

ALINE CARON BORGES

EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE A ALIMENTOS PALATÁVEIS NO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NAS RESPOSTAS INDUZIDAS POR
COCAÍNA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*Callithrix penicillata*)

Brasília

2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE CARON BORGES

EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE A ALIMENTOS PALATÁVEIS NO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NAS RESPOSTAS INDUZIDAS POR
COCAÍNA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*Callithrix penicillata*)

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Barros

Brasília
2015

ALINE CARON BORGES

EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE A ALIMENTOS PALATÁVEIS NO
COMPORTAMENTO ALIMENTAR E NAS RESPOSTAS INDUZIDAS POR
COCAÍNA EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (*callithrix penicillata*)

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em 25 de junho de 2015

BANCA EXAMINADORA

Marília Barros (Presidente)
Universidade de Brasília

Carlos Alberto Bezerra Tomaz
Universidade de Brasília

Jorge Zeredo
Universidade de Brasília

Reinaldo Takahashi
Universidade Federal de Santa Catarina

Rafael Souto Maior
Universidade de Brasília

Marcia Renata Mortari
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha tia Lenita Caron (in memoriam) por ter sido minha primeira professora, me ensinado a ler e escrever e, por ter me amado com filha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, pela confiança, paciência e persistência nessa jornada. Esse trabalho também é dedicado a você prof. Marília Barros que é um exemplo de organização, dedicação e competência;

Aos médicos veterinários, Cecília Dias, Raiumundo e Lucas Carsoso, pelo cuidado com os animais;

Aos estagiários José Reinaldo Costa, Priscilla Bomfim, Ana Paula Borges, Gabriela Cabral, Augusto Jesus e Luma Nogueira por dedicarem o tempo na coleta de dados no decorrer desses quatro anos de trabalho, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria viável;

Aos colegas de doutorado Jonathan Melamed e, em especial, Renata Duarte por ser minha amiga nesses quatro anos de trabalho;

Ao prof. Carlos Tomaz pela ajuda intelectual e pelas palavras de carinho em momentos de ansiedade;

Ao Sr. Alexis Maior, pela confecção dos aparatos experimentais;

Aos tratadores dos animais, Geinaldo e Almir;

Ao meu marido por aceitar conhecer meu tema de pesquisa e debater comigo cada um dos experimentos, do início ao fim e por sempre estar ao meu lado me dando carinho e atenção;

Ao CNPq pelo apoio financeiro em forma de bolsa de estudo;

A minha família pelo apoio e amor incondicional, em especial à minha tia Lidia e minha prima Karine.

“There is no love more sincere than the love we have for food”

(George Bernard Shaw)

RESUMO

O comportamento alimentar é regulado por dois sistemas complementares: o sistema homeostático e o hedônico. O primeiro regula o equilíbrio energético por meio do aumento da motivação para comer em situações de déficit energético. O segundo, relacionado ao prazer, pode sobrepor-se ao primeiro e gerar comportamentos alimentares patológicos. A compulsão alimentar e a dependência por drogas dividem, em parte, as mesmas bases neurais, uma vez que drogas de abusos se apropriam do sistema neural de recompensa de reforçadores naturais. O presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo animal de comportamento alimentar do tipo compulsivo em primatas não-humanos (micos-estrela; *Callithrix penicillata*), e investigar o efeito da pré-exposição a alimentos palatáveis (ricos em açúcar e/ou gordura) em comportamentos induzidos pela administração de cocaína. No Estudo 1, dois grupos homogêneos compostos por machos e fêmeas foram estabelecidos e submetidos a diferentes regimes alimentares: grupo HR (*high restriction* – acesso à bala de banana restrito a três dias por semana) e grupo LR (*low restriction* – acesso diário à bala de banana) por 15 min, em uma caixa de alimentação. Após quatro semanas, não foram encontradas diferenças significativas no consumo de bala entre os grupos, no entanto, houve diferença entre os gêneros. Fêmeas consumiram mais balas que machos e também apresentaram maior duração e maior frequência de forrageio, o que sugere maior susceptibilidade para o modelo animal de comportamento compulsivo em relação ao macho. Portanto, o Estudo 2 investigou o efeito da pré-exposição à dieta de cafeteria no comportamento de hipervigilância gerado pela administração de 5mg/kg de cocaína em dois grupos de fêmeas (HR: acesso à dieta de cafeteria duas vezes por semana, e GC: acesso a frutas apenas). Não foi possível observar episódio de compulsão alimentar, pois os animais do grupo HR não escalonaram a ingestão de dieta de cafeteria da primeira para a última semana de estudo (S1 vs. S6). Porém, dois perfis foram identificados: animais propensos e animais não-propensos à hiperfagia. Os animais propensos à hiperfagia também apresentaram maior vigilância após receberem um injeção de cocaína, sugerindo, assim, uma possível predisposição a desenvolver comportamentos compulsivos. No Estudo 3 foi avaliado o efeito da pré-exposição à dieta de cafeteria oferecida no viveiro de moradia por seis semanas no

comportamento de preferência por lugar condicionada à cocaína (3mg/kg). O grupo de fêmeas expostas à dieta de cafeteria apresentou escalonamento no consumo alimentar, portanto, sugere-se que, com essa metodologia, é possível induzir um comportamento do tipo compulsivo em calitriquídeos. No entanto, ambos os grupos apresentaram comportamentos de preferência-por-lugar condicionada à cocaína, e esse comportamento se manteve por pelo menos quinze dias após a última sessão de condicionamento, sugerindo que a dieta de cafeteria não influenciou o efeito reforçador da droga.

Palavras-chave: primata, compulsão alimentar, dieta de cafeteria, cocaína, sensitização, preferência-por-lugar.

ABSTRACT

Feeding behavior is regulated by both homeostatic and hedonic systems. The former regulates energy balance by increasing an individual's motivation towards feeding in situations of energy deficit. The latter, related to pleasure, can override this homeostatic system and generate pathological eating behaviors. The neural bases responsible for binge eating disorder and drug addiction seem to overlap, as drugs overtake the reward system of natural reinforcers. Accordingly, the present study aimed to develop an animal model of compulsive-like eating behaviour in non-human primates (black tufted-ear marmosets; *Callithrix penicillata*) and to investigate the effects of the pre-exposure to palatable foods (rich in sugar and/or fat) on cocaine-induced behaviors. In Study 1, two homogenous groups with both males and females were submitted to different feeding schedules: HR group (high restriction – restricted access to banana candy three times a week) and LR group (low restriction – daily access to banana candy) for 15 min in a feeding chamber. After a four week period, significant between-group differences were not seen, however there was a significant between-gender effect. Females consumed significantly more candy and foraged longer than males, thus suggesting being more susceptible to the procedure for inducing compulsive type behavior. Thus, Study 2 investigated in two groups of female marmosets (HR: access to cafeteria diet twice a week, and GC: access to fruit only) the effects of a pre-exposure to a cafeteria diet on cocaine-induced (5mg/kg) hypervigilance. A compulsive-like eating behaviour was not seen, as there was no escalation in the amount of cafeteria diet ingested between the first and last week (S1 vs. S6). However, two profiles were identified: animals prone and resistant to overeat. Those prone to overeat were more vigilant following cocaine injections, suggesting a possible general predisposition to develop compulsive behaviors. In Study 3 the effect of pre-exposing female marmosets to a cafeteria diet in their home-cages during six weeks on a cocaine-induced (3mg/kg) conditioned-place preference paradigm was evaluated. Females exposed to cafeteria diet escalated their consumption of the palatable foods. Therefore, this procedure may possibly induce a compulsive type behavior in the marmosets. However, both groups acquired a conditioned-place preference response to cocaine which was still present after a 15-day period, suggesting that the cafeteria diet did not influence this drug's reinforcing properties.

Key words: non-human primate, binge eating, cafeteria diet, cocaine, sensitization, conditioned place preference.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Controle do comportamento alimentar por mecanismos neurobiológicos. Setas vermelhas representam diminuição e setas verdes representam aumento na ingestão de alimentos. ARC – núcleo arqueado do hipotálamo, NPY – neuropeptídeo Y, AgRP - proteína relacionada ao agouti, POMC – pró-ópio-melanocortina, PYY – peptídeo YY, CCK – colecistoquinina. Imagem modificada por Renata Duarte. Disponível em <<http://www.scripps.edu/zorrilla/research.html>> Acesso em: 23 de maio de 2015. Imagem do encéfalo retirada de LENT, 2010..... 18

Figura 2: Modelo de Volkow (2011) de adaptações neurais em cérebros de dependentes. Retirado de: http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n11/box/nrn3118_BX1.html. 31

Figura 3: indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (esquerda) e de vida livre (direita)..... 44

Figura 4: Fotografia da caixa de alimentação (AL) nas vistas superior (esquerda) e frontal/lateral (direita), contendo um mico-estrela e demonstrando o posicionamento dos pratos de alimentação. O aparato foi dividido virtualmente em 3 zonas: zona da bala correspondeu ao espaço no qual o recipiente contendo bala de banana fora posicionado; zona da fruta espaço no qual o recipiente contendo fruta fora posicionado, cada uma dessas zonas correspondia 25% da área total da caixa AL. A zona neutra correspondeu à 50% da caixa AL, e nela não continha pratos de alimentação..... 52

Figura 5: Correlação entre o consumo de bala (em gramas) na fase de seleção de grupos com o consumo médio de balas (em gramas) nas semanas 1 e 4 (S1-S4); n=12. 60

Figura 6: Consumo individual de bala (em gramas) por machos e fêmeas na primeira e na última semana do estudo (S1-S4); n=6/gênero. 61

Figura 7: Consumo semanal de bala e fruta (em gramas; média+EPM), duração média do forrageio (em segundos) de bala e fruta e frequência de ingestão de bala e fruta nas semanas 1 à 4 (S1-S4) nos machos e fêmeas de micos-estrelas (n=6/grupo). *p<0,05 machos vs. fêmeas. 63

Figura 8: Duração da vigilância (em segundos; média ±EPM), distância total percorrida (em metros; média±EPM) e o tempo de permanência nas zonas bala e fruta (em segundos; média±EPM) na ultima sessão de habituação (H4) e nas

semanas 1 à 4 (S1-S4) de acesso intermitente à bala de banana por micos estrelas machos e fêmeas (n=6/gênero). *p<0,05 H4 e S2 vs. S3..... 64

Figura 9: Consumo (em gramas) e duração do forrageio (em segundos; média+EPM) de bala de fruta na semana 4 (S4) e no teste de privação alimentar (Pruvação) de machos e fêmeas (n=6/gênero); *p<0,05 machos vs. fêmeas, #p<0,05 S4 vs. prruvação..... 65

Figura 10: Duração da vigilância (em segundos, média+EPM) e distância total percorrida (em metros, média+EPM) na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste de estresse por prruvação alimentar por machos e fêmeas (n=6/gênero)..... 66

Figura 11: Consumo (em gramas), duração do forrageio (em segundos) e tempo de permanência nas zonas (em segundos) na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste confronto com predador por machos e fêmeas (n=6/gênero). *p<0,05 machos vs. fêmeas; #p<0,05 S4 vs. Predação. 67

Figura 12: Duração da vigilância (em segundos, média+EPM) e distância total percorrida (em metros, média+EPM), na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste de estresse por prruvação de machos e fêmeas (n=6/gênero).#p<0,05 Predação vs. S4..... 68

Figura 13: Consumo individual (em Kcal) de DC (dieta de cafeteria) em fêmeas no primeiro e último dia teste. BD1= primeiro dia de teste (binge day 1); BD14 = último dia de teste (binge day 14)..... 83

Figura 14: Consumo de dieta de cafeteria e fruta (em Kcal), duração do forrageio (em segundos) e tempo de permanência nas zonas bala e fruta (em segundos) por micos-estrelas fêmeas no primeiro e ultimo dia de teste (BD1-BD14). GC (grupo controle; n=5), NPH (não-propensas à hiperfagia; n=4) e PH (propensas à hiperfagia; n=4). *p<0,05 NPH vs PH; #p<0,05 BD1 vs BD14..... 84

Figura 15: Duração da vigilância (em segundos; média±EPM), distância total percorrida (em metros; média±EPM) e frequência de exploração do aparato (média±EPM) na última sessão de habituação (H3), e no primeiro (BD1) e no último (BD14) dia de acesso intermitente à dieta de cafeteria pelas fêmeas de micos-estrela. GC (grupo controle; n=5), NPH (não-propensas à hiperfagia; n=4) e PH (propensas à hiperfagia; n=4). 85

Figura 16: Média+EPM do comportamento de vigilância (em segundos) observada nas duas sessões de exposição à cocaína (C1 e C2) e à solução salina (S1 e S2) pelas fêmeas de micos-estrela; GC:n=5; PH e NPH:n=4/grupo. *p<0,05 PH vs. GC; #p<0,05 Cocaína vs. Salina. 86

| | |
|---|-----|
| Figura 17: Correlação entre o consumo de DC (em Kcal) por micos estrelas fêmeas do grupo HR no ultimo dia do protocolo de intermitência (Binge day 14 – BD14,) com a duração da vigiância (em segundos) ou com a distância percorrida (em metros) nas sessões 1 e 2 de exposição à cocaína..... | 87 |
| Figura 18Fotografias da caixa de CPP. | 95 |
| Figura 19: Consumo calórico semanal (média+EPM) de dieta de cafeteria pelo grupo HR (n=4) e de fruta pelo grupo controle (n=5) na primeira e na última semana do protocolo de intermitência (S1 e S6). *p<0,05 HR vs. GC. | 99 |
| Figura 20: Tempo de permanência (média+EPM; segundos) de micos-estrelas fêmeas nos compartimentos branco e listrado da caixa de CPP na última sessão de habituação (H2); n=5/grupo. GC=grupo controle (n=5); HR=high restriction (n=4). | 100 |
| Figura 21: Tempo de permanência no compartimento pareado à cocaína (em segundos; média±EPM) na fase pré condicionamento (H2) e nas três sessões testes (T1 – T3) para os grupos controle (GC; n=5) e high restriction (HR, n=4). T1 e T2 foram realizados após três e seis sessões de condicionamento respectivamente. T3 ocorreu 15 dias após a última sessão de condicionamento com salina. Nenhuma injeção foi administrada nas sessões teste. #p<0,05 H2 vs. T1, T2 e T3. | 101 |
| Figura 22: Média (±EPM) da duração da vigiância (em segundos) e distância total percorrida (em metros) na primeira (C1) e na última (C6) sessão de condicionamento com cocaína e na primeira (S1) e na última (S6) sessão de condicionamento com salina pelas fêmeas de micos-estrela dos grupos controle (GC; não expostas previamente à dieta de cafeteria; n=5) e teste (HR; expostas à 2 sessões semanais de acesso à dieta de cafeteria durante 6 semanas consecutivas; n=4). | 102 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Resposta comportamental de micos durante a fase de habituação à caixa de alimentação..... | 59 |
| Tabela 2: Consumo alimentar semanal dos grupos HR e LR..... | 60 |
| Tabela 3: Principais diferenças metodológicas entre os Estudos 1 e 2..... | 77 |
| Tabela 4: Resposta comportamental de micos-estrelas fêmeas observadas na fase de habituação à caixa de alimentação..... | 82 |
| Tabela 5. Consumo semanal de DC e fruta durante teste de acesso intermitente... | 83 |
| Tabela 6: Relação entre o consumo de fruta na ultima sessão e a duração da vigilância nas sessões 1 e 2 de exposição à cocaína..... | 87 |
| Tabela 7: Principais diferenças metodológicas no protocolo de intermitência entre os Estudos 1, 2 e 3. | 93 |
| Tabela 8: Resposta comportamental de micos-estrela fêmeas observada na fase de habituação à caixa de CPP..... | 100 |

LISTA DE ABREVIATURA

AgRP: Agouti-related Protein
AP: Área Postrema
CART: Cocaine-and-amphetamine-regulated
CCK: Coleocistoquinina
CRF: Fator de Liberação de corticotrofina
DA: Dopamina
DAT: Transportador de dopamina
DC: Dieta de cafeteria
DLMPFC: Dorsolateral-medial prefrontal cortex
DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
GC: Grupo controle
GHSR-1A: Receptor de grelina
HL: Hipotálamo Lateral
HR: High restriction (alta restrição)
HPA: Hipotálamo-hipófise-adrenal
HVM: Hipotálamo Ventromedial
LR: Low restriction (baixa restrição)
MCH: Melanin-concentrating hormone
NAcc: Núcleo Accumbens
NST: Núcleo do trato solitário
NPH: Não-propenso à hiperfagia
PH: Propenso à hiperfagia
POMC: Pró-opio-melancortina
PYY: Peptídeo Y
SNC: Sistema nervoso central
TCAP: Transtorno de compulsão alimentar periódica
VMAT: Transportador vesicular de monoaminas
VTA: Área tegmental ventral
5-HT: Serotonina

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 | NEUROBIOLOGIA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR..... | 19 |
| 1.2 | COMPORTAMENTO ALIMENTAR COMPULSIVO | 25 |
| 1.3 | TESTES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA COMPULSÃO ALIMENTAR | 27 |
| 1.4 | COCAÍNA E MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DEPENDÊNCIA..... | 30 |
| 1.5 | TESTES CLÁSSICOS PARA O ESTUDO DA DEPENDÊNCIA..... | 33 |
| 1.6 | RELAÇÃO ENTRE DEPENDÊNCIA POR ALIMENTOS PALATÁVEIS (FOOD ADDICTION) E DROGAS DE ABUSO..... | 35 |
| 1.7 | <i>Callithrix penicillata</i> COMO MODELO ANIMAL NO ESTUDO DA DEPENDÊNCIA..... | 41 |
| 2 | RELEVÂNCIA E ORIGINALIDADE DO ESTUDO | 44 |
| 3 | HIPÓTESES | 47 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 48 |
| 5 | materiais e métodos: ASPECTOS GERAIS | 49 |
| 5.1 | ASPECTOS ÉTICOS..... | 49 |
| 5.2 | SUJEITOS E CONDIÇÕES GERAIS DE ALOJAMENTO..... | 49 |
| 5.3 | ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO | 50 |
| 6 | ESTUDO 1. EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE À BALA DE BANANA NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE MICOS-ESTRELA (<i>Callithrix penicillata</i>) | 51 |
| 6.1 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 51 |
| 6.1.1 | Sujeitos e Condições de Alojamento | 51 |
| 6.1.2 | Aparato Experimental..... | 51 |
| 6.1.3 | Alimento teste | 52 |
| 6.1.4 | Procedimento..... | 53 |
| 6.2 | ANÁLISE DE DADOS..... | 57 |
| 6.3 | RESULTADOS | 59 |
| 6.3.1 | Fase 1: Habituação ao Aparato | 59 |
| 6.3.2 | Fase 2: Seleção de Grupos | 59 |
| 6.3.3 | Fase 3: Acesso intermitente à Bala de Banana..... | 59 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.3.4 | Fase 4: Teste de Privação Alimentar | 64 |
| 6.3.5 | Fase 5: Teste de Confronto com Predador..... | 66 |
| 6.4 | DISCUSSÃO..... | 69 |
| 6.5 | CONCLUSÃO DO ESTUDO 1..... | 76 |
| 7 | ESTUDO 2. EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE À DIETA DE CAFETERIA EM COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA COCAÍNA | 77 |
| 7.1 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 77 |
| 7.1.1 | Sujeitos e Condições de Alojamento | 77 |
| 7.1.2 | Aparato Experimental..... | 77 |
| 7.1.3 | Alimento teste | 78 |
| 7.1.4 | Drogas e Doses | 78 |
| 7.1.5 | Procedimentos | 78 |
| 7.2 | ANÁLISE DOS DADOS | 81 |
| 7.3 | RESULTADOS | 82 |
| 7.3.1 | Fase 1: Habituação ao Aparato Experimental | 82 |
| 7.3.2 | Fase 2: Teste de Acesso Intermitente à DC | 82 |
| 7.3.3 | Fase 3: Pré-exposição à DC em Comportamentos Induzidos por Cocaína | 86 |
| 7.4 | DISCUSSÃO..... | 88 |
| 7.5 | CONCLUSÃO DO ESTUDO 2..... | 92 |
| 8 | ESTUDO 3: EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO À DIETA DE CAFETERIA NA AQUISIÇÃO DE UM COMPORTAMENTO DE PREFERENCIA-POR-LUGAR CONDICIONADO À COCAÍNA (CPP) | 93 |
| 8.1 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 94 |
| 8.1.1 | Sujeitos e Condições de Alojamento | 94 |
| 8.1.2 | Aparato Experimental..... | 94 |
| 8.1.3 | Droga e Dose | 95 |
| 8.1.4 | Procedimento..... | 95 |
| 8.2 | ANÁLISE DE DADOS | 98 |
| 8.3 | RESULTADOS | 99 |
| 8.3.1 | Fase 1: Acesso intermitente à Dieta de Cafeteria no viveiro | 99 |
| 8.3.2 | Fase 2: Teste de CPP | 99 |
| 8.4 | DISCUSSÃO..... | 104 |

| | | |
|-----|----------------------------------|-----|
| 8.5 | CONCLUSÃO DO ESTUDO 3..... | 107 |
| 9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 108 |
| 10 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 111 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROBIOLOGIA DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR

A ingestão de alimentos é condição *sine qua non* para a sobrevivência de todas as espécies do reino animal e está sob influência de fatores genéticos e ambientais (VOLKOW e WISE, 2005). O padrão alimentar pode variar entre as espécies, enquanto algumas passam a maior parte do seu dia forrageando, outras podem ficar meses sem se alimentar, mas todas têm uma finalidade comum: manter a homeostase e garantir a sobrevivência (SAPER, CHOU e ELMQUIST, 2002; STERNSON e cols., 2013).

O comportamento alimentar pode ser entendido como grupo de ações sob controle voluntário, motivado pelo balanço entre as sensações de fome e saciedade, que se agrupa em três fases: 1) fase “apetitiva” – voltada para a procura, a identificação e a aquisição do alimento em situações de déficit energético; 2) fase “consumatória” – associada à ingestão *per se* do alimento, a mastigação e deglutição (BENOIT e TRACY, 2008); e 3) fase “pós-ingestiva” – que ocorre após a ingestão de alimentos e subsequentemente gera sensações de saciedade (BENOIT e TRACY, 2008).

O sistema nervoso central (SNC) exerce o principal controle sobre o comportamento alimentar via circuitos que regulam os níveis de vários nutrientes no sangue e nas reservas corporais (SAPER, CHOW e ELMQUIST, 2002; SHENG e cols., 2014).

Para exercer esse controle, há dois sistemas alimentares paralelos bem descritos: um homeostático, 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, independentemente do balanço energético (BERTHOUD e cols., 2011; KENNY, 2011; LUTTER e NESTLER, 2009).

Em relação ao sistema homeostático, a percepção do “estado de fome”, que motiva o comportamento alimentar, pode ser induzida por diferentes sinais fisiológicos (BENOIT e TRACY, 2008), que dependem da detecção e integração de sinais 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).

O controle neural da homeostase energética foi, por muito tempo, atribuído principalmente a dois grupamentos celulares no hipotálamo. O hipotálamo lateral (HL – chamado de “centro da fome”; Figura 1) é responsável por induzir a ingestão de alimentos (SAPER, CHOW e ELMQUIST, 2002). Neurônios nessa região sintetizam e liberam o neuropeptídeo Y e a proteína relacionada ao agouti (AgRP; *agouti-related protein*), que, quando ativados, promovem aumento no consumo de alimentos em animais, enquanto uma lesão nesse núcleo resulta em comportamento de hipofagia (SCHWARTZ e cols., 2000; MORTON e cols., 2006 e 2014). O hipotálamo ventromedial (HVM – “centro da saciedade”; Figura 1) tem a função oposta, a de inibir a ingestão de alimentos (SAPER, CHOW e ELMQUIST, 2002). Neurônios dessa região expressam a pró-opio-melanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína/anfetamina (CART; *cocaine-and-amphetamine-regulated transcript*), proteínas que inibem a ingestão de alimentos, e uma lesão nesse núcleo resulta em comportamento de hiperfagia (SCHWARTZ e cols., 2000; Figura 1).

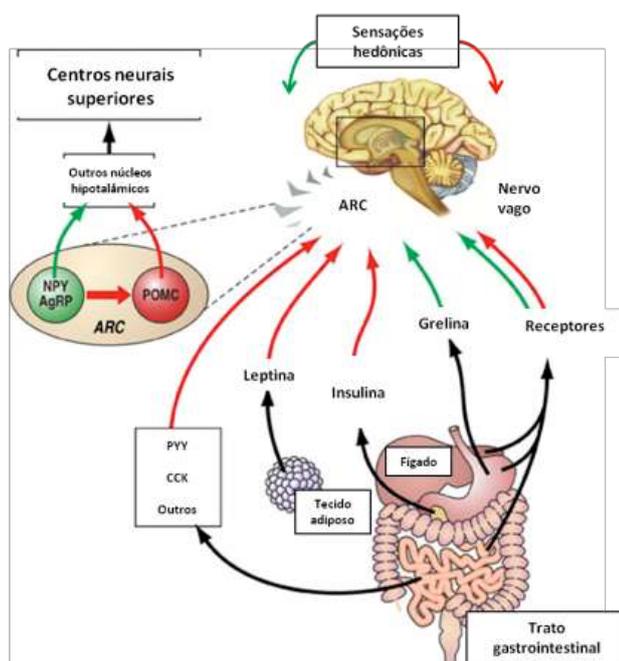


Figura 1: Controle do comportamento alimentar por mecanismos neurobiológicos. Setas vermelhas representam diminuição e setas verdes representam aumento na ingestão de alimentos. ARC – núcleo arqueado do hipotálamo, NPY – neuropeptídeo Y, AgRP - proteína relacionada ao agouti, POMC – pró-ópio-melanocortina, PYY – peptídeo YY, CCK – colecistoquinina. Imagem modificada por Renata Duarte. Disponível em <<http://www.scripps.edu/zorrilla/research.html>> Acesso em: 23 de maio de 2015. Imagem do encéfalo retirada de LENT, 2010.

Atualmente, sabe-se que, além dos dois núcleos hipotalâmicos citados, existem vários circuitos neuro-humorais, centrais e periféricos, que também exercem um papel importante no controle do comportamento alimentar e, conseqüentemente, na homeostase energética. O SNC organiza-se, portanto, em amplos circuitos interconectados em vez de núcleos isolados (BRANDÃO, 2004; SHENG e cols., 2014), o que atesta a complexidade da fisiologia do comportamento alimentar.

A regulação alimentar, assim, decorre de uma integração de sinais periféricos e de vários circuitos cerebrais. Dentre os vários sinais orexigênicos (indutores do apetite), tem-se, por exemplo, a queda dos níveis de glicose e/ou ácidos graxos presentes no sangue. Os níveis desses indicadores metabólicos podem ser detectados pelo SNC (via nervo vago) e pelo fígado, sendo que o primeiro monitora apenas a quantidade de glicose disponível, enquanto o segundo monitora a glicose e os ácidos graxos presentes no restante do corpo (MORTON e cols., 2014).

Outro importante sinal orexigênico é a grelina, peptídeo secretado principalmente pelo estômago (Figura 1; SMITKA e cols., 2013). Em animais, os níveis circulantes de grelina aumentam durante a privação alimentar e caem logo após a passagem do alimento do estômago para o intestino (KOJIMA e cols., 1999) e, 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. Neste, ela ativa centros neurais do controle do comportamento alimentar de forma indireta, via ativação do nervo vago (DATE e cols., 2002), e direta, atravessando a barreira hematoencefálica (BANKS e cols., 2002; 2008) e ligando-se a 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, o que reduz o gasto de energia e libera outros hormônios envolvidos na sinalização da “fome” (MCH – *melanin-concentrating hormone* –, orexina e hipocretina); e (3) antagonizam (via AgRP) o receptor do tipo 4 para melanocortina (MC4; CARLSON, 2001). Essa

ação antagônica no receptor MC4 bloqueia a sinalização de “saciedade” do sistema da melanocortina.

Em contraposição, os primeiros sinais de saciedade homeostática (anorexigênicos) começam a ser desencadeados (via nervo vago) pelo próprio gosto, cheiro e deglutição, seguidos de sinais gástricos que indicam a ingestão e digestão dos alimentos (p. ex.: distensão estomacal e presença de diferentes tipos de nutrientes). A entrada de alimento no intestino, por sua vez, promove a liberação de colecistoquinina (CCK) e peptídeo YY (PYY) pelo órgão, os quais contribuem para sinalizar etapas subsequentes do processo digestório (p. ex.: a liberação de bile), assim como para inibição do comportamento alimentar. O intestino também tem receptores sensíveis à presença de glicose, aminoácidos e ácidos graxos (RITTER e cols., 1992), que, assim como o fígado, sinalizam quando os alimentos estão sendo absorvidos e conjuntamente contribuem para sensação de saciedade (CARLSON, 2001).

A liberação da leptina é outro sinal anorexigênico (ZHANG e cols., 1995; FAROOQI e cols., 1999; SHENG e cols., 2014), trata-se de um peptídeo secretado principalmente por adipócitos contendo triglicerídeos (Figura 1; ZHANG e cols., 1995). Os níveis circulantes de leptina aumentam quando animais estão se alimentando e diminuem quando estão em jejum (AHIMA e cols., 2000; FREDERICH e cols., 1995; MAFFEI e cols., 1995), apesar de sua administração exógena não prevenir a obesidade (KALRA e cols., 2003; KALRA e KALRA, 2004, LEE e cols., 2002). Uma vez liberada, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e liga-se a receptores específicos (LEPb), presentes principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo (BARSH e SCHWARTZ, 2002; FEI e cols., 1997; HAKANSSON e cols., 1996; MERCER e cols., 1996). 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. Por sua vez, o sistema de melanocortina 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).

Além dos circuitos homeostáticos descritos acima, vários sinalizadores periféricos e centrais modulam áreas relacionadas à memória e ao aprendizado, influenciando o padrão alimentar futuro (FARR e cols., 2006; MALIK e cols., 2008;

GASBARRI e cols., 2014). Lesões em áreas mnemônicas importantes, como o hipocampo, diminuem a resposta a sinais de fome/saciedade (CLIFTON e cols., 1998). Por exemplo, a leptina e a grelina, além de seu papel na homeostase, influenciam o sistema neural de recompensa, responsável por sensações de prazer (hedônicas), conforme será descrito abaixo (ABIZAID e cols., 2006; SHALEV e cols., 2001; FIGLEWICZ, 2003). A ativação desse sistema contribui para a ingestão de alimentos mesmo sem a necessidade homeostática, ou seja, em indivíduos saciados (FIGLEWICZ e cols., 2004). Ademais, características do próprio alimento, como palatabilidade, também ativam/inibem esse sistema (MURRAY e cols., 2014).

Portanto, de modo simplificado, o controle homeostático 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 (atos relacionados à ingestão de alimentos); (2) os eventos fisiológicos e metabólicos periféricos; e (3) as interações com os neurotransmissores do SNC (BLUNDELL, 1991; para revisão BLUNDELL, 1999).

Diversos 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). Os comportamentos apetitivos têm um importante componente aprendido e estão condicionados a mecanismos de aprendizagem (GASBARRI e cols., 2014), evidenciando a influência de estruturas neurais para além do hipotálamo, como o hipocampo e amígdala. Mais precisamente, o comportamento requer a integração entre circuitos corticais (hipocampo e córtex pré-frontal) e sub-corticais (hipotálamo; BENOIT e cols., 2010). A capacidade de escolher e de reconhecer certos tipos de alimentos em determinado contexto social e ambiental é adquirida por meio de processos de aprendizado. Trata-se de habilidade essencial para a sobrevivência do indivíduo, fornecendo informações benéficas ou aversivas a respeito de determinado alimento (BERTHOUD, 2007).

O simples fato de se pensar em um alimento pode modular a atividade de áreas neurais específicas envolvidas no controle cognitivo de comportamentos voltados à busca de alimentos (ARANA e cols., 2003). Na ausência de um alimento real, pistas indicativas podem servir como um estímulo condicionado para evocar sua representação na memória (DAVIDSON, 2000; DAVIDSON e cols., 2000).

Assim, o comportamento alimentar consiste em processo complexo, com participação de diversas áreas neurais somadas a informações periféricas, que mantêm a homeostase do organismo.

Além do sistema homeostático, os mecanismos neurais de recompensa também regulam o comportamento alimentar (LUTTER e NESTLER, 2009). O sistema hedônico igualmente envolve diversos circuitos neurais, dentre os mais importantes: o córtex orbitofrontal e amígdala que participam da codificação de informações relacionadas ao valor reforçador do alimento (ROOLS, 2008 e 2010) e a ínsula que processa informações sobre o sabor e as propriedades hedônicas do alimento (SMALL, 2010). A motivação e as propriedades reforçadoras do alimento são mediadas pelo núcleo accumbens (NAcc) e pelo estriado dorsal e a dopamina desempenha um papel importante nesse processo (MALIK e cols., 2008). Ademais, o hipotálamo lateral também parece regular as respostas hedônicas a alimentos palatáveis e o *drive* para se alimenta (KELLEY e cols., 2003; 2005).

Essas estruturas cerebrais agem de maneira harmônica e assim conseguem controlar o aprendizado para as propriedades hedônicas de um determinado alimento, o que regula os esforços relacionados a obtenção do alimento em relação a estímulos ambientais (DAGHER, 2009).

O sistema mesolímbico-dopaminérgico parece estar associado à busca pelo alimento palatável, enquanto outros neurotransmissores regulam as propriedades hedônicas do alimento. Ratos deficientes de dopamina (pela inativação da tirosina hidroxilase) ainda demonstram preferência por sacarose, mas consomem quantidades menores que animais controle (ROITMAN e cols., 2004). Humanos diagnosticados com Doença de Parkinson apresentam degenerações de neurônios dopaminérgicos e consomem menos alimento que indivíduos normais, e o tratamento da doença pode gerar comportamentos do tipo compulsivo para alimentos hipercalóricos (NIREMBERG e WATERS, 2006).

O importante poder reforçador de alimentos palatáveis vem sendo demonstrado em experimentos com roedores. Ratos saciados se submeteram voluntariamente a frio extremo (-15°C) e choque nas patas para obter alimentos palatáveis (tortas, coca-cola, M&M, chocolate), ricos em gordura e açúcar (OSWALD e cols., 2011).

1.2 COMPORTAMENTO ALIMENTAR COMPULSIVO

O processo natural de procura e ingestão de alimentos parece estar mais bem elucidado do que os comportamentos alimentares patológicos como a anorexia, a bulimia, a compulsão alimentar e a obesidade. As desordens alimentares são definidas por distúrbios em hábitos alimentares que normalmente envolvem a ingestão insuficiente ou excessiva de alimentos, resultando em desequilíbrio energético (KIM, 2012; GASBARRI et al., 2014).

A homeostase baseia-se no sinergismo entre pistas periféricas e comportamentais; uma quebra no sinergismo prejudica esse equilíbrio e pode levar a comportamentos alimentares patológicos. Indivíduos com anorexia nervosa, por exemplo, se privam de alimentos mesmo quando seu organismo está apresentando sinais fisiológicos de déficit energético (KAYE e cols., 2013). Analogamente, indivíduos obesos consomem alimentos altamente calóricos mesmo com sinais fisiológicos de que há uma quantidade de energia estocada em seus organismos (BERTHOUD, 2012).

Portanto, desordens alimentares ocorrem quando a ingestão de alimentos não corresponde ao desejo de comer (BERRIDGE e cols., 2010), ou seja, ingerir alimentos quando se está saciado ou ignorar sinais fisiológicos de fome. Apesar da recente relevância do estudo de distúrbios alimentares, seu tratamento farmacológico ainda é limitado (BAILEY e cols., 2014; BRAY e RYAN, 2014). A identificação dos mecanismos neurais que coordenam as pistas energéticas e as respostas comportamentais apropriadas poderão sugerir caminhos eficientes para combater esses distúrbios.

A compulsão alimentar, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-5), é um distúrbio caracterizado por episódios de consumo excessivo de alimentos em curto espaço de tempo, sob condições em que não há, necessariamente, sinais fisiológicos de fome (longos períodos de privação). Complementarmente, indivíduos que apresentam compulsão alimentar ingerem quantidades maiores de alimentos do que a maioria dos indivíduos ingeririam em condições similares (APA, 2013). Episódios de compulsão (*binge*) incluem, geralmente, a ingestão de alimentos altamente palatáveis, ricos em açúcar e/ou gordura. Esses episódios estão associados a, pelo menos, três dos seguintes

fatores: 1) comer muito mais rápido do que o normal; 2) comer até sentir-se desconfortável; 3) ingerir grandes quantidades de alimento quando não se apresenta sinais fisiológicos de fome, 4) comer sozinho, por sentimentos de vergonha em relação à quantidade de comida que se está ingerindo; e 5) sentir-se enojado, deprimido e culpado após ter comido (APA, 2013).

Apesar de ocorrer de forma intermitente, a persistência e a recorrência de episódios de compulsão alimentar por um longo período de tempo caracterizam o Transtorno de Compulsão Alimentar Periódica – TCAP, que constitui um grande problema de saúde pública, uma vez que esses indivíduos apresentam outras comorbidades, como a ansiedade, a depressão e a obesidade (YANOVSKI, 2003). Essa característica dificulta tanto seu diagnóstico e tratamento como o desenvolvimento de modelos animais adequados para seu estudo (SWANSON e cols., 2011).

O fato de a compulsão alimentar ser um distúrbio multifatorial, cujas bases biológicas não estão totalmente elucidadas (WENDY e cols, 2009; ADAN e cols., 2008), torna difícil a existência de um tratamento único e eficaz para os indivíduos diagnosticados com esse transtorno. No entanto, haja vista sua relação com outras co-morbidades, o tratamento farmacológico conta com o uso de medicamentos antidepressivos, supressores do apetite e/ou anticonvulsivantes (CARTER e cols., 2003). Medicamentos eficazes para o tratamento da dependência de nicotina e opióides (p.ex., baclofen), tanto em modelos animais, como em humanos, também diminuem a ingestão alimentar durante episódio compulsivo, o que constitui um importante indício de uma estreita relação anatomo-fisiológica entre os diversos tipos de compulsão, incluindo a compulsão/dependência por substâncias de abuso, conforme será visto a seguir (BUDA-LEVIN e cols., 2005; BROFT e cols., 2007). Contudo, dado o alto percentual de recaída, nenhuma dessas estratégias farmacoterapêuticas parece ser completamente eficaz.

1.3 TESTES EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA COMPULSÃO ALIMENTAR

Para se estabelecer um modelo animal de compulsão alimentar é necessário que o modelo desenvolva comportamentos similares ou análogos àqueles presentes em humanos. Busca-se, assim, simular o consumo excessivo de alimentos em curto período de tempo e em quantidades superiores às de animais controle sob as mesmas condições (CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; MATHES e cols., 2009; CORWIN e WOJINICKI, 2006). Esse comportamento, descrito no DSM-5 (APA, 2013), pode ser transposto para animais. Um modelo animal, contudo, não consegue englobar toda a complexidade dos fatores socioculturais que influenciam o comportamento alimentar do homem (PARYLAK e cols., 2011).

Faz-se necessário desenvolver testes que abordem comportamentos repetidos intermitentes e excessivos, como o observado na compulsão alimentar em humanos. Os modelos animais que já foram desenvolvidos, até o momento, são baseados em uma abordagem isomórfica (i.e., desenhados para mimetizar o comportamento humano; CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004). Na compulsão alimentar, o modelo deve apresentar três características gerais: 1) ocorrer repetidamente durante um longo período de tempo; 2) apresentar, em uma situação semelhante, uma ingestão de alimentos significativamente maior em animais compulsivos do que em animais controle; e 3) desenvolver escalonamento na ingestão alimentar ao longo do tempo.

A maioria dos procedimentos experimentais existentes para o estudo da compulsão alimentar está associada ao estresse. Já em 1969, Miller e colaboradores propuseram um modelo de isolamento social em macacos *rhesus* e observaram episódios de hiperfagia. Em 1997, Hagan e Moss desenvolveram um modelo animal em roedores de compulsão baseado na privação alimentar. O teste consistia em restrição alimentar (privação), seguida pela oferta de alimento. Posteriormente, em 2002, os mesmos pesquisadores propuseram a restrição foi seguida de oferta de alimento acrescida de um fator estressante agudo (choque nas patas).

As premissas do protocolo de privação baseiam-se no fato de vários indivíduos com distúrbios alimentares relatarem consumo excessivo de alimentos,

geralmente ricos em açúcar e gordura, em curtos espaços de tempo, seguido por longos períodos de autoprivação (comportamento compensatório). Embora tal fato o assemelhe a comportamentos voluntários humanos, não se pode afirmar o quanto o animal esta comendo por fome/necessidade fisiológica e o quanto do comportamento está relacionado unicamente à compulsão. Não se pode, portanto, distinguir a ativação dos sistemas homeostático e hedônico. Além disso, o comportamento não é realizado voluntariamente pelo animal.

No final dos anos 1990, outro teste de compulsão foi desenvolvido por Corwin (para revisão vide CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; CORWIN e WOJNICKI, 2006; CORWIN e cols., 2011), que se baseia no acesso limitado e intermitente a um alimento opcional (gordura vegetal) em roedores que têm acesso irrestrito à dieta regular. A premissa é a de que quanto maior for a restrição ao acesso a esse alimento, maior será o consumo. Essa premissa tem suas bases em estudos com os chamados “alimentos proibidos” (hipercalóricos) em humanos, para os quais o acesso é limitado pelo próprio indivíduo (GUERTIN e CONGER, 1999; GIBSON, 2012).

O protocolo é metodologicamente constituído por dois grupos de animais inicialmente homogêneos, que recebem um alimento opcional em regimes alimentares distintos: três dias por semana durante um breve intervalo de tempo (1 – 2 h) *versus* sete vezes por semana durante o mesmo período. Os animais com acesso reduzido, com o passar do tempo, ingerem quantidades significativamente maiores do alimento teste comparado com o grupo de maior acesso, mimetizando, assim, um episódio de compulsão alimentar em humanos. Ocorre também escalonamento na ingestão do alimento teste para o grupo de menor acesso. Diferenças significativas no padrão alimentar são observadas a partir da terceira ou quarta semana de teste.

Nesse paradigma, ao não se privarem os animais de água nem de sua dieta normal, evitam-se possíveis confusões entre a fome e o comportamento compulsivo, bem como aproxima o teste da realidade observada em humanos (ARAUJO-HELD e cols., 2002; CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; CORWIN e WOJNICKI, 2006). A simplicidade e o baixo custo do teste também favorecem o seu uso. O comportamento “tipo compulsivo desenvolve-se pela intermitência *per se* do acesso ao alimento, mas também pode ter influência, em parte, do estresse psicossocial do isolamento social (crônico) no qual o sujeito está submetido. Cabe destacar que o

estresse crônico tem sido apontado como importante gerador do comportamento compulsivo, principalmente em humanos, e que todos os procedimentos já desenvolvidos em animais geram, de uma forma ou outra, estresse nos animais.

Recentemente, Velazquez-Sanchez e colaboradores (2014), basearam-se no modelo de acesso intermitente e propuseram reduzir a intermitência do modelo de Corwin, ao limitar o acesso a alimento rico em açúcar a 1h/dia, por no mínimo doze dias consecutivos. Mesmo com acesso mais frequente e tempo reduzido de protocolo, os pesquisadores afirmam que houve escalonamento na ingestão alimentar pelo grupo que recebe o alimento teste, mimetizando assim um comportamento compulsivo.

Outro importante marco no estudo de comportamento compulsivo foi proposto por Avena e Hoebel (2003), os quais se tornaram pioneiros no tema “dependência por alimentos”. O modelo animal proposto por esses pesquisadores baseia-se em uma alimentação cíclica: período de 12h de privação, seguida de 12 h de acesso à solução de sacarose (10%) e à ração, por um período de 21 dias.

A maioria dos testes utilizam roedores como sujeito experimental, tanto para compulsão alimentar, quanto para outros distúrbios alimentares, como a obesidade. Os resultados desses modelos, no entanto, apresentam limitações à transposição para humanos, tais como diferenças filogenéticas e comportamentais (SUZETTE e cols., 2013; WACHTMAN e cols., 2011).

Há poucos estudos nessa área utilizando primatas não-humanos como sujeitos experimentais. Foltin (2006) e Foltin e Haney (2007) avaliaram o comportamento alimentar de babuínos, empregando um procedimento de comportamento operante (pressionar uma barra) em duas fases: 1) fase apetitiva – apresentação apenas do estímulo visual; e 2) fase consumatória – oferta do alimento. A esse esquema, foi aplicada uma variação do teste de intermitência descrito acima, sendo utilizada apenas a premissa da intermitência ao acesso, sem outros controles. Os animais com acesso ao alimento opcional três vezes por semana consumiram 75% do total calórico diário em balas durante a primeira refeição (FOLTIN, 2006; FOLTIN e HANEY, 2007). Novos estudos são imprescindíveis para uma melhor elucidação do comportamento compulsivo em primatas não-humanos, assim como da influência de fatores sociais e ambientais aos quais primatas não-humanos estão expostos que os diferenciam de roedores.

Em resumo, pela evolução dos estudos e do desenvolvimento de diferentes protocolos para o estudo de comportamentos do tipo compulsivo em modelos animais, diversos autores entendem que, mais que o alimento em si, a forma de ingestão é o fator principal no desenvolvimento de comportamentos alimentares patológicos, uma vez que é por meio da forma que se observa a perda do controle da ingestão do alimento (AVENA e cols., 2005; HOEBEL e cols, 2009).

1.4 COCAÍNA E MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DEPENDÊNCIA

Os indivíduos estão constantemente cercados de estímulos capazes de gerar prazer. Pode-se tomar, como exemplo, a busca por alimentos e por sexo (reforçadores naturais), que promovem a sobrevivência das espécies. Outros elementos, como atividade física, jogos de azar e drogas de abuso, também têm a capacidade de gerar prazer, pois ativam os mesmos circuitos neurais envolvidos nos processos de reforçadores naturais. Ao sentir prazer com essas atividades, as chances de o indivíduo repetir os comportamentos são maiores. Muitos desses estímulos são benéficos para garantir sobrevivência, outros, no entanto, podem prejudicar o indivíduo e gerar comportamentos patológicos, como é o caso da dependência por drogas de abuso (KALIVAS e VOLKOW, 2005).

Em relação às áreas do cérebro envolvidas, Volkow e colaboradores (2011) propuseram um modelo que enfatiza seis circuitos neurais integrados na dependência: 1) recompensa (NAcc e Pálido ventral); 2) memória/aprendizagem/hábitos (amígdala e hipocampo); 3) controle inibitório/funções executivas (córtexes pré-frontal dorsolateral medial, inferior, orbitofrontal e cíngulo anterior); 4) motivação (córtexes orbitofrontal, subcaloso e motor, e estriado dorsal); 5) interocepção (ínsula e córtex cíngulo anterior); e 6) evitar aversão/reactividade ao estresse (habênula, amígdala; Figura 2). Esses circuitos recebem inervações diretas de neurônios dopaminérgicos e ainda se conectam entre si via interneurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos, modulados por sinapses monoaminérgicas (serotonina e noradrenalina). Essas conexões afetam uma gama de comportamentos, e isso ajuda a explicar a complexidade da natureza de comportamentos, como a dependência e suas co-morbidades com outras desordens mentais (VOLKOW e BALER, 2012).

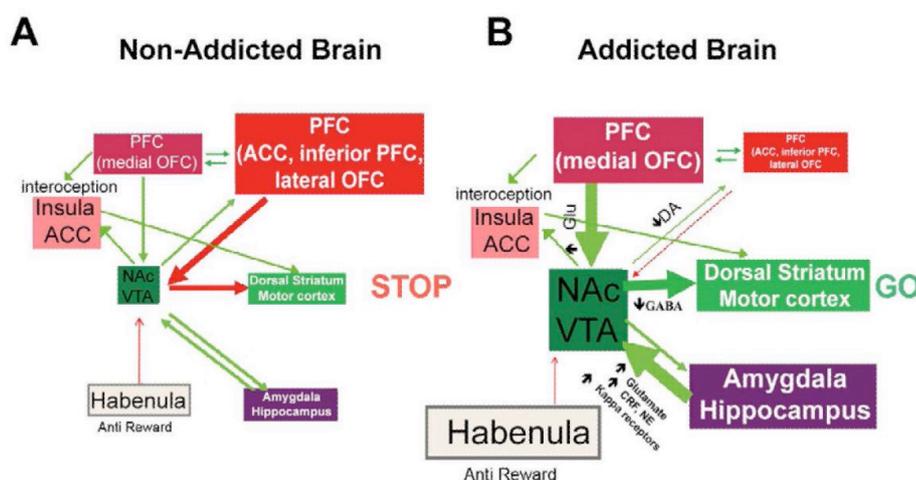


Figura 2: Modelo de Volkow (2011) de adaptações neurais em cérebros de dependentes. Retirado de: http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n11/box/nrn3118_BX1.html.

Na farmacodependência, observam-se aumentos na ativação da via mesocorticolímbica dopaminérgica – conhecida como sistema de “recompensa/prazer” – originada na área tegmental ventral do mesencéfalo (VTA) e que se projeta para o estriado ventral, incluindo o NAcc e outras regiões do sistema límbico, como a amígdala e o septo, bem como para diferentes áreas do córtex pré-frontal (FELDMAN e cols., 1997, KOOB, 2014; KALES, 1990; JANSEN e VAN DEN HOUT, 1991; DREWNOWSKI e cols., 1992; WHITE e GRILO, 2005). O aumento na disponibilidade extracelular da DA no NAcc está intimamente relacionado ao comportamento de autoadministração e aos processos de reforço positivo que, por sua vez, subsidiam o desenvolvimento da dependência por várias drogas psicoativas (WISE, 1996; WHITE, 1996; CANNON e BSEIKRI, 2004; O’BREIN, 2006). Portanto, o NAcc atua como uma importante interface entre os sistemas límbicos e motor, atuando na motivação das ações (VENTULANI, 2001).

Uma das drogas de abuso com alto potencial de causar dependência é a cocaína. Extraída das folhas da coca (*Erythroxylon coca*; planta originária na América do Sul) e utilizada desde o século XV, a cocaína tem propriedades medicinais (anestésico local) e psicoestimulantes, com capacidade de gerar sensações intensas de prazer e euforia, diminuir a fadiga e a fome, e aumentar a vigília (O’BRIEN, 2006). Essas características, juntamente com o aumento da atividade locomotora, são observadas segundos/minutos após o consumo, dependendo da dose e da via de administração. Além dos efeitos comportamentais subjetivos, esse psicoestimulante também altera diversas funções autonômicas e

fisiológicas como, por exemplo, midríase, aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e da temperatura corporal. Doses mais elevadas e/ou uso crônico e indiscriminado podem desencadear episódios de agressividade, delírios, alucinações, distúrbios do humor, comportamentos estereotipados e irritabilidade (O'BREIN, 2006). A droga pode também causar parada cardiorrespiratória e levar ao óbito.

O mecanismo pelo qual a cocaína leva à dependência está relacionado principalmente ao bloqueio da recaptação da DA liberada na fenda sináptica, uma vez que a droga se liga às proteínas transportadoras de DA (DAT) presentes na membrana pré-sináptica (NESTLER e cols., 2001). Alguns estudos sugerem também um aumento da liberação de DA, via transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT), responsáveis pelo armazenamento desse neurotransmissor nos neurônios pré-sinápticos, porém esse mecanismo ainda não se encontra totalmente elucidado (VENTON e cols., 2006). Independentemente do mecanismo específico, sabe-se que a cocaína leva a aumento extracelular substancial de DA (NESTLER e cols., 2001). No NAcc, esse acúmulo proveniente da área tegmental ventral (VTA) é visto como um dos principais mecanismos subjacentes ao efeito reforçador e à hiperatividade induzida pela administração da cocaína (KOOB, SANNA e BLOOM, 1998, KOOB e LE MOAL, 2001).

Estudos em camundongos geneticamente modificados (*knockouts*) para DAT sugerem que outros neurotransmissores também exercem um importante papel modulador na dependência de cocaína, via mecanismos dependentes e/ou independentes de DA (MULLER e cols., 2003). Sabe-se, por exemplo, que a cocaína aumenta a disponibilidade de serotonina (5-HT) no NAcc (NESTLER e cols., 2001), podendo haver, portanto, uma interação entre os sistemas DA/5-HT nesta e talvez em outras regiões com altas concentrações de receptores serotoninérgicos.

A administração de cocaína também gera ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), decorrente do aumento na liberação do fator de liberação de corticotropina (CRF) pelo hipotálamo, aumentando significativamente os níveis circulantes de corticosterona em roedores (MANTSCH e cols., 2000) e de cortisol em primatas não-humanos e no homem (BAUMANN e cols., 1995; SARNYAI e cols., 1996). O mecanismo exato de como a cocaína estimula o eixo HPA ainda não está totalmente elucidado, apesar de haver indícios de uma modulação direta via neurotransmissores como a DA e 5-HT (KALIVAS e cols., 1987; LAVICKY e cols.,

1993). Os glicocorticóides atuam diretamente no mecanismo reforçador da cocaína, uma vez que facilitam a neurotransmissão dopaminérgica no NAcc (MARINELLI e PIAZZA, 2002). Portanto, as alterações hormonais observadas com o uso da cocaína podem subsidiar, em parte, os mecanismos da dependência por esse psicoestimulante, além de contribuir para respostas de recaída após a sua retirada.

1.5 TESTES CLÁSSICOS PARA O ESTUDO DA DEPENDÊNCIA

Existem vários modelos animais para estudar diferentes fases ou características da dependência. O presente trabalho se limitou a estudar a Preferência-por-lugar condicionada a estímulo (CPP) e a sensitização.

O teste de CPP tem se tornado um método importante para avaliar o efeito reforçador de uma variedade de substâncias (alimentos e drogas) com potencial de causar dependência (FIGLEWICZ e cols., 2004; TZSCHENTKE, 2007; CHABRAWI e BARROS, 2011; WANG e cols., 2004; MORALES e cols., 2012) e tem sido empregado experimentalmente em estudos com diferentes espécies (KAUN e cols., 2011; CUNNINGHAM, GRENEL e GROBLEWSKI, 2006; TZSCHENTKE, 2007; DUARTE e cols., 2014; BORGES e cols., 2015). O teste tem como base o condicionamento clássico (pavloviano), no qual estímulos originalmente neutros adquirem propriedades motivacionais após serem pareados repetidas vezes com estímulos incondicionados, tais como drogas de abuso (SANCHIS-SEGURA e SPANAGEL, 2006) e alimentos altamente palatáveis (LATAGLIATA e cols., 2010; DUARTE e cols., 2014). Conseqüentemente, o estímulo neutro (agora 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; TZSCHENTKE, 2007). Várias características de um ambiente originalmente neutro, tais como cor ou textura, podem ser usadas para obtenção de um condicionamento contextual e, assim, com repetidas exposições, o estímulo neutro (ambiente) adquire características de condicionado (BARDO e BEVINS, 2000).

No paradigma de CPP, dois ou mais conjuntos de pistas visuais, espaciais, táteis e/ou olfativas são pareadas com uma injeção da droga e uma injeção de solução salina (esta é opcional, dependendo do delineamento experimental). Embora existam variações metodológicas, em geral, o indivíduo é confinado em um

dos compartimentos do aparato (caixa de CPP, variável de acordo com a metodologia, para maiores detalhes, vide seção Materiais e Métodos) após receber a droga e em outro ao receber salina. No condicionamento, o animal recebe injeções de uma substância prazerosa (o estímulo não-condicionado) em um compartimento (o estímulo neutro) e injeções de salina no outro compartimento. O objetivo é o de que o sujeito associe a sensação subjetiva de prazer gerada pela droga ao lugar onde essa foi administrada, tornando o compartimento em um estímulo condicionado.

Na sessão teste, o animal tem acesso irrestrito a ambos os compartimentos do aparato sem a administração da droga, e o tempo gasto em cada compartimento é registrado. Um aumento no tempo de permanência no compartimento pareado com a droga, após condicionamento, em relação à quantidade de tempo gasto no mesmo compartimento antes do condicionamento é indicativo de que a droga induziu um efeito de CPP.

Uma grande vantagem do teste de CPP é a possibilidade de avaliar tanto o efeito reforçador do estímulo, seja esse natural ou farmacológico (revisado em TZSCHENTKE, 2007), como os efeitos aversivos de um tratamento (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 condicionamento, dispensa de procedimentos cirúrgicos prévios, realização da sessão teste na ausência 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 (BARDO e BEVINS, 2000; MUELLER e STEWART, 2000).

Portanto, o paradigma CPP permite a avaliação dos efeitos motivacionais de drogas de abuso, sem confundir os efeitos reforçadores com os efeitos motores gerados pelas drogas quando se estuda, por exemplo, a auto-administração. O CPP, no entanto, não avalia a dependência em si, mas os indícios do potencial reforçador da substância.

Outro teste importante utilizado no estudo da dependência é o teste de sensitização. A sensitização é um termo que se refere a capacidade de um estímulo repetitivo, de mesma intensidade, produzir aumento na magnitude da resposta em função de adaptações neurais decorrentes do uso repetido da substância. A sensitização cruzada, por sua vez, é a capacidade de um agente (estímulo) em

sensitizar a resposta induzida por um segundo estímulo (VEZINA e cols., 1989). O processo de sensitização a psicoestimulantes parece estar relacionado ao sistema mesolímbico dopaminérgico, sendo a sensitização cruzada um efeito gerado pelo fato de dois estímulos apresentarem mecanismos de ação em comum (SELF e NESTLER, 1995). Contudo, até o presente, nenhum estudo foi realizado a fim de analisar uma sensitização cruzada entre alimentos altamente palatáveis e drogas de abuso (cocaína) em primatas não-humanos, o que poderia contribuir significativamente para o nosso entendimento a cerca dos mecanismos subjacentes à dependência (por alimentos ou drogas) no modelo animal mais próximo do homem.

1.6 RELAÇÃO ENTRE DEPENDÊNCIA POR ALIMENTOS PALATÁVEIS (*FOOD ADDICTION*) E DROGAS DE ABUSO

Alimentos ricos em açúcar e gordura podem causar dependência? A resposta vai depender da definição de *dependência por alimentos*. Em uma primeira análise, os animais são “dependentes” de alimentos para sobreviver, mas pode-se pensar na dependência como patologia. Dependência é descrita nos conceitos da farmacologia como uma doença em razão de adaptações neurais crônicas causadas pelo uso repetido de drogas que modificam comportamentos voluntários e hábitos e que geram prejuízo ao indivíduo (KOOB e LE MOAL, 2001; VOLKOW, FOWLER e YANG, 2003; VOLKOW e BALER, 2014).

Assim, do ponto de vista farmacológico, são características da dependência descritas no DSM-5: 1) uso de uma substância em quantidades maiores ou por mais tempo do que o planejado; 2) desejo persistente ou incapacidade de controlar o desejo; 3) gasto importante de tempo em atividades para obter a substância; 4) fissura; 5) deixar de desempenhar atividades sociais, ocupacionais e/ou familiares em razão do uso; 6) continuar o uso apesar de apresentar problemas sociais e/ou interpessoais; 7) restrição do repertório de vida em função do uso; 8) manutenção do uso apesar de prejuízos físicos; 9) uso em situações de exposição a risco; 10) tolerância; e 11) abstinência. A dependência pode ser classificada de leve a severa, dependendo de quantos critérios estiverem presentes (APA, 2013).

O presente estudo adotou como ponto de partida, uma definição simples de dependência por alimentos proposta por Rogers e Smit (2000) como sendo a perda

de controle sobre o consumo de alimentos hipercalóricos e palatáveis. Pode-se, então, dizer que a dependência por alimentos (*food addiction*) se manifesta pelo comportamento hiperfágico, fissura – desejo incontrolável de ingestão do alimento – e sensação de ansiedade na ausência de determinados alimentos (IFLAND e cols., 2009; PARYLAK e cols., 2011).

Há várias teorias que buscam estabelecer um denominador comum entre a dependência por alimentos e a por drogas de abuso. Uma das maneiras para se demonstrar essa relação está em tentar demonstrar que determinados tipos de alimentos com altas concentrações de açúcar e gordura têm potencial de causar modificações fisiológicas e comportamentais (p. ex., ingestão excessiva – *binge*) semelhantes àsquelas observadas em indivíduos dependentes de drogas, tais como a cocaína, o tabaco ou o álcool (AVENA, RADA e HOEBEL, 2008; PELCHAT, 2009; GEARHARDT e cols., 2011; AVENA e cols., 2009 e CORWIN e GRIGSON, 2009).

Em relação a semelhanças comportamentais, a dependência por drogas e por alimentos podem ser consideradas como resultado de hábitos que se reforçam pelo prazer e pela repetição do comportamento e que se tornam cada vez mais difíceis para o indivíduo controlar, apesar de suas consequências potencialmente prejudiciais à saúde. O consumo excessivo de alimentos (em geral palatáveis) e o uso de drogas são comportamentos movidos inicialmente por suas propriedades reforçadoras positivas, o prazer, e são mantidos pelo reforço negativo (evitar crises de abstinência).

A observação de comportamentos similares entre droga e alimento e a idéia de que pode haver dependência por determinados tipos de alimentos aparecem nos trabalhos de Hoebel e colaboradores (1998), os quais propuseram um modelo animal no qual os sujeitos (roedores) são submetidos a um determinado padrão alimentar (restrição calórica, seguida de acesso à soluções de sacarose), que resulta em respostas comportamentais características de dependência: a busca compulsiva e episódios de compulsão, bem como o aparecimento de sinais de abstinência (AVENA, RADA e HOEBEL, 2008; AVENA e HOEBEL, 2009).

Gosnell (2005) relatou que animais pré-expostos à açúcar apresentaram maiores taxas de atividade locomotora quando receberam injeção de cocaína (15mg/Kg). Avena e Hoebel (2003) obtiveram resultados semelhantes, com aumento de duas a três vezes na resposta comportamental quando administraram dose única de anfetamina em ratos que passaram por protocolo intermitente de sacarose. Essa

sensitização cruzada (açúcar/droga) reforça a existência de caminhos neurais comuns e semelhanças comportamentais e fisiológicas entre ambos os comportamentos compulsivos.

Está bem descrito na literatura que o circuito mesolímbico dopaminérgico é ativado em resposta a drogas de abuso. Estudos também vem demonstrando que alimentos palatáveis com altas concentrações de açúcar e e gordura também aumentam a concentração de DA principalmente no NAcc (WISE, 1996; HAJNAL, SMITH e NORGREN, 2004). O sistema de recompensa tem sido associado à emissão de respostas comportamentais relacionadas a ingestão de alimentos não apenas de valor homeostático, mas também de valor hedônico. Assim, Volkow e colaboradores (2012) sugeriram que a perda de controle tanto para drogas, quanto para alimentos, ocorrem por um desequilíbrio dopaminérgico principalmente na via mesolímbica que modulam respostas comportamentais a estímulos do ambiente.

Alimentos ativam o circuito neural de recompensa de duas maneiras, via palatabilidade (participação de opióides endógenos e canabinoides) e por meio do aumento da glicose e insulina (participação da DA), enquanto drogas ativam os mesmos circuitos via efeito farmacológico (ativação direta de neurônios dopaminérgicos ou indireta através da modulação de outros neurônios como opióides, nicotina, GABA; VOLKOW e WISE 2005).

Portanto, a dependência por alimentos e por drogas têm, possivelmente, as mesmas bases neurais de determinação do comportamento, que, conseqüentemente, geram alterações no comportamento motivado aprendido em relação ao alimento/droga (KOOB e MOAL, 2001; VOLKOW e WISE, 2005; DAVIDSON e cols., 2007; VOLKOW e WISE, 2005; AVENA, RADA e HOEBEL, 2006; PELCHAT, 2009; CORWIN, AVENA e BOGGIANO, 2011).

Estimulações repetidas da via dopaminérgica são responsáveis, em parte, pelas adaptações neurais em outros neurotransmissores e circuitos, que possivelmente propiciam o aparecimento de comportamentos compulsivos e levam à perda do controle da ingestão de alimentos ou da administração de drogas. O uso crônico de drogas leva à plasticidade neural no circuito glutamatérgico cortico-estriatal, a qual resulta em um aumento da reação emocional e diminuição do controle inibitório, favorecendo, assim, o consumo excessivo da droga (VOLKOW e LI, 2004).

De maneira semelhante, a exposição repetida à alimentos hipercalóricos em indivíduos vulneráveis (predisposição genética) pode resultar no aparecimento de comportamentos compulsivos e propiciar o desenvolvimento da obesidade (AVENA, RADA e HOEBEL, 2008). No entanto, é importante lembrar que a regulação neurobiológica da ingestão alimentar é mais complexa do que a de drogas de abuso, uma vez que o consumo de alimentos é controlado não apenas por mecanismos de recompensa, mas também por diversos fatores periféricos e centrais (LEVINE, KOTZ e GOSNELL, 2003).

O valor hedônico de alimentos palatáveis (calóricos, ricos em gordura e/ou açúcar) é cada vez mais reconhecido como uma causa importante para o aumento dos distúrbios alimentares na população. Esse tem a capacidade de ativar a via dopaminérgica mesocortibolímbica e conseqüentemente gera sensações prazerosas no indivíduo. Alguns indivíduos são mais propensos a consumir esse tipo de alimento, podendo exibir uma resposta hedônica elevada (BOGGIANO e cols., 2007).

A DA regula o consumo de alimentos de duas maneiras: a primeira é por meio da modulação das propriedades reforçadoras e a segunda facilitando o aprendizado e promovendo a motivação para realização de comportamentos direcionados ao consumo futuro (MARTEL E FANTINO, 1996). Esse neurotransmissor também facilita o condicionado a estímulos alimentares que, em seguida, induzem uma motivação para consumir o alimento (KIYATKIN e GRATTON 1994).

O efeito neuroquímico observado durante um episódio compulsivo é distinto daquele visto no comportamento alimentar normal, e se aproxima de um comportamento patológico compulsivo. No episódio de compulsão, a concentração de DA na região da concha do NAcc aumenta a cada episódio (RADA, AVENA e HOEBEL, 2005), como é visto na administração repetida de diferentes drogas de abuso (DI CHIARA e IMPERATO, 1988). Já na ingestão normal de alimento, a resposta dopaminérgica diminui progressivamente, indicando uma habituação e/ou perda de novidade do alimento (BASSAREO e DI CHIARA, 1997). No comportamento compulsivo também ocorre uma diminuição no número de receptores dopaminérgicos do tipo D₂ nas regiões do estriado e NAcc e uma super-expressão dos receptores D₁ nas mesmas áreas (COLANTUONI e cols., 2002).

Avena e cols. (2006) e Rada e cols. (2005) demonstraram que ratos com acesso intermitente à açúcar consomem o alimento de maneira compulsiva e que

em cada episódio há liberação de dopamina no NAcc de maneira semelhante à que ocorre quando animais são expostos a drogas de abuso. Além disso, o consumo de alimentos palatáveis também aumenta a disponibilidade extracelular de DA na via mesolímbica, em especial no NAcc. No entanto, em casos de privação de alimentos – por exemplo de indivíduos que fazem dieta de restrição alimentar – os níveis extracelulares de DA no NAcc diminuíram (POTHOS, HERNANDEZ e HOEBEL, 1995; GEIGER e cols., 2009). Assim, muitas são as evidências sugerindo um mecanismo neural comum para reforço advindo de alimentos e de drogas (KELLEY e BERRIDGE, 2002; PELCHAT, 2002; WISE, 1996; AVENA, 2010).

Em estudos de neuroimagem, indivíduos obesos ou com transtorno de compulsão alimentar apresentam alterações na sinalização dopaminérgica e hiperatividade do sistema de recompensa quando pistas visuais relacionadas ao alimento são apresentadas, com resultados similares aos vistos em usuários de drogas quando pistas visuais associadas à droga são apresentadas (VOLKOW e cols., 2008). Stoeckel e cols., (2008) e Murdaugh e cols., (2012) relataram que, quando apresentadas imagens de alimentos calóricos, mulheres obesas tiveram ativação neural em diversas regiões do sistema límbico (córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal, amígdala, estriado ventral e dorsal, ínsula, córtex cingulado anterior e hipocampo), enquanto mulheres de peso normal aumentaram significativamente apenas a ativação do caudado dorsal.

No caso da antecipação e/ou da ingestão de alimentos ricos em açúcar e gordura, áreas cerebrais sabidamente associadas ao comportamento motivacional também são ativadas, incluindo o córtex pré-frontal (cingulado, orbitofrontal) e a amígdala (WANG e cols., 2004; GEARHARDT e cols., 2011). Recentemente, um estudo de meta-análise em humanos, demonstrou que pistas visuais relacionadas à comida e à nicotina ativaram as mesmas áreas do SNC: córtex orbitofrontal, estriado e amígdala, ou seja, áreas relacionadas à aprendizagem, memória e motivação (TANG e cols., 2012).

A ingestão de alimentos altamente palatáveis e fatores associados a ela, tais como restrição calórica (HAGAN e MOSS, 1997, HAGAN e cols., 2002a, 2002b) e estresse (MCINTOSH e cols., 1999; PECORARO e cols., 2004), podem contribuir para a exibição de comportamentos compulsivos (CORWIN e cols., 1998; CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; COLANTUONI e cols., 2001) e gerar mudanças no sistema neural de recompensa (KELLEY e cols., 2003; BOGGIANO e cols., 2005).

Além da DA, outros neurotransmissores como a serotonina, glutamato, GABA, opióides e noradrenalina exibem um importante efeito modulatório no circuito de recompensa e de comportamentos motivados (NESTLER e cols., 2001).

O eixo HPA também é alterado por drogas de abuso, podendo os hormônios liberados exercerem um efeito importante sobre os mecanismos envolvidos em diferentes fases da dependência (KALIVAS e cols., 1987; LAVICKY e cols., 1993).

Exposições a dietas ricas em gordura, em modelos animais, demonstraram alterações em vários neuropeptídeos como a galanina, encefalinas e orexinas cujo efeito é aumentar a ingestão alimentar, gerando um ciclo vicioso no comportamento alimentar. Em ratos alimentados com dietas baseadas em gordura, observa-se também a rápida resistência à leptina e à insulina, sugerindo que a ingestão de gordura provoca mudanças na homeostase corporal, em níveis neuroquímicos, mesmo após poucas exposições (LEIBOWITZ e cols., 2004).

Além do sistema de recompensa, os circuitos neurais relacionados à aprendizagem e à memória, principalmente aqueles relacionados à aprendizagem associativa, aos hábitos aprendidos e à memória declarativa (VANDERSCHUREN e EVERITT, 2005) também estão envolvidos nos processos da dependência. O efeito de drogas no sistema neural relacionado à memória sugere maneiras de como o estímulo neutro adquire propriedades reforçadoras. Novamente a participação da DA é importante, pois sabe-se que esse neurotransmissor está presente em situações que antecipam o reforço (advindos de drogas ou de reforçadores naturais; SCHULTZ, 2002). Estudos em roedores e em humanos demonstraram que, quando pareados com a droga (por meio de repetições), estímulos neutros geram aumento na liberação de DA principalmente no estriado dorsal e NAcc e se tornam estímulos condicionados (VOLKOW e cols. 2006)

Isso sugere que algumas perturbações neurobiológicas na dependência podem ocorrer em função de respostas condicionadas desencadeadas pela DA que conseqüentemente resultam em hábitos de consumo de drogas que levam a comportamentos compulsivos. É provável que essas respostas condicionadas envolvam adaptações em vias glutamatérgicas cortico-estriatal que regulam a liberação de DA (KALIVAS e cols, 2005). Assim, enquanto as drogas (assim como alimentos) podem, inicialmente, levar à liberação de DA no estriado ventral (recompensa de sinalização), com a administração repetida e com o desenvolver de

hábitos, parece haver uma mudança nos aumentos de DA que ocorrem no estriado dorsal.

Também, diferenças individuais na preferência por sacarose podem ser correlacionadas às variações individuais na autoadministração de anfetamínicos (DE SOUSA e cols., 2000). Em esquemas de consumo intermitente, ratos apresentaram um aumento da autoadministração de cocaína (PUHL e cols., 2011), maior efeito de sensitização por anfetamina (AVENA e HOEBEL, 2003a, 2003b) e sensitização cruzada avaliada por meio da hiperlocomoção induzida por psicoestimulantes (AVENA e HOEBEL, 2003a, 2003b; GOSNELL, 2005; SHALEV e cols., 2010). Uma alteração na sensibilidade por anfetamina também já foi demonstrada em ratos com dietas ricas em gordura testados no teste de preferência-condicionada-por-lugar (DAVIS e cols., 2008).

Assim, a farmacodependência apresenta várias similaridades com a dependência por alimentos, evidenciada, por exemplo, pela sobreposição: 1) do circuito neuroquímico ativado, em termos de localização, tipo de neurotransmissores, caracterização do receptor e mecanismos de transdução do sinal; 2) do recrutamento de estruturas e regiões neurais; e 3) da alteração no perfil fisiológico e de comportamentos motivados complexos (OLSEN, 2011). Existe também uma alta co-morbidade entre essas duas importantes formas de dependência (SWANSON e cols., 2011), especificamente para o álcool (WIEDERMAN e PRYOR, 1996) e para a cocaína (JONAS e cols., 1987). Além disso, em humanos, há uma correlação entre a preferência por drogas de abuso e alimentos ricos em açúcar (PELCHAT, 2002).

1.7 *Callithrix penicillata* COMO MODELO ANIMAL NO ESTUDO DA DEPENDÊNCIA

A maioria dos estudos para investigar o processo de dependência, seja por drogas seja por alimentos, utilizam roedores como modelo animal (CORWIN e BABBS, 2012; PUHL e cols., 2011). Experimentos com roedores são de suma importância e têm dado notáveis contribuições para o entendimento atual dos mecanismos neurais que subsidiam o processo de dependência. Apesar da importância de se pesquisar em roedores, estudos com primatas não-humanos têm sido empregados com maior frequência em abordagens neurofarmacológicas e

comportamentais, haja vista a maior complexidade do repertório comportamental de primatas se comparado com roedores (VALENTINUZZI e cols., 2008; CHABRAWI e BARROS, 2011; ARCE e cols., 2010; MELAMED e cols., 2013, MAIOR e cols., 2011).

O uso de primatas não-humanos favorece a generalização dos resultados para humanos pois os aspectos filogenéticos, a organização morfofuncional e os aspectos comportamentais e neuroquímicos são mais próximos dos humanos do que em qualquer outro modelo animal (MAIOR e cols., 2011; PIGGOTT e cols., 1999; WEERTS, FANTERGROSSI e GOODWIN, 2007).

Maior e cols (2011) exemplificam os benefícios ao destacar que para além de uma proximidade genética com humanos de cerca de 95% os primatas não-humanos apresentam uma complexa gama comportamental tanto em relação à organização social como para respostas quase idênticas as de humanos para drogas de abuso (p. ex.abstinência).

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 necessidades específicas 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, higiene, consanguinidade, exame periódico do estado de saúde, dentre outros (ANDRADE e cols., 2002).

A utilização de primatas do Novo Mundo, de pequeno a médio porte, é vantajosa, pois tem relativamente baixo custo de manutenção em cativeiros comparado com primatas de grande porte e ainda apresentam um bom índice de reprodução (TORRES e cols., 2010). Os calitriquídeos (*Callithrix penicillata* – mico estrela; Figura 2) têm se demonstrado como um ótimo sujeito experimental em investigações biomédicas, comportamentais e neuropsicofarmacológicas (BARROS e TOMAZ, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado similaridades entre humanos e indivíduos do gênero *Callithrix* em respostas psicossociais ao estresse, tais como separação mãe-infante (PRYCE e cols, 2004; 2005); separação do par heterossexual (JOHNSON e cols., 1996; NORCROSS e NEWMAN, 1999); mudanças ambientais; mudanças na alimentação e mudanças de parceiros de viveiro (FERRAZ e cols.,

2011). Além disso, exibem similaridades anátomo-funcionais de regiões do sistema nervoso, envolvidas na resposta ao estresse e a patologias relacionadas a ele (HONESS e MARIN, 2006). Sob essa perspectiva, Sousa e cols., (2002) demonstraram que mudanças no ambiente familiar (estresse físico) de indivíduos do gênero *Callithrix* podem desencadear respostas autonômicas e endócrinas ao estresse e modificar perfis comportamentais (MANSFIELD, 2003; GALVÃO-COELHO e cols., 2008; NORCROSS e NEWMAN, 1999; SOUSA e cols., 2002).

A literatura também relata que a espécie *Callithrix* responde bem a manipulações calóricas. Tardif e cols. (2009) analisaram variações relativas à prevalência de diabetes do tipo 2, enquanto Fong (2004) induziu obesidade e síndrome metabólica em calitriquídeos (*Callithrix jacchus*) a fim de analisar drogas anti-obesidade. No entanto o estudo sobre o comportamento alimentar patológico nessa espécie ainda é limitado.

Estudos também demonstraram com sucesso a utilização da espécie *Callithrix penicillata* em trabalhos que investigam as respostas fisiológicas e comportamentais a drogas de abuso e a diferentes fármacos (LIMA e cols., 2008; SILVA e cols., 2008; BARROS e cols., 2007; DE SOUZA SILVA e cols., 2006; MELLO e cols., 1997; BARROS e cols., 2003). Melamed e cols., (2013) mostraram que a administração repetida de cocaína (7mg/kg) em micos gera uma sensitização comportamental, observada por um aumento no comportamento de vigilância. Nessa mesma dose, Borges e cols., (2015) observaram um comportamento de CPP.

Em humanos, estudos sobre a dieta são susceptíveis ao erro em razão de imprecisões dos relatos sobre a alimentação; com primatas não-humanos, há a possibilidade de um controle preciso da ingestão alimentar, tal qual em roedores. Diferentemente de roedores, no entanto, primatas não-humanos apresentam uma gama de comportamentos e diversidade alimentar que se assemelha à condição humana (BICA-MARQUES, 2000).

Até o momento não há modelos animais de compulsão alimentar em primatas não-humanos de pequeno porte. Com base no mencionado acima, desenvolver um modelo animal para o estudo do comportamento compulsivo em animais que possuem maior similaridade com humanos pode trazer novos entendimentos a cerca dessa patologia e propiciar nova abordagem para um tratamento eficaz.



Figura 3: indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (mico-estrela) mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (esquerda) e de vida livre (direita).

2 RELEVÂNCIA E ORIGINALIDADE DO ESTUDO

Nas últimas décadas, o interesse nas pesquisas voltadas a comportamentos compulsivos aumentou. Trata-se de reflexo de novas facetas da dependência: jogos, comida, internet, exercícios físicos, compras etc. Enquanto dependência foi tradicionalmente entendida como dependência química (álcool, cocaína, nicotina), os estudos apontam para uma visão mais holística desse fenômeno. O presente estudo, portanto, pretendeu analisar um desses comportamentos, a compulsão alimentar e sua relação com dependência a drogas de abuso.

O foco nesse assunto advém, primeiramente, dos crescentes índices mundiais de obesidade, condição que chega a afetar aproximadamente 500 milhões de indivíduos em todo o mundo de acordo com Organização Mundial da Saúde (2011). No Brasil, metade da população adulta está com sobrepeso e aproximadamente 12% dos homens e 17% das mulheres são obesos (IBGE, 2010).

A dificuldade de estratégias terapêuticas eficientes para combater esses distúrbios também aumenta o interesse no aprofundamento dos estudos. Muitos dos fármacos disponíveis para o tratamento não só da obesidade, mas da bulimia nervosa e da anorexia não são muito eficazes, e a taxa de recaída comportamental

é alta. Existe também uma forte correlação entre os distúrbios alimentares com outras psicopatologias, a exemplo da ansiedade, depressão e da farmacodependência, o que indica a necessidade de estudo interdisciplinar desses distúrbios. Assim, na tentativa de explicar a neurobiologia desses comportamentos patológicos que até o momento estão apenas parcialmente elucidados, pesquisadores vêm apresentando resultados nas últimas décadas que apontam particularmente para a similaridade entre a dependência química e a dependência por alimentos, expressa como compulsão.

Dessa forma, o estudo sobre as bases neurais da compulsão alimentar é muito relevante, haja vista sua similaridade com outras formas de dependência e com outras co-morbidades. Atualmente já se sabe que muitos dos mecanismos fisiológicos e comportamentais que medeiam a compulsão alimentar são semelhantes àqueles responsáveis pela dependência química (VOLKOW e WISE, 2005).

Modelos animais podem ajudar no estudo da dependência e de comportamentos compulsivos. A maior parte dos estudos em animais é realizada em roedores, o que dificulta, em alguns casos, sua transposição direta para comportamentos patológicos humanos.

Nesse sentido, dados importantes poderão ser obtidos em primatas não-humanos, considerando a grande similaridade entre esses animais e humanos em termos da diversidade da dieta, da sociabilidade, do ciclo circadiano e de aspectos filogenéticos, como a organização morfofuncional (WEERTS e cols., 2007). Essas similaridades contribuem para que modelos com primatas não-humanos sejam mais fidedignos e representativos do comportamento humano.

Além das similaridades comportamentais, várias espécies de primatas têm sido utilizadas como a etapa final de ensaios pré-clínicos no estabelecimento da segurança e eficácia de novos tratamentos farmacológicos (p. ex., KING e cols., 1998). Ademais, tem-se uma melhor previsibilidade farmacocinética em símios do que em roedores (WARD e SMITH, 2004). Existe também uma diferença significativa na densidade e distribuição de receptores em regiões cerebrais relacionadas à dependência (por drogas e possivelmente por alimentos) entre roedores e primatas não-humanos (p.ex., LIDOW, 1989). Estudos de longo prazo e comparações intra-individuais são possíveis em várias espécies de primatas devido

à longevidade dessas espécies (WEERTS e cols., 2007) e podem contribuir para mimetizar as condições dos seres humanos.

O presente estudo pretende fornecer uma contribuição inédita para elucidação do comportamento alimentar, por meio: 1) do desenvolvimento de uma nova abordagem experimental para o estudo dos mecanismos neuropsicobiológicos da compulsão alimentar em uma espécie de primata neotropical amplamente empregada em estudos biomédicos; e 2) da determinação de uma possível correlação entre o consumo de alimentos comerciais hipercalóricos com a resposta comportamental à psicoestimulantes.

3 HIPÓTESES

Com base no exposto acima, o presente estudo tem como hipóteses:

O acesso intermitente a alimentos altamente calóricos e palatáveis é capaz de induzir o desenvolvimento de um comportamento do tipo compulsivo em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*);

Animais que são pré-expostos a alimentos altamente calóricos e palatáveis e que desenvolvem um comportamento do tipo compulsivo por tais alimentos, demonstram uma resposta comportamental diferente à cocaína, comparado a animais nunca expostos a essa dieta.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um teste para estabelecer e avaliar comportamento compulsivo em primatas não-humanos com base no protocolo de acesso intermitente, utilizando alimentos altamente palatáveis e estabelecer uma relação entre alimentos ricos em açúcar e gordura e drogas de abuso.

Especificamente, o trabalho se propôs a:

Induzir uma resposta de compulsão alimentar em micos-estrela adultos (*Callithrix penicillata*) por meio do protocolo de acesso restrito e intermitente a alimentos ricos em açúcar e gordura;

Verificar o efeito de um estresse agudo no comportamento alimentar de micos-estrela pré-expostos ao protocolo de acesso intermitente;

Determinar se o acesso intermitente e crônico a alimentos ricos em açúcar e gordura influencia, posteriormente, o desenvolvimento do comportamento de hipervigilância induzido pela administração sistêmica e repetida de cocaína nos micos-estrela;

Avaliar se a pré-exposição a alimentos ricos em açúcar e gordura influencia, posteriormente, a aquisição de um comportamento de preferência-por-lugar condicionado a administração de cocaína;

Estabelecer se animais que são propensos a apresentar comportamentos de hiperfagia também são propensos a desenvolver comportamentos de dependência por cocaína.

5 MATERIAIS E MÉTODOS: ASPECTOS GERAIS

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 (UnBdoc nº: 2468/2013, Anexo I). Todos os preceitos éticos estipulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal foram observados. Após o encerramento do estudo, os animais utilizados permaneceram no plantel permanente do Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CP/UnB). O CP/UnB 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

Foram utilizados sujeitos adultos (>18 meses), machos e fêmeas, da espécie mico-estrela (*Callithrix penicillata*), com massa corporal acima de 250g. Os animais foram mantidos no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília (CP-UnB). O CP-UnB localiza-se na Fazenda Água Limpa da UnB, área de preservação ambiental, circundada por mata de galeria, que permite a manutenção dos animais sob condições naturais de temperatura, luminosidade e umidade. Os sujeitos que participaram desse estudo já faziam parte do plantel no CP-UnB.

Os animais foram alojados aos pares em viveiros padrão para calitriquídeos (1 m de largura, 2 m de profundidade e 2 m de altura). A disposição dos viveiros permite o contato acústico e olfativo entre os animais, porém restringe o contato visual entre eles. A alimentação/dieta regular foi fornecida uma vez ao dia, às 07:00 h, e o remanescente retirado do viveiro às 17:00 h. A dieta regular consistiu em frutas, legumes, verduras, sementes/nozes e proteína (ovos cozidos, grilos, tenébrions, peito de frango cozido). Água e ração seca estavam disponíveis *ad libitum*, exceto quando mencionado.

As condições descritas acima seguiram as normas e regulamentos do IBAMA e foram respeitadas em todos os estudos. A massa corporal dos animais foi aferida

semanalmente e houve acompanhamento permanente por médicos veterinários durante a realização do projeto.

5.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho foi dividido em três estudos. Cada um deles será apresentado individualmente:

Estudo 1: Efeito do acesso intermitente à bala de banana no comportamento alimentar de micos estrelas (*Callithrix penicillata*);

Estudo 2: Efeito do acesso intermitente à dieta de cafeteria em comportamentos induzidos pela cocaína;

Estudo 3: Efeito da pré-exposição à dieta de cafeteria na aquisição de um comportamento de preferência-por-lugar condicionado à cocaína (CPP).

6 ESTUDO 1. EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE À BALA DE BANANA NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE MICOS-ESTRELA (*CALLITHRIX PENICILLATA*)

O objetivo desse primeiro estudo foi desenvolver um modelo animal de comportamento alimentar compulsivo, com base no protocolo de acesso intermitente (proposto por Cowin e Wojnick, 2004) e verificar o efeito do estresse agudo no comportamento alimentar de micos-estrela pré-expostos ao protocolo de acesso intermitente.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Sujeitos e Condições de Alojamento

Doze sujeitos foram utilizados no presente experimento, seis machos e seis fêmeas. A condição de alojamento está detalhada no item 5.2.

6.1.2 Aparato Experimental

O aparato experimental utilizado foi denominado de caixa de alimentação (caixa AL), que consistiu em uma arena quadrada de livre circulação (60 cm de largura x 60 cm de profundidade x 40 cm de altura), suspensa a 1 m do solo (Figura 4). O piso e três paredes eram de chapa de alumínio, enquanto o teto e a quarta parede, de vidro transparente. Uma porta tipo-guilhotina dava acesso ao aparato, localizada na parede oposta à de vidro. A caixa AL foi pintada de branco e dividida (virtualmente) em três (zonas) sendo duas de iguais dimensões (30 x 30 x 40 cm) e uma medindo (60 x 30 x 40 cm), para fins de análises comportamentais (vide abaixo). Em cantos opostos do chão, fixados próximos à parede de vidro e com a mesma distância para a porta de entrada, foram colocados suportes para pratos de aço inox, onde o alimento foi disponibilizado durante as sessões experimentais.

A zona da bala foi considerada como aquela em que esse alimento foi disponibilizado (25% da área de circulação), enquanto a zona da fruta foi aquela em que a dieta regular foi oferecida (25% da área de circulação). A zona neutra compreendeu o restante do espaço da caixa AL (50% da área de circulação). Para melhor ilustrar vide fotografia da caixa AL na Figura 4.

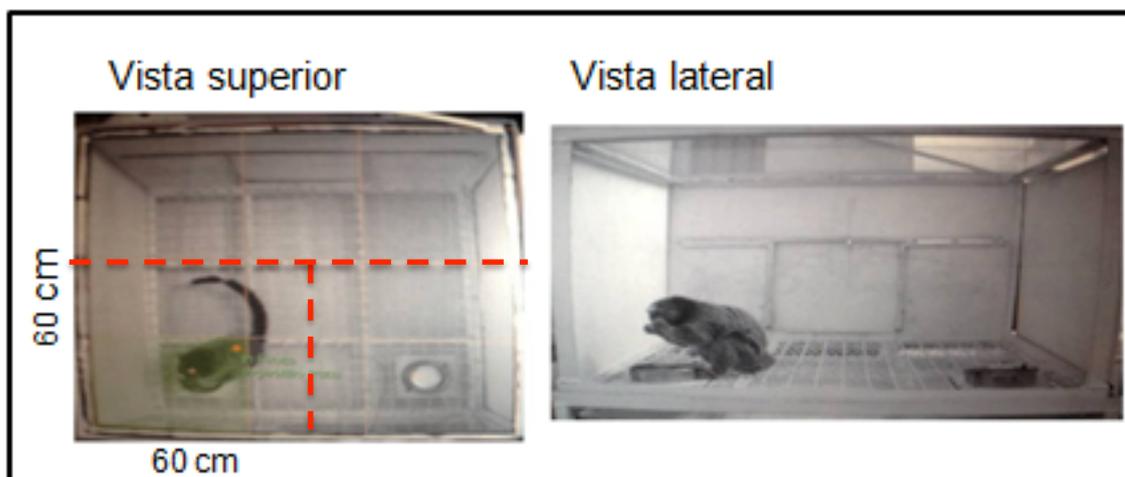


Figura 4: Fotografia da caixa de alimentação (AL) nas vistas superior (esquerda) e frontal/lateral (direita), contendo um mico-estrela e demonstrando o posicionamento dos pratos de alimentação. O aparato foi dividido virtualmente em 3 zonas (pontilhado vermelho): zona da bala correspondeu ao espaço no qual o recipiente contendo bala de banana fora posicionado; zona da fruta espaço no qual o recipiente contendo fruta fora posicionado, cada uma dessas zonas correspondia 25% da área total da caixa AL. A zona neutra correspondeu à 50% da caixa AL, e nela não continha pratos de alimentação.

Para esse estudo foram utilizadas duas caixas AL idênticas, o que permitiu que dois animais fossem testados simultaneamente. Os aparatos foram instalados em uma sala de experimento, situada a 50 m dos viveiros de moradia dos animais. Duas lâmpadas de 100 W, em paredes opostas, serviram de fonte de iluminação da sala de experimento. A observação e o registro das sessões foram realizados via circuito interno de filmagem, composto por duas câmeras digitais (Fire-i, Unibrain, EUA). Uma câmera foi instalada a aproximadamente 1 m acima do aparato (vista superior) e a outra a 1 m de distância da parede de vidro do aparato (vista frontal). As câmeras foram conectadas diretamente a um computador portátil (*laptop*), localizado em uma sala de observação adjacente à sala de experimento. Da sala de observação as sessões foram acompanhadas e registradas.

6.1.3 Alimento teste

Para induzir um comportamento alimentar compulsivo, utilizam-se alimentos opcionais, que, dependendo do protocolo variam em sua composição. Originalmente, o protocolo de acesso intermitente utiliza gordura vegetal. Há também estudos que testaram misturas de gordura e açúcar em baixas concentrações. Como os sujeitos do presente estudo estão habituados a uma dieta variada, optou-se por oferecer a eles bala de banana (vendidas comercialmente;

3,3kcal/g; carboidrato 16g, ÍNDIA®), cortadas em pequenos pedaços para facilitar o seu manuseio pelo animal. A concentração de açúcar era de 75%. Também foram utilizadas frutas variadas (de acordo com as frutas oferecidas no dia do respectivo teste, tais como banana, maçã, mamão, melão, manga) cortadas em pequenos pedaços. Os alimentos foram disponibilizados em pratos de aço inoxidáveis (8 cm X 9,5 cm altura e diâmetro). dispostas em um dos dois recipientes que foi acoplado no interior da caixa AL.

6.1.4 Procedimento

Em todas as sessões, os sujeitos foram capturados com o auxílio de um puçá e transportados de seus viveiros de moradia, por meio de caixas de transporte (35 cm largura x 20 cm de profundidade x 23 cm de altura cada), até a sala de experimento e, após a sessão, retornados ao viveiro moradia. As caixas de transporte não permitiram que o sujeito visualizasse o ambiente e esta possuía uma porta tipo-guilhotina que se acoplava diretamente à porta de entrada/saída do aparato. Em todas as sessões do experimento a técnica de captura acima descrita foi a mesma e todas as sessões foram realizadas na caixa AL. Os procedimentos a seguir foram divididos em cinco fases.

6.1.4.1 Fase 1: Habituação ao Aparato

Foram realizadas quatro sessões de habituação ao aparato, com o objetivo de habituar os sujeitos ao procedimento de captura, transporte e ao novo ambiente. Cada sessão teve duração de 15 min e foram realizadas em intervalos de 48 h. Durante essas sessões, o sujeito teve livre acesso à caixa AL, porém nenhum alimento foi disponibilizado. A ordem dos sujeitos foi estabelecida randomicamente em cada dia de teste; todas as sessões dessa fase foram registradas para análises comportamentais.

6.1.4.2 Fase 2: Seleção de Grupos

Essa fase teve por objetivo estabelecer grupos homogêneos entre si. Foram realizadas três sessões de 15 min cada, em intervalos de 24 h, na presença do alimento teste (bala de banana), a fim de identificar o perfil inicial de consumo de balas de cada sujeito. A seleção de grupo baseou-se em dois critérios: (1) a quantidade média de bala consumida nas três sessões e (2) a massa corporal aferida na última sessão.

Nas três sessões, todos os sujeitos receberam 50 g de balas nos dois recipientes fixados na caixa AL. Nessa fase, o comportamento não foi registrado para análises comportamentais, pois o objetivo era apenas analisar a quantidade de alimento ingerido.

A quantidade (em gramas) de bala consumida em cada sessão foi calculada ao subtrair a quantidade remanescente da quantidade inicialmente fornecida. Todos os pedaços de bala que foram retirados do recipiente, manipulados pelo animal, mas não consumidos foram adicionados ao peso final do recipiente. Dois grupos foram estabelecidos de modo a não haver diferença estatística em termos dos dois critérios descritos acima.

6.1.4.3 Fase 3: Acesso Intermitente à Bala de Banana

Durante quatro semanas consecutivas, os sujeitos foram submetidos a uma sessão diária de 15 min, na caixa AL, com o objetivo de verificar se, ao fim desse período, os animais apresentavam um comportamento do tipo compulsivo. Cada grupo teve diferentes graus de restrição ao alimento teste, sendo eles:

Grupo HR (High Restriction) – alta restrição à bala de banana: o grupo teve acesso à bala por 15 min, apenas três dias por semana (em dias estabelecidos de forma aleatória). Nos dias de acesso à bala (operacionalmente denominado *binge day*), foram disponibilizadas em um dos pratos 50g de bala e no outro 50g de frutas variadas. Nos demais dias da semana (operacionalmente denominado *non-binge days*), apenas frutas foram oferecidas em um dos pratos, permanecendo vazio o

prato correspondente à bala. Para um mesmo sujeito, o local onde foi colocado a bala e a dieta regular (esquerda/direita) permaneceu o mesmo durante todo o procedimento, mas variou entre os sujeitos de modo que metade recebeu a bala no lado direito e a outra, no lado esquerdo;

Grupo LR (Low Restriction) – baixa restrição à bala: o grupo teve acesso ao alimento teste por 15 min, todos dias da semana. Foram disponibilizadas em um dos pratos 50g de bala e no outro 50g de frutas. Para um mesmo sujeito, o local onde foi oferecida a bala e a dieta regular (esquerdo/direito) permaneceu o mesmo durante todo o procedimento, mas variou entre os sujeitos de modo que metade do grupo recebeu a bala no lado direito e a outra, no lado esquerdo.

Durante cada sessão, o mico teve acesso a todo o aparato, sendo disponibilizada a bala e/ou dieta regular no seu interior, de acordo com o esquema alimentar descrito acima. A quantidade consumida (em gramas) de cada alimento foi registrada diariamente. Cada sujeito teve seu comportamento registrado duas vezes por semana, em *'binge days'*. Foram adotados os critérios estabelecidos por Corwin e colaboradores (2011), para determinar o desenvolvimento do comportamento do tipo compulsivo, ou seja: (1) quando os animais do grupo HR ingerem, significativamente, mais balas do que o grupo LR, no mesmo período de tempo; e/ou (2) quando houver um escalonamento na ingestão de balas ao longo das semanas no grupo HR. Passado esse período de quatro semanas, os animais foram submetidos a dois diferentes testes de estresse.

6.1.4.4 Fase 4: Teste de Privação Alimentar

O objetivo desse teste foi analisar se, após 24h de privação de alimentos, o comportamento alimentar dos sujeitos que foram pré-expostos à bala de banana se modificaria.

Ao se concluir a fase anterior, os animais foram testados sem a presença de alimentos (*non-binge day*) e ao saírem do teste foram privados de alimentos por 24h. Após esse período, os animais foram testados na mesma ordem do dia anterior a fim de garantir o mesmo período de privação. Uma única sessão teste na presença de fruta e bala de banana (ou seja, um *'binge day'*) foi realizada e tanto o

comportamento alimentar quanto o consumo de bala e fruta foram registrado para análise.

6.1.4.5 Fase 5: Teste de Confronto com Predador

Primatas humanos são uma fonte valiosa para o estudo de distúrbios psiquiátricos como por exemplo a ansiedade, devido, principalmente à semelhanças com os seres humanos, tanto nas respostas fisiológicas quanto no comportamento (NEWMAN e FARLEY, 1995). Testes que utilizam-se de choques elétricos e estímulos aversivos são utilizados como geradores de medo/ansiedade em modelos animais. No entanto, é interessante tentar mimetizar estímulos naturais que geram ansiedade para a espécie em estudo, na tentativa de induzir comportamentos naturais de medo/ansiedade (FILE, 1980). O teste de confronto predador mimetiza situações vividas pelos animais na sua condição natural e gera sintomas de ansiedade. Em primatas não-humanos, a vigilância a atividade locomotora são medidas confiáveis para inferir medo/ansiedade foram superiores às taxas basais, quando o animal é exposto a situações aversivas (CAINE, 1998). Barros e cols., (2000) desenvolveram um teste de confronto com predador para testar ansiedade em calitriquídeos e utilizaram como estímulo um gato empalhado ou uma serpente artificial. Em seus experimentos, foram observados aumentos das taxas de vigilância e locomoção sugerindo aumento dos níveis de ansiedade. (revisado em BARROS e cols., 2000).

O teste de confronto com o predador teve como objetivo avaliar possíveis modificações no comportamento alimentar de animais que foram pré-expostos bala de banana quando submetidos a um fator de estresse, como o confronto com um predador natural (modelo de serpente).

O teste de confronto com o predador ocorreu 48h após o teste de privação alimentar. Entre um teste e outro os animais foram submetidos a uma sessão de *non-binge*. O animal foi capturado, transportado até a sala de experimento e posicionado dentro de uma caixa AL (posicionada no lado direito da sala; vide ilustração gráfica em figura 4). Essa caixa permaneceu sem nenhum alimento. Uma serpente artificial foi posicionada no lado de fora da caixa AL, a um metro do chão em frente à parede de vidro, de modo a possibilitar o contato visual do mico com

esse estímulo aversivo. O sujeito permaneceu na caixa AL por 5 min e logo em seguida foi transferido (via caixa de transporte) para a segunda caixa AL. A serpente foi removida do campo visual do animal e uma sessão teste, na presença de alimento, foi iniciada. O animal permaneceu na caixa por 15 min na presença de bala e fruta, e o consumo e o comportamento foram registrados e analisados. Comparou-se o consumo alimentar, a frequência e duração do forrageio, bem como vigilância e distancia percorrida na semana 4 com os mesmos parâmetros no teste de confronto com o predador. Para melhor ilustrar o delineamento experimental, *vide* apêndice A com a representação esquemática do Estudo 1 (Apêndice 1).

6.2 ANÁLISE DE DADOS

Os comportamentos apresentados nas fase de habituação, de indução do comportamento alimentar compulsivo e os testes de estresse foram registrados para análises comportamentais. Durante a fase de indução do comportamento alimentar compulsivo, cada sujeito teve duas sessões registradas a cada semana. Para cada parâmetro comportamental, foi calculada a média das duas sessões de cada sujeito, obtendo-se uma média semanal.

Em todas as fases, os comportamentos registrados foram gravados no programa de análises comportamentais Any-Maze (Stoelting Co., EUA) e analisados por um observador previamente treinado (confiabilidade intra-observador de 95%). As variáveis analisadas e computadas de forma automática pelo programa foram: (1) *locomoção*: distância total percorrida; (2) *uso do espaço*: tempo de permanência em cada uma das três zonas da caixa AL. As variáveis computadas manualmente pelo observador foram: (1) *vigilância*: duração dos movimentos de varredura da cabeça enquanto o animal permaneceu parado; (2) *exploração*: frequência dos comportamentos cheirar, morder e/ou lambe qualquer parte do aparato experimental; (3) *forrageio*: duração e frequência de procura ativa, manuseio e mastigação do alimento.

O consumo de alimento foi analisado via médias semanais (segunda – domingo). Para ambos os grupos, a análise do consumo baseou-se no cálculo da média obtida em *binge days* do grupo HR. Portanto, considerando que o grupo HR recebeu dieta regular + balas em apenas três dias da semana, a média semanal foi

calculada com base nesses três dias. Para o grupo LR, foram utilizados os mesmos três dias correspondentes para efetuar a média semanal.

O comportamento e o consumo de alimentos foram expressos como a média e o erro padrão da média (EPM). Os parâmetros comportamentais observados na habituação foram comparados à primeira e à última sessão (H1 e H4) via teste-t para amostras pareadas. Para selecionar grupos homogêneos, o consumo médio de balas dos três dias consecutivos e o peso corporal foram analisados por meio do teste-t para amostras pareadas. Os grupos foram considerados homogêneos quando $p > 0,05$ para as duas variáveis.

Os dados obtidos, em cada categoria, foram analisados para possíveis diferenças estatísticas entre os grupos e ao longo das diferentes sessões/semanas empregando uma análise de variância de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*), sendo 'grupo' o fator independente e 'sessão' o de amostras repetidas. Quando obtido resultados significativos, os dados foram analisados *post hoc* com o teste de Tukey. Além disso, utilizou-se o teste de correlação de Pearson para avaliar possíveis relações entre o consumo de bala na fase de seleção de grupos com o consumo nas semanas 1 e 4 de protocolo. 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 $p = 0,05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Fase 1: Habituação ao Aparato

Os micos-estrela expostos repetidamente à caixa AL demonstraram uma diminuição significativa na distância total percorrida dentro do aparato ($t_{11}=3,67$; $p=0,004$), no tempo que permaneceram vigilantes ($t_{11}=3,47$; $p=0,005$) e na frequência com que exploraram o aparato ($t_{11}=4,79$; $p=0,001$), quando a primeira exposição foi comparada a última (H1 x H4; Tabela 1).

Tabela 1: Resposta comportamental de micos durante a fase de habituação à caixa de alimentação.

| Parâmetro | Sessão de habituação | |
|--------------------------|----------------------|---------|
| | H1 | H4 |
| Distância percorrida (m) | 35±5 | 17±2* |
| Vigilância (s) | 288±40 | 158±15* |
| Exploração do aparato | 23±3 | 12±2* |

H1=primeira sessão de habituação; H4=última sessão de habituação à caixa de alimentação. * $p<0,05$ H4 vs. H1.

6.3.2 Fase 2: Seleção de Grupos

Após a habituação, todos os sujeitos foram submetidos à fase de seleção de grupos, na qual receberam bala de banana na caixa de alimentação por 15 min em 3 dias consecutivos. A quantidade consumida em cada sessão foi registrada e, com base no consumo médio dos três dias e do peso corporal registado no início dessa fase, dois grupos homogêneos (três fêmeas e três machos em cada) foram formados (consumo médio de balas: $t_{11}= -0,27$; $p=0,99$) e massa corporal inicial (LR: $340\pm 14g$ e HR: $335\pm 23g$; $t_{11}=0,17$; $p=0,86$).

6.3.3 Fase 3: Acesso intermitente à Bala de Banana

Não foram encontradas diferenças significativas no consumo de bala e fruta entre as semanas (bala: $F_{4,40}=0,83$; $p=0,50$; fruta: $F_{3,30}=2,90$; $p=0,51$), nem entre os grupos LR e HR (bala: $F_{1,10}=0,49$; $p=0,49$; fruta: $F_{1,10}=0,47$; $p=0,50$) e tampouco interações significativas entre grupos vs. semanas (bala: $F_{4,40}=1,04$; $p=0,38$; fruta: $F_{3,30}= 0,21$; $p=0,80$; Tabela 2). A massa corporal dos sujeitos não sofreu variações significativas entre os grupos ($F_{1,11}=0,000$; $p=0,99$) nem entre as semanas

($F_{4,11}=2,21$; $p=0,15$) nem interação grupos vs semanas ($F_{4,11}=0,89$; $p=0,40$; Tabela 2).

Tabela 2: Consumo alimentar semanal dos grupos HR e LR.

| Grupo | Alimento | SG | S1 | S2 | S3 | S4 |
|-------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| LR | Bala | 4±1 | 3±1 | 3±1 | 3±1 | 4±1 |
| | Fruta | N.O | 1±0 | 2±1 | 1±0 | 2±0 |
| HR | Bala | 4±1 | 5±2 | 4±1 | 5±1 | 4±1 |
| | Fruta | N.O | 1±0 | 2±0 | 2±0 | 2±1 |

LR=*low restriction*; HR=*high restriction*; SG= seleção de grupos; S1-S4= semanas de experimento) N.O= alimento não oferecido. Dados apresentados em gramas (média± EPM)

No entanto, foi encontrada uma correlação positiva significativa entre o consumo médio de balas na fase de seleção de grupos com o consumo médio de balas na semana 1 ($r=0,84$; $p<0,001$) e na semana 4 ($r=0,62$; $p=0,03$; Figura 5).

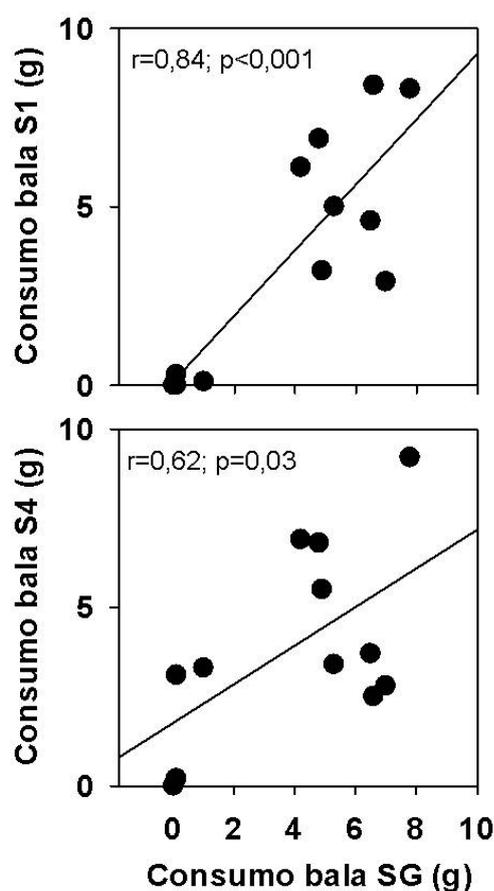


Figura 5: Correlação entre o consumo de bala (em gramas) na fase de seleção de grupos com o consumo médio de balas (em gramas) nas semanas 1 e 4 (S1-S4); $n=12$.

Como nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os dois grupos (LR vs. HR) em termos de consumo dos alimentos, os dados foram agrupados e reanalisados por gênero (Figura 6).

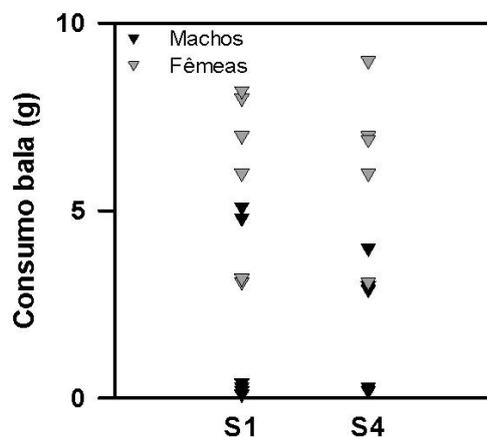


Figura 6: Consumo individual de bala (em gramas) por machos e fêmeas na primeira e na última semana do estudo (S1-S4); n=6/gênero.

6.3.3.1 Machos *versus* Fêmeas

Em vista do perfil diferenciado entre os gêneros evidenciado acima (Figura 6), todas as análises a seguir compararam machos vs. fêmeas, em vez dos grupos LR vs. HR. Dessa maneira, entre os gêneros (Figura 7), foram encontradas diferenças significativas em termos do consumo de bala ($F_{1,10}=15,4$; $p=0,003$) e da duração ($F_{1,10}=11,9$; $p=0,006$) e da frequência do forrageio por bala ($F_{1,10}=11,7$; $p=0,006$). Mas para esses parâmetros, não houve um efeito significativo ao longo das semanas do estudo (*Consumo*: $F_{3,30}=1,21$; $p=0,31$; *Tempo forrageio*: $F_{3,30}=0,04$; $p=0,91$; *Frequência forrageio*: $F_{3,30}=1,80$; $p=0,19$) ou uma interação entre os fatores gênero vs. semana (*Consumo*: $F_{3,30}=0,17$; $p=0,84$; *Tempo forrageio*: $F_{3,30}=0,39$; $p=0,62$; *Frequência forrageio*: $F_{3,30}=0,41$; $p=0,08$).

Por outro lado, o consumo da fruta não apresentou diferenças significativas (*Consumo* – fator gênero: $F_{1,10}=0,07$; $p=0,79$; fator semana $F_{3,30}= 2,96$; $p=0,78$; interação gênero vs. semana: $F_{3,30}= 0,43$; $p=0,64$; *Tempo forrageio* – fator gênero: $F_{1,10}= 1,47$; $p=0,25$; fator semana: $F_{3,40}= 1,91$; $p=0,19$; interação gênero vs. semana: $F_{3,30}=1,15$; $p=0,31$; *Frequência forrageio* – fator gênero: $F_{1,10}=0,69$; $p=0,42$; fator

semanas: $F_{3,30}=2,85$; $p=0,09$; interação gênero vs. semana: $F_{3,30}=1,04$; $p=0,35$; Figura 7).

O tempo de permanência nas zonas da bala e da fruta não diferiu significativamente entre gêneros (zona bala: $F_{1,10}=3,03$; $p=0,11$; zona fruta $F_{1,10}=0,24$; $p=0,63$), entre semanas (zona bala: $F_{4,40}=2,21$; $p=0,12$; zona fruta: $F_{4,40}=1,18$; $p=0,21$), tampouco apresentou interação significativa entre gênero vs. semanas (zona bala: $F_{4,40}=0,23$; $p=0,81$; zona fruta: $F_{4,40}=0,85$; $p=0,43$; Figura 7).

O comportamento de vigilância foi analisado comparando-se o tempo observado na última sessão de habituação (H4) com o tempo médio semanal (S1 à S4) entre machos e fêmeas. Foi encontrada diferença significativa entre as semanas sendo que nas semanas 3 e 4 a vigikância foi menor do que na habituação (H4; $F_{4,40}=3,67$; $p=0,03$; fator gênero: $F_{1,10}=0,13$; $p=0,72$; interação semanas vs. gênero: $F_{4,40}=1,58$; $p=0,22$; Figura 8). A atividade locomotora, analisada por meio da distância total percorrida durante a sessão, não apresentou diferença significativa em nenhum parâmetro (fator gênero: $F_{1,10}=2,34$; $p=0,15$; fator semana: $F_{4,40}=2,09$; $p=0,11$; interação semanas vs gêneros: $F_{4,40}=1,97$; $p=0,13$; Figura 8). Por fim, não houve diferença significativa entre gêneros para o peso corporal ($F_{1,11}=0,93$; $p=0,35$), semanas ($F_{4,11}=2,40$; $p=0,127$) e interação entre gênero vs. semanas ($F_{4,11}=0,59$; $p=0,53$).

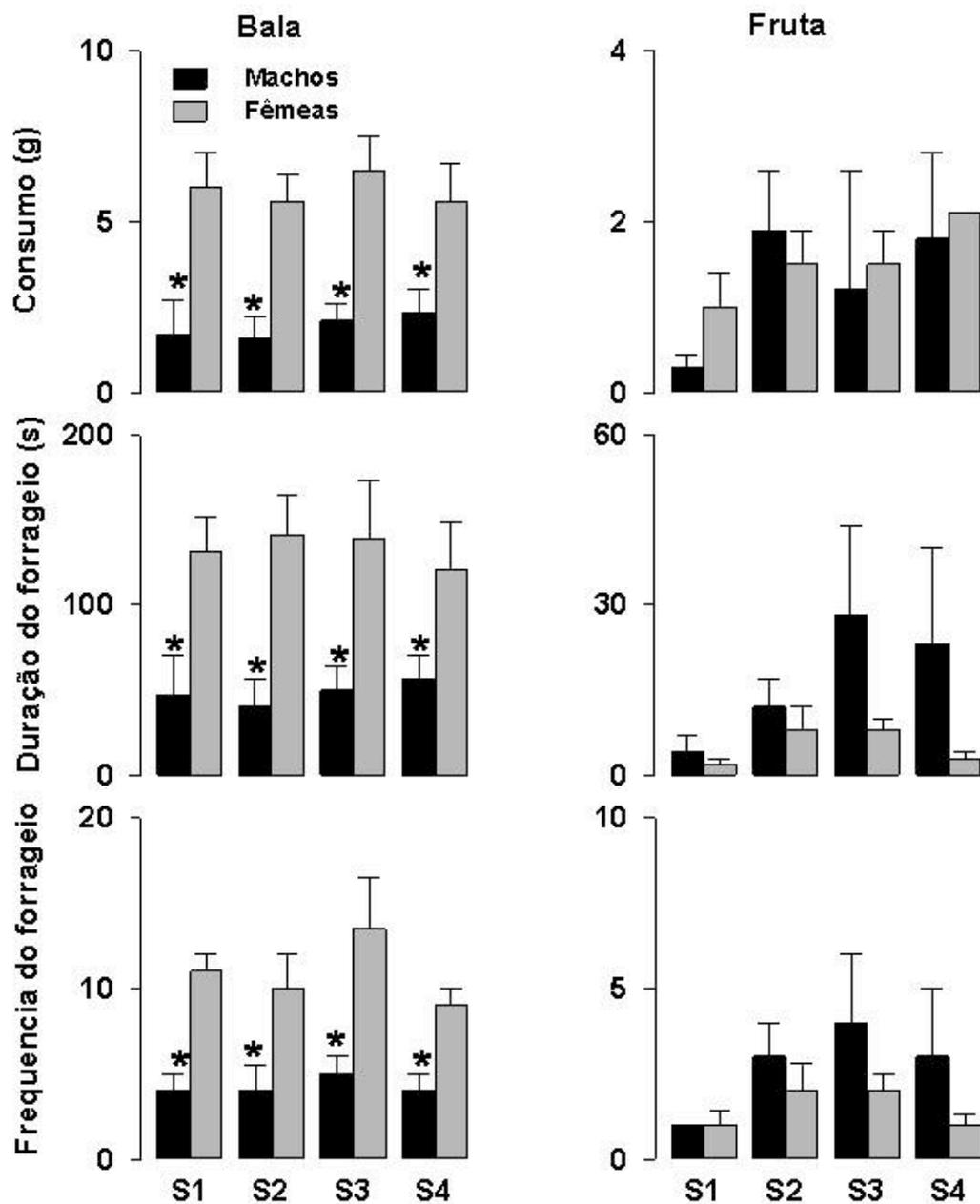


Figura 7: Consumo semanal de bala e fruta (em gramas; média+EPM), duração média do forrageio (em segundos) de bala e fruta e frequência de ingestão de bala e fruta nas semanas 1 à 4 (S1-S4) nos machos e fêmeas de micos-estrelas (n=6/grupo). *p<0,05 machos vs. fêmeas.

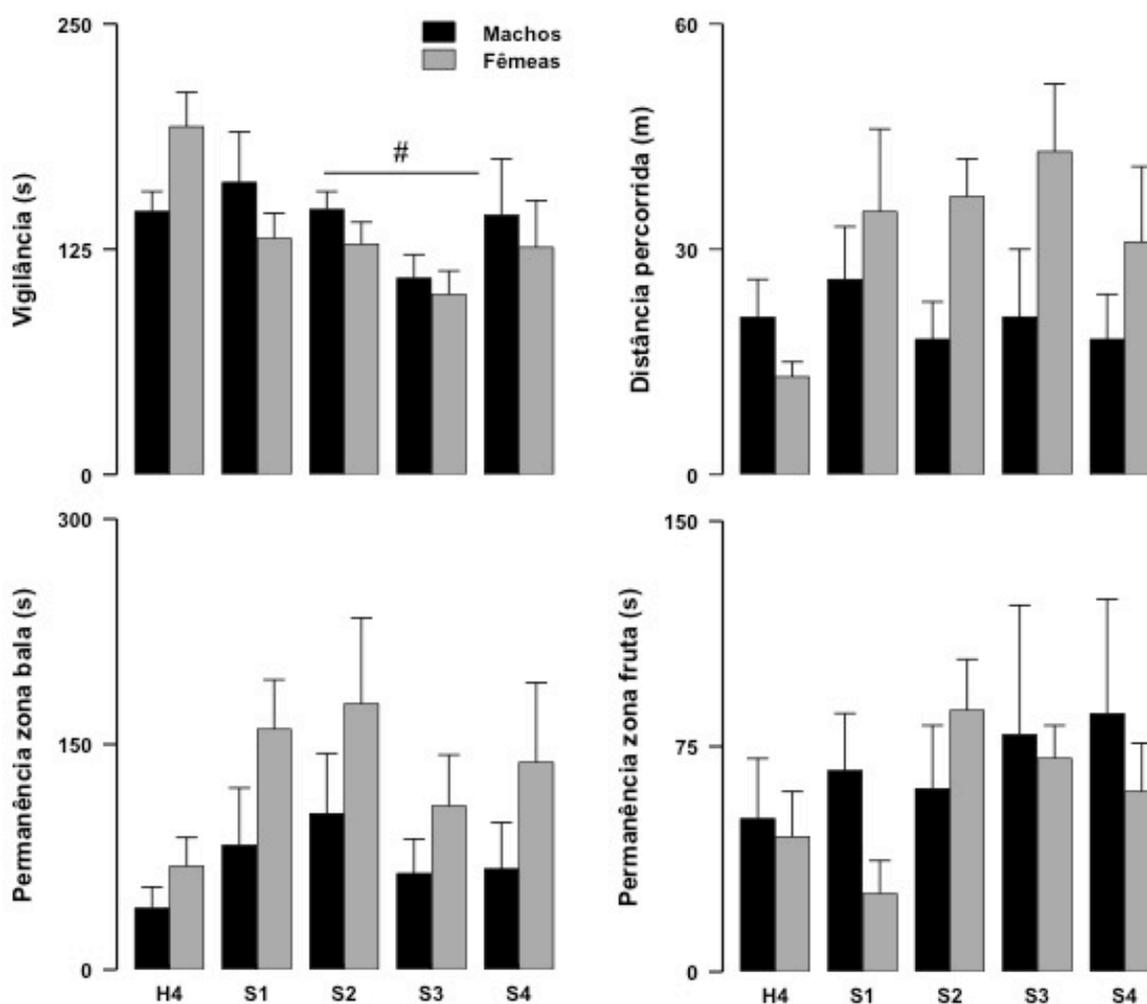


Figura 8: Duração da vigilância (em segundos; média \pm EPM), distância total percorrida (em metros; média \pm EPM) e o tempo de permanência nas zonas bala e fruta (em segundos; média \pm EPM) na última sessão de habituação (H4) e nas semanas 1 à 4 (S1-S4) de acesso intermitente à bala de banana por micos estrelas machos e fêmeas ($n=6/\text{gênero}$). # $p<0,05$ S2 e S3 vs. H4

Após esse período, os animais foram submetidos a dois diferentes testes de estresse com 48h de intervalos, sendo eles:

6.3.4 Fase 4: Teste de Privação Alimentar

Foram encontradas diferenças significativas em termos do consumo de bala ($F_{1,10}=7,74$; $p=0,01$), sendo que as fêmeas consumiram mais balas que os machos.

No entanto, não houve diferença entre as sessões ($F_{1,10}=3,82$; $p=0,07$), tampouco houve interação entre gênero vs. sessões ($F_{1,10}=0,02$; $p=0,88$). O consumo da fruta aumentou significativamente quando comparado à quantidade ingerida antes e após 24h de privação ($F_{1,10}=16,96$; $p=0,002$), mas não houve diferenças entre machos e

fêmeas ($F_{1,10}=0,41$; $p=0,53$) ou interação gênero vs. sessão ($F_{1,10}=0,09$; $p=0,35$; Figura 9).

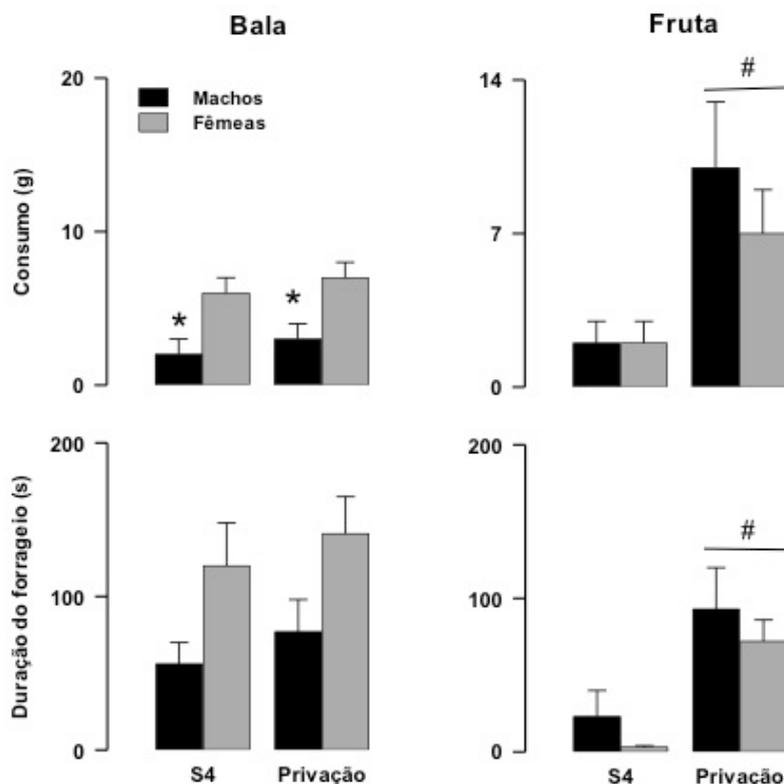


Figura 9: Consumo (em gramas) e duração do forrageio (em segundos; média+EPM) de bala de fruta na semana 4 (S4) e no teste de privação alimentar (Pração) de machos e fêmeas ($n=6$ /gênero); * $p<0,05$ machos vs. fêmeas, # $p<0,05$ S4 vs. privação.

A duração do forrageio da bala e da fruta foram analisadas e não houve diferenças estatísticas significativas para a variável bala (fator gênero: $F_{1,10}=4,7$; $p=0,06$; fator sessões: $F_{1,10}=3,32$; $p=0,09$; interação gênero vs. sessões: $F_{1,10}=0,001$; $p=0,95$). Em relação à duração do forrageio da fruta, apenas diferenças entre sessões foram observadas (fator sessões: $F_{1,10}=43,02$; $p<0,001$; fator gênero: $F_{1,10}=0,81$; $p=0,38$; interação gênero vs. sessões: $F_{1,10}=0,003$; $p=0,97$; Figura 9).

Por fim, o comportamento de vigilância não sofreu alterações significativas (fator sessões: $F_{1,10}=0,001$; $p=0,97$; fator gênero; $F_{1,10}=0,51$; $p=0,49$; interação sessões vs gênero: $F_{1,10}=0,14$; $p=0,90$; Figura. 10). De maneira similar, não foram observadas diferenças significativas para a distância total percorrida (fator sessões: $F_{1,10}=40,82$; $p=0,38$; fator gênero: $F_{1,10}=1,75$; $p=0,21$; interação sessões vs. gênero: $F_{1,10}=0,02$; $p=0,87$; Figura 10).

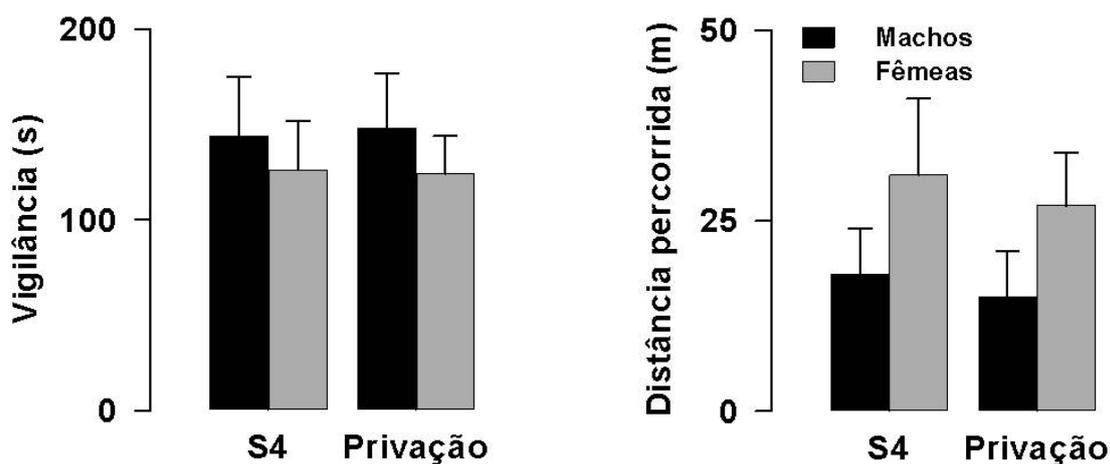


Figura 10: Duração da vigilância (em segundos, média+EPM) e distância total percorrida (em metros, média+EPM) na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste de estresse por privação alimentar por machos e fêmeas (n=6/gênero).

6.3.5 Fase 5: Teste de Confronto com Predador

O teste de confronto com predador (doravante expresso como teste de Predação) apontou diferenças significativas no consumo de bala entre os gêneros ($F_{1,10}=5,55$; $p=0,04$) e entre sessões ($F_{1,10}=13,75$; $p=0,004$), sem interação significativa entre os fatores gênero vs. sessão ($F_{1,10}=2,84$; $p=0,12$). A duração do forrageio da bala diferiu significativamente entre as sessões ($F_{1,10}=33,19$; $p<0,001$), mas não houve diferença entre os gêneros ($F_{1,11}=2,69$; $p=0,13$) ou entre gênero vs. sessão ($F_{1,10}=2,24$; $p=0,16$). Porém, o consumo e a duração do forrageio da fruta não foram modificados de maneira significativa (*Consumo* – fator gênero: $F_{1,10}=0,81$; $p=0,38$; fator sessão: $F_{1,10}=0,09$; $p=0,76$; interação gênero vs. sessão: $F_{1,10}=0,86$; $p=0,37$; *Tempo forrageio* – fator gênero: $F_{1,10}=0,75$; $p=0,40$; fator sessão: $F_{1,10}=0,005$; $p=0,94$; interação gênero vs sessão: $F_{1,10}= 1,27$; $p=0,28$; Figura 11).

Além disso, foi observada uma diferença significativa para o tempo de permanência na zona da bala em termos dos gêneros ($F_{1,10}=7,12$; $p=0,02$) e das sessões ($F_{1,10}=13,97$; $p=0,004$), mas sem interação entre esses fatores ($F_{1,10}=3,64$; $p=0,08$; Figura 11). Diferenças significativas também foram encontradas entre as sessões para o tempo de permanência na zona da fruta ($F_{1,10}=5,24$; $p=0,04$), mas não houve diferença entre os gêneros ($F_{1,10}=0,01$; $p=0,99$) ou interação entre os fatores gênero vs. sessão ($F_{1,10}= 0,23$; $p=0,63$; Figura 11).

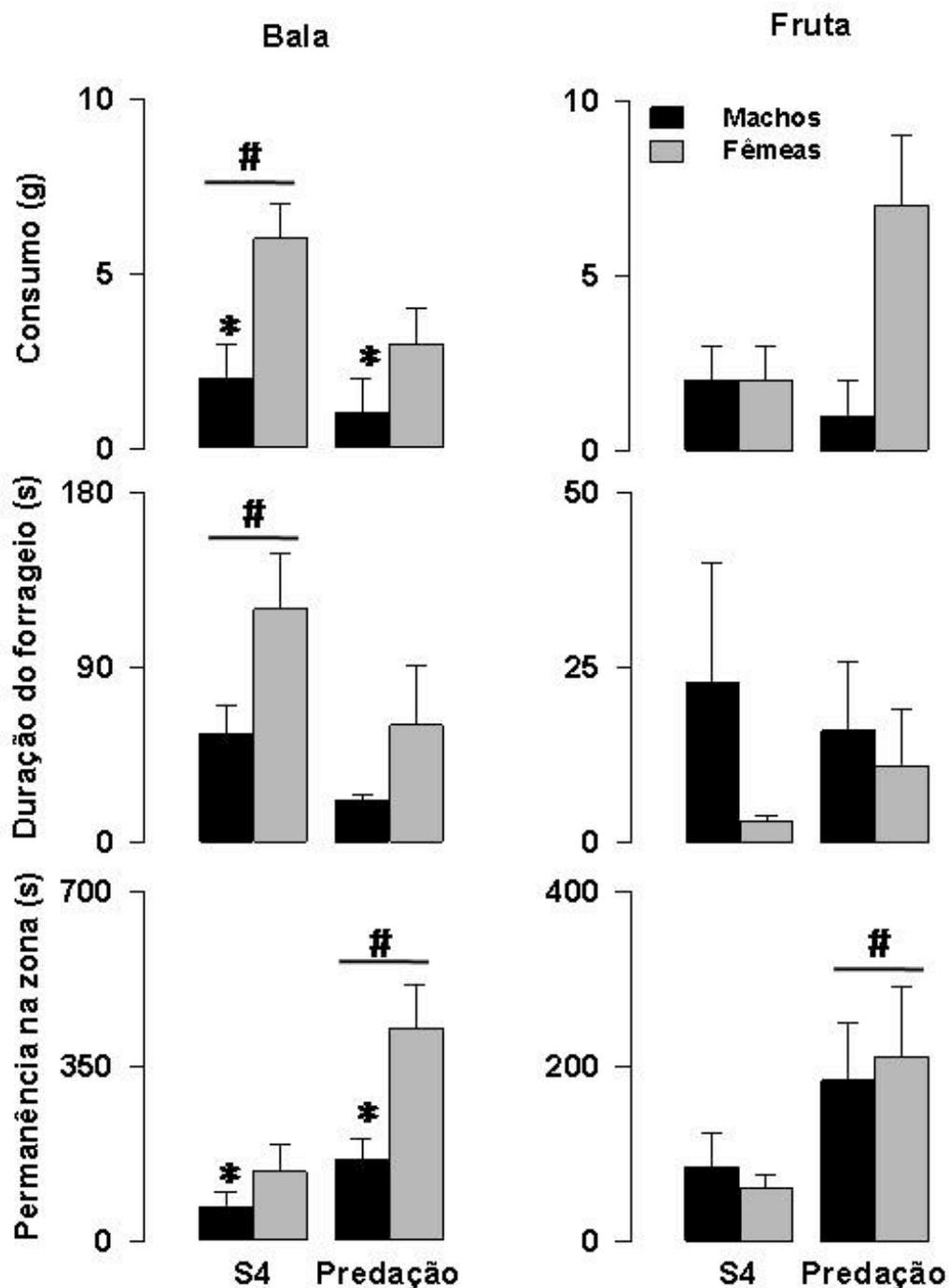


Figura 11: Consumo (em gramas), duração do forrageio (em segundos) e tempo de permanência nas zonas (em segundos) na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste confronto com predador por machos e fêmeas ($n=6/\text{gênero}$). * $p<0,05$ machos vs. fêmeas; # $p<0,05$ S4 vs. Predação.

Para a vigilância, houve diferença significativa entre as sessões ($F_{1,10}=11,75$; $p=0,006$), sendo esta maior no teste de Predação do que na S4. Não houve diferença entre gênero ($F_{1,10}=0,06$; $p=0,93$) nem houve interação sessões vs. gênero ($F_{1,10}=0,23$; $p=0,63$). Não houve diferença estatística na distância total percorrida

(fator sessões: $F_{1,10}=2,86$; $p=0,12$; fator gênero: $F_{1,10}=1,68$; $p=0,22$; interação gêneros vs. sessões: $F_{1,10}=0,002$; $p=0,96$; Figura 12).

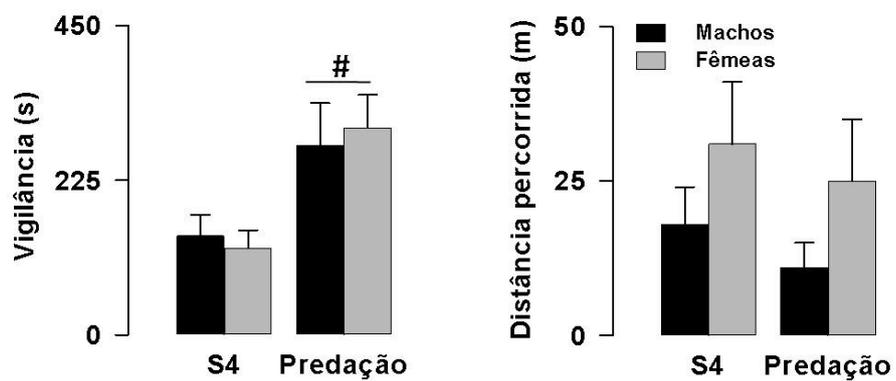


Figura 12: Duração da vigilância (em segundos, média+EPM) e distância total percorrida (em metros, média+EPM), na última semana de acesso à bala de banana (S4) e no teste de estresse por predação de machos e fêmeas ($n=6$ /gênero). # $p < 0,05$ Predação vs. S4.

6.4 DISCUSSÃO

Ao longo da fase de habituação à caixa AL, os sujeitos apresentaram uma diminuição significativa nos comportamentos de vigilância, locomoção e exploração do aparato. Esses comportamentos já foram relacionados aos níveis de estresse e ansiedade em calitriquídeos (BARROS e TOMAZ, 2002, TOMAZ e BARROS, 2008). Sugere-se então que os animais demonstraram um perfil de habituação comportamental ao serem expostos repetidamente a esse ambiente novo.

Um dos modelos animais utilizados para mimetizar comportamentos do tipo compulsivo em roedores é o de acesso restrito e intermitente a um alimento opcional palatável (CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004). Contudo, no presente experimento, não foi possível replicar em calitriquídeos o protocolo de intermitência tipicamente empregado em roedores, pois nenhum dos dois critérios propostos por Corwin e Buda-Leivin (2004) para se estabelecer um episódio de compulsão alimentar foram observados. Esses critérios são baseados no perfil de consumo do alimento teste pelo grupo HR, em que ele deve apresentar um consumo significativamente maior do que o LR, e/ou deve escalonar seu consumo ao longo do tempo. O fato de o grupo HR não ter aumentado seu consumo de bala comparado ao grupo LR ou ter escalonado seu consumo ao longo das semanas de teste refuta a hipótese do estabelecimento de um comportamento do tipo compulsivo nos termos originais do protocolo.

O fato de primatas não-humanos apresentarem algumas características diferentes das observadas em roedores pode ter dificultado a transposição literal do modelo usado em roedores para os calitriquídeos. Até o momento não há, na literatura, relatos da implementação desse modelo, sem adaptações metodológicas significativas, em primatas não-humanos.

Um possível fator que pode estar relacionado ao fato de não se ter estabelecido um comportamento do tipo compulsivo nos micos é a duração da sessão. Para os micos, 15 min pode ter sido um período muito curto de acesso ao alimento teste, o que corresponde a uma restrição demasiadamente elevada para ambos os grupos (HR e LR). Os sujeitos podem não ter tido tempo suficiente para consumir o alimento teste de modo a escalonar seu consumo. O acesso de apenas 15 min, ainda que diário (grupo LR), pode ser restrito demais para que haja

diferença significativa entre os dois grupos, o que tornaria, na prática, ambos os grupos de alta restrição ao acesso de alimento-teste.

Estudos em roedores, que utilizam como ferramenta o protocolo de intermitência geralmente disponibilizam o alimento teste por períodos de 20 min até duas horas (WOLFE e cols., 2009; CORWIN e cols 1998, CORWIN e BUDA-LEVIN, 2004; CORWIN e WOJINICKI, 2006; CORWIN, AVENA e BOGGIANO, 2011; AVENA, 2011). No presente estudo, a escolha da duração das sessões foi adotada para 1) aproximá-lo de episódios de compulsão em humanos e 2) permitir que as sessões fossem registradas para análises comportamentais de todos os sujeitos no mesmo período do dia.

Recentemente, Velásquez-Chancéz e cols. (2014 e 2015) estabeleceram um comportamento compulsivo em ratos empregando um acesso diário de 1h a alimentos hipercalóricos. Com esse regime alimentar, houve um escalonamento de quatro vezes no consumo calórico no grupo com restrição, comparado ao grupo controle (apenas ração). É importante ressaltar que esse regime de acesso restrito equivale ao que os micos do grupo LR foram presentemente expostos. Portanto, o acesso diário e menos restrito que o acesso intermitente ao alimento-teste, também pode gerar comportamento do tipo compulsivo em alguns sujeitos.

Adaptações metodológicas no protocolo de intermitência também foram relatadas nos estudos de Foltin e Evans (1997), que usaram uma versão modificada do modelo de acesso intermitente (sistema de *commodity*, utilizaram balas e chocolate na primeira refeição do dia) e afirmaram gerar compulsão em um grupo pequeno de babuínos (*Papio cynocephalus anubis*). Foltin (2005, 2006) apenas depois de nove semanas de exposição intermitente a balas (30 min, 3 vezes por semana) observou aumento na quantidade de alimento consumido na primeira refeição pelos babuínos.

Ainda, os micos do presente estudo foram testados durante um intervalo de tempo longo, entre às 13:00 e 17:00 h. Uma vez que dispunham de sua dieta regular *ad libitum* em seus viveiros, não foi possível padronizar a latência desde sua última refeição, o que pode ter influenciado, em parte, o consumo alimentar durante as sessões de teste na caixa AL.

Outro fator importante é o fato de que animais submetidos a dietas monótonas (p. ex.: ração), com pouca variedade e pobres em palatabilidade, são mais propensos a consumir grandes quantidades de alimentos novos quando estes

são introduzidos na dieta (PELCHAT e SCHAEFER, 2000). De fato, os experimentos realizados com roedores em geral introduzem alimentos novos a uma dieta que é composta apenas por ração. Por outro lado, a dieta dos micos no presente estudo era semelhante àquela que eles têm na natureza (ARAUJO e DE CASTRO, 1998) e consistiu em uma variedade de frutas e verduras, de fontes de proteína (tenébrios, ovos, peito de frango), além de ração *ad libitum*, consistindo em uma dieta variada. Assim, é possível que comportamentos do tipo compulsivo pela introdução de um alimento novo palatável sejam mais difíceis de serem estabelecidos nesse contexto.

É possível que a escolha do alimento teste no presente estudo influenciou na quantidade de alimento ingerida pelos micos. Wojnicki, Stine e Corwin (2007) testaram diferentes concentrações de açúcar misturadas à gordura e observaram que quando a gordura é misturada ao açúcar em elevadas concentrações (32%) não são observadas diferenças no consumo entre os grupos. A concentração de açúcar presente no alimento teste do presente estudo foi de 75%. No entanto, Foltin (2005), baseado no protocolo de Corwin, ofereceu alimentos com elevadas concentrações de açúcar e afirma observar comportamento do tipo compulsivo em babuínos, embora o aumento no consumo seja observado apenas na primeira semana do protocolo enquanto nas demais, o consumo se mantém. Na literatura, há dados que sugere que calitriquídeos apresentam preferência em ingerir alimentos ricos em carboidratos simples (WATCHMAN e cols, 2011).

Outro fator que pode influenciar na aquisição do comportamento compulsivo é o ciclo circadiano. Keith e cols (2013) demonstraram que camundongos expostos à pasta de amendoim e à pasta de amendoim + metanfetamina apresentaram maiores índices de consumo no início do dia comparado com o fim do dia. Barros e colaboradores (2014) relatam que, em micos-estrela, o ciclo circadiano interfere no CPP por alimentos.

Os micos foram divididos de forma a comporem dois grupos homogêneos, com base na quantidade de bala consumida na fase de seleção de grupos, tendo portanto em cada grupo, animais que consumiram mais e menos do alimento teste. De fato, o protocolo empregado propõe que, pela intermitência, haverá uma mudança comportamental independente da pré-disposição dos sujeitos. Porém, o que se observou foi: os micos que consumiram quantidades maiores mantiveram esse perfil de consumo do início ao fim do protocolo. De fato, embora não tenha ocorrido um escalonamento no consumo por parte dos micos, foi detectada uma

correlação positiva em termos do consumo médio de bala entre a fase inicial de seleção de grupos (pré-teste) e o início (S1) e o fim do protocolo de intermitência (S4).

A manutenção desse comportamento no decorrer do tempo indica que essa tendência não se deu em função do protocolo, mas parece estar relacionada com certa pré-disposição à hiperfagia.

Outro aspecto interessante observado no presente estudo foi a diferença significativa no padrão alimentar entre os gêneros, em relação ao consumo de alimentos novos e palatáveis. As fêmeas de ambos os grupos (HR e LR) ingeriram mais bala durante todo o estudo do que os machos. As fêmeas também apresentaram uma maior duração e frequência do comportamento de forrageio do que os machos, o que de fato reflete a maior quantidade de balas que elas consumiram. Como não houve escalonamento, essa preferência por alimentos altamente calóricos parece ser algo intrínseco, e não uma alteração da resposta comportamental ao protocolo. Ademais, como os níveis de vigilância permaneceram constantes ao longo das semanas do estudo, independente do gênero, o acesso restrito à bala de banana não induziu um estado de ansiedade nesses animais, conforme também já foi relatado em roedores (ROSSETTI e cols, 2014, ROSSETTI e SPENA, 2013).

Em ratos submetidos ao protocolo de intermitência, foi observado que as fêmeas tinham de duas a seis vezes mais chances de serem classificadas como propensas à hiperfagia (*binge-eating prone*) que os machos (KELLY e cols., 2013; KLUMP e cols., 2013). Ademais, as fêmeas escalonam mais rápido o consumo, apresentando maior prevalência de comportamento do tipo compulsivo que machos, com cerca de 40% dos animais (BABBS e cols. 2011). Em calitriquídeos, fêmeas adultas parecem ter prioridade e preferência para obter alimentos temporariamente restritos ou escassos que outros membros de seu grupo social (BOX, 1997; 2003; GARBER, 1987; BICA-MARQUES, 2000). Em humanos, por sua vez, alimentos hipercalóricos ricos em açúcar e/ou gordura são predominante preferidos por mulheres (PLA-SANJUANELO e cols., 2014), e a prevalência de compulsão alimentar nesse gênero é significativamente maior que em homens (JACOBI et cols., 2004; KINZL e cols., 1999).

A diferença de gênero no comportamento alimentar é provavelmente o resultado hormonal presente na diferenciação sexual (SCHWARZ e MCCARTY,

2008). Contudo, em macacos rhesus, o consumo de sacarose oferecida duas horas por dia, três dias por semana, não diferiu entre os gêneros (KEMNITZ e cols., 1986). O consumo de alimento de fêmeas de babuínos que estavam em contato com machos também não diferiu das de fêmeas sem contato (BIELERT e BUSSE, 1983 *apud* ASARIAN e GEARY, 2013). Em humanos, Dye e Blunde (1997) verificaram que não havia variações na ingestão de macronutrientes ao longo do ciclo ovariano em mulheres. Apesar de não terem sido realizadas medidas hormonais para identificar a fase do ciclo hormonal das fêmeas no presente estudo, sugere-se que as diferenças de consumo podem estar relacionadas à questões de gênero que não estão necessariamente relacionadas ao ciclo ovariano.

As respostas hedônicas, vinculadas à palatabilidade, e que determinam as avaliações subjetivas do alimento, também podem diferir entre machos e fêmeas (ASARIAN e GEARY, 2013). Box (1995) sugere que diferenças entre gêneros no consumo possam se dar em função de diferenças nos níveis motivacionais para a busca de alimento. Apesar de não ter sido realizado um teste específico para avaliar o valor hedônico da bala de banana no presente estudo, após um intervalo de 24 h sem alimento (Teste de Privação Alimentar), o consumo desse alimento pelos machos e fêmeas se manteve constante mesmo estando em um estado de equilíbrio energético. Ambos os gêneros comeram a mesma quantidade habitual de bala, com as fêmeas consumindo quantidades significativamente maiores que os machos. No entanto, independentemente do gênero, houve um aumento significativo no consumo de fruta após as 24 h de privação de alimento (vide discussão mais detalhada abaixo). O consumo de bala, apesar de ter havido uma ingestão significativamente maior de fruta, sugere que a bala possivelmente constitui um alimento com uma propriedade hedônica para ambos os gêneros.

Um outro fator importante a ser analisado quando se trata de comportamento alimentar compulsivo é a influência do estresse na ingestão, tanto em animais como em humanos (HAGAN e cols, 2002; CROWTHER e cols, 2001). Episódios compulsivos estão geralmente associados a sensações negativas e são iniciados por eventos estressores (GOLDSCHMIDT e cols., 2012, HAEDT-MATT e KEEI, 2011; HILBERT e TUSCHEN-CAFFIER, 2007). Rossetti e Spina (2013) observaram que roedores pré-expostos duas vezes por semana a uma dieta palatável apresentaram um comportamento do tipo compulsivo quando o acesso ao alimento era pareado com um choque moderado nas patas.

Nesse contexto, os micos foram avaliados em duas situações diferentes de estresse – um fisiológico (Teste de Privação de Alimento) e um psicológico (Teste de Confronto com Predador). No primeiro, os animais foram privados de alimento durante 24 h e em seguida submetidos a uma sessão teste (*binge day*; com acesso ao alimento teste e fruta). Apesar de a quantidade de bala não ter sido alterada em função da privação, independentemente do gênero, tanto os machos como as fêmeas aumentaram significativamente seu consumo de fruta, comparado a semana 4. O fato de os animais terem suprido suas necessidades energéticas predominantemente com sua dieta regular demonstra o importante papel dos hábitos alimentares. Ademais, a manutenção do perfil de consumo de bala (em ambos os gêneros), mesmo após uma privação de alimento por 24 h, sugere um possível “efeito teto” para o consumo desse item.

Ratos submetidos a um regime de restrição alimentar associado a estresse também demonstraram um aumento no consumo de ração (HAGAN e cols., 2003). O maior consumo de ração, ao invés de um alimento mais calórico, pode ocorrer em razão de experiências prévias positivas com esse tipo de alimento quando o indivíduo se encontra em uma condição de *déficit* homeostático (HAGAN e cols., 2003).

Primatas humanos são uma fonte valiosa para o estudo da ansiedade, devido à semelhanças com os seres humanos, tanto nas respostas fisiológicas quanto comportamentais (NEWMAN e FARLEY, 1995). Diversos testes, como choques elétricos e estímulos aversivos, podem ser utilizados como geradores de ansiedade em animais. No entanto, é interessante buscar mimetizar estímulos naturais, na tentativa de induzir comportamentos comparáveis à ansiedade em seres humanos (FILE, 1980). O teste de confronto predador mimetiza situações vividas pelos animais na sua condição natural e gera sintomas de ansiedade. Durante o teste, a vigilância e locomoção foram superiores às taxas basais, comportamentos bem estabelecidos em situações de medo/ansiedade (CAINE, 1998). Experimento semelhante foi realizado por Barros e cols., 2000. Micos da espécie *Callithrix penicillata* foram expostos à presença de um gato selvagem empalhado. Os animais testados apresentaram mudanças de comportamento que demonstraram desenvolvimento de ansiedade (revisado em BARROS e cols., 2000).

No teste de predação, por sua vez, a ingestão de bala em ambos os gêneros diminuiu significativamente após uma exposição de 5 min a um modelo de serpente, enquanto apenas nas fêmeas foi visto um aumento no consumo de frutas. Os níveis de vigilância pós-confronto também aumentaram nos machos e nas fêmeas, comparado ao que foi observado na última semana do regime alimentar, o que demonstra o efeito do estresse no comportamento dos animais.

6.5 CONCLUSÃO DO ESTUDO 1

O presente estudo foi o primeiro a tentar desenvolver uma metodologia para induzir um comportamento do tipo compulsivo em primatas não-humanos de pequeno porte (*Callithrix penicillata*). Teria-se, assim, um modelo animal de comportamento alimentar compulsivo em uma espécie de primata que realiza comportamentos semelhantes aos dos humanos. Isso por sua vez é de suma importância para o entendimento das bases neurais, bem como para a busca de tratamentos eficientes, uma vez que há indícios de que os mesmos mecanismos neurais envolvidos nesse distúrbio também subsidiam a dependência por drogas de abuso.

Contudo, o protocolo de acesso intermitente a um alimento opcional, palatável, oferecido em intervalos restritos, não gerou, ao longo de quatro semanas, um escalonamento na ingestão desse alimento por parte dos micos. Tal fato pode ter sido decorrente de diferentes aspectos metodológicos incluindo: horário do dia, tempo de exposição ao alimento, nível/intensidade da restrição, tipo de alimento e gênero.

As diferenças entre os gêneros podem ter sido um fator importante, uma vez que as fêmeas consumiram mais balas do que os machos, desde a fase de seleção de grupo, até o término do estudo. Fêmeas de fato apresentam uma maior predisposição a desenvolver comportamentos alimentares patológicos devido, em parte à diferenças neuroendócrinas e fisiológicas existente entre gêneros.

Além disso, após o estresse por privação alimentar, machos e fêmeas aumentaram significativamente o consumo de frutas, sugerindo que, em situação de desequilíbrio homeostático, há preferência por ingerir alimentos habituais.

Assim, buscou-se adaptar tais aspectos do protocolo do Estudo 1, de modo a tentar desenvolver um modelo de compulsão alimentar em primatas não-humanos no Estudo 2.

7 ESTUDO 2. EFEITO DO ACESSO INTERMITENTE À DIETA DE CAFETERIA EM COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA COCAÍNA

O Estudo 2 teve por finalidade adaptar o modelo de intermitência de Corwin e cols. (2009), a partir dos resultados obtidos no Estudo 1, a fim de estabelecer um comportamento alimentar do tipo compulsivo em primatas não-humanos. Visou também investigar a influência da pré-exposição à alimentos ricos em gordura e/ou açúcar na alterações comportamentais induzidas pela administração sistêmica de cocaína.

Abaixo, na Tabela 3, seguem as principais modificações metodológicas aplicadas no *Estudo 2*, com base no que foi observado no estudo anterior.

Tabela 3: Principais diferenças metodológicas entre os Estudos 1 e 2.

| Parâmetro | Estudo 1 | Estudo 2 |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|
| Horário das sessões | 12:30 - 17:30 h | 07:00 - 09:30 h |
| Duração da sessão | 15 min | 30 min |
| Tipo de dieta | bala de banana + fruta | dieta de cafeteria + fruta |
| Gênero dos sujeitos | machos e fêmeas | fêmeas |
| Grupos experimentais | LR e HR | HR e GC |
| Divisão dos grupos | peso + consumo | peso |
| Acesso ao alimento opcional | 3x semana | 2x semana |

GC= grupo controle; LR=Low restriction; HR=High restriction.

7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1 Sujeitos e Condições de Alojamento

Foram utilizadas treze fêmeas adultas (>18 meses; >250 g) de micos-estrela (*Callithrix penicillata*). As condições de alojamento dos animais foram as mesmas descritas detalhadamente no *Estudo 1*.

7.1.2 Aparato Experimental

O aparato experimental utilizado para analisar o comportamento dos animais foi a caixa AL cuja descrição completa encontra-se no item 5.2.

7.1.3 Alimento teste

No presente experimento utilizou-se como alimento teste uma mistura de alimentos com alto índice calórico, vendidos comercialmente (biscoito negresco®, chocolate M&M®, jujuba, queijo e batata chips) e denominou-se esse conjunto de itens de: “dieta de cafeteria – DC”.

7.1.4 Drogas e Doses

Foi utilizado hidrocloreto de cocaína (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 5mg/Kg dissolvida em solução salina (0,9%), administrada via intraperitoneal num volume de 1mL/Kg, 5 minutos antes de serem testadas na caixa AL. Em dias alternados os animais receberam injeções de solução salina (0,9%/1mL/Kg).

7.1.5 Procedimentos

Os procedimentos foram realizados no período matutino, entre 07:00 e 09:30h. Este estudo foi dividido em três fases consecutivas, detalhadas abaixo.

7.1.5.1 Fase 1: Habituação ao Aparato

Realizaram-se três sessões de habituação à caixa AL, seguindo o mesmo procedimento adotado no Estudo 1, e dois grupos foram designados com base no peso corporal:

Grupo High restriction (HR): o grupo teve acesso à DC por 30 min, apenas dois dias por semana (segundas e quintas-feiras). Nos dias de acesso à DC (operacionalmente chamado de *binge day*), foram disponibilizados em um dos pratos 50g de DC e no outro 50g de frutas variadas (banana, maçã, manga, melão, melancia). Nos demais quatro dias da semana, os animais permaneceram em seus viveiros e receberam sua dieta regular, sem sofrer nenhuma manipulação do experimentador. Para um mesmo sujeito, o local onde foi colocado a bala e a dieta regular (esquerda/direita) permaneceu o mesmo durante todo o procedimento, mas variou entre os sujeitos de modo que metade recebeu a bala no lado direito e a outra, no lado esquerdo;

Grupo Controle (GC) – não teve acesso à DC, somente frutas durante 30 min, duas vezes por semana. Foi disponibilizado em um dos pratos aproximadamente 50g de frutas, enquanto o outro permaneceu vazio. Para um mesmo sujeito, o local onde foi oferecida a dieta regular (esquerdo/direito), bem como o que ficaria vazio, permaneceu o mesmo durante todo o procedimento, mas variou entre os sujeitos de modo que metade recebeu a dieta regular do lado direito e a outra metade no lado esquerdo.

7.1.5.2 Fase 2: Acesso Intermitente à Dieta de Cafeteria

Na segunda fase, com duração de sete semanas consecutivas, as fêmeas de micos-estrela foram submetidas a sessões de 30 min na caixa AL, realizadas duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras), entre às 07:00 e 09:00 h. Nos demais dias da semana elas permaneceram nos seus viveiros de moradia, recebendo sua dieta normal e sem sofrer nenhum tipo de manipulação. Não houve restrição alimentar em momento algum do teste e vale ressaltar que os animais habitualmente não ingerem alimentos no período noturno após entrarem nas suas caixas-ninho. As sobras das frutas foram retiradas ao final do dia (17:00h). Portanto, nos dias de teste (*binge days*), considerou-se a primeira refeição do dia a sessão experimental (com DC ou fruta).

Em cada sessão, a fêmea foi capturada em seu viveiro de moradia e transportada até a sala de experimento. O comportamento foi registrado em todas as sessões realizadas na caixa AL. A ordem dos sujeitos, em cada dia de teste, foi estabelecida de forma aleatória. Foi registrada a quantidade consumida (em gramas) de cada alimento durante a sessão.

7.1.5.3 Fase 3: Pré-exposição à DC em Comportamentos Induzidos pela Cocaína

O acesso à DC foi suspenso após sete semanas, sendo que ambos os grupos passaram a receber apenas em seus viveiros de moradia a dieta regular de frutas (das 07:00 às 17:00h). Os dois grupos foram então testados com cocaína (Fase 3).

Cada sujeito recebeu duas doses desse psicoestimulante e duas de solução salina em intervalos de 24h, sendo que a primeira dose foi de cocaína para todos os sujeitos. O período de teste permaneceu o mesmo, ou seja, entre 07:00 e 09:00 h.

Em cada uma das quatro sessões realizadas, a fêmea foi capturada em seu viveiro de moradia, imobilizada manualmente e recebeu uma injeção intra-peritoneal de cocaína (5mg/kg) ou solução salina. Após esse procedimento, ela foi imediatamente transportada até a sala de experimento. A caixa de transporte foi acoplada à parte posterior da caixa AL, e o animal pôde explorar todo o aparato por um período de 30 min, tendo seu comportamento registrado e analisado. Após cada sessão, a fêmea foi retornada ao seu viveiro e recebeu sua dieta regular de fruta.

7.2 ANÁLISE DOS DADOS

Os parâmetros comportamentais observados nas Fases 1 e 3 (realizadas no próprio viveiro dos sujeitos) foram registrados no programa de análises comportamentais Etholog® por dois observadores com uma confiabilidade intra- e inter-observador de 95%. A quantidade de frutas ingerida e a duração do forrageio foram registradas antes e após os animais serem submetidos à DC. Possíveis diferenças no consumo e na duração do forrageio foram analisadas por meio de teste-t para amostras pareadas, e adotou-se o nível de significância de $p \leq 0,05$.

Na Fase 2, correspondente ao teste de acesso intermitente à DC realizado na caixa AL, foi calculada a média das duas sessões de cada sujeito, obtendo-se uma média semanal do consumo, bem como para cada parâmetro comportamental. O escalonamento na ingestão do alimento-teste (DC) no decorrer das semanas foi adotado como critério para determinar a aquisição de um comportamento do tipo compulsivo no grupo HR.

O consumo médio semanal de DC do grupo HR foi analisado via análise de variância de uma via para amostras repetidas (*one-way repeated measures ANOVA*) para identificar possíveis diferenças ao longo das semanas. O consumo médio semanal de frutas dos grupos HR e GC foi analisado empregando uma análise de variância de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*), sendo “grupo” o fator independente e “sessão” o de amostras repetidas.

Durante as sessões da Fase 3, também foi registrada a duração do comportamento de vigilância. Um possível efeito da pré-exposição à DC no comportamento de vigilância induzida foi analisado comparando-se os níveis observados nos dois grupos (HR e GC) na primeira e segunda exposição do animal à droga (Cocaína 2 vs Cocaína1). Para tanto, também foi utilizada a análise de variância de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*), sendo “grupo” o fator independente e “sessão” o de amostras repetidas.

Para todas as análises, os resultados com efeitos significativos foram analisados *post hoc* com o teste de Tukey. A definição do comportamento de forrageio e vigilância foi a mesma daquela descrita acima no Estudo 1. Em todos os testes, foi adotado para o nível de significância um valor de $p \leq 0,05$

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Fase 1: Habituação ao Aparato Experimental

Na fase de habituação ao aparato, não foram encontradas diferenças significativas entre a primeira e a última sessão (H1 vs. H3) para nenhum comportamento analisado (distância total percorrida: $t_8 = 1,20$; $p = 0,25$; duração da vigilância: $t_{10} = 0,63$; $p=0,53$ e frequência de exploração do aparato: $t_{10} = -0,58$; $p=0,57$; Tabela 4).

Tabela 4: Resposta comportamental de micos-estrelas fêmeas observadas na fase de habituação à caixa de alimentação.

| Parâmetro | Sessão de habituação | |
|--------------------------|----------------------|--------|
| | H1 | H3 |
| Distância percorrida (m) | 66 ±4 | 44±7 |
| Vigilância (s) | 836±170 | 691±82 |
| Exploração | 20±3 | 17±3 |

H1=sessão de habituação 1; H3=sessão de habituação 3. Valores representam à média semanal (\pm EPM)

7.3.2 Fase 2: Teste de Acesso Intermitente à DC

Ao longo das sete semanas dessa fase, o grupo HR não apresentou um perfil de escalonamento na sua ingestão de DC ($F_{3,7}=2,46$; $p=0,30$; Tabela 5). No entanto, foi observada entre as fêmeas do grupo HR uma alta variabilidade em termos da quantidade de DC que foi consumida (Figura 11). Portanto, os animais deste grupo foram subdivididos como sendo “propensos à hiperfagia” (PH) ou “não-propensos à hiperfagia” (NPH), de acordo com a quantidade ingerida. Os animais que mais consumiram durante todo o estudo foram considerados PH, enquanto os que menos consumiram foram classificados como NPH. As fêmeas PH diferiram significativamente das NPH de modo que não houve sobreposição dos sujeitos.

Tabela 5. Consumo semanal de DC e fruta durante teste de acesso intermitente.

| Grupo | Alimento | Semana de exposição à DC | | | | | | |
|-------|----------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 |
| HR | DC | 9±2 | 11±3 | 6±2 | 8±3 | 8±1 | 7±1 | 8±2 |
| | Fruta | 11±2 | 7±1 | 11±2 | 10±2 | 11±2 | 9±1 | 8±1 |
| GC | Fruta | 10±1 | 10±1 | 13±3 | 9±1 | 6±1 | 11±2 | 11±2 |

GC=grupo controle; HR=*High restriction*; DC=dieta de cafeteria. S1-S7=Semanas 1 à 7. Valores representam a média semanal (\pm EPM).

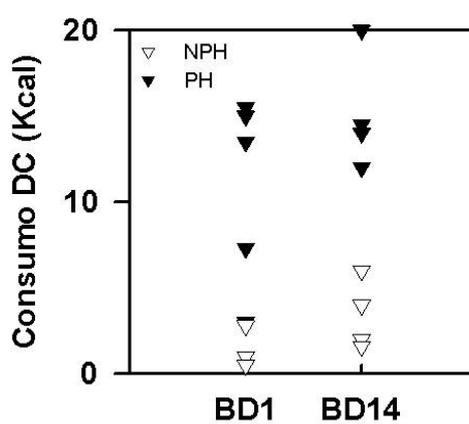


Figura 13: Consumo individual (em Kcal) de DC (dieta de cafeteria) em fêmeas no primeiro e último dia de teste. BD1= primeiro dia de teste (*binge day 1*); BD14 = último dia de teste (*binge day 14*).

O consumo e o tempo de forrageio da DC entre as fêmeas PH e NPH do grupo HR diferiu significativamente (consumo: $F_{1,6}=38,48$; $p=0,001$; forrageio: $F_{1,6}=8,11$; $p=0,03$), mas não houve diferença entre as sessões (consumo: $F_{1,6}=5,41$; $p=0,06$; forrageio: $F_{1,6}=0,57$; $p=0,48$) ou uma interação entre os fatores grupo vs. sessão (consumo: $F_{1,6}=0,29$; $p=0,60$; forrageio: $F_{1,6}=0,003$; $p=0,95$, Figura 14).

Em termos do consumo da fruta, as fêmeas tiveram o mesmo perfil (fator grupo: $F_{2,10}=2,26$; $p=0,15$; fator sessão: $F_{1,10}=4,05$; $p=0,07$; grupo vs. sessão: $F_{2,10}=1,59$; $p=0,25$). Mas, na duração do forrageio da fruta, diferenças significativas foram encontradas entre as sessões, sendo que as do grupo PH forragearam por mais tempo que as do grupo NPH (fator sessão: $F_{1,10}=7,66$; $p=0,02$; fator grupo: $F_{2,10}=2,83$; $p=0,10$; interação grupo vs. sessão: $F_{2,10}=2,32$; $p=0,14$; Figura 14).

Nenhum efeito significativo foi visto para o tempo de permanência dos animais nas zonas da fruta e da bala (*Zona fruta* – fator grupo: $F_{2,9}=0,45$; $p=0,65$; fator sessão: $F_{1,9}=0,35$; $p=0,56$; interação sessões vs grupos $F_{2,9}=1,45$; $p=0,28$; *Zona*

DC – fator grupo: $F_{2,9}=0,45$; $p=0,65$; fator sessões: $F_{1,9}=0,35$; $p=0,56$; interação sessões vs grupos $F_{2,9}=1,46$; $p=0,28$, Figura 14).

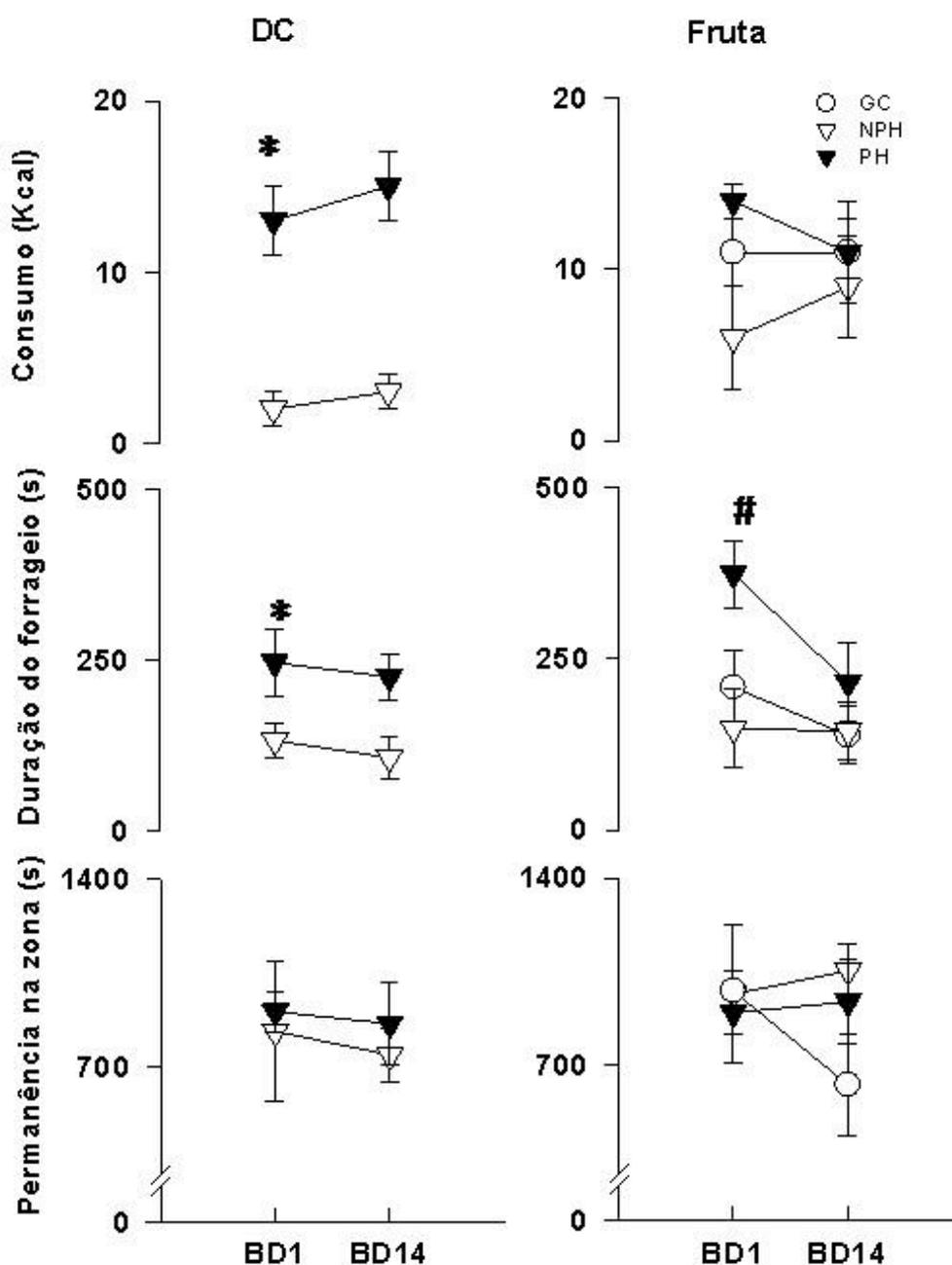


Figura 14: Consumo de dieta de cafeteria e fruta (em Kcal), duração do forrageio (em segundos) e tempo de permanência nas zonas bala e fruta (em segundos) por micos-estrelas fêmeas no primeiro e último dia de teste (BD1-BD14). GC (grupo controle; n=5), NPH (não-propensas à hiperfagia; n=4) e PH (propensas à hiperfagia; n=4). * $p<0,05$ NPH vs PH; # $p<0,05$ BD1 vs BD14.

O tempo de vigilância, a distância percorrida e a frequência de exploração do aparato também foram analisados, comparando-se os níveis observados na última

sessão de habituação e no primeiro e último dia de acesso à DC. Não foram observados efeitos significativos para nenhum desses parâmetros comportamentais (vigilância – fator grupo: $F_{2,9}=2,02$; $p=0,18$; fator sessão: $F_{2,18}=3,45$; $p=0,06$; grupo vs. sessão: $F_{4,18}=0,92$; $p=0,45$; distância percorrida – fator grupo: $F_{2,8}=2,21$; $p=0,17$; fator sessão: $F_{2,16}=0,11$; $p=0,88$; grupo vs. sessão: $F_{4,16}=1,27$; $p=0,32$; exploração aparato – fator grupo: $F_{2,9}=0,18$; $p=0,83$; fator sessão: $F_{2,18}=3,14$; $p=0,08$; grupo vs. sessão: $F_{4,18}=2,39$; $p=0,11$; Figura 15).

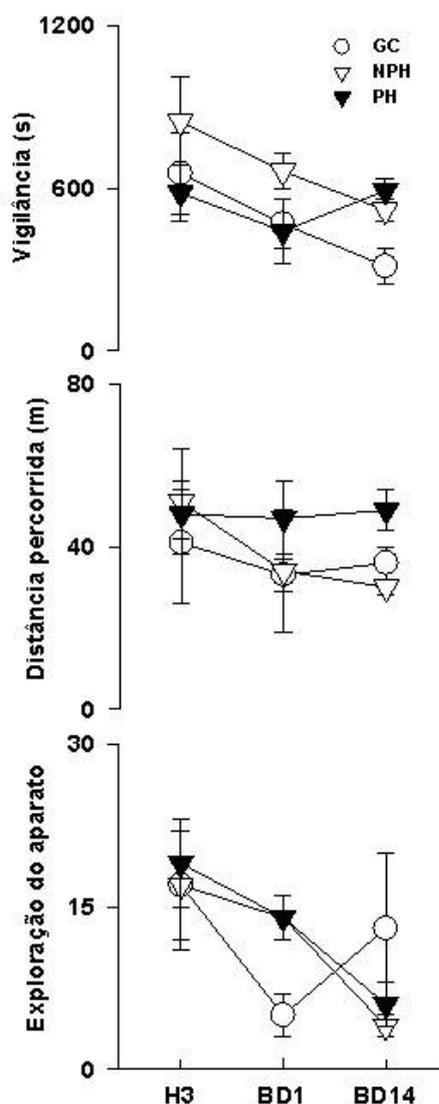


Figura 15: Duração da vigilância (em segundos; média±EPM), distância total percorrida (em metros; média±EPM) e frequência de exploração do aparato (média±EPM) na última sessão de habituação (H3), e no primeiro (BD1) e no último (BD14) dia de acesso intermitente à dieta de cafeteria pelas fêmeas de micos-estrela. GC (grupo controle; n=5), NPH (não-propensas à hiperfagia; n=4) e PH (propensas à hiperfagia; n=4).

7.3.3 Fase 3: Pré-exposição à DC em Comportamentos Induzidos por Cocaína

Em termos do tempo de viglância, foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos, sendo que na segunda administração da droga (cocaína 2) o grupo PH apresentou maiores níveis desse comportamento comparado ao grupo GC ($F_{2,10}=6,76$; $p=0,01$). Também foi observada uma diferença significativa entre as sessões cocaína vs. salina ($F_{3,30}=26,13$; $p<0,001$), além de uma interação entre os fatores grupo vs. sessão ($F_{6,30}=2,43$; $p=0,04$; Figura 16).

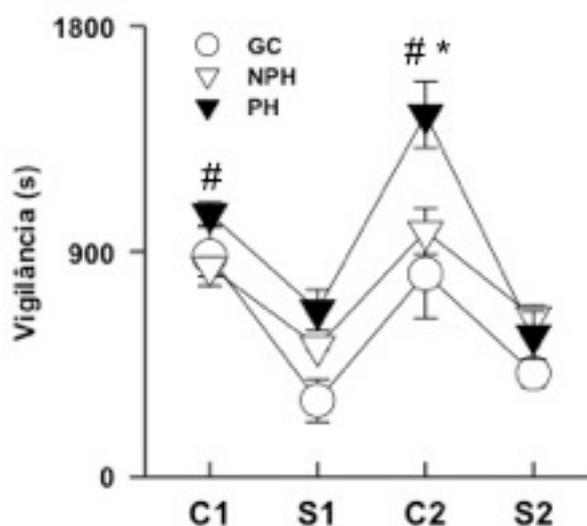


Figura 16: Média+EPM do comportamento de vigilância (em segundos) observada nas duas sessões de exposição à cocaína (C1 e C2) e à solução salina (S1 e S2) pelas fêmeas de micos-estrela; GC:n=5; PH e NPH:n=4/grupo. * $p<0,05$ PH vs. GC; # $p<0,05$ Cocaína vs. Salina.

Ademais, o consumo prévio de DC pelo grupo HR (PH + NPH) apresentou uma correlação positiva com a duração do comportamento de vigilância observada durante ambas as sessões com cocaína (cocaína 1; $r=0,72$; $p=0,02$; Cocaína 2: $r=0,69$; $p=0,05$). Por outro lado, correlações negativas foram encontradas entre o consumo de DC nesse grupo e a distância percorrida nas sessões de cocaína (Cocaína 1: $r=-0,24$; $p=0,05$; Cocaína 2: $r=-0,70$; $p=0,04$; Figura 17). Para o consumo da fruta, nenhuma correlação foi observada em termos dos comportamentos de vigilância, conforme observa-se na Tabela 6.

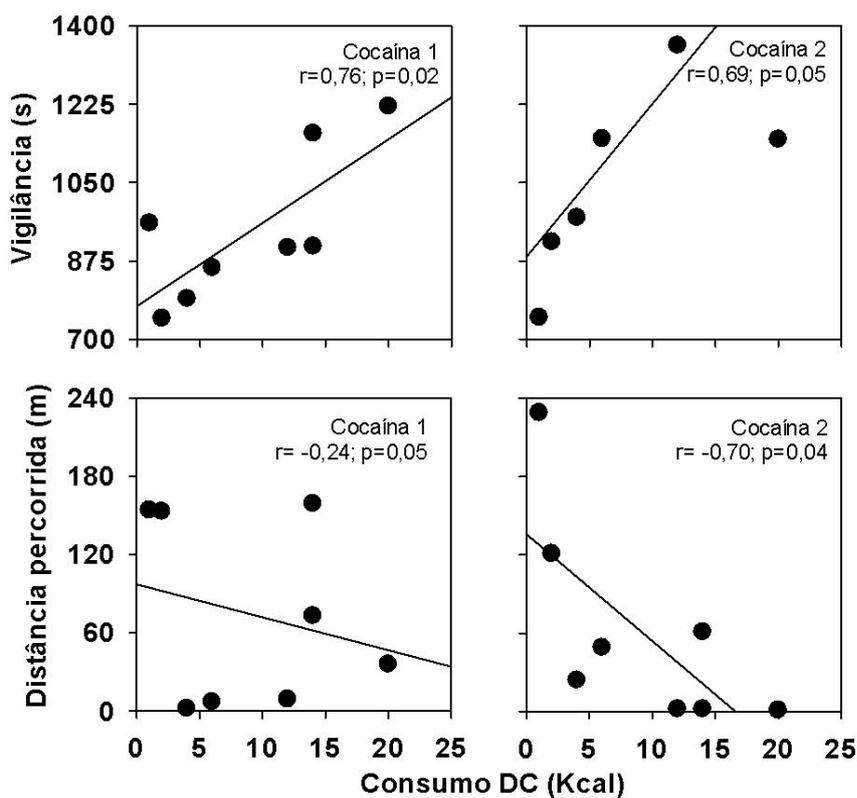


Figura 17: Correlação entre o consumo de DC (em Kcal) por micos estrelas fêmeas do grupo HR no último dia do protocolo de intermitência (Binge day 14 – BD14,) com a duração da viglância (em segundos) ou com a distância percorrida (em metros) nas sessões 1 e 2 de exposição à cocaína.

Tabela 6: Relação entre o consumo de fruta na ultima sessão e a duração da viglância nas sessões 1 e 2 de exposição à cocaína.

| Vigilância | Pearson | Significância |
|------------|---------|---------------|
| GC | | |
| Cocaína 1 | -0,81 | 0,89 |
| Cocaína 2 | 0,02 | 0,97 |
| HR | | |
| Cocaína 1 | 0,45 | 0,25 |
| Cocaína 2 | 0,57 | 0,13 |

GC= grupo controle; HR= *High restriction*.

7.4 DISCUSSÃO

Apesar das alterações metodológicas adotadas no presente estudo (vide Tabela 3), a oferta intermitente de DC não induziu nas fêmeas de micos-estrelas um escalonamento no seu consumo desse alimento no decorrer das sete semanas do estudo. Portanto, com base nesse critério, novamente não foi possível estabelecer um comportamento do tipo compulsivo na ingestão de alimentos altamente calóricos e palatáveis nessa espécie.

Em ratos, nem todos os animais submetidos a 1h/dia de acesso a alimentos hipercalóricos/palatáveis desenvolvem um comportamento do tipo compulsivo ao longo do tempo (VELZAQUEZ-SANCHEZ e cols., 2014). No entanto, vários estudos empregando esse tipo de sujeito experimental e utilizando a metodologia desenvolvida por Corwin e cols. relatam esse tipo de comportamento (CORWIN, 2004; 2011; CORWIN e BUDA LEVIN, 2004; CORWIN, AVENA e BOGGIANO, 2011).

Essa discrepância pode ser devido, em parte, ao número de sujeitos utilizados e a variabilidade interindividual observada. Enquanto que, na maioria dos estudos com roedores, se emprega um número elevado de sujeitos (>10/grupo), em primatas, a quantidade de animais disponíveis é bem mais reduzida, os quais também apresentam uma grande variação em termos do repertório comportamental basal e o induzido experimentalmente (BICCA-MARQUES, 2000).

É importante notar que, comportamentos que se tornam automatizados após práticas repetidas (hábitos) e que são voltados para obtenção de determinados objetivos (*goal directed behaviors*) são mais resistentes a mudanças a curto prazo (revisado em GASBARRI e cols., 2014). Nesse contexto, pode-se sugerir que os animais do presente experimento, por já estarem habituados a uma primeira refeição do dia composta essencialmente por frutas, não tiveram esse comportamento sobreposto pela DC durante as sete semanas do teste. Nas sessões teste, as fêmeas do grupo HR tiveram acesso simultâneo a ambos os alimentos (fruta + DC).

Outro aspecto que pode ter influenciado esse resultado no presente estudo diz respeito à duração do protocolo, que compreendeu um intervalo de sete semanas consecutivas. Esse período pode ter sido insuficiente para se induzir um comportamento do tipo compulsivo de forma estável. Em macacos rhesus, um maior

consumo de alimentos palatáveis foi observado apenas de forma transitória – na primeira semana do estudo (FOLTIN, 2006). Em calitriquídeos, por sua vez, uma dieta rica em açúcar ou gordura levou 16 e 40 semanas, respectivamente, para induzir alterações significativas no fenótipo e na atividade metabólica dos indivíduos (WACHTMAN e cols., 2011).

Um dado relevante do presente estudo foi o fato de o consumo calórico total do grupo HR, que recebeu DC + fruta duas vezes por semana, ter sido significativamente maior que o do grupo GC, que recebeu apenas fruta nos mesmos dias. Mesmo entre as fêmeas do grupo HR, importantes diferenças individuais foram observadas no consumo da DC, indicando a presença de dois perfis distintos. Alguns animais apresentaram um consumo calórico da DC significativamente maior que o de outros. Assim, com base na quantidade ingerida de DC, as fêmeas foram classificadas como sendo propensas à hiperfagia (PH) ou não-propensas à hiperfagia (NPH). Apesar de ambos os tipos ingerirem uma quantidade equivalente de fruta, as fêmeas PH consumiram significativamente mais alimentos DC que as fêmeas NPH.

Na verdade, vem sendo ressaltada cada vez mais a existência de diferenças entre indivíduos de uma mesma espécie. Também tem crescido o número de estudos voltados para traçar perfis distintos em animais de laboratório a fim de identificar fatores genéticos e potenciais alvos para o tratamento e para o entendimento da compulsão alimentar (DUCA, SWARTZ e COVASA, 2014). Britny e cols. (2014) relataram diferenças entre ratos de diferentes linhagens (Sprague-Dawley vs. Wistar) em relação a sua tendência à hiperfagia, o que sugere possíveis elementos genéticos na modulação da ingestão patológica de alimentos.

Alimentos ricos em açúcar e gordura nunca foram de tão fácil acesso, e isso vem aumentando os índices de sobrepeso, obesidade e indivíduos com transtornos alimentares (em razão do baixo custo, da alta variabilidade e de porções grandes). O contato constante com esses alimentos ativa o sistema hedônico, que promove a ingestão de alimentos mesmo quando os indivíduos não os necessitam, levando a um acúmulo de energia corporal. No entanto, de acordo com Boggiano e cols. (2007), das pessoas que estão expostas a esse tipo de dieta moderna, apenas alguns se tornam obesos. O mesmo é válido para dependência por drogas, em que nem todos os indivíduos que as usam se tornarão um dependente (VOLKOW e WISE, 2005).

Considerando a hipótese de que a compulsão por alimentos e drogas são subsidiados por mecanismos fisiológicos e comportamentais semelhantes, pode-se sugerir que o acesso intermitente a um alimento palatável seja capaz de induzir um efeito de sensitização cruzada com drogas de abuso. A exposição prévia a determinados regimes alimentares parece influenciar sim a resposta subsequente do indivíduo a uma droga de abuso, algo que já foi bem demonstrado em roedores (AVENA e cols., 2008; GOSNELL, 2000 e 2005) e, em menor escala em primatas (BASANI e cols., 2008; FOLTIN, 2011). Contudo, mesmo em roedores, há uma certa divergência em termos dos resultados, podendo ser em função do procedimento empregado, da espécie testada, da dose e da droga utilizada (AVENA e HOEBEL, 2003; GOSNELL, 2005).

No presente estudo, as fêmeas submetidas a sete semanas de acesso intermitente à DC na primeira refeição do dia apresentaram perfil de resposta comportamental distinto quando foram expostas à cocaína. As fêmeas classificadas como PH apresentaram níveis de vigilância significativamente maiores comparadas às NPH e as do grupos GC (que não receberam DC). Estudos têm demonstrado que, em micos, exposições repetidas à cocaína geram aumento progressivo da vigilância (sensitização), observada em média a partir da quarta sessão de exposição à droga. Além disso, o fenômeno da sensitização cruzada também foi observado em calitriquídeos, contrário do que se observa em roedores (alterações na atividade locomotora) em função da administração da cocaína (DE SOUZA e cols., 2006; GAGNI e cols., 2012; MELAMED e cols., 2013).

É possível que animais que tenham uma maior propensão de ingerir alimentos ricos em açúcar e gordura também sejam mais responsivos ao efeito de drogas. Roedores expostos à uma solução de sacarose (10%) durante três semanas tiveram uma resposta de hiperlocomoção maior do que os que não receberam a dieta quando tratados em seguida com anfetamina (AVENA e HOEBEL, 2003), sugerindo um sensitização cruzada entre o alimento e a droga. Em diferentes linhagens de roedores, aquelas selecionadas para terem uma maior preferência por sacarose também foram as que tiveram uma maior resposta de locomoção induzida por cocaína (CARROL e cols., 2007; GULLEY e cols., 2003, FESTA e QUINONES-JENAB, 2004). Uma preferência por sacarose também já foi associada a um aumento de responsividade ao álcool e da taxa de autoadministração de cocaína e anfetamina (WOODS e cols., 2003; DE SOUZA e cols., 2000; GOSNELL, 2000 e

2005). Ainda, Vitale e cols. (2002) relataram que, em ratos, o acesso crônico a sacarose aumentou o valor reforçador da anfetamina e do fentanil (opióide), medido pelo teste de CPP. Levy e cols. (2013), após submeterem ratos a teste de CPP com biscoitos Oreo, observaram que animais propensos a CPP por Oreos também apresentaram maiores taxas de autoadministração de cocaína.

Esse efeito pode estar relacionado à modificações neuroquímicas relacionadas à neurotransmissão dopaminérgica. A cocaína e o consumo de soluções contendo açúcar aumentam a sinalização dopaminérgica no NAcc (AVENA e cols., 2008, MARK e cols., 1991, RADA e cols., 2005). Volkow e cols. (2003) relataram que a tendência para ingerir determinados tipos de alimentos quando expostos a emoções negativas foi correlacionada negativamente com a disponibilidade de receptores dopaminérgicos D2 (VOLKOW e cols., 2003). Além disso, pesquisas apontam para uma correlação inversa entre o índice de massa corporal e a densidade de receptores D2 no estriado (WANG e cols., 2001; HALTIA e cols., 2007). De fato, o bloqueio farmacológico dos receptores D2 com drogas antipsicóticas aumentaram a ingestão de alimento e, com isso, os riscos do aparecimento de sobrepeso e obesidade (ALLISON e cols. 1999). No entanto, os mecanismos pelos quais a baixa disponibilidade de receptores D2 aumenta os riscos do surgimento de comportamentos compulsivos ainda não estão completamente elucidados. É possível que os indivíduos que apresentaram maior consumo de DC, e que também apresentaram maiores taxas de respostas à cocaína, possam ser mais susceptíveis a desenvolver comportamentos compulsivos e que isso pode estar relacionado a uma má adaptação do seus sistemas neurais de recompensa.

7.5 CONCLUSÃO DO ESTUDO 2

No presente estudo, uma série de adaptações metodológicas foram aplicadas ao procedimento adotado no Estudo 1. Contudo, a oferta intermitente de DC não induziu nas fêmeas de micos-estrela um escalonamento no seu consumo desse alimento no decorrer das sete semanas do estudo e assim não se estabeleceu um comportamento do tipo compulsivo. Em primatas, a formação de hábitos alimentares pode ser mais complexa do que em roedores, e assim a introdução de uma alimentação alternativa, rica em açúcar e gordura pode não ser capaz de suprimir o comportamento rotineiro de ingerir frutas na primeira refeição do dia. Talvez, se os animais fossem mantidos nesse regime alimentar por mais tempo seria possível observar uma mudança no padrão alimentar. Outra sugestão para novos estudos seria a de modificar o horário dos testes e de oferecer o alimento teste em um ambiente altamente familiar, como é feito com roedores.

Apesar da ausência de um comportamento alimentar do tipo compulsivo, a oferta da DC de forma intermitente, na primeira refeição do dia propiciou a identificação de dois perfis distintos de fêmeas de micos-estrela: as propensas vs. as não-propensas à hiperfagia. Isso é um dado relevante e pode ser uma medida para identificar animais com perfil comportamentais distintos nessa espécie, diferentemente do método do terço utilizado em roedores.

As fêmeas animais classificadas como propensas à hiperfagia também apresentaram uma maior resposta a um tratamento subsequente à cocaína, evidenciado pelos níveis significativamente mais altos de vigilância na segunda sessão de tratamento com esse psicoestimulante, comparado com o grupo controle e as fêmeas não-propensas. Sugere-se, assim, que elementos individuais, genéticos e/ou fisiológicos, possam influenciar os comportamentos do tipo compulsivo nesses animais.

8 ESTUDO 3: EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO À DIETA DE CAFETERIA NA AQUISIÇÃO DE UM COMPORTAMENTO DE PREFERENCIA-POR-LUGAR CONDICIONADO À COCAÍNA (CPP)

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, o presente estudo teve como objetivo realizar novas adaptações ao protocolo de intermitência a fim de induzir um comportamento do tipo compulsivo nos micos. Além disso, também visou avaliar se a exposição prévia à DC influenciaria na aquisição de um comportamento de CPP induzido pela cocaína.

Tabela 7: Principais diferenças metodológicas no protocolo de intermitência entre os Estudos 1, 2 e 3.

| Parâmetro | Estudo 1 | Estudo 2 | Estudo 3 |
|--------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Horário | 12:30 - 17:30 h | 07:00 - 09:30 h | 12:30 – 15:00 |
| Duração | 15 min | 30 min | 30 min |
| Tipo de dieta | bala + fruta | DC + fruta | DC OU fruta |
| Gênero | machos e fêmeas | fêmeas | fêmeas |
| Grupos | LR e HR | HR e GC | HR e GC |
| Divisão dos grupos | peso + consumo | peso | aleatória |
| Alimento teste | 3x semana | 2x semana | 2x semana |
| Período exposição | 4 semanas | 7 semanas | 6 semanas |
| Local do teste | Caixa AL | Caixa AL | Viveiro |

Caixa AL= caixa de alimentação; LR=*Low restriction* (animais que receberam alimento teste 7x semana); HR=*High restriction* (animais que receberam alimento teste 3x semana); GC (animais que receberam apenas fruta); DC=dieta de cafeteria.

8.1 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1.1 Sujeitos e Condições de Alojamento

Nove fêmeas adultas (>18 meses; >250g) de micos-estrela (*C. penicillata*) foram utilizadas. A manutenção e as condições de alojamento dos animais permaneceram as mesmas descritas no tópico 5.2.

8.1.2 Aparato Experimental

Para o teste de CPP (descrito a abaixo), foi utilizado como aparato a caixa de CPP. Este aparato consistiu em uma arena retangular, dividida em dois compartimentos de iguais dimensões (60 x 60 x 35 cm; largura, comprimento e altura). A caixa de CPP tinha três paredes e um piso feitos de chapa de metal, enquanto o teto e uma parede eram de vidro transparente. Os dois compartimentos eram separados por uma parede de alumínio retrátil (60 x 35 cm; comprimento e altura). Um dos dois compartimentos foi pintado de branco e tinha a superfície interna lisa, o outro apresentava listras diagonais em preto e branco, com superfície rugosa. Além disso, uma antecâmara quadrada (*hall* de entrada – 15 x 10 x 35 cm; comprimento, largura e altura) foi acoplada a caixa de CPP, em frente às portas de entrada/saída de cada um dos compartimentos.

O acesso a essa antecâmara se dava por uma porta do tipo-guilhotina localizada em sua porção posterior. A porta de acesso a antecâmara acoplava-se à caixa de transporte (35 x 20 x 23 cm; comprimento, largura e altura). A caixa de transporte era de alumínio e também possuía uma porta tipo-guilhotina que se acoplava diretamente a porta de acesso de entrada/saída do aparato. 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 (Figura 18).

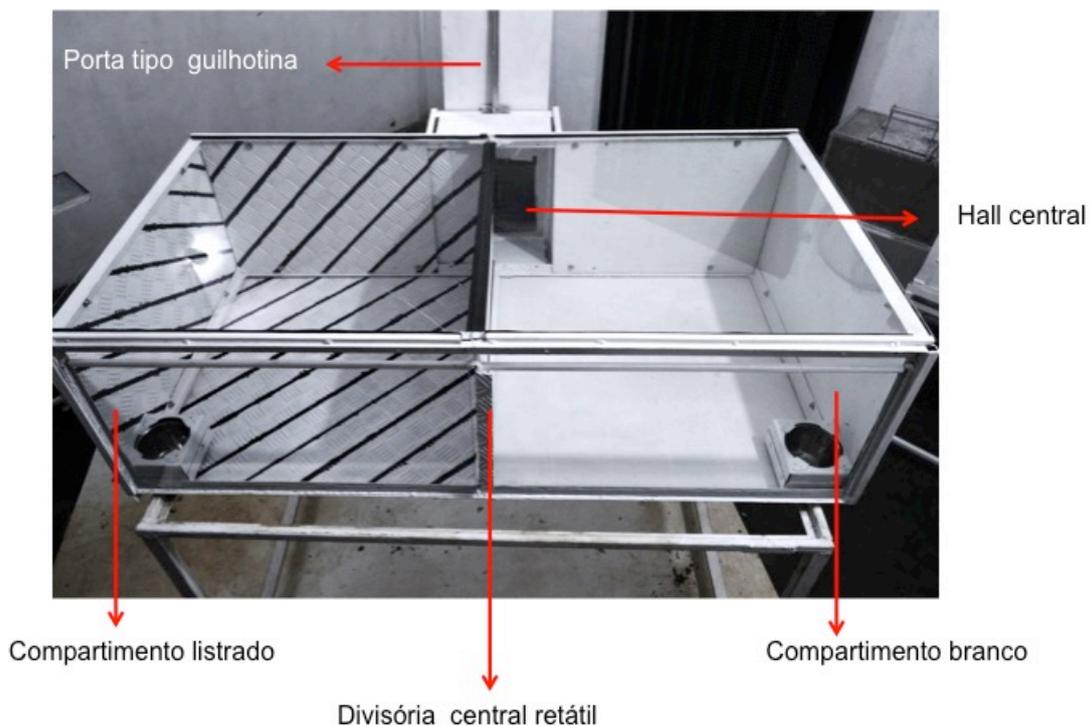


Figura 18: Fotografias da caixa de CPP.

8.1.3 Droga e Dose

Foi utilizado hidrocloreto de cocaína (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 3mg/Kg dissolvida em solução salina (0,9%), administrada via intraperitoneal, e em um volume de 1mL/Kg, 5 min antes do condicionamento na caixa de CPP. Em dias alternados os animais receberam injeções de solução salina (0,9%/1mL/Kg).

8.1.4 Procedimento

O presente estudo foi dividido em duas fases, descritas a seguir. Os testes foram realizados entre 13:00 e 15:00 h. Para melhor ilustrar o delineamento experimental, *vide* apêndice C com a representação esquemática do Estudo 3.

8.1.4.1 Fase 1: Teste de Acesso Intermitente à DC no viveiro

Cada sessão teve duração de 30 min e os animais permaneceram nos seus viveiros de moradia durante a realização das sessões. Os respectivos parceiros foram capturados e colocados em uma gaiola (30 x 40 x 60 cm), sendo esta posicionada na parte posterior do próprio viveiro do animal. A gaiola permaneceu no

viveiro durante esta fase do experimento e o parceiro foi liberado ao final da sessão experimental. Mas durante as sessões, os animais mantiveram contato visual e olfativo com o seu parceiro, porém, apenas o animal experimental teve acesso ao alimento teste possibilitando assim a quantificação da ingestão da DC para o grupo experimental ou das frutas para o grupo controle. Os sujeitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos e foram submetidos ao protocolo de acesso intermitente ao alimento altamente palatável ou apenas fruta:

High Restriction (HR) – alta restrição à DC: acesso livre à DC no seu próprio viveiro durante 30 minutos duas vezes por semana (segundas e quintas-feiras) ao longo de seis semanas consecutivas. A DC foi disponibilizada em recipientes semelhantes aos das frutas e posicionada em um suporte fixado na tela frontal do viveiro. No restante dos dias, os animais permaneceram com sua dieta regular de frutas e ração e não foram privados de alimentos.

Grupo Controle (GC): sem acesso à DC: submetido ao mesmo procedimento que os animais do grupo HR, no entanto, apenas frutas foram disponibilizadas no viveiro durante 30 minutos ao longo de seis semanas consecutivas. Nos demais dias da semana, sua dieta regular de frutas e ração foi mantida e não houve privação alimentar.

Os animais do grupo HR receberam DC de forma intermitente e ao fim de seis semanas foi comparado a quantidade em Kcal ingerida na primeira e na última semana para ambos os grupos. Para investigar se os animais desenvolveram o comportamento do tipo compulsivo utilizou-se o critério de escalonamento na ingestão alimentar (CORWIN, 2008).

8.1.4.2 Teste de CPP

O acesso à DC foi suspenso depois das seis semanas, sendo que ambos os grupos voltaram a receber apenas sua dieta regular de frutas (das 07:00 às 17:00h). Após 24h do final da fase anterior, todas as fêmeas foram submetidas ao teste de CPP. Esse procedimento foi dividido em três fases descritas abaixo.

8.1.4.2.1 Habituação ao Aparato

Nessa primeira fase, cada sujeito foi submetido a duas sessões de habituação, com 20 minutos de duração, em intervalos de 24h entre si. Durante cada sessão, as fêmeas puderam explorar simultaneamente os dois compartimentos, uma vez que a porta central (retrátil) permaneceu semiaberta. Nenhum fármaco foi administrado nessa fase, tampouco houve exposição à DC.

8.1.4.2.2 Condicionamento

Como nenhuma preferência inata por um dos dois compartimentos do aparato foi encontrada (vide Resultados abaixo), metade das fêmeas foram randomicamente condicionadas à cocaína no compartimento branco e a outra metade no compartimento listrado. Todos os indivíduos foram submetidos diariamente a uma sessão na caixa de CPP. Em dias alternados, os sujeitos receberam uma injeção de cocaína ou salina e após 5 min foram confinados em um dos compartimentos e permaneceram lá por 20 minutos. No total, doze sessões de condicionamento (seis sessões de cocaína C1-C6) e seis sessões alternadas de salina (S1-S6) foram realizadas em intervalos de 24h. Os comportamentos foram registrados e posteriormente analisados.

8.1.4.2.3 Teste

Três sessões testes foram realizadas. A primeira ocorreu depois da terceira sessão de condicionamento com salina (S3) e a segunda após a sexta e última sessão de salina (S6). Os testes ocorrem 24h após a sessão de salina. A terceira sessão teste ocorreu 15 dias após a última sessão de salina (S6).

Nas sessões teste, a porta retrátil que divide os dois compartimentos permaneceu semi-aberta permitindo que os sujeitos explorassem ambos os compartimentos simultaneamente. O tempo de permanência em cada compartimento, bem como o comportamento foram registrados e analisados posteriormente.

8.2 ANÁLISE DE DADOS

O consumo foi comparado para possíveis diferenças entre os grupos e ao longo das diferentes sessões/semanas empregando-se uma análise de variância de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*), sendo 'grupo' o fator independente e 'sessão' o de amostras repetidas. Quando resultados significativos foram obtidos, os dados foram analisados *post hoc* com o teste de Tukey.

Em relação ao procedimento de CPP, nas duas sessões de habituação (H1-H2), nas sessões de condicionamento 1 e 6 (C1/S1 e C6/S6) e nas três sessões de teste (T1-T3) foi utilizado o programa AnyMaze (Stoelting Co., EUA) para registrar o comportamento. Os comportamentos registrados de forma automática pelo programa foram a distância total percorrida e o tempo de permanência em cada compartimento. Ademais, um observador com confiabilidade intra-observador de 95% registrou de forma manual os seguintes comportamentos: (1) exploração: frequência de cheirar, morder e/ou lambe o aparato; e (2) vigilância: duração de movimentos de varredura da cabeça enquanto o animal permaneceu imóvel.

Os comportamentos de vigilância, exploração, distância percorrida, tempo de permanência nos compartimentos branco e listrados foram comparados via análise de variância de desenho misto (*two-way mixed design ANOVA*), sendo 'grupo' o fator independente e 'sessão' o de amostras repetidas. Para avaliar se houve CPP, comparou-se o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga na última sessão de habituação com o tempo de permanência no mesmo compartimento nos testes 1 à 3 (H2 vs. T1,T2,T3). Quando resultados significativos foram obtidos, os dados foram analisados *post hoc* com o teste de Tukey. Em todos os testes foi adotado para o nível de significância um valor de $p \leq 0,05$.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Fase 1: Acesso intermitente à Dieta de Cafeteria no viveiro

Uma diferença significativa no consumo calórico entre os grupos HR e GC foi observada ($F_{1,7}=19,55$; $p=0,003$), sendo que HR consumiu mais DC (em Kcal) do que o GC consumiu em termos de fruta (em Kcal). Não houve diferença significativa entre as semanas ($F_{1,7}=0,87$; $p=0,38$), nem uma interação entre os fatores grupo vs. semana ($F_{1,7}=0,13$; $p=0,72$; Figura 19).

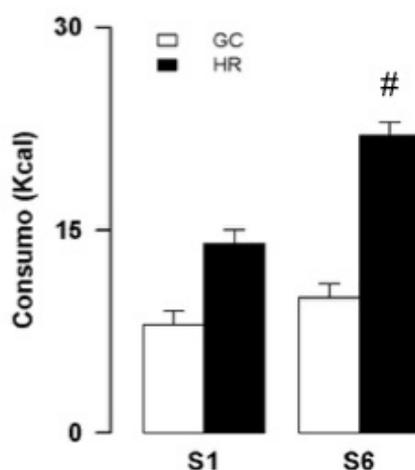


Figura 19: Consumo calórico semanal (média+EPM) de dieta de cafeteria pelo grupo HR (n=4) e de fruta pelo grupo controle (n=5) na primeira e na última semana do protocolo de intermitência (S1 e S6). * $p<0,05$ HR vs. GC.

8.3.2 Fase 2: Teste de CPP

Na fase de habituação ao aparato (Tabela 8), os parâmetros comportamentais avaliados mantiveram-se constantes entre a primeira e última sessão (*Distância percorrida* – fator grupo: $F_{1,7}=0,32$; $p=0,58$; fator sessão: $F_{1,7}=0,95$; $p=0,36$; grupo vs sessão: $F_{1,7}=0,57$; $p=0,47$; *Vigilância* – fator grupo: $F_{1,8}=0,42$; 0,53; fator sessão: $F_{1,8}=1,79$; $p=0,21$; grupo vs. sessão: $F_{1,8}=0,01$; $p=0,99$; *Exploração aparato* – fator grupo: $F_{1,7}=0,40$; $p=0,54$; fator sessão: $F_{1,7}=0,27$; $p=0,61$; grupo vs. sessão: $F_{1,7}=0,27$; $p=0,61$).

Tabela 8: Resposta comportamental de micos-estrela fêmeas observada na fase de habituação à caixa de CPP.

| Parâmetro | Sessões de habituação | |
|--------------------------|-----------------------|--------|
| | H1 | H2 |
| Distância percorrida (m) | | |
| GC | 40±19 | 38±16 |
| HR | 47±12 | 40±3 |
| Vigilância (s) | | |
| GC | 265±38 | 349±88 |
| HR | 223±12 | 272±69 |
| Exploração do aparato | | |
| GC | 12±3 | 12±3 |
| HR | 17±4 | 19±7 |

H1-H2; habituação 1 e 2; GC: grupo controle (n=5); HR: *high restriction* (n=4).

O tempo de permanência nos compartimentos branco e listrado na última sessão de habituação (H2) foi semelhante entre os grupos, demonstrando que não havia uma preferência inicial por um dos lados do aparato ($F_{1,8}=0,004$; $p=0,94$; Figura 20).

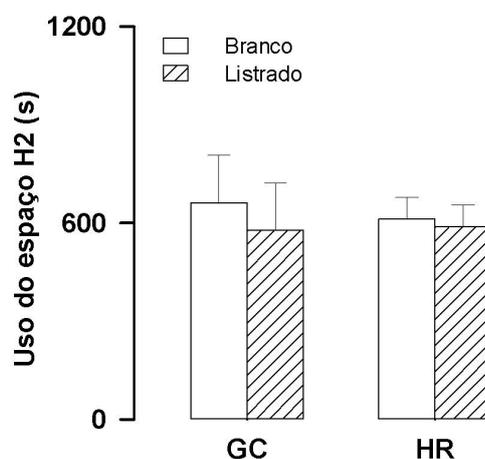


Figura 20: Tempo de permanência (média+EPM; segundos) de micos-estrelas fêmeas nos compartimentos branco e listrado da caixa de CPP na última sessão de habituação (H2); n=5/grupo. GC=grupo controle (n=5); HR=*high restriction* (n=4).

Para o teste de CPP, foi comparado o tempo de permanência no compartimento pareado à cocaína na fase de pré-condicionamento (H2) com o tempo nas sessões testes 1 a 3 (T1-T3). Observou-se uma diferença significativa entre as sessões ($F_{3,24}=10,93$; $p=0,002$), mas nenhum efeito significativo em termos do fator grupo ($F_{1,8}=0,74$; $p=0,41$) ou uma interação entre os fatores grupo vs. sessão ($F_{3,24}=0,89$; $p=0,41$; Figura 21).

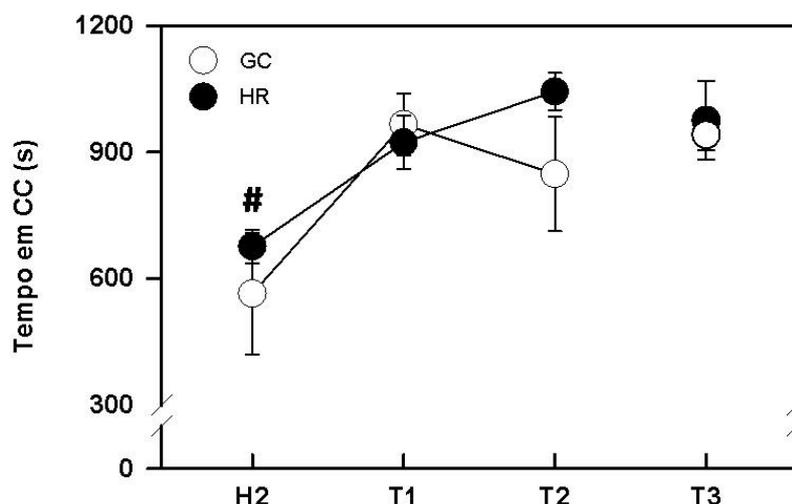


Figura 21: Tempo de permanência no compartimento pareado à cocaína (em segundos; média±EPM) na fase pré condicionamento (H2) e nas três sessões testes (T1 – T3) para os grupos controle (GC; n=5) e *high restriction* (HR, n=4). T1 e T2 foram realizados após três e seis sessões de condicionamento respectivamente. T3 ocorreu 15 dias após a última sessão de condicionamento com salina. Nenhuma injeção foi administrada nas sessões teste. # $p < 0,05$ H2 vs. T1, T2 e T3.

O efeito da cocaína no comportamento de vigilância foi analisado e foi observado efeito significativo entre as sessões ($F_{3,18}=15,18$; $p=0,002$), mas não entre os grupos ($F_{1,6}=0,09$; $p=0,77$) ou uma interação entre os fatores grupo vs. sessão ($F_{3,18}=0,28$; $p=0,68$). Em relação à distancia total percorrida, não houve diferenças significativas em nenhum aspecto (fator grupo: $F_{1,7}=0,42$; $p=0,53$; fator sessão: $F_{3,21}=0,17$; $p=0,76$; grupo vs sessão: $F_{3,21}=0,32$; $p=0,65$; Figura 22).

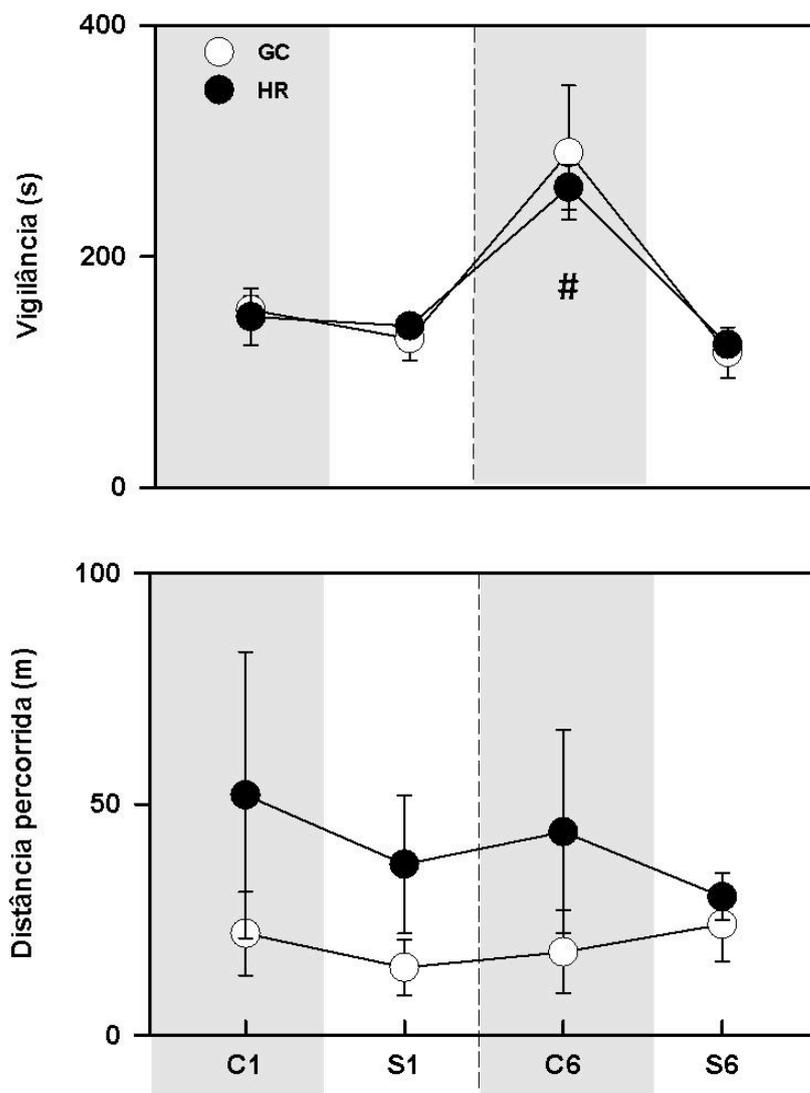


Figura 22: Média (\pm EPM) da duração da vigilância (em segundos) e distância total percorrida (em metros) na primeira (C1) e na última (C6) sessão de condicionamento com cocaína e na primeira (S1) e na última (S6) sessão de condicionamento com salina pelas fêmeas de micos-estrela dos grupos controle (GC; não expostas previamente à dieta de cafeteria; $n=5$) e teste (HR; expostas à 2 sessões semanais de acesso à dieta de cafeteria durante 6 semanas consecutivas; $n=4$). # $p<0,05$ cocaína vs. Salina.

Ademais, foi realizado um teste de correlação entre o consumo calórico médio na Semana 6 com o tempo de permanência no compartimento pareado à cocaína em cada uma das sessões teste, porém não se observou um efeito significativo (*grupo GC* – S6xT1: $r=0,04$; $p=0,95$; S6xT2: $r=0,45$; $p=0,44$; S6xT3: $r=0,30$; $p=0,62$; *grupo HR* – S6xT1: $r=0,27$; $p=0,65$; S6xT2: $r=0,59$; $p=0,28$; S6xT3: $r=0,40$; $p=0,50$).

Por fim, o consumo calórico médio ingerido na última semana (S6) também foi correlacionado à duração da vigilância e da distância percorrida na primeira (C1) e na última (C6) sessão de condicionamento à cocaína, também não havendo efeitos

significativos (*Vigilância*: GC – S6xC1: $r=0,43$; $p=0,46$; S6xC6: $r=0,63$; $p=0,25$; HR – S6xC1: $r=0,77$; $p=0,12$; S6xC6: $r=0,84$; $p=0,07$. *Distância percorrida*: GC –S6xC1: $r=0,01$; $p=0,98$; S6xC6: $r=0,10$; $p=0,86$. HR –S6xC1: $r=0,80$; $p=0,10$; S6xC6: $r=0,71$; $p=0,17$).

8.4 DISCUSSÃO

A DC, oferecida de forma intermitente às fêmeas de micos-estrela no seus próprios viveiros de moradia, gerou um escalonamento no consumo. As fêmeas do grupo HR consumiram mais DC na última semana (S6), comparada com a primeira (S1). Além disso, o grupo HR consumiu mais Kcal de alimento nas sessões da primeira e da última semana do estudo (S1 e S6), comparado as fêmeas do grupo GC.

O acesso restrito e intermitente a alimentos palatáveis pode gerar comportamentos do tipo compulsivos, sugerido pelo escalonamento da ingestão ao longo do tempo. Em roedores, isso vem sendo demonstrado por vários grupos de pesquisa (CORWIN, AVENA e BOGGIANO, 2011; CORWIN e BABBS, 2012; BLAKE, MORGAN e MERCER, 2014; OSWALD e cols., 2011). O padrão alimentar de indivíduos com transtorno de compulsão alimentar tem como uma das suas principais características a intermitência, em que alimentos proibidos não são consumidos diariamente e sim em excesso durante episódios pontuais e recorrentes de compulsão (GUERTIN 1999; KALES, 1990).

Diferentes regimes de oferta e de tempo de acesso são capazes de alterar o comportamento alimentar de forma a induzir um comportamento do tipo compulsivo (CORWIN, AVENA e BOGGIANO, 2011), mas, independente do procedimento e modelo animal utilizados, uma característica comum é a intermitência. Esse fator pode estar levando a um perfil de compulsão em razão da incerteza associada a oportunidades futuras de acesso ao alimento palatável (fator aprendizagem), ainda que a alimentação regular esteja facilmente acessível (CORWIN, 2011). Ademais, um esquema de reforço intermitente é um dos mais difíceis de serem extintos (BOUTON, 2004).

Manter os animais em seus viveiros em vez de transportá-los para serem testados na caixa AL parece ter sido um aspecto importante para o fato de apenas nesse terceiro estudo ter ocorrido o escalonamento no consumo do alimento teste, e assim um comportamento do tipo compulsivo. Em geral, micos demonstram uma típica curva de habituação a exposições repetidas a um ambiente novo, caracterizado principalmente pela diminuição da atividade locomotora e exploratória, e às vezes de um aumento concomitante nos níveis de vigilância (BARROS e cols.,

2004). Apesar da realização de uma fase de habituação à caixa AL ter sido feita nos estudos anteriores, é possível que esse ambiente *per se* e/ou o procedimento de captura e transporte que também são requeridos para levar o sujeito até o ambiente de teste, não sofreram adaptação suficiente e ainda constituíram em procedimentos aversivos ao menos para alguns sujeitos. O isolamento social na caixa AL pode também representar outra fonte de estresse em micos, principalmente em se tratando de períodos acima de 20-30 min (NORCROSS e NEWMAN, 1999). Um estresse agudo, por sua vez, pode, dentre outras funções, diminuir a ingestão de alimentos (MAJZOUN, 2006). Além disso, como não foi possível analisar os níveis do hormônio cortisol, não há um índice fisiológico dos níveis de estresse das fêmeas investigadas. Sabe-se na verdade que as respostas comportamental e fisiológica a situações de medo, ansiedade e estresse nessa espécie nem sempre demonstram o mesmo curso temporal (NORCROSS E NEWMAN, 1999; RUKSTALIS e FRENCH, 2005). Portanto, é possível que o ambiente familiar do viveiro de moradia empregado nesse estudo tenha propiciado mais facilmente o desenvolvimento de um comportamento alimentar do tipo compulsivo por minimizar possíveis fontes de estresse agudo em calitriquídeos.

Depois de seis semanas de acesso à DC ou à fruta, as fêmeas foram submetidas ao teste de CPP. Nas sessões teste, ambos os grupos permaneceram mais tempo no compartimento que havia sido condicionado à cocaína, comparado aos níveis observados nesse mesmo lado do aparato antes da administração do psicoestimulante (H2 x T1-T3). O comportamento de CPP se manteve presente e nos mesmos níveis por pelo menos 15 dias após o último condicionamento, mesmo na ausência de contato com a droga e o aparato, demonstrando assim ter um efeito duradouro. Ainda, não foi observada uma correlação entre o consumo calórico medido na Semana 6 com a resposta de CPP observada nas sessões teste. Dessa forma, a pré-exposição a uma DC e/ou a indução de um comportamento alimentar do tipo compulsivo nos micos, não parece influenciar a aquisição, magnitude e duração da resposta de CPP.

A cocaína é uma droga com alto poder reforçador, e é capaz de induzir uma resposta de CPP (revisado em TZSCHENTKE, 2007). Em um estudo recente usando micos-estrela machos, foi observado que uma dose de 3mg/Kg era capaz de induzir um efeito de CPP, mesmo sem os animais terem sido pré-expostos a um alimento altamente calórico/palatável (BORGES e cols., 2015). Com essa mesma

dose, os micos do presente estudo não apresentaram um perfil de hipervigilância, conforme já foi observado em trabalhos anteriores com essa mesma espécie (BORGES e cols., 2015). Em outras espécies de primatas, uma dose de 4mg/Kg aumentou progressivamente a vigilância após administração repetidas de cocaína (FARFEL e cols., 1992). Porém, há relatos de que a administração repetida de cocaína em doses maiores (5 e 7mg/Kg) em micos-estrela gera um aumento gradual da vigilância nesses primatas, conforme também observado no Estudo 2 (CAGNI e cols., 2012; MELAMED e cols., 2013).

Nem todos os animais expostos a alimentos palatáveis desenvolvem comportamentos do tipo compulsivo (BOGGIANO e cols., 2007; OSWALD e cols., 2011), da mesma forma que nem todos os indivíduos com compulsão alimentar serão obesos e vice-versa (BOGGIANO e cols., 2007). O fato de os micos apresentarem um escalonamento na ingestão, consistente com estudos em roedores, não necessariamente fez com eles tivesse uma resposta diferenciada de CPP induzido pela cocaína.

O presente estudo também avaliou se a DC oferecida de forma restrita e intermitente as fêmeas de micos-estrelas poderia influenciar a aquisição de uma resposta de CPP por baixas doses de cocaína. Os animais que foram pré-expostos à DC apresentaram o comportamento de CPP na mesma velocidade e na mesma magnitude que animais controles (acesso à fruta). Vitale e cols., (2002) relataram que, em ratos, o acesso crônico a sacarose aumenta o valor reforçador (medido pelo teste de CPP) tanto de anfetamina quanto de fentanil (opióide).

O comportamento de CPP também já foi empregado em modelos animais utilizando alimentos palatáveis (LATAGLIATA e cols., 2010; DUARTE e cols., 2014), ou seja, alguns tipo de alimentos possuem uma propriedade reforçadora maior que outros. No entanto, os indivíduos podem viver sem drogas, mas jamais sem alimentos. Então, sugere-se que não é o alimento per se que gera comportamentos patológicos e sim a maneira e a intensidade de como eles são consumidos.

8.5 CONCLUSÃO DO ESTUDO 3

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar que primatas não-humanos de pequeno porte, como o mico-estrela, são capazes de desenvolver comportamentos do tipo compulsivo. No entanto, apesar de apresentarem esse comportamento, sua susceptibilidade para desenvolver um comportamento de CPP por cocaína não foi alterada/influenciada.

Após várias adaptações metodológicas de procedimento largamente empregado em roedores, o presente estudo foi o primeiro a desenvolver uma metodologia para induzir um comportamento do tipo compulsivo em primatas não-humanos de pequeno porte (*C. penicillata*). Um modelo de comportamento alimentar compulsivo em um animal que realiza comportamentos semelhantes aos dos humanos é de suma importância para o entendimento das bases neurais, bem como a busca de tratamentos eficientes, uma vez que há indícios de que os mesmos mecanismos neurais envolvidos nesse distúrbio também estão envolvidos na dependência por drogas de abuso.

Por meio dessas adaptações metodológicas, foi possível observar escalonamento no consumo, portanto, caracterizar, com base nos protocolos que fundamentaram esse estudo, comportamento do tipo compulsivo. Esse resultado, no entanto, deve ser observado com cautela, uma vez que, se compulsão alimentar é definida por um consumo excessivo em um curto espaço de tempo, houve consumo em grande quantidade nos três estudos.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a desenvolver uma metodologia para o estudo de comportamento alimentar do tipo compulsivo em primatas não-humanos de pequeno porte (*Callithrix penicillata*). No Estudo 3, observou-se um escalonamento na quantidade de alimento consumido ao longo das semanas para aqueles indivíduos que receberam de forma intermitente uma dieta de cafeteria no seu próprio viveiro. Esse critério de escalonamento é comumente empregado em estudos similares com roedores para o estabelecimento do comportamento alimentar compulsivo. No entanto, esse resultado deve ser visto com cautela, uma vez que, se compulsão alimentar é definida por um consumo excessivo em um curto espaço de tempo, houve de fato um consumo elevado do alimento teste nos três experimentos realizados presentemente nos micos.

O protocolo de acesso intermitente a um alimento opcional, que facilmente leva roedores a desenvolverem comportamentos do tipo compulsivo, só foi estabelecido nos micos quando:

1) se testou apenas fêmeas, reforçando evidências em roedores e humanos que esse gênero apresenta uma maior predisposição a desenvolver comportamentos alimentares patológicos;

2) o alimento altamente palatável foi disponibilizado em um ambiente altamente familiar (viveiro de moradia), sugerindo que o respostas emocionais de medo/ansiedade induzidas pela exposição à um ambiente desconhecido pode influenciar o comportamento alimentar dessa espécie (Estudo 3). De fato, o consumo de bala de banana no Estudo 1 não aumentou quando os animais estavam privados de alimentos por 24h (estresse fisiológico agudo). O estresse causado pelo confronto com o predador diminuiu o consumo da bala, em ambos os gêneros, mas aumentou o consumo de fruta apenas para as fêmeas;

3) o acesso ao alimento se deu de forma mais restrita (duas vezes por semana);

4) o intervalo de acesso foi por um período mais prolongado (30 min);

5) o alimento teste consistiu em vários tipos de itens para considerar possíveis preferências individuais (dieta de cafeteria); e

6) o alimento foi disponibilizado num horário do dia em que os animais tivessem grande probabilidade de estarem saciados, evitando assim a interferência de um consumo para manutenção da homeostase energética.

A identificação de dois perfis distintos de fêmeas de micos-estrela, propensas e não-propensas à hiperfagia (Estudo 2), é um dado relevante e pode ser uma medida para identificar sub-groups de indivíduos nessa espécie. Assim, para uma melhor análise, o estudo de comportamento alimentar patológico em animais têm de levar em consideração características da espécie e também do comportamento individual do sujeito. Tal aspecto corrobora dados epidemiológicos em humanos, que indicam que nem todas as pessoas expostas a determinados alimentos irão adquirir um comportamento alimentar compulsivo. Há na verdade uma susceptibilidade maior de alguns sujeitos, e isso deve ser explorado melhor em estudos futuros.

Além disso, no presente estudo, foi observado que fêmeas de micos-estrela classificadas como propensas à hiperfagia também tiveram uma maior resposta de hipervigilância quando essa foi induzida pela administração repetida e sistêmica de cocaína (Estudo 2). Isso corrobora a idéia da existência de mecanismos neurais comuns para diferentes tipos de comportamentos compulsivos e, possivelmente, da dependência.

Por outro lado, mesmo com escalonamento no consumo, a pré-exposição à DC não teve efeito relevante no desenvolvimento de um comportamento de CPP induzido pela cocaína (Estudo 3). O número reduzido de sujeitos nesse estudo impediu a identificação de fêmeas propensas ou não-propensas à hiperfagia, o que poderia ter ajudado na elucidação das diferentes respostas ao teste de CPP. É importante ressaltar porém, que nos Estudos 2 e 3, que avaliaram a resposta de vigilância e CPP dos micos, respectivamente, empregaram doses diferentes de cocaína. Tal fato pode ter influenciado nas diferenças observadas.

Vale ressaltar a importância do desenvolvimento de um procedimento mais naturalístico possível, que leve em consideração os aspectos fisiológicos e comportamentais da espécie em estudo. Uma das grandes vantagens do atual protocolo é que não requer privação alimentar, assim, garante-se o comportamento hedônico.

Modelos animais continuam sendo a chave para entender os substratos neurobiológicos que medeiam desordens psiquiátricas e assim auxiliar no desenvolvimento de técnicas farmacológicas e/ou comportamentais eficazes para o

seu tratamento. Embora a maioria dos estudos sejam realizados em roedores, é importante levar em consideração que o repertório comportamental, organização social, de hábitos desses animais são mais elementares do que os de primatas não-humanos. Infelizmente há um hiato na transposição de modelos animais à comportamentos humanos. Portanto, ainda existe muito a ser descoberto no que concerne a modelos animais de compulsão alimentar e esse foi o primeiro trabalho demonstrar o comportamento alimentar do tipo compulsivo através do protocolo de acesso restrito e intermitente a um alimento opcional.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abizaid, A.; Liu, Z.W.; Andrews, Z.B.; Shanabrough, M.; Borok, E.; Elsworth, J.D.; Roth, R.H.; Sleeman, M.W.; Picciotto, M.R.; Tschop, M.H.; Gao, X.B.; Horvath, T.L.; Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(12): 3229-39.

Adan, R.A.H.; Vanderschuren L.J.M.J; la Fleur, S.E. Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29. p.208-217.

Ahima, R. S.; Saper, C. B.; Flier, J. S.; Elmquist, J. K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2000; 21: 263–307.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5)*, American Psychiatric Association, Arlington, VA 2013. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 Oct;99(6):581-9. Epub 2004 Nov 18.

Andrade MC, Ribeiro CT, Silva VF, Molinaro EM, Gonçalves MA, Marques MA, Cabello PH, Leite JP. Biologic data of Macaca mulatta, Macaca fascicularis, and Saimiri sciureus used for research at the Fiocruzprimate center.

Arana, F. S.; Parkinson, J. A.; Hinton, E.; Holland, A.J.; Owen, A. M.; Roberts, A. C. Dissociable Contributions of the Human Amygdala and Orbitofrontal Cortex to Incentive Motivation and Goal Selection. *The Journal of Neuroscience*, 23(29): 9632–9638, 2003.

Arce M, Michopoulos V, Shepard KN, Ha Q-C, Wilson ME. Diet choice, cortisol reactivity, and emotional feeding in socially housed rhesus monkeys. *Physiol Behav*. 2010; 101:446–455.

Araujo-Held, M.; Martin, M.L.; de Sousa Almeida, S.; Luscher, B.; Corwin, R.L. Anxiety-related behavior in mice is affected by “bingeing” possible involvement of GABA-A receptors. *FASEB Journal*. 2002;16. p.A283.

Asarian L, Geary N. Sex differences in the physiology of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(11):R1215-67.

Avena NM. The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite*. 2010 Dec;55(3):734-7

Avena NM. Food and addiction: implications and relevance to eating disorders and obesity. *Curr Drug Abuse Rev*. 2011 Sep;4(3):131-2

Avena N.M., Hoebel B.G. Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003a; 74(3):635-9.

Avena NM, Hoebel BG. A diet promoting sugar dependency causes behavioral cross-sensitization to a low dose of amphetamine. *Neuroscience*. 2003b;122(1):17-20.

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

Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Evidence of sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev*: 2008; 32. p.20-39.

Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *J Nutrition*: 2009; 139. p.623-628.

Avena, N.M.; Rada, P.; Hoebel, B.G. Sugar bingeing in rats. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 9: Unit9.23C. 2006.

Bailey A.P., Parker A.G., Colautti L. A., Hart L. M., Liu P., Hetrick S. E. Mapping the evidence for the prevention and treatment of eating disorders in young people. *Journal of Eating Disorders*. 2014; 2:5

Babbs RK, Wojnicki FH, Corwin RL. Effect of 2-hydroxyestradiol on binge intake in rats. *Physiol Behav.* 2011 Jul 6;103(5):508-12.

Babbs RK, Unger EL, Corwin RL. 2-Hydroxyestradiol enhances binge onset in female rats and reduces prefrontal cortical dopamine in male rats. *Horm Behav.* 2013 Jan;63(1):88-96.

Bardo MT, Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl).* 2000 Dec;153(1):31-43.

Banks, W. A.; Burney, B. O.; Robinson, S. M. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides*, 29: 2061–2065, 2008.

Banks, W.A.; Tschop, M.; Robinson, S.M.; Heiman, M.L. 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.

Barsh, G. S.; Schwartz, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics.* 2002; 3: 589–600.

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

Barros, M.; Tomaz, C. Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; 26. p.187-201.

M. Barros, M.A. de Souza Silva, J.P. Huston, C. Tomaz. Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during and after experimentally induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav*, 78. 2004; pp. 357–367

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. *Behav Brain Res.* 2000 Mar;108(2):205-11.

Barros, M.; Mello Jr., E.L.; Maior, R.S.; Müller, C.P.; Souza Silva, M.A.; Carey, R.J.; Huston, J.P.; Tomaz, C. Anxiolytic-like effects of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 in non-human primates. *European Journal Pharmacology*, 482: 197-203; 2003.

Bassareo V, Di Chiara G. Modulation of feeding-induced activation of mesolimbic dopamine transmission by appetitive stimuli and its relation to motivational state. *Eur J Neurosci.* 1999 Dec;11(12):4389-97.

Bassareo, V.; Di Chiara, G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci.* 1997; 17. p.851-861.

Baumann M.H., Gendron T.M., Becketts K.M., Henningfield J.E., Gorelick D.A., Rothman R.B. Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biol Psychiatry.* 1995; 38(11):751-5.

Bello NT, Hajnal A. Dopamine and binge eating behaviors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Nov;97(1):25-33.

Benoit, S.C.; Davis, J.F.; Davidson, T.L. Learned and cognitive controls of food intake. *Brain Research.* 2010; 1350. p.71-78.

Benoit, S.C.; Tracy, A.L. Behavioral controls of food intake. *Peptides.* 2008; p.139-147.

Berke, J. D.; Hyman, S.E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 2000; 25: 515-532.

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

Berridge, K.C.; Ho, C.Y.; Richard, J.M.; DiFeliceantonio, A. G. The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Research*. 2010; 1350: 43–64.

Berridge, K.C.; Ho, C.Y.; Richard, J.M.; DiFeliceantonio, A. G. The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Research*. 2010; 1350: 43–64.

Berthoud H.R. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity*. 2006; 14 Suppl 5:197S-200S.

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

Berthoud, H.R.; Lenard, N. R.; Shin, A. C. Food reward, hyperphagia, and obesity. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 300: 2011,p.1266–1277.

Berthoud H.R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proc. Nutr. Soc.* 2012; 71, 478–487.

Bicca-Marques JC. 2000. Cognitive aspects of within-patch foraging decisions in wild diurnal and nocturnal New World monkeys. Ph.D. thesis, University of Illinois.

Bielert C, Busse C., (1983) Influences of ovarian hormones on the food intake and feeding of captive and wild female chacma baboons (*Papio ursinus*). *Physiol Behav.* 30(1):103-11.

Bisaga A., Danysz W., Foltin R.W. Antagonism of glutamatergic NMDA and mGluR5 receptors decreases consumption of food in baboon model of binge-eating disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008; 18(11):794-802.

Bake T, Morgan DG, Mercer JG. Feeding and metabolic consequences of scheduled consumption of large, binge-type meals of high fat diet in the Sprague-Dawley rat. *Physiol Behav.* 2014;128:70-9.

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

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

Boggiano, M. M.; Chandler, P. C.; Viana, J. B.; Oswald, K.D.; Maldonado, C.R.; Wauford, P.K. Combined dieting and stress evoke exaggerated responses to opioids in binge-eating rats. *Behavioral Neuroscience.* 2005; 119: 1207–1214.

Bonggiano, M. M.; Artiga, A. I.; Pritchett, C. E.; Chandler-Laney, P. C.; Smith, M. L.; Eldridge, A. J. 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.* 2007; 31, 1357–1367, 2007.

Borges AC, Duarte RB, Nogueira L, Barros M. Temporal and dose-dependent differences in simultaneously-induced cocaine hypervigilance and conditioned-place-preference in marmoset monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 2015 Mar 1;148:188-94.

Bouton ME. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem.* 2004 Sep-Oct;11(5):485-94

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

Bray G.A., Ryan D.H. Update on obesity pharmacotherapy. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014; 1311, 1–13.

Broft, A.I.; Spanos, A.; Corwin, R.L.; Mayer, L.; Steinglass, J.; Devlin, M.J.; Attia, E.; Walsh, B.T. Baclofen for binge eating: an open-label trial. *Int J Eat Disorder*. 2007; 40. p.687-691.

Bowling SL1, Bardo MT. Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 Jun;48(2):459-64.

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

Buda-Levin, A.; Wojnicki, F.H.; Corwin, R.L. Baclofen reduces fat intake under binge-type conditions. *Physiol Behavior*. 2005; 15. p.176-184.

Cagni P, Komorowski M, Melo GC, Lima T, Tomaz C, de Souza Silva MA, Huston JP, Barros M. Repeated cocaine administration in marmoset monkeys induces hypervigilance-related behaviors, but no changes in locomotion and cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Dec;103(2):279-83.

Caine NG. Cutting costs in response to predatory threat by Geoffroy's marmosets (*Callithrix geoffroyi*), 1998. *Am J Primatol*. 46(3):187-96.

Cannon, C.M.; Bseikri, M.R. Is dopamine required for natural reward? *Physiol Behavior*. 2004; 81. p.741-748.

Carlson, N.R. *Physiology of Behavior*. 7 ed. Allyn and Bacon: Needham Heights/EUA. 2001.

Carroll ME, Anderson MM, Morgan AD. Higher locomotor response to cocaine in female (vs. male) rats selectively bred for high (HiS) and low (LoS) saccharin intake. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Nov;88(1):94-104

Carter, W.P.; Hudson, J.I.; Lalonde, J.K.; Pindyck, L.; McElroy, S.L. Pope Jr., H.G. Pharmacologic treatment of binge eating disorder. *Int J Eat Disorder*. 2003; 34: p.S74-S88.

Chabrawi, S. ; Barros, M. Conditioned place preference: a new experimental procedure to evaluate mechanisms of drug abuse in nonhuman primates. *Neurobiologia (Recife. Impresso)*, v. 74, p. 159-170, 2011.

Cirulli F1, Laviola G. Paradoxical effects of D-amphetamine in infant and adolescent mice: role of gender and environmental risk factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Jan;24(1):73-84.

Clifton, P.G.; Vickers, S.P.; Somerville, E.M. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*. 1998; 112: 502-11.

Colantuoni C., Rada P., McCarthy J., Patten C., Avena N.M., Chadeayne A., Hoebel B.G. Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence. *Obes Res*. 2002; 10(6):478-88.

Colantuoni, C.; Schwenker, J.; McCarthy, J.; Rada, P.; Ladenheim, B.; Cadet, J.L.; Schwartz, G.J.; Moran, T.H.; Hoebel, B.G. Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport*. 2001. 12. p.3549-3552.

Corwin RL, Grigson PS. Symposium overview--Food addiction: fact or fiction? *J Nutr*. 2009; 139(3):617-9.

Corwin RL. The face of uncertainty eats. *Curr Drug Abuse Rev*. 2011 Sep;4(3):174-81.

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. *Physiol Behav*; 1998; 65:545-53.

Corwin, R.L.; Avena, N.M.; Boggiano, M.M. Feeding and reward: Perspectives from three rat models of binge eating. *Physiol Behavior*. 2011; 104. p.87-97.

Corwin RL, Babbs RK. Rodent models of binge eating: are they models of addiction? *ILAR J*. 2012;53(1):23-34.

Corwin, R.L.; Buda-Levin, A. Behavioral models of binge-type eating. *Physiol Behavior*. 2004; 82. p.123-130.

Corwin, R.L.; Wojnicki, F.H.E. Binge eating in rats with limited access to vegetable shortening. *Curr Prot Neurosci*. 2006. 9.23B. p.1-9.

Cummings, D. E.; Shannon, M. H. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Archives of Surgery*, 138(4): 2003, p.389-96.

Crowther JH, Sanftner J, Bonifazi DZ, Shepherd KL. The role of daily hassles in binge eating. *Int J Eat Disord*. 2001 May;29(4):449-54.

Cunningham CL, Gremel CM, Groblewski PA. Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1662-70.

Dagher, A. (2009). The neurobiology of appetite: Hunger as addiction. *Int. J. Obes. (Lond.)* 33 (Suppl 2), S30–S33.

Dagher, A., and Robbins, T.W. (2009). Personality, addiction, dopamine: Insights from Parkinson's disease. *Neuron* 61, 502–510.

Date, Y.; Murakami, N.; Toshinai, K.; Nijima, 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(4), 2002, p. 1120–1128.

Davidson, T. L. Pavlovian occasion setting: a link between physiological change and appetitive behavior. *Appetite*. 2000; 35: 271-2.

Davidson, T.L.; Morell, J.R.; Benoit, S.C.; Memory and macronutrient regulation. In: Berthoud, H.R.; Seeley, R.J.; (eds.) Neural and metabolic control of macronutrient intake. Boca Raton: CRC Press. 2000; 203-17.

Davidson, T.L.; Kanoski, S.E.; Schier, L.A.; Clegg, D.J.; Benoit, S.C. A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Curr Opin Pharmacol.* 2007. p.613-616.

Davis C, Levitan RD, Carter J, Kaplan AS, Reid C, Curtis C, Patte K, Kennedy JL. Personality and eating behaviors: a case-control study of binge eating disorder. *Int J Eat Disord.* 2008;41(3):243-50.

Davis, J. D.; 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.* 1973; 83: 64. p. 379-387.

Di Chiara, D.; Imperato, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85. p.5274-5278. 1988.

Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, Price JL, Mathis CA. Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry.* 2001 Jan 15;49(2):81-96.

Drewnowski, A.; Krahn, D.D; Demitrack, M.A.; Nairn, K.; Gosnell, B.A. Taste responses and preferences for sweet high-fat foods: evidence for opioid involvement. *Physiology & Behavior.* 1992; 51:371-9.

Duarte, r. B. M. ; Patrono, e. ; Borges, a. C. ; Cesar, a. A. S. ; Tomaz, c ; Ventura, r. ; Gasbarri, a. ; Puglisi-allegria, s. ;Barros, m . Consumption of a highly palatable food induces a lasting place-conditioning memory in marmoset monkeys. *Behavioural Processes (Print).* v. 107, p. 163-166, 2014.

Dye L, Blundell JE. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. *Hum Reprod*; 1997;12: 1142–1151.

Farfel GM, Kleven MS, Woolverton WL, Seiden LS, Perry BD. Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res*. 1992 Apr 24;578(1-2):235-43.

Farooqi, I. S.; Jebb, S. A.; Langmack, G.; Lawrence, E.; Cheetham, C. H.; Prentice, A. M.; Hughes, I. A.; McCamish, M. A.; O’Rahilly, S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England Journal of Medicine*. 1999;341: 879-884.

Farr, S.A.; Banks, W.A.; Morley, J. E. Effects of leptin on memory processing. *Peptides*. 2006; 27 (6):1420-5.

Fei, H.; Okano, H.J.; Li, C.; Lee, G.H.; Zhao, C.; Darnell, R.; Friedman, J. M.; 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*. 1997; 94: 7001–7005.

Feldman, R.S.; Meyer, J.S.; Quenzer, L.F. *Principles of neuropsychopharmacology*. McGraw-Hill, 1997.

Ferraz, M. C.; Matos, A. V. R.; Moraes, L. F.; Orsi, R. O. Ação da própolis sobre as proteínas do soro e aspectos hematológicos em *Callithrix* sp. submetidos ao estresse em cativeiros. *Veterinária e Zootecnia*, 18(1): 70-80, 2011.

Festa ED1, Quinones-Jenab V. Gonadal hormones provide the biological basis for sex differences in behavioral responses to cocaine. *Horm Behav*. 2004 Dec;46(5):509-19.

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

Figlewicz, D.P.; Bennett, J.; Evans, B.S.; Kaiyala, K.; Sipols, A.J.; Benoit, S.C. Intraventricular Insulin and Leptin Reverse Place Preference Conditioned With High-Fat Diet in Rats. *Behavioral Neuroscience*. 2004; 118 (3): 479–487.

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

File S.E. The use of social interactions as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs, 1980. *J Neurosci Methods* 2:219–38.

Foltin R.W. Baclofen decreases feeding in non-human primates. *Pharmacol Biochem Behav.*2005; 82(4):608-14.

Foltin R.W. Consumption of palatable food decreases the anorectic effects of serotonergic, but not dopaminergic drugs in baboons. *Physiol Behav.*2011; 103(5):493-500.

Foltin RW, Evans SM.A novel protocol for studying food or drug seeking in rhesus monkeys.*Psychopharmacology (Berl)*.1997;132(3):209-16.

Foltin, R.W.; Haney, M. Effects of the cannabinoid antagonist SR141716 (rimonabant) and d-amphetamine on palatable food and food pellet intake in non-human primates. *Pharmacol. Biochem Behav.* 2007; 86. p.766-773.

Foltin, R.W. “Tasting and wasting” behavior in non-human primates: Aberrant behavior or normal behavior in “times of plenty”. *Physiol Behavior*. 2006; 89. p.587-597.

Foltin, R.W.; Danysz, W.; Bisaga, A. A novel procedure for assessing the effects of drugs on satiation in baboons: effects of memantine and dexfenfluramine. *Psychopharmacol* . 2008; 199. p.583-592.

Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H, Kimura F, Akema T, Funabashi T. Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. *Front Neurosci*. 2015 Mar 30;9:88.

Funabashi T, Hagiwara H, Mogi K, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F. Sex differences in the responses of orexin neurons in the lateral hypothalamic area and feeding behavior to fasting. *Neurosci Lett*. 2009 Sep 29;463(1):31-4

Galvão-Coelho, N. L.; Silva, H. P. A.; Leão, A. C.; Sousa, M. B. C. 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

Gasbarri A., Pompili A., Packard M.G., Tomaz C. Habit learning and memory in mammals: behavioral and neural characteristics. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 114:198-208.

Gasbarri, A., Pompili, A. Serotonergic 5-HT7 receptors and cognition. *Reviews in the Neurosciences*, *Reviews in the Neurosciences*. 2014; 25: 3, 311–323.

Gasbarri A, Tomaz C. Memory and motivational/emotional processes. *Front Behav Neurosci*. 2012 Nov 2;6:71

Gearhardt, A.N.; Yokum, S.; Orr, P.T.; Stice, E.; Corbin, W.R.; Brownell, K.D. Neural correlates of food addiction. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 68. p.808-816.

Geiger BM, Haburcak M, Avena NM, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN. Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*. 2009;159(4):1193-9.

Goldschmidt AB1, Engel SG, Wonderlich SA, Crosby RD, Peterson CB, Le Grange D, Tanofsky-Kraff M, Cao L, Mitchell JE. Momentary affect surrounding loss of control and overeating in obese adults with and without binge eating disorder. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Jun;20(6):1206-11.

Gosnell B.A. Sucrose intake predicts rate of acquisition of cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000; 149(3):286-92.

Gosnell B.A. Sucrose intake enhances behavioral sensitization produced by cocaine. *Brain Res*. 2005; 1031(2):194-201.

Gulley JM, Hoover BR, Larson GA, Zahniser NR. Individual differences in cocaine-induced locomotor activity in rats: behavioral characteristics, cocaine pharmacokinetics, and the dopamine transporter. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Dec;28(12):2089-101.

Guan, X. M.; Yu, H.; Palyha, O.C; McKee, K.K.; Feighner, S.D.; Sirinathsinghji, D.J.; Smith, R.G. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*.1997, p. 48:23–29.

Guertin TL, Conger AJ. Mood and forbidden foods' influence on perceptions of binge eating. *Addict Behav*. 1999 Mar-Apr;24(2):175-93.

Haedt-Matt, A.A., Keel, P.K. (2011). Revisiting the affect regulation model of binge eating: a meta-analysis of studies using ecological momentary assessment. *Psychol Bull*, 137, pp. 660–681.

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. *Int J Eat Disord*. 2003 Sep;34(2):183-97.

Hagan , M.M.; Wauford, P.K.; Chandler, P.C.; Jarrett, L.A.; Rybak, R.J.; Blackburn, K. A new animal model of binge eating: key synergistic role of past caloric restriction and stress. *Physiol Behavior*. 2002a; 77. p.45-54.

Hagan MM, Shuman ES, Oswald KD, Corcoran KJ, Profitt JH, Blackburn K, Schwiebert MW, Chandler PC, Birbaum MC. Incidence of chaotic eating behaviors in binge-eating disorder: contributing factors. *Behav Med*. 2002b Fall;28(3):99-105.

Hagan, M.M.; Moss, D.E. Persistence of binge-eating patterns after a history of restriction with intermittent bouts of refeeding on palatable food in rats: implications for bulimia nervosa. *Int J Eat Disord.* 1997; 22. p.411-20.

Hajnal, A., Smith, G.P., Norgren, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat, *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004; 286,R31–R37.

Hakansson, M. L.; Hulting, A. L.; 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.* 1996; 8: 733–735.

Hildebrandt BA, Klump KL, Racine SE, Sisk CL. Differential strain vulnerability to binge eating behaviors in rats. *Physiol Behav.* 2014 Mar 29;127:81-6.

Hilbert, A., Tuschen-Caffier, B. Maintenance of binge eating through negative mood: a naturalistic comparison of binge eating disorder and bulimia nervosa. *Int J Eat Disord.* 2007; 40, pp. 521–530.

Honess PE1, Marin CM. Behavioural and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006;30(3):390-412.

Hoebel B.G., Avena N.M., Bocarsly M.E., Rada P. Natural addiction: a behavioral and circuit model based on sugar addiction in rats. *J Addict Med.* 2009 3(1):33-41.

Hoebel BG, Avena NM, Bocarsly ME, Rada P. Natural addiction: a behavioral and circuit model based on sugar addiction in rats. *J Addict Med.* 2009 Mar;3(1):33-41.

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

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

Huston JP1, Silva MA, Topic B, Müller CP. What's conditioned in conditioned place preference? *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Mar;34(3):162-6.

Ifland, J.R.; Preuss, H.G.; Marcus, M.T.; Rourke, K.M.; Taylor, W.C.; Burau, K.; Refined food addiction: a classic substance use disorder. *Med Hypotheses.* 2009; 72. p.518-526.

Jacobi C1, Hayward C, de Zwaan M, Kraemer HC, Agras WS. Coming to terms with risk factors for eating disorders: application of risk terminology and suggestions for a general taxonomy. *Psychol Bull.* 2004 Jan;130(1):19-65.

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

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci.* 2010;13(5):635-41.

Johnson EO, Kamilaris TC, Carter CS, Calogero AE, Gold PW, Chrousos GP. The biobehavioral consequences of psychogenic stress in a small, social primate (*Callithrix jacchus jacchus*). *Biol Psychiatry.* 1996;40(5):317-37.

Jonas J.M., Gold M.S., Sweeney D., Pottash A.L. Eating disorders and cocaine abuse: a survey of 259 cocaine abusers. *J Clin Psychiatry.* 1987; 48(2):47-50.

Kales, E. F. Macronutrient analysis of binge eating in bulimia. *Physiology & Behavior.* 1990; 48:837-840.

Kalivas P.W., Volkow N., Seamans J. Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron.* 2005; 45(5):647-50.

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

Kalivas, P.W.; Duffy, P.; Latimer, L.G. Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987; 242. p.757-763.

Kalra, S.P.; Bagnasco, M.; Otukonyong, E.E.; Dube, M.G.; Kalra, P.S. Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity. *Regulatory Peptides*,111(1-3):1-11, 2003.

Kalra, SP, Kalra PS. Overlapping and interactive pathways regulating appetite and craving.*J Addict Dis.* 2004;23(3):5-21.

Keith DR1, Hart CL, Robotham M, Tariq M, Le Sauter J, Silver R. Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013 Sep;110:117-26.

Kaun K. R., Azanchi R., Maung Z., Hirsh J., Heberlein U. (2011). A *Drosophila* model for alcohol reward. *Nat. Neurosci.* 14, 612–619 10.1038/nn.2805

Kaye W. H., Wierenga C. E., Bailer U. F., Simmons A. N., Bischoff-Grethe A. Nothing tastes as good as skinny feels: the neurobiology of anorexia nervosa. *Trends Neurosci.* 2013; 36, 110–120.

Kelley, A. E.; Baldo, B. A.; Pratt, W. E.; Will, M. J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & Behavior*, 86: 773– 795, 2005.

Kelley, A. E.; Berridge, K.C. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of Neuroscience.* 2002; 22:3306-3311.

Kelley, A. E.; Will, M. J.; Steininger, T. L.; Zhang, M.; Haber, S. N. Restricted daily consumption of a highly palatable food (chocolate Ensure) alters striatal enkephalin gene expression. *European Journal of Neuroscience.* 2003;18: 2592–2598.

Kenny, P. J. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12. 2011, p. 638–651.

Kemnitz JW, Francken GA. Characteristics of spontaneous obesity in male rhesus monkeys. *Physiol Behav.* 1986 Oct;38(4):477-83.

Kim SF. Animal models of eating disorders. *Neuroscience.* 2012; 1;211:2-12.

King, F.A.; Yarbrough, C.J.; Anderson, D.C.; Gordon, T.P.; Gould, K.G. *Primates. Science:* 240. p.1475-1482. 1988.

Kinzl JF, Traweger C, Trefalt E, Mangweth B, Biebl W. Binge eating disorder in females: a population-based investigation. *Int J Eat Disord.* 1999 Apr;25(3):287-92.

Kinzl JF, Traweger C, Trefalt E, Mangweth B, Biebl W. Binge eating disorder in males: a population-based investigation. *Eat Weight Disord.* 1999 Dec;4(4):169-74.

Kiyatkin E.A., Gratton A. Electrochemical monitoring of extracellular dopamine in nucleus accumbens of rats lever-pressing for food. *Brain Res.* 1994, 652(2):225-34.

Klump KL, Racine S, Hildebrandt B, Sisk CL. Sex differences in binge eating patterns in male and female adult rats. . *Int J Eat Disord.* 2013 Nov;46(7):729-36.

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: ,1999, p. 656-660.

Koob GF. Neurocircuitry of alcohol addiction: synthesis from animal models. *Handb Clin Neurol.* 2014;125:33-54

Koob GF, Sanna PP, Bloom FE. Neuroscience of addiction. *Neuron.* 1998 Sep;21(3):467-76.

Koob, JF and Moal. M.L .Drug Addiction, Dysregulation of Reward,and Allostasis. *Neuropsychopharmacology.* 2001; 24,2.

Koob G.F., Buck C.L., Cohen A., Edwards S., Park P.E., Schlosburg J.E., Schmeichel B., Vendruscolo L.F., Wade C.L., Whitfield T.W. Jr, George O. Addiction as a stress surfeit disorder. *Neuropharmacology*. 2014. 76 Pt B:370-82.

Koob, JF and Moal. M.L. Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*: 278 (5335), 52-58.1997.

Koob GF, Zorrilla EP. Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010 Jan;11(1):63-71

Kuhn CM, Koob GF, editors. *Advances in the Neuroscience of Addiction*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010.

Laakso, A.; Mohn, A. R.; Gainetdinov, R.R.; Caron, M.G. Experimental genetic approach to addiction. *Neuron*. 2002; 36:213-228.

Latagliata EC, Patrono E, Puglisi-Allegra S, Ventura R. Food seeking in spite of harmful consequences is under prefrontal cortical noradrenergic control. *BMC Neurosci*. 2010; 8;11:15.

Lavicky, J.; Dunn, A.J. Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J Neurochem*. 1993; 60. p.602-612.

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

Lee, D.M.; Leinung, M.C.; Rozhavskaia-Arena, M.; Grasso, P. Leptin and the treatment of obesity: its current status. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 440:129-39.

Leibowitz S.F., Dourmashkin J.T., Chang G.Q., Hill J.O., Gayles E.C., Fried S.K., Wang J. Acute high-fat diet paradigms link galanin to triglycerides and their transport and metabolism in muscle. *Brain Res*. 2004; 1008(2):168-78.

Levine, A.S., Kotz, C.M., Gosnell, B.A. Sugars and fats: the neurobiology of preference. *J. Nutrition*. 2003; 133. 831-4.

Levy A, Salamon A, Tucci M, Limebeer CL, Parker LA, Leri F. Co-sensitivity to the incentive properties of palatable food and cocaine in rats; implications for co-morbid addictions. *Addict Biol*. 2013 Sep;18(5):763-73.

Lidow, M.S.; Goldman-Rakic, P.S.; Rakic, P.; Innis, R.B. Dopamine D2 receptors in the cerebral cortex: Distribution and pharmacological *characterization* with [3H]raclopride. *Proceed Nat Acad Sci*. 86. p.6412–6416. 1989.

Lutter, M., Nestler, E. J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *Journal of Nutrition*, 2009;139: p. 629–632.

Maffei, M.; Halaas, J.; Ravussin, E.; Pratley, R. E; Lee, G. H.; 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*. 1995; 1:1155-1161.

Maior, RS; Barros, M; Tomaz. C. Contributions of non-human primates to the understanding of cocaine addiction. T. Uehara (Ed.), *Psychiatry disorders — trends and developments*, InTech, Croácia (2011), pp. 339–366

Majzoub, Joseph A. "Corticotropin-releasing hormone physiology." *European Journal of Endocrinology* 155.suppl 1. 2006; S71-S76.

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

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

Mantsch J.R., Schlussman S.D., Ho A., Kreek M.J. Effects of cocaine self-administration on plasma corticosterone and prolactin in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294(1):239-47.

Marinelli M., Piazza P.V. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(3):387-94.

Martel P., Fantino M. Influence of the amount of food ingested on mesolimbic dopaminergic system activity: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 55(2):297-302

Marx, J. Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science*. 2003; 299: 846-9.

Mathes, W.F.; Kimberly A.; Brownley, K.A.; Mo, X.; Bulik. C.M. The biology of binge eating. *Apetite*: 52. p.545-553. 2009.

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*.1999;113: 97–106.

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 Alcohol Depend*. 2013;128(1-2):155-60.

Mello, N.K.; Mendelson, J. H. Cocaine's effects on neuroendocrine systems: clinical and preclinical studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.1997; 57: 571-599.

Mercer, J.G.; Hoggard, N.; Williams, L. M.; Lawrence, C. B.; Hannah, L.T.; 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*. 1996; 387: 113– 116.

Miller, R.E.; Mirsky, I.A.; Caul, W.F.; Sakata, T. Hyperphagia and polydipsia in socially isolated rhesus monkeys. *Science*. 1969; 165. p.1027-1028.

Monclaro, A. ; SAMPAIO, Ana C ; RIBEIRO, Natália B ; BARROS, Marília . Time-of-day effect on a food-induced conditioned place preference task in monkeys. *Behavioural Brain Research*.2014, v. 259, p. 336-341, 2014.

Morton, G.J.; Cummings, D.E.; Baskins, D.G.; Barsh, G.S.; Schwartz, M.V. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006; 21: (7109):289-95.

Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jun;15(6):367-78.

Mueller D, Stewart J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res*. 2000;115(1):39-47.

Murdaugh DL1, Cox JE, Cook EW 3rd, Weller RE. fMRI reactivity to high-calorie food pictures predicts short- and long-term outcome in a weight-loss program. *Neuroimage*. 2012 Feb 1;59(3):2709-21.

Murray S1, Tulloch A1, Gold MS2, Avena NM1. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Sep;10(9):540-52.

Renthal W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*. 2008 Aug;14(8):341-50

Nestler, E.J.; Hyman, S.E.; Malenka, R.C. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. Ed. McGraw-Hill, New York. 2001.

Nestler EJ. Effects of drugs of abuse on the brain during development. Foreword. *Dev Neurosci*. 2009;31(1-2):6.

Nirenberg MJ, Waters C. Compulsive eating and weight gain related to dopamine agonist use. *Mov Disord*. 2006;21:524–529.

Newman J.D., Farley M.J. An ethologically based, stimulus and gender-sensitive nonhuman primate model for anxiety, 1995 *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19:677–85.

Noble EP. Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry*. 2000 Mar;15(2):79-89.

Norcross JL, Newman JD. Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol*. 1999;47(3):209-22.

O'Brein, C.P. Drogagem e Uso Abusivo de Drogas. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Ed. McGraw-Hill, Califórnia. p. 543-562. 2006.

O'Connor, D. B., Jones, F., Conner, M., McMillan, B., e Ferguson, E. (2008). Effects of daily hassles and eating style on eating behavior. *Health Psychology*, 27(Suppl. 1), S20–S31

Olausson P1, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, Nestler EJ, Taylor JR. DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *J Neurosci*. 2006 Sep 6;26(36):9196-204.

Olsen CM. Natural rewards, neuroplasticity, and non-drug addictions. *Neuropharmacology*. 2011 Dec;61(7):1109-2

Oswald KD, Murdaugh DL, King VL, Boggiano MM. Motivation for palatable food despite consequences in an animal model of binge eating. *Int J Eat Disord*. 2011 Apr;44(3):203-11.

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

Parylak, S.L.; Koob, G.F.; Zorrilla, E.P. The dark side of food addiction. *Physiol Behavior*, 2011; 104. p.149-156.

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

Pelchat, M.L. Food addiction in humans. *J Nutrition*. 2009; 139. p.620-622.

Pelchat. M.L. Of human bondage: Food craving, obsession, compulsion, and addiction. *Physiology behavior*. 2002; 76:3, 347–352.

Pelchat ML, Schaefer S. Dietary monotony and food cravings in young and elderly adults. *Physiol Behav*. 2000 Jan;68(3):353-9

Pla-Sanjuanelo J, Ferrer-García M, Gutiérrez-Maldonado J, Riva G, Andreu-Gracia A, Dakanalis A, Fernandez-Aranda F, Forcano L, Ribas-Sabaté J, Riesco N, Rus-Calafell M, Sánchez I, Sanchez-Planell L. Identifying specific cues and contexts related to bingeing behavior for the development of effective virtual environments. *Appetite*. 2015 Apr;87:81-9.

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*. 1999;90(2):433-45.

Pothos EN, Hernandez L, Hoebel BG. Chronic food deprivation decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens: implications for a possible neurochemical link between weight loss and drug abuse. *Obes Res*. 1995 Nov;3 Suppl 4:525S-529S.

Pryce CR, Dettling A, Spengler M, Spaete C, Feldon J. Evidence for altered monoamine activity and emotional and cognitive disturbance in marmoset monkeys exposed to early life stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1032:245-9.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29(4-5):649-74.

Puhl, M. D.; Cason, A. M.; Wojnicki, F. H. E.; Corwin, R. L.; Grigson, P. S. A history of bingeing on fat enhances cocaine seeking and taking. *Behavioral Neuroscience*. 2011;125: 930- 942.

Rada, P.; Avena, N.M.; Hoebel, B.G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neurosci*. 2005. 134. p.737-744.

Roebber, J.K. Izenwasser, S., Chaudhari, N. (2015). Cocaine decreases saccharin preference without altering sweet taste sensitivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* Vol 133, 18–24

Rogers PJ, Smit HJ. Food craving and food “addiction”: A critical review of the evidence from a biopsychosocial perspective. *Pharmacol Biochem Behavior*. 2000; 66:3-14.

Roitman M.F., Stuber G.D., Phillips P.E., Wightman R.M., Carelli R.M. (2004). Dopamine operates as a subsecond modulator of food seeking. *J Neurosci*., 24(6):1265-71.

Rolls ET. Taste, olfactory and food texture reward processing in the brain and obesity. *Int J Obes (Lond)* 2010.

Rolls ET. Functions of the orbitofrontal and pregenual cingulate cortex in taste, olfaction, appetite and emotion. *Acta Physiol Hung*. 2008;95:131–164

Rossetti C1, Spena G, Halfon O, Boutrel B. Evidence for a compulsive-like behavior in rats exposed to alternate access to highly preferred palatable food *Addict Biol*. 2014 Nov;19(6):975-85.

Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S., & Weber, S. M. Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 305, 1–8.

Sanchis-Segura C1, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol.* 2006 Mar;11(1):2-38.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron.* 2002 Oct 10;36(2):199-211.

Sarnyai Z., Mello N.K., Mendelson J.H., Erös-Sarnyai M., Mercer G. Effects of cocaine on pulsatile activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rhesus monkeys: neuroendocrine and behavioral correlates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 277(1):225-34.

Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron.* 2002 Oct 10;36(2):241-63

Schwartz, M. W.; Woods, S. C.; Porte, D. Jr.; Seeley, R. J.; Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404; 2000, p. 661-671.

Schwarz JM, McCarthy MM. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Apr;109(3-5):300-6.

Self D.W., Nestler E.J. Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci.* 1995; 18:463-95.

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

Shalev U., Tylor A., Schuster K., Frate C., Tobin S., Woodside B. Long-term physiological and behavioral effects of exposure to a highly palatable diet during the perinatal and post-weaning periods. *Physiol Behav.*2010; 101(4):494-502.

Silva, M. A. S.; Jocham, G.; Barros, M.; Tomaz, C. A. B. ; Müller, C. P. Neurokinin3 receptor modulation of the behavioral and neurochemical effects of cocaine in rats and monkeys. *Reviews in the Neurosciences*, 19: 101-111, 2008.

Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers.

Sheng Z, Santiago AM, Thomas MP, Routh VH. Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. *Mol Cell Neurosci*. 2014 Sep;62:30-41.

Neuroimage. 2003 Aug;19(4):1709-15.

Small DM. Taste representation in the human insula. *Brain Struct Funct*. 2010;214:551–561.

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*, 21, 2013.

Sousa, M. B. C.; Silva, H. P. A.; Leão, A. C. Sexual differences on behavior and fecal cortisol using the separation paradigm in common marmosets, *Callithrix jacchus*. In: Abstracts, IPS Conference, Beijing, p.94, 2002.

Spangler, R.; Wittkowski, K. M.; Goddard, N. L.; Avena, N. M.; Hoebel, B. G.; Leibowitz, S. F. Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain. *Molecular Brain Research*. 2004; 124:134–142.

Sternson, S.M., Betley, J.N., Cao, Z.F.H. Neural circuits and motivational processes for hunger *Current Opinion in Neurobiology*. Vol 23, June 2013, p. 353–360.

Stoeckel LE1, Weller RE, Cook EW 3rd, Twieg DB, Knowlton RC, Cox JE. Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods. *Neuroimage*. 2008 Jun;41(2):636-47.

Strubbe, J. H.; Woods, S. C. The timing of meals. *Psychological Reviews*. 2004,111: 128–141.

Swanson, S.A.; Crow, S.J.; Le Grange, D.; Swendsen, J.; Merikangas, K.R. Prevalence and correlates of eating disorders in adolescents: results from the

national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 68. p.714-723.

Tang DW, Fellows LK, Small DM, Dagher A. Food and drug cues activate similar brain regions: a meta-analysis of functional MRI studies. Tardif, S.D.; Carson, R.I.; *Physiol Behavior*. 2012; 106(3):317-24.

Tomasi D, Wang GJ, Wang R, Caparelli EC, Logan J, Volkow ND. Overlapping patterns of brain activation to food and cocaine cues in cocaine abusers: association to striatal D2/D3 receptors. *Hum Brain Mapp*. 2015 Jan;36(1):120-36. doi: 10.1002/hbm.22617. Epub 2014 Aug 21.

Tomaz, C.; Barros, M. Non-human primate models for psychiatric disorders. *Rev Neuroscience*.2008; 19(2-3): p.1-3;

Torres LB, Silva Araujo BH, Gomes de Castro PH, Romero Cabral F, Sarges Marruaz K, Silva Araujo M, Gomes da Silva S, Muniz JA, Cavalheiro EA. The use of new world primates for biomedical research: an overview of the last four decades. *Am J Primatol*. 2010;72(12):1055-61.

Teegarden SL, Bale TL. Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biol Psychiatry*. 2007 May 1;61(9):1021-9.

Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*. 2007 Sep;12(3-4):227-462.

Umberg EN1, Shader RI, Hsu LK, Greenblatt DJ. From disordered eating to addiction: the "food drug" in bulimia nervosa. *J Clin Psychopharmacol*. 2012 Jun;32(3):376-89.

Vanderschuren L.J., Everitt B.J. Behavioral and neural mechanisms of compulsive drug seeking. *Eur J Pharmacol*. 2005; 526(1-3):77-88.

Velázquez-Sánchez C., Ferragud A., Moore C.F., Everitt B.J., Sabino V., Cottone P. High trait impulsivity predicts food addiction-like behavior in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39(10):2463-72.

Velázquez-Sánchez C, Santos JW, Smith KL, Ferragud A, Sabino V, Cottone P. Seeking behavior, place conditioning, and resistance to conditioned suppression of feeding in rats intermittently exposed to palatable food. *Behav Neurosci*. 2015 Apr;129(2):219-24

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. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(4):604-7.

Venton B.J., Seipel A.T., Phillips P.E., Wetsel W.C., Gitler D., Greengard P., Augustine G.J., Wightman R.M. Cocaine increases dopamine release by mobilization of a synapsin-dependent reserve pool. *J Neurosci*. 2006; 26(12):3206-09.

Vezina P., Giovino A.A., Wise R.A., Stewart J. Environment-specific cross-sensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. *Pharmacol Biochem Behavior*. 1989; 32(2):581-4

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R, Gifford A, Wong C, Pappas N. Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry*. 2001 Dec;158(12):2015-21.

Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J., Goldstein R.Z. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem*. 2002; 78(3):610-24.

Volkow N.D., Fowler J.S, Wang G.J. The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest*. 2003; 111(10):1444-51.

Volkow N.D., Li T.K. Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat Rev Neurosci*. 2004; 5(12):963-70.

Volkow, N.D.; Wise, R.A. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci*. 2005; p.555-560.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, Jayne M, Ma Y, Wong C. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci*. 2006 Jun 14;26(24):6583-8.

Volkow N.D., Wang G.J., Fowler J.S., Telang F. Overlapping neuronal circuits in addiction and obesity: evidence of systems pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2008; 363(1507):3191-200.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Baler., R.D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011; 15, p. 37–46.

Volkow N.D., Baler R.D. Neuroscience. To stop or not to stop? *Science*. 2012; 335(6068):546-8.

Volkow N.D., Baler R.D. Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*. 2014; 76 Pt B:235-49.

Wachtman, L.N; Joshua A. Kramer, Andrew D. Miller, Audra Hachey, Elizabeth Curran, Keith G. Mansfield. Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity (Silver Spring)*. 2011 June; 19(6): 1145–1156.

Wang, G.J.; Volkow, N.D.; Telang, F.; Jayne, M.; Ma, J.; Rao, M.L.; Zhu, W.; Wong, C.T.; Pappas, N.R.; Geliebter, A.; Fowler, J.S.; Wong, C.T. Exposure to appetitive food stimuli markedly activates the human brain. *Neuroimage*. 2004; 21. p.1790-1797.

Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK, Fowler JS. Similarity between obesity and drug addiction as assessed by neurofunctional imaging: a concept review. *J Addict Dis*.

Ward KW, Smith BR. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey

to humans. I. Clearance. *Drug Metab Dispos.* 2004 Jun;32(6):603-11.

Weerts, E.; Fantergrossi, W.E.; Goodwin, A.K. The Value of Nonhuman Primates in Drug Abuse Research. *Exp Clin Psychopharmacol.* 2007; 15. p. 309–327.

Wendy Foulds Mathes, Ph.D.,¹ Kimberly A. Brownley, Ph.D.,¹ Xiaofei Mo, M.D.,² and Cynthia M. Bulik. The Biology of Binge Eating. *Appetite.* 2009 Jun; 52(3): 545–553.

White, F.J. Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Ann Rev Neurosc.* 1996; 19. p.405-136.

White, M. A.; Grilo, C. M. Psychometric properties of the Food Craving Inventory among obese patients with binge eating disorder. *Eating Behaviors.* 2005; 6 (3): 239-45.

Wiederman MW, Pryor T. Multi-impulsivity among women with bulimia nervosa. *Int J Eat Disorder.* 1996; 20(4):359-65.

Wise, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience.* 2004; 5: 483–494.

Wise, R.A. Neurobiology of addiction, *Curr. Opin. Neurobiol.* 1996; 6, 243 – 251.

Wojnicki FH, Stine JG, Corwin RL. Liquid sucrose bingeing in rats depends on the access schedule, concentration and delivery system. *Physiol Behav.* 2007; 92(4):566-74.

Wolfe BE, Baker CW, Smith AT, Kelly-Weeder S. Validity and utility of the current definition of binge eating. *Int J Eat Disord.* 2009;42(8):674-86.

Woods, S. C.; Lutz, T. A.; Geary, N.; Langhans, W. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B,* 2006. 361: 1219–1235.

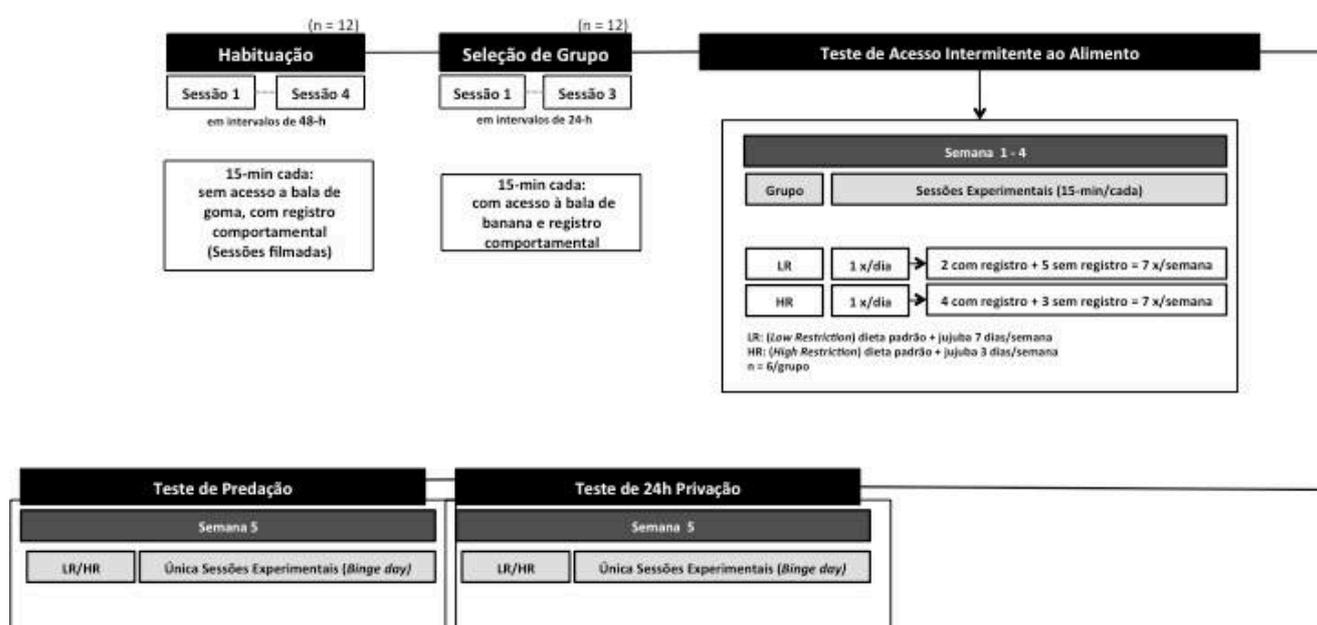
Yanovski, S.Z. Binge eating disorder and obesity in 2003: could treating an eating disorder have a positive effect on the obesity epidemic? *Int J Eat Disord.* 2003; 34. p:S117-S220.

You, Y.; Avery, L. Appetite Control: worm's-eye-view. *Animal Cells Systems (Seoul)*, 16(5): 2012, p. 351–356.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1995; 372, 425–432.

APÊNDICE A – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESTUDO 1

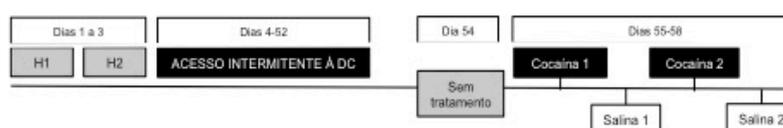
PROTOCOLO EXPERIMENTAL ESTUDO 1.



APÊNDICE B – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESTUDO 2

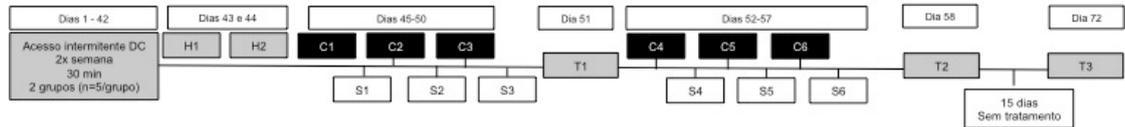
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

ESTUDO 2: Efeito do acesso intermitente à dieta de cafeteria na hipervigilância induzida por cocaína



APÊNDICE C – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ESTUDO 3

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL
ESTUDO 3: Efeito da pré-exposição à dieta de cafeteria na aquisição de um comportamento de preferência-por-lugar condicionada à cocaína (CPP)



ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA)

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 04 de março de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **“DEPENDÊNCIA POR ALIMENTO ALTAMENTE PALATÁVEL E SUA SENSITIZAÇÃO CRUZADA COM A COCAÍNA: UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E HORMONAL EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CALLITHRIX PENICILLATA).”**, UnBDOC n.º 2468/2013, sob responsabilidade da Professora 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

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

Drug and Alcohol Dependence 148 (2015) 188–194



Contents lists available at ScienceDirect

Drug and Alcohol Dependence

journal homepage: www.elsevier.com/locate/drugalcdep

Temporal and dose-dependent differences in simultaneously-induced cocaine hypervigilance and conditioned-place-preference in marmoset monkeys

Aline C. Borges^a, Renata B.M. Duarte^b, Luma Nogueira^a, Marilia Barros^{a,*}^a Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, CEP 70910-900 Brasilia, DF, Brazil^b Primate Center and Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, University of Brasilia, 70910-900 Brasilia, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2014
 Received in revised form 5 January 2015
 Accepted 7 January 2015
 Available online 15 January 2015

Keywords:

Marmoset
 Cocaine
 Hypervigilance
 Place-conditioning
 Long-term effect
 Individual differences

ABSTRACT

Background: Although repeated exposure to cocaine can induce hypervigilance and conditioned-place-preference (CPP) in nonhuman primates (NHPs), more detailed analyses are warranted since the outcome can be influenced by different factors.

Methods: We evaluated in marmoset monkeys (*Callithrix penicillata*): (1) the onset time-course and dose-dependent (3 or 7 mg/kg; i.p.) profile of their hypervigilance and CPP response to repeated cocaine exposure; (2) whether these behavioral measures are still detectable after a 15-day no-drug period; (3) the relationship between their hypervigilance and CPP responses; and (4) if these behavioral changes correlate with pre- and post-drug behaviors (i.e., vigilance, locomotion, exploration), and/or first response to cocaine.

Results: Hypervigilance had a slow-onset, was only effective with the 7 mg/kg dose of cocaine, lacked long-term conditioned effects and was not related to the initial cocaine response or pre-drug behaviors, regardless of the dose tested. CPP was promptly induced with the 3 and 7 mg/kg doses, and had a dose-dependent long-term effect and negative correlation with pre-drug locomotion and exploration. Hypervigilance and CPP were not significantly correlated.

Conclusions: Although hypervigilance and CPP were induced, they had distinct temporal and dose-dependent profiles, and were not equally co-expressed in the same marmoset. Also, in NHPs, pre-drug locomotion and exploration were predictive of the low-dose CPP response.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In nonhuman primates (NHPs), several behavioral, hormonal and neurochemical changes, similar to those observed in humans, occur following repeated exposure to psychostimulants such as cocaine (reviewed in Bradberry, 2007; Mello and Mendelson, 2002). Among their most prominent and consistent behaviors are stereotyped psychotomimetic or hallucinatory-like responses, particularly those related to vigilance (Bradberry, 2007). This response becomes progressively enhanced in different NHP species after both repeated escalating or same-dose regimes (Cagni et al., 2012, 2014; Castner and Goldman-Rakic, 1999, 2003; Castner et al., 2000; Farfel et al., 1992; Kleven and Woolverton, 1990; Melamed et al., 2013; Post et al., 1976; Ridley et al., 1982; Saka et al., 2004),

and may persist for weeks or even months after administrations are discontinued (Castner and Goldman-Rakic, 1999). In terms of cocaine, NHPs will also exhibit hypervigilance when subsequently challenged with this drug some time later, independently from the enhanced locomotion typically seen in rodents (Melamed et al., 2013), with both profiles corresponding to a behavioral sensitization (Vezina and Leyton, 2009). As a result, functional neuroadaptations take place within the brain's reward-circuit, which in NHPs may involve the co-participation of several neurochemical mechanisms besides the putative enhancement of the dopamine system (Bradberry, 2007; Melamed et al., 2013).

Repeated exposure to drugs of abuse, including cocaine, may also lead to environmentally-triggered conditioned responses, such as a conditioned-place-preference (CPP). This effect is based on an associatively-learned preference for certain locations that is acquired in response to having previously experienced a rewarding agent at that same place. In fact, it has become an increasingly prevalent procedure to evaluate aspects of addiction-like behaviors

* Corresponding author. Tel.: +55 61 31072002; fax: +55 61 31072002.
 E-mail address: mbarros@unb.br (M. Barros).