1977*. Duderstadt (DE): Mecke-Druck, 1-14, 1978.

Pournajafi-Nazarloo H, Partoo L, Yee J, Stevenson J, Sanzenbacher L, Kenkel W, Mohsenpour SR, Hashimoto K, Carter CS. Effects of social isolation on mRNA expression for corticotrophin releasing hormone receptors in prairie voles. *Psychoneuroendocrinology* 36:780–789, 2011.

Preuss TM. Do rats have prefrontal cortex? The rose-woolsey-akert program reconsidered. *Journal of Cognitive Neuroscience* 7: 1–24, 1995.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463: 3-33, 2003.

Pryce CR, Dettling AC, Feldon J. Evidence for altered monoamine activity and emotional and cognitive disturbance in marmoset monkeys exposed to early life stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032: 245–249, 2004.

Pryce CR, Palme R, Feldon J. Development of pituitary-adrenal endocrine function in the marmoset monkey: infant hypercortisolism is the norm. *JCEM* 87: 691–699, 2002.

Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Fergert B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29: 649–674, 2005.

Puhl MD, Cason AM, Wojnicki FHE, Corwin RL, Grigson PS. A history of bingeing on fat enhances cocaine seeking and taking. *Behavioral Neuroscience* 125: 930-942, 2011.

Radley JJ, Williams B, Sawchenko PE. Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *Journal of Neuroscience* 28: 5806–5816, 2008.

Ritter D, Chao J, Needleman P, Tetens E, Greenwald JE. Localization, synthetic regulation, and biology of renal atriopeptin-like pro-hormone. *The American Journal of Physiology* 263: 503-509, 1992.

Rocha C G. Estudo dos perfis de metabólitos hormonais urinários e fecais de cortisol e testosterona em machos de sagui-de-tufos-pretos (*Callithrix penicillata*, Geoffroy, 1812) submetidos à contenção física. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2010.

Rodgers R. Animal tests for anxiety. In: Koob GF, Le Moal M, Thompson RF (eds). *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Academic Press: Oxford, 90–100, 2010.

Rukstalis M, French JA. Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. *Hormones and Behavior* 47: 1 – 7, 2005.

Rutters F, Nieuwenhuizen AG, Lemmens SG, Born JM, Westerterp-Plantenga MS. Acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. *Obesity (Silver Spring)* 17: 72–7, 2009.

Rylands A. B, Schneider H, Langguth A, Mittermeier RA, Groves CP, Rodriguez-Lulna E. An assessment of the diversity of new world primates. *Neotropical Primates*, Washington 8: 61-93, 2000.

Rylands AB, FARIA DS. Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*. In: A. B. Rylands (ed.), *Marmosets and Tamarins. Systematics, Behaviour and Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 262-272, 1993.

Sabeli HC, Javaid JI. Phenylethylamine modulation of affect: therapeutic and diagnostic implications. *Journal of Neuropsychology* 7: 6-14, 1995.

Sahakian BJ, Robbins TW, Iversen SD. The effects of isolation rearing on exploration in the rat. *Animal Learning & Behavior* 5: 193–198, 1977.

Saltzman W, Schultz-Darken NJ, Scheffler G, Wegner FH, Abbott DH. Social and reproductive influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. *Physiology and Behavior* 56: 801-810, 1994.

Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction* 11: 2–38, 2006.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36: 199–211, 2002.

Sapolsky R, Krey L, McEwen B. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 81: 6174, 1984.

Sapolsky RM, Alberts SC, Altmann J. Hypercortisolism associated with social subordination or social isolation among wild baboons. *Archives of General Psychiatry* 54: 1137–43, 1977.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* 21: 55–89, 2000.

Sapolsky RM. Stress-induced elevation of testosterone concentrations in high-ranking baboons: role of catecholamines. *Endocrinology* 118: 1630–1635, 1986.

Savage A, Snowdon CT, Giraldo LH, Soto LH. Parental care patterns and vigilance in wild cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). In: Norconk, M.A., Rosenberger, A.L., Garber, P.A. (Eds.), *Adaptive Radiations of Neotropical Primates*. Plenum Press, New York, 187–199, 1996.

Schapiro SJ, Bloomsmith KJS, Kessel AL, Shively CA. Effects of enrichment and housing on cortisol response in rhesus monkeys. *Applied animal behavioral Science* 37: 251–263, 1993.

Schapiro SJ, Nehete PN, Perlman JE, Bloomsmith MA, Sastry KJ. Effects of dominance status and environmental enrichment on cell-mediated immunity in rhesus macaques. *Applied Animal Behaviour Science* 56: 319–332, 1998.

Schroeder BE, Binzack JM, Kelley AE. A common profile of prefrontal cortical activation following exposure to nicotine- or chocolate associated contextual cues. *Neuroscience* 10: 535–545, 2001.

Schroeder JP, Packard MG. Systemic or intra-amygdala injections of glucose facilitate memory consolidation for extinction of drug-induced conditioned reward. *European Journal of Neuroscience* 17: 1482–1488, 2003.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661–671, 2000.

Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berlin)* 168: 3–20, 2003.

Shalev U, Yap J, Shaham Y. Leptin attenuates food deprivation-induced relapse to heroin seeking. *Journal of Neuroscience* 21: 129, 2001.

Shepherd RE, French JA. Comparative analysis of sociality in lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*) and marmosets (*Callithrix kuhli*): responses to separation from long-term pairmates. *Journal of Comparative Psychology* 113: 24–32, 1999.

Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Effects of isolation-rearing on the development of social behaviors in male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Physiology and Behavior* 94: 491–500, 2008.

Silva MAS, Jocham G, Barros M, Tomaz CAB, Müller CP. Neurokinin3 receptor modulation of the behavioral and neurochemical effects of cocaine in rats and monkeys. *Reviews in the Neurosciences* 19: 101-111, 2008.

Smith AS, Birnie AK, French JA. Social isolation affects partner-directed social behavior and cortisol during pair formation in marmosets, *Callithrix geoffroyi*. *Physiology and Behavior* 104: 955–961, 2011.

Smith AS, Kelez S, Buchanan-Smith HM. Factors affecting vigilance within wild mixed-species troops of saddleback (*Saguinus fuscicollis*) and moustached tamarins (*S.mystax*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56: 18-25, 2004.

Smith TE, French JA. Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhli*). *Physiology and Behavior* 62: 225–232, 1997.

Smith TE, McGreer-Whitworth B, French JA. Close Proximity of the Heterosexual Partner Reduces the Physiological and Behavioral Consequences of Novel-Cage Housing in Black Tufted-Ear Marmosets (*Callithrix kuhli*). *Hormones and Behavior* 34: 211–222, 1998.

Smith DG, Robbins TW. The Neurobiological Underpinnings of Obesity and Binge Eating: A Rationale for Adopting the Food Addiction Model. *Biological Psychiatry* 73: 804–810, 2013.

Smitka K, Papezova H, Vondra K, Hill M, Hainer V, Nedvidkova J. The role of “mixed” orexigenic and anorexigenic signals and autoantibodies reacting with appetite-regulating neuropeptides and peptides of the adipose tissue-gut-brain axis: relevance to food intake and nutritional status in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *International Journal of Endocrinology* 2013: 1-21, 2013.

Snowdon CT, Hodun A, Rosenberger AL, Coimbra-Filho AF. Long-Call Structure and its relation to taxonomy in lion tamarins. *American Journal of Primatology* 11: 253–261, 1986.

Sousa MBC, Silva HPA, Leão AC. Sexual differences on behavior and fecal cortisol using the separation paradigm in common marmosets, *Callithrix jacchus*. In: Abstracts, IPS Conference, Beijing, 94, 2002.

Spangler R, Wittkowski KM, Goddard NL, Avena NM, Hoebel BG, Leibowitz SF.. Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain. *Molecular Brain Research* 124: 134–142, 2004.

Stanton ME, Patterson JM, Levine S. Social influences on conditioned cortisol secretion in the squirrel monkey. *Psychoneuroendocrinology* 10: 125-134, 1985.

Stein RI, Kenardy J, Wiseman CV, Douchis JZ, Arnow BA, Wilfley DE. What’s driving the binge in binge eating disorder?: A prospective examination of precursors and consequences. *International Journal of Eating Disorders* 40: 195–203, 2007.

Stevenson MF, Rylands AB. The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier RA, Rylands AB, Coimbra-Filho A, Fonseca GAB. *Ecology and behavior of neotropical primates, vol 2*. Littera Maciel Ltda/WWF, Contagem, Brazil, 31-222, 1988.

Stice E, Agras WS, Telch CF, Halmi KA, Mitchell JE, Wilson T. Subtyping binge eating-disordered women along dieting and negative affect dimensions. *International Journal of Eating Disorders* 30: 11–27, 2001.

Stites DP, Terr AI. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Prentice – Hall do Brasil Ltda. 1991.

Stojan-Dolar M, Heymann EW. Vigilance in a cooperatively breeding primate. *Internacional Journal of Primatology* 31: 95-116, 2010.

Stroebele N, de Castro JM. Television viewing nearly adds an additional meal to daily intake. *Appetite* 42: 11, 2004.

Strubbe JH, Woods SC. The timing of meals. *Psychological Reviews* 111: 128–141, 2004.

Sudakov SK, Nazarova GA, Alekseeva EV, Bashkatova VG. Estimation of the Level of Anxiety in Rats: Differences in results of open-field test, elevated plus-maze test, and vogel's conflict test. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 155: 295-297, 2013.

Sushama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, Graeff FG. Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 97-109, 2007.

Swanson SA, Crow SJ, Le Grange D, Swendsen J, Merikangas KR. Prevalence and correlates of eating disorders in adolescents: results from the national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Archives of General Psychiatry* 68: 714-723, 2011.

Tardif SD, Richer CB. Competition for desired food in family groups of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cotton top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Laboratory Animal Science* 31: 52-55, 1981.

Tataranni PA, Larson DE, Snitker S, Young JB, Flatt JP, Ravussin E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *The American Journal of Physiology* 271: 317-325, 1996.

Tello NS, Huck M, Heymann EW. Boa constrictor attack and successful group defence in moustached tamarins, *Saguinus mystax*. *Folia Primatologica* 73: 146–8, 2002.

Terborgh J. *Five New World Primates. A study in comparative ecology*. Princeton, Princeton University Press, 260, 1983.

Thorson JM, Morgan RA, Brown JS, Norman JE. Direct and indirect cues of predatory risk and patch use by fox squirrels and thirteen-lined ground squirrels. *Behavioral Ecology* 9: 151– 157, 1998.

Treves A, Drescher A, Snowdon CT. Maternal watchfulness in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Ethology* 109: 135–146, 2003.

Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology* 12: 227–462, 2007.

Uchino BN. Social support and health: a review of physiological processes potentially underlying links to disease outcomes. *Journal of Behavioral Medicine* 29: 377–387, 2006.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 397–409, 2009.

Urosevic S, Abramson LY, Harmon-Jones E, Alloy LB. Dysregulation of the behavioral approach system (BAS) in bipolar spectrum disorders: review of theory and evidence. *Clinical Psychology Review* 28: 1188–205, 2008.

Valentinuzzi VS, Neto SP, Carneiro BT, Santana KS, Araújo JF, Ralph MR. Memory for time of training modulates performance on a place conditioning task in marmosets. *Neurobiology of Learning and Memory* 89: 604–607, 2008.

Vanderschuren LJMJ, Everitt BJ. Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305: 1017-1019, 2004.

Ventura R, Latagliata EC, Morrone C, La Mela I, Puglisi-Allegra S. Prefrontal norepinephrine determines attribution of “high” motivational salience. *PLoS ONE* 3: 3044, 2008.

Ventura R, Morrone C, Puglisi-Allegra S. Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 5181–5186, 2007.

Vilela SL, Faria DS. Dieta do *Callithrix penicillata* (Primates, Callithricidae) em áreas do Cerrado no Distrito Federal, Brasil. *Neotropical Primates* 10: 17-20, 2002.

Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia* 21: 1-7, 1971.

Vogt JL, Coe CL, Levine S. Behavioral and adrenocorticoid responsiveness of squirrel monkeys to a live snake: Is flight necessarily stressful? *Behavioral and Neural Biology* 32: 391–405, 1981.

Volkow ND, Wang G, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends in Cognitive Sciences* 15: 37–46, 2011.

Volkow ND, Wang G, Fowler JS, Telang F. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philosophical Transactions of the Royal Society Lond B Biological Sciences* 363: 3191–3200, 2008.

Volkow ND, Wang G, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress A, Jayne M, Ma Yeming, Wong C. Cocaine Cues and Dopamine in Dorsal Striatum: Mechanism of Craving in Cocaine Addiction. *The Journal of Neuroscience* 26: 6583– 6588, 2006.

Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD. Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obesity Reviews* 14: 2-18, 2013.

Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? *Nature Neuroscience* 8: 555-560, 2005.

Wang GJ, Volkow ND, Telang F, Jayne M, Ma J, Rao ML, Zhu W, Wong CT, Pappas NR, Geliebter A, Fowler JS, Wong CT. Exposure to appetitive food stimuli markedly activates the human brain. *Neuroimage* 21: 1790-1797, 2004.

Weerts E, Fantergrossi WE, Goodwin AK. The Value of Nonhuman Primates in Drug Abuse Research. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 15: 309–327, 2007.

Weingarten HP. Conditioned cues elicit feeding in sated rats: a role for learning in meal initiation. *Science* 220: 431–3, 1983.

White MA, Grilo CM. Psychometric properties of the Food Craving Inventory among obese patients with binge eating disorder. *Eating Behaviors* 6: 239–45, 2005.

Williams LM, Gordon E. Dynamic organization of the emotional brain: responsivity, stability, and instability. *The Neuroscientist* 13: 349–70, 2007.

Wise RA. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annual Review of Neuroscience* 19: 319–340, 1996.

Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 483–494, 2004.

Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361: 1219–1235, 2006.

Woods SC, Ramsay DS. Pavlovian influences over food and drug intake. *Behavioural Brain Research* 110: 175–182, 2000.

Yamaguchi C, Izumi A, Nakamura K. Time Course of Vocal Modulation During Isolation in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 72: 681–688, 2010.

Yamamoto S, Utsu S, Tanioka Y, Ohsawa N. Extremely high levels of corticosteroids and low levels of corticosteroid binding macromolecule in plasma of marmoset monkeys. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*. 85: 398–405, 1977.

Yorgason JT, Espana RA, Konstantopoulos JK, Weiner JL, Jones SR. Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *European Journal of Neuroscience* 37: 1–20, 2013.

You Y, Avery L. Appetite Control: worm's-eye-view. *Animal Cells Systems (Seoul)* 16: 351–356, 2012.

Young C, Majolo B, Heistermann M, Schulke O, Ostner J. Responses to social and environmental stress are attenuated by strong male bonds in wild macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 18195–18200, 2014.

Zandian M, Ioakimidis I, Bergh C, Södersten P. Cause and treatment of anorexia nervosa. *Physiology and Behavior* 92: 283–290, 2007.

Zardooz H, Rostamkhani R, Zaringhalam J, Faraji Shahrivar F. Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO₂ in male rats. *Physiological Research* 59: 973–8, 2010.

Zhang Y, Mantsch JR, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ. Conditioned place preference after single doses or “binge”cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73: 655–662, 2002.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432, 1994.

Zombeck JÁ, Chen GT, Johnson ZV, Rosenberg DM, Craig AB, Rhodes JS. Neuroanatomical specificity of conditioned responses to cocaine versus food in mice. *Physiology and Behavior* 93: 637-50, 2008.

11.0 ANEXO I – Declaração de aprovação do Comitê de Ética Animal


Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 03 de maio de 2012.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“EFEITO DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR COMPULSIVO EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CALLITHRIX PENICILLATA): UMA ABORDAGEM NEUROBIOLÓGICA”**, UnBDOC n.º 43392/2012, sob responsabilidade da Profa. Marília Barros foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




 Prof. José Raimundo Corrêa
 Coordenador da CEUA