

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Lucas Cardoso Pereira**

**Temperatura da membrana timpânica durante situações de estresse  
e ansiedade em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*):  
um estudo sobre lateralização hemisférica.**

Brasília  
2020

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Lucas Cardoso Pereira**

**Temperatura da membrana timpânica durante situações de estresse  
e ansiedade em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*):  
um estudo sobre lateralização hemisférica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde na área de Neurociências Comportamental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília Barros

Brasília  
2020

**Lucas Cardoso Pereira**

**Temperatura da membrana timpânica durante situações de estresse e ansiedade em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*): um estudo sobre lateralização hemisférica.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde na área de Neurociências Comportamental.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Marília Barros (presidente)  
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Renata Bezerra Duarte  
Secretaria de Educação do Distrito Federal

Prof. Dr. Fábio Viegas Caixeta  
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jorge Luís Lopes Zeredo  
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amato Amorim (suplente)  
Universidade de Brasília

Brasília  
2020

*Dedico a todas vidas que direta ou indiretamente contribuíram para realização de  
nosso trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por me permitir viver e encontrar pessoas sensacionais que, todos os dias, contribuem para realização dos meus objetivos.

Agradeço também aos meus familiares por estarem presentes tanto nos momentos mais fáceis, como nos mais difíceis.

Sou grato à minha orientadora Profa. Marília Barros pois, sem ela, nada seria possível e eu nunca teria percorrido essa jornada tão importante na minha vida, tanto profissional, como pessoal.

Agradeço também a toda equipe de profissionais do Centro de Primatologia da UnB, em especial aos colegas Renata, Clara, Antonizete, Cecília, Almir e Geinaldo, e aos Profs. Clotilde e Rafael.

Agradeço ainda ao CNPq pela bolsa de doutorado e ao Laboratório SABIN de Brasília pelo apoio para a realização dos ensaios hormonais.

## RESUMO

A lateralização hemisférica consiste na ativação assimétrica dos lados direito e esquerdo do cérebro, cada qual assumindo funções distintas. Acredita-se que essa característica, presente no homem e em vários animais, aumenta a capacidade, velocidade e eficiência do processamento de informações. Embora eventos aversivos pareçam ser processados predominantemente pelo hemisfério direito, isso ainda não está totalmente estabelecido na literatura. Ademais, pouco se sabe sobre como situações desse tipo são processadas por micos - um pequeno primata neotropical usado cada vez mais como modelo translacional em pesquisas biomédicas e neuropsicobiológicas. Assim, o presente estudo comparou o padrão de atividade neuronal em micos-estrela (*Callithrix penicillata*) adultos, induzido por diferentes situações potencialmente estressantes e/ou ansiogênicas, visando estabelecer uma possível lateralização hemisférica para tais eventos. A temperatura da membrana timpânica (TMT) – empregada como um indicador indireto e não-invasivo da atividade neuronal hemisférica em tempo real – foi aferida antes e após cada condição experimental: ameaça humana, confronto com predador, estresse de contenção, privação alimentar, isolamento social e exposição à ambientes novos. Alterações na TMT podem refletir uma mudança ipsilateral na temperatura cerebral e no fluxo sanguíneo decorrentes de um aumento na atividade neuronal. Em todas as situações avaliadas, os animais apresentaram uma elevação nos níveis de cortisol. Porém, essa resposta hormonal nem sempre refletiu o que foi visto em termos da resposta comportamental (Estudo 1), diferiu entre machos e fêmeas (Estudo 1), variou em termos da intensidade e da duração do estímulo, com uma diminuição ao longo do tempo (Estudos 2 e 3), e foi atenuada (*buffered*) por interações sociais positivas (Estudo 4). Vale destacar que os diferentes eventos foram, na sua maior parte, processados de forma assimétrica. Uma atividade predominante no hemisfério direito foi vista após os eventos de ameaça humana, confronto com predador e estresse de contenção (Estudos 1 e 2), conforme já relatado na literatura. Além disso, não foi observada uma correlação entre a TMT e as respostas comportamental ou hormonal. Porém, dependendo da natureza e da duração do evento, o processamento de estímulos aversivos em primatas parece ser complexo, podendo ter uma predominância do lado esquerdo ou até mesmo uma ativação bilateral (Estudos 3 e 4). Os resultados corroboram também o uso da TMT como um indicador indireto, rápido, não-invasivo e de baixo custo para avaliar a ativação neuronal em tempo real em animais. Apesar de mais estudos serem necessários para esclarecer os mecanismos responsáveis e o significado funcional da direção na qual a TMT muda (i.e., aumento vs. diminuição), a aferição desse parâmetro poderá contribuir de forma significativa para o nosso conhecimento sobre a lateralização de diferentes funções neurais.

**Palavras-chave:** estresse, ansiedade, temperatura membrana timpânica, cortisol, lateralização hemisférica, mico

## ABSTRACT

Hemisphere lateralization consists in the right and left sides of the brain being activated asymmetrically, each side having distinct functions. This characteristic, seen in humans and several animals, increases information processing capacity, speed and efficiency. Although aversive events seem to be predominantly processed by the right cerebral hemisphere, this has yet to be fully established in the literature. In addition, very little is known about how these types of events are processed by marmosets – a small neotropical primate that is being increasingly used as a translational model in biomedical and neuropsychobiological research. Therefore, the present study compared the pattern of neuronal activity of adult black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*) induced by different potentially stressful and/or anxiogenic conditions in order to establish the possible lateralization of such events. The tympanic membrane temperature (TMT) – an indirect and non-invasive indicator of real-time hemispheric neuronal activity – was assessed before and after each experimental condition: human threat, predatory stress, restraint stress, food deprivation stress, social isolation and exposure to a novel environment. Variations in the TMT can reflect ipsilateral changes in cerebral temperature and blood flow induced by an increase in neuronal activity. On all of the experimental conditions tested, the marmosets' cortisol levels increased. However, this hormonal response did not always reflect what was detected in terms of the behavioral reaction (Study 1), differed between males and females (Study 1), varied according to the intensity and duration of the aversive stimulus, decreasing over time (Studies 2 and 3), and was buffered by positive social interactions (Study 4). Noteworthy, the different aversive events were, for the most part, asymmetrically processed. The right hemisphere was predominantly activated by the human threat, predatory stress and restraint stress conditions (Studies 1 and 2), similar to previous reports in the literature. In addition, the TMT was not related to the behavioral or hormonal response. However, according to the nature and duration of the event, aversive stimuli seem to be processed in a more a complex way than initially envisioned. A left-side bias may be detected, as well as a bilateral activation pattern (Studies 3 and 4). The present results also corroborate the use of the TMT as an indirect, fast, non-invasive and low-cost index of real-time neuronal activity in animals. Although more studies are necessary to fully elucidate the underlying mechanisms and functional significance of the direction in which the TMT changes (i.e., increase vs. decrease), assessment of this parameter may significantly contribute to our understanding about the lateralization of different neuronal functions of the brain.

**Keywords:** stress, anxiety, tympanic membrane temperature, cortisol, hemisphere lateralization, marmoset

## LISTA DE ABREVIATURAS & SIGLAS

AH	Ameaça Humana
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CLIA	<i>Chemiluminescence Immunoassay</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Confronto com Predador
CPUnB	Centro de Primatologia da Universidade de Brasília
CT	Sessão Controle
DF	Distrito Federal
ECI	Estresse de Contenção-Isolamento
EEG	Eletroencefalograma
GC	Grupo Controle
EUA	Estados Unidos da América
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturas Renováveis
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PA	Privados de Alimento
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PNH	Primatas Não-Humanos
PVC	Policloreto de Vinila
RMf	Ressonância Magnética Funcional
SNC	Sistema Nervoso Central
SSH	Sistema Septo-Hipocampal
TMT	Temperatura da Membrana Timpânica
TSC	Temperatura Subcutânea
UnB	Universidade de Brasília

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1.** Indivíduo adulto da espécie *Callithrix penicillata* no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. Foto: Marília Barros ..... 39
- Figura 4.2.** Fotografias do Pavilhão dos Calitriquídeos do CPUUnB. (a) Vista frontal, com a porta central de acesso; (b) Vista interna, a partir do corredor central de segurança e com a disposição dos dois corredores paralelos de 12 viveiros; e (c, d) vistas externas laterais (fotos: Marília Barros)..... 41
- Figura 5.1.** Representação esquemática da sequência das fases do procedimento do Estudo 1, incluindo ao final a etapa de coleta de sangue, realizada para cada uma das três diferentes condições experimentais: sessão controle (CT), sessão do teste de ameaça humana (AH), sessão do teste de confronto com predador (CP). Todos os sujeitos (n=12) foram avaliados nas três condições, sendo as sessões realizadas em intervalos de 15 dias. A ordem específica das três sessões variou aleatoriamente para cada sujeito ..... 46
- Figura 5.2.** Resposta comportamental dos micos machos e fêmeas durante a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT): olhar direto (frequência), proximidade e vigilância (em segundos). n=6/gênero; dados expressos como a média+epm; \*p<0,05 vs. sessões CT e CP, #p<0,05 vs. sessões CT e AH ..... 50
- Figura 5.3.** Resposta comportamental dos micos machos e fêmeas durante a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT): *head-cock* (frequência), vocalização de alarme *tsik-tsik*, *swaying* e locomoção (em segundos). n=6/gênero; dados expressos como a média+epm; \*p<0,05 vs. sessões CT e AH ..... 51
- Figura 5.4.** Concentração de cortisol (média+epm) dos micos machos e fêmeas logo após a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT). n=6/gênero; \*p<0,05 vs. sessões CT e AH (nas fêmeas) ..... 52
- Figura 5.5.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos machos e fêmeas, durante a fase de 5 min de confronto no teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT). Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C; n=6/gênero; \*p<0,05 vs. sessão CT (ouvido direito), \*\*p<0,05 vs. sessões CT e AH (ouvido direito) ..... 53
- Figura 6.1.** Representação esquemática da sequência das fases do procedimento do Estudo 2, incluindo ao final a etapa de coleta de sangue, que foi realizada para cada um dos três grupos experimentais. Todos os grupos passaram por todas as etapas, diferindo apenas o intervalo de estresse contensão-isolamento ..... 64
- Figura 6.2.** Concentração de cortisol (média+epm) detectada nos micos logo após um intervalo de estresse de contensão-isolamento de 0-, 15- ou 30-min. n=5/grupo; \*p<0,05 grupos 15- e 30-min vs. grupo 0-min ..... 67

**Figura 6.3.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos durante um intervalo de estresse de contenção-isolamento de 0-, 15- ou 30-min. Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C; n=5/grupo; \*p<0,05 vs. 0-min (TMT direita) ..... 68

**Figura 7.1.** Representação esquemática do procedimento geral do Estudo 3 que realizado com cada um dos quatro grupos experimentais: privação alimentar de 3 h (PA3h), grupo controle da PA3h (GC3h), privação alimentar de 6 h (PA6h) e grupo controle da PA6h (GC6h). Cada sujeito foi avaliado uma única vez ..... 79

**Figura 7.2.** Concentração de cortisol (média+epm) detectada nos micos logo após o procedimento experimental do Estudo 3 realizado em cada um dos quatro grupos experimentais. Os dois grupos controle não foram privados de alimento, enquanto que os outros dois grupos foram privados de alimento por 3 ou 6 h além do horário normal de fornecimento. n=6/grupo; \*p<0,05 vs. demais grupos ..... 82

**Figura 7.3.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos durante um episódio de estresse de privação alimentar de 3 ou 6 h. Os dois grupos controle não foram privados de alimento, enquanto que os outros dois grupos foram privados de alimento por 3 ou 6 h além do horário normal de fornecimento. Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C; n=6/grupo; \*p<0,05 grupo com privação vs. respectivo grupo controle ..... 83

**Figura 8.1.** Fotografias do aparato do Campo Aberto utilizado no estudo. À *Esquerda*: Vista lateral do aparato, com a caixa-transporte acoplada diretamente em frente a porta do tipo-guilhotina e evidenciando o teto e a parede (ao fundo) de vidro transparente; À *Direita*: Vista superior do aparato, evidenciando as três paredes de chapa de alumínio, o piso de tela metálica, e a porta do tipo-guilhotina. (Foto: Clarissa Vannuchi) ..... 94

**Figura 8.2.** Representação esquemática do procedimento geral do Estudo 4 que foi realizada em cada um dos quatro grupos experimentais: FAM+SOC = exposição a um ambiente físico familiar + ambiente social habitual (grupo controle); FAM+ISO = exposição a um ambiente físico familiar + em isolamento social; NOV+SOC = exposição a um ambiente novo + ambiente social habitual; e NOV+ISO = exposição a um ambiente físico novo + em isolamento social; n = 6/grupo..... 96

**Figura 8.3.** Concentração sérica de cortisol (média+epm) detectada logo após os micos serem expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (S; social) ou ausência (I; isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia. n=6/grupo; \*p<0,05 vs. grupos Familiar+S e Novo+S ..... 99

**Figura 8.4.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) nos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (S; social) ou ausência (I; isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia. Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste. n=6/grupo; \*p<0,05 vs. grupo Novo+S (esquerda); \*\*p<0,05 vs. grupos Familiar+S e Novo+S (esquerda); #p<0,05 vs. demais grupos (direita) ..... 99

**Figura 8.5.** Correlação negativa entre a concentração sérica de cortisol e a mudança de temperatura na membrana timpânica esquerda (escore  $\Delta$  da TMT esq) nos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar na ausência do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (grupo Fam+Iso). Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste..... 100

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1.** Relação entre o valor absoluto da temperatura da membrana timpânica (TMT) e o tempo de captura no viveiro de moradia ou a temperatura subcutânea (TSC) registrados antes e/ou depois das sessões controle (CT), de ameaça humana (AH) e de confronto com predador (CP), expressa como o valor de  $r$  da correlação de *Pearson* (e o respectivo valor de  $p$ ) ..... 54
- Tabela 6.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental nos micos submetidos a um evento de estresse de contenção-isolamento por 0, 15 ou 30 minutos (média±epm) ..... 65
- Tabela 6.2.** Peso corporal inicial e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos submetidos a um evento de estresse de contenção-isolamento por 0, 15 ou 30 minutos (média±epm) ..... 68
- Tabela 7.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental nos micos submetidos a um episódio de estresse de privação de alimento de 0 (não-privado), 3 ou 6 horas (média±epm, em segundos) ..... 80
- Tabela 7.2.** Massa corporal e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos submetidos a um episódio de estresse de privação de alimento de 0, 3 ou 6 horas (média±epm)..... 84
- Tabela 8.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental com os micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (social) ou ausência (isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (média±epm, em segundos) ..... 97
- Tabela 8.2.** Massa corporal e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (social) ou ausência (isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (média±epm) ..... 101

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	14
1.1. Lateralização hemisférica: aspectos gerais .....	14
1.2. Lateralização hemisférica: fundamentação teórica .....	16
1.3. Abordagens metodológicas para o estudo da lateralização hemisférica .....	21
1.4. Temperatura da membrana timpânica .....	23
1.5. Medo, ansiedade e resposta ao estresse .....	26
1.6. Testes em animais para o estudo do medo/ansiedade e estresse .....	30
1.7. Calitriquídeos como modelos animais .....	33
<b>2. Objetivos</b> .....	36
2.1. Objetivo geral .....	36
2.2. Objetivos específicos .....	36
<b>3. Relevância Científica e Originalidade</b> .....	37
<b>4. Aspectos Metodológicos Gerais</b> .....	39
4.1. Aspectos éticos .....	39
4.2. Sujeitos e condições gerais de alojamento .....	39
4.3. Aferição e análise da temperatura da membrana timpânica (TMT) .....	42
<b>5. Estudo 1: Ameaça Humana e Confronto com Predador</b> .....	43
5.1. Aspectos gerais .....	43
5.2. Procedimento experimental .....	43
5.3. Resultados .....	49
5.4. Discussão .....	54
5.5. Conclusão .....	59
<b>6. Estudo 2: Estresse de Contenção</b> .....	61
6.1. Aspectos gerais .....	61
6.2. Procedimento experimental .....	62
6.3. Resultados .....	66
6.4. Discussão .....	69
6.5. Conclusão .....	74
<b>7. Estudo 3: Privação Alimentar</b> .....	76
7.1. Aspectos gerais .....	76
7.2. Procedimento experimental .....	76
7.3. Resultados .....	82
7.4. Discussão .....	85
7.5. Conclusão .....	91
<b>8. Estudo 4: Ambiente Novo e Isolamento Social</b> .....	92
8.1. Aspectos gerais .....	92
8.2. Procedimento experimental .....	93
8.3. Resultados .....	98
8.4. Discussão .....	101

8.5. Conclusão .....	107
<b>9. Conclusões gerais</b> .....	<b>109</b>
<b>10. Referências bibliográficas</b> .....	<b>112</b>
<b>Anexo 1. Declaração da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA)</b> .....	<b>128</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Lateralização hemisférica: aspectos gerais

A lateralização hemisférica, também conhecida como especialização cerebral, é vista como uma ativação e/ou um funcionamento assimétrico entre os lados direito e esquerdo do cérebro, cada qual assumindo funções distintas na gênese e regulação de determinadas tarefas ou em resposta a determinados estímulos (p.ex., MACNEILAGE e cols., 2009). Foi descrita de forma sistemática pela primeira por Marc Dax em 1836 e em seguida por Paul Broca em 1861 (MANNING e THOMAS-ANTÉRION, 2011).

Essa capacidade de cada hemisfério cerebral atuar mais especificamente em determinadas tarefas parece ser uma característica onipresente entre os vertebrados e também em alguns invertebrados, como polvos, abelhas e nematóides (ROGERS e ANDREW, 2002). Tal fato indica que essa característica não é exclusiva do homem, como se pensou por muito tempo, e sim um princípio fundamental na organização do Sistema Nervoso Central (SNC) (OCKLENBURG e GÜNTÜRKÜN, 2012).

Contudo, a extensão e a efetividade da lateralização são decorrentes, em grande parte, de aspectos evolutivos, genéticos e da interação organismo-ambiente, expressas pelas vivências de um indivíduo desde seu nascimento (em animais: HOPKINS e cols., 2015; SULLIVAN, 2004; em humanos: MACNEILAGE e cols., 2009; OCKLENBURG e GÜNTÜRKÜN, 2012). Há indícios que aspectos relacionados ao gênero, via hormônios, também podem influenciar como cada hemisfério cerebral se especializa (revisado em TOGA e THOMPSON, 2003).

Apesar da aparente semelhança macroscópica entre os hemisférios cerebrais, os mesmos podem apresentar diferenciações anatômicas que emergem ainda durante a fase embrionária e progridem para evidentes assimetrias durante o desenvolvimento pós-natal (DEVINSKY, 2000). Por exemplo, SILVA (2012, 2015) descreveu em ratos que a realização de exercício durante a gestação melhorou a capacidade de aprendizagem espacial da prole. Esse efeito foi atribuído a um aumento nos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) e no

número de neurônios do hipocampo direito do cérebro, o que gerou uma assimetria anatômica, e posteriormente uma diferenciação funcional, entre os hemisférios cerebrais. Porém, vale ressaltar que no homem, há apenas assimetrias anatômicas sutis em termos de tamanho e/ou volume em áreas específicas do cérebro (revisado em AMUNTS, 2010). O hemisfério direito é mais saliente e largo que o esquerdo na região frontal, enquanto o esquerdo está mais ressaltado e largo que o direito na região occipital (LE MAY, 1976).

Diferenças em nível celular, na estrutura morfológica dos neurônios e da sua arborização dendrítica também já foram descritas (revisado em TOGA e THOMPSON, 2003). Há ainda diferenças entre os hemisférios direito e esquerdo para algumas vias neurotransmissoras (GLICK e cols., 1982). Grande parte da lateralização hemisférica em primatas, em geral, é vista em termos funcionais.

De acordo com VALLORTIGARA e ROGERS (2005), a especialização de um dos hemisférios para executar uma determinada função deixa o lado contralateral livre para realizar funções (adicionais) distintas e assim possibilitaria um aumento na capacidade, velocidade e eficiência do processamento de informações em nível do SNC. A lateralização também minimizaria a ocorrência de interferências, conflitos e incompatibilidades entre os hemisférios, favorecendo o processamento de mais informações, de forma simultânea e paralela, pelos dois lados (CORBALLIS, 2009). Evitaria ainda a duplicidade de funções nos dois hemisférios, poupando assim circuitos neurais (CORBALLIS, 2009). Inclusive, sua importância adaptativa faz com que seja, em parte, transmitida por mecanismos genéticos (ROGERS e ANDREW, 2002).

Contudo, a lateralização hemisférica também pode conferir desvantagens. Segundo CORBALLIS (1998), o mundo físico não é muito diferente em termos do lado esquerdo ou direito. Portanto, qualquer déficit lateralizado pode deixar um indivíduo vulnerável. Por exemplo, várias espécies de peixes, anfíbios e répteis (revisado em BISAZZA e cols., 1998) são mais propensas a reagir quando uma ameaça está no seu lado esquerdo do que o direito, apesar do fato que predadores podem aparecer em

ambos os lados do corpo. Vista nesse contexto, a lateralização pode vir a ser uma desvantagem (VALLORTIGARA e ROGERS, 2005).

## **1.2. Lateralização hemisférica: fundamentação teórica**

Uma assimetria cerebral é facilmente evidenciada em áreas do cérebro relacionadas exclusivamente ao processamento das diferentes modalidades sensoriais e em áreas motoras primárias. As fibras nervosas sensitivas e motoras do SNC se encontram cruzadas (parcialmente em mamíferos), para o lado contralateral, em termos do resto do corpo. Assim, o hemisfério esquerdo do cérebro controla o lado direito do corpo e o hemisfério direito do cérebro controla o lado esquerdo do corpo (CARNEIRO, 2002). De fato, em várias classes de vertebrados tem-se demonstrando uma preferência na orientação do corpo em resposta a estímulos sonoros, visuais e olfativos, e uma preferência pelo uso de uma das mãos/membros para manipulação de objetos e realização de tarefas motoras (revisado em ROGERS, 2014). Isso levou a hipótese de que o processamento lateralizado de tais informações é uma característica primitiva dos vertebrados (FITCH e BRACCINI, 2013). Porém, vale ressaltar que a maioria das preferências observadas são dependentes do contexto (p.ex., ser a presa ou o ser predador), do estímulo ou da tarefa sendo realizada, e da existência ou não de uma valência emocional (FITCH e BRACCINI, 2013).

A lateralização hemisférica não se limita apenas à percepção sensorial e habilidades motoras, apesar de haver muita polêmica em torno do tema quando se trata de atividades e comportamentos mais complexos. Tradicionalmente, o hemisfério esquerdo é visto como o centro dominante da linguagem e da lógica, enquanto o lado direito controla relações espaciais e aspectos emocionais (BISAZZA e cols., 1998). Desde o início do século XIX tem sido observado que pacientes com lesões restritas ao hemisfério esquerdo, mas não no direito, tinham afasias mais severas (revisado em TOGA e THOMPSON, 2003). Por outro lado, danos unilaterais no lado direito do

cérebro, mas não no esquerdo, estavam mais relacionados a quadros de mania, embotamento afetivo (BABINSKI e cols., 1914) e depressão (ROBINSON e cols., 1984).

Atualmente, sob a perspectiva de uma possível influência do processo evolutivo, sugere-se que o hemisfério esquerdo atua no controle de padrões comportamentais já bem estabelecidos e em situações familiares, enquanto o hemisfério direito detecta e responde rapidamente a alterações inesperadas no ambiente (MACNEILAGE e cols., 2009). Nesse contexto, os hemisférios esquerdo e direito teriam inicialmente se diferenciado para controlar comportamentos motivados por fatores intrínsecos (*top-down control*) ou extrínsecos (*bottom-up control*), respectivamente (MACNEILAGE e cols., 2009). A partir daí, a necessidade diária de comunicação e de realizar tarefas que exigem maior destreza manual teriam contribuído para o surgimento da lateralização da linguagem e da preferência manual no hemisfério esquerdo. O lado direito teria evoluído para a detecção e o reconhecimento rápido de predadores e membros da própria espécie, contribuindo para o surgimento das respostas emocionais (MACNEILAGE e cols., 2009).

No homem, a percepção e produção de emoções são processos amplamente aceitos como estando lateralizados no cérebro, apesar de ainda não haver um consenso sobre qual hemisfério que domina. Por exemplo, vários estudos observaram um maior nível de acerto e/ou uma menor latência de resposta em tarefas de reconhecimento de expressões faciais, independente da valência emocional, quando o estímulo foi apresentado no campo visual esquerdo e assim processado pelo hemisfério direito (revisado em BOROD e cols., 1997). Por outro lado, uma maior severidade no quadro de depressão foi relatada em pacientes com lesões no hemisfério esquerdo (GOLDSTEIN, 1939). JANSARI e cols. (2000) verificaram ainda uma melhor discriminação de expressões faciais negativas pelo hemisfério direito e de expressões positivas pelo hemisfério esquerdo. Resultados contraditórios também são observados em termos da produção de expressões faciais (revisado em BOROD e cols., 1997).

Estudos em primatas não-humanos (PNH) também tem gerado dados conflitantes. Em chimpanzés (*Pan troglodytes*; FERNÁNDEZ-CARRIBA e cols., 2002a,b), macacos rhesus (*Macaca mulatta*; HAUSER, 1993; HAUSER e AKRE, 2001; IFUNE e cols., 1984), macacos vervet (*Cercopithecus aethiops*; GIL-DA-COSTA e HAUSER, 2006) e babuínos (*Papio anubis*; CASPERD e DUNBAR, 1996; WALLEZ e VAUCLAIR, 2011), o lado esquerdo (rosto/ouvido) – e assim o hemisfério direito – estava mais envolvido na detecção de estímulos e/ou produção de expressões faciais emotivas. Entretanto, em algumas espécies, o hemisfério esquerdo é que foi dominante na discriminação de vocalizações emotivas (HAUSER e ANDERSSON, 1994; HEFFNER e HEFFNER, 1984; PETERSON e cols., 1978). Em micos (*Callithrix jacchus*), a dominância esquerda-direita na produção de vocalizações dependeu da valência emocional que estava sendo expressa (i.e., medo vs. contato social; HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998).

O debate em torno de como o SNC está organizado para processar emoções se estende há algum tempo. Duas importantes hipóteses já foram propostas referente a atuação dos dois hemisférios cerebrais nesse processo: 1) a do 'hemisfério direito' e 2) a da 'valência'. A primeira postula que o controle da percepção, do processamento e da produção de todas as emoções está localizado no hemisfério direito (GIANOTTI, 1972). Essa foi a primeira hipótese que surgiu referente à lateralização hemisférica das emoções, tendo sido baseada na análise de relatos das consequências negativas de lesões cerebrais sob as respostas emocionais de pacientes com danos cerebrais (revisado em BOROD e cols., 1997).

Desde então, outros estudos têm fornecido evidências que corroboram a hipótese do 'hemisfério direito'. Independente da valência emocional, pacientes com lesões unilaterais no hemisfério direito, mas não no esquerdo, tiveram dificuldade em identificar e discriminar expressões faciais (ADOLPHS e cols., 1996; BOROD e cols., 1998; BOWERS e cols., 1991) e frases emotivas (BLONDER e cols., 1991), assim como emitir respostas emocionais durante uma entrevista (BLONDER e cols., 1993; ROSS,

1981). A capacidade de identificar corretamente entonações de voz com valência emocional, tanto positiva como negativa, também foi maior quando o som foi apresentado no ouvido esquerdo/hemisfério direito de voluntários sadios (ERHAN e cols., 1998). Em pacientes com atrofia fronto-temporal mais pronunciada no lado direito versus esquerdo, devido a um quadro de demência, também foram observadas maiores alterações emocionais (revisado em GIANOTTI, 2012).

Em animais, apenas alguns estudos compararam sistematicamente a resposta emocional para estímulos com valências positivas e negativas. Em chimpanzés, a discriminação (MORRIS e HOPKINS, 1993) e a produção de expressões faciais (FERNÁNDEZ-CARRIBA e cols., 2002a,b) foi mais pronunciada no lado esquerdo, sugerindo uma possível dominância do hemisfério direito no controle das emoções.

A hipótese da 'valência', por sua vez, postula que ambos os hemisférios cerebrais estariam envolvidos no controle das emoções, mas cada um para uma valência específica. O lado esquerdo atuaria no caso de emoções positivas ou estímulos que induzem aproximação (*approach*), enquanto o direito atuaria no caso de emoções negativas ou estímulos que levam a evitação/esquiva (*avoidance* ou *withdrawal*; DAVIDSON, 1992). De fato, em humanos, expressões faciais positivas (de alegria) foram reconhecidas mais rápida e facilmente quando estavam no campo visual direito/hemisfério esquerdo e as de faces negativas (de tristeza) quando no campo visual esquerdo/hemisfério direito (BOROD e cols., 1986; JANSARI e cols., 2000; NATALE e cols., 1983; REUTER-LORENZ e DAVIDSON, 1981). Pacientes com lesões unilaterais no hemisfério esquerdo apresentaram maior incidência de depressão, enquanto naqueles com danos restritos ao lado direito foram vistos quadros de crises de riso (GOLDSTEIN, 1939; SACKEIM e cols., 1982).

Estudos realizados em diferentes animais apresentam dados que também parecem corroborar com a hipótese da 'valência'. Em roedores, apenas lesões unilaterais de estruturas no hemisfério direito (p.ex., córtex pré-frontal, amígdala) alteraram respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas em diferentes tarefas

que induzem estresse e ansiedade (revisado em SULLIVAN, 2004). Além disso, a atividade neural de chimpanzés após a apresentação de vídeos com conteúdos positivos, negativos e neutros diferiu entre os dois hemisférios (PARR e HOPKINS, 2000). Nessa mesma espécie, a mão esquerda/hemisfério direito foi usado mais vezes para coçar durante um evento estressante (HOPKINS, 2006), enquanto que em outras espécies os indivíduos com uma preferência manual direita (i.e., ativação hemisférica esquerda) tiveram uma menor latência para explorar objetos no ambiente (i.e., comportamento de aproximação; micos: BRACCINI e CAINE, 2009; CAMERON e ROGERS, 1999; chimpanzés: HOPKINS e BENNETT, 1994). Segundo ROGERS (2009), a preferência manual pode ser empregada como um índice indireto de dominância do hemisfério contralateral. Ademais, em babuínos, o hemisfério direito estava mais ativo durante conflitos entre co-específicos presente no campo visual esquerdo (CASPERD e DUNBAR, 1996). Em macacos rhesus, KALIN e cols. (1998, 2000) observaram uma correlação positiva entre a ativação do hemisfério direito e a resposta de medo e de liberação de cortisol em condições basais, e quando diante de uma situação aversiva.

Assim, o hemisfério dominante para o processamento emocional permanece incerto. KILLGORE e YURGELUN-TODD (2007) afirmaram que é possível que as duas hipóteses possam ocorrer, uma vez que processos cognitivos também são capazes de influenciar a percepção e a resposta à estímulos positivos e negativos. Portanto, pode haver uma complementaridade hemisférica na execução de algumas determinadas tarefas que envolvam simultaneamente aspectos cognitivos e emocionais (BEEMAN e cols., 2000).

No entanto, é importante ressaltar que aspectos metodológicos também podem estar contribuindo para as discrepâncias indicadas acima. Várias abordagens, métodos e instrumentos vem sendo usados no estudo da lateralização hemisférica, conforme apresentado resumidamente a seguir.

### 1.3. Abordagens metodológicas para o estudo da lateralização hemisférica

Diferentes abordagens experimentais podem se empregadas para o estudo da lateralização hemisférica, variando desde protocolos simples e rápidos, até procedimentos caros e complexos. De uma forma geral, os trabalhos já publicados têm usado uma abordagem mais anatômica, eletrofisiológica e/ou comportamental. Essa diversidade, e o fato de que alguns procedimentos poderem recrutar circuitos neurais em ambos os hemisférios, podem dificultar a interpretação dos resultados obtidos.

Inicialmente os estudos sobre a lateralização hemisférica tiveram uma abordagem exclusivamente neuroanatômica. Identificava-se, por exemplo, déficits ou perda de funções específicas em animais experimentais e em pacientes humanos que sofreram algum tipo de lesão cerebral unilateral (SABBATINI, 2003). Nesses pacientes, porém, o tipo e a extensão da lesão podem variar significativamente, que por sua vez leva a déficits inconsistentes e resultados inconclusivos.

Outra abordagem neuroanatômica utilizada para investigar funções específicas dos hemisférios esquerdo e direito é a de avaliar pacientes submetidos a transecção do corpo caloso (*split-brain*) para o tratamento cirúrgico de determinados tipos de epilepsia (p.ex., DERENZI e SPINNLER, 1966; LEVY e TREVARTHEN, 1976). No entanto, esses estudos também revelaram ser insuficientes e inconclusivos, visto que nem sempre há uma boa extrapolação para indivíduos clinicamente normais. De fato, os dois hemisférios se conectam em outros pontos além do corpo caloso (p.ex., aderência intertalâmica, comissura hipocampal).

Novos tipos de estudos neuroanatômicos se tornaram possíveis com o surgimento das tecnologias de neuroimagem, incluindo, por exemplo, a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a ressonância magnética funcional (RMf). A primeira consiste na administração de glicose marcada com um elemento radioativo (p.ex., oxigênio ou flúor). Locais específicos do SNC com maior atividade neuronal terão um consumo de glicose mais elevado e por consequência uma maior densidade do elemento radioativo, fornecendo assim informações mais detalhadas sobre a

funcionalidade de diferentes regiões cerebrais (ROBILOTTA, 2006). A RMf também detecta modificações no fluxo sanguíneo regional induzidas por padrões distintos de atividade neuronal em diferentes áreas do cérebro. Contudo, aqui a imagem é obtida via aplicação de campos magnéticos associados à pulsos de radiofrequência para detectar diferenças na quantidade de oxigênio presente no sangue (*blood-oxygen-level dependent contrast*). Áreas mais ativas contêm mais sangue oxigenado e que é mais resistente a um campo magnético, comparado a áreas menos ativas com sangue menos oxigenado e assim mais susceptível ao campo magnético (ROBILOTTA, 2006). Portanto, pode-se detectar essa diferença no fluxo sanguíneo e assim inferir, com alta resolução espacial, o nível de atividade dos neurônios (ROSEN e cols., 1998). No entanto, a utilização da RMf em animais é um pouco limitada, uma vez que os sujeitos muitas vezes precisam estar sedados para realização do procedimento. Tal fato diminui a possibilidade de realizar testes experimentais em que os sujeitos precisam estar acordados e se comportando (p.ex., estudos sobre memória).

Uma outra possível abordagem metodológica para o estudo da lateralização hemisférica consiste no registro por eletroencefalograma (EEG). Com essa técnica se registra, essencialmente, flutuações na atividade iônica de neurônios nas camadas mais corticais, detectadas a partir de eletrodos colocados em contato com pontos pré-definidos na cabeça (NIEDERMEYER e DA SILVA, 2004). O EEG possui uma certa limitação em termos de resolução espacial, fato que na verdade não limita a técnica para estudos de lateralização hemisférica e continua a ser uma valiosa ferramenta de investigação e diagnóstico clínico. No entanto, seu uso tem diminuído com o advento das técnicas de neuroimagem citadas acima que possuem uma melhor resolução espacial (NIEDERMEYER e DA SILVA, 2004).

As abordagens comportamentais tiveram início principalmente com o desenvolvimento do teste do Campo Visual Dividido (*divided visual field technique*). Nesse procedimento, um determinado estímulo é exposto a apenas um campo visual (BROADBENT, 1958) ou ouvido do sujeito (TREISMAN, 1960, 1964a,b), o que levará

então ao processamento do mesmo apenas pelo hemisfério contralateral devido ao cruzamento das fibras sensoriais, conforme explicado acima.

Outro procedimento que surgiu mais recentemente diz respeito ao estudo da preferência manual. Nesse teste, avalia-se a utilização predominante de uma das mãos/patas (e seu processamento preferencial pelo hemisfério contralateral) para a execução de diferentes tipos de tarefas manuais (FAGOT e VAUCLAIR, 1991). Assim, sugere-se ter um indicador de lateralização hemisférica (HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1995).

Em geral, as técnicas de neuroimagem e de EEG possuem alto custo operacional e para sua aquisição, requerem tempo para serem realizadas e não são facilmente empregadas em situações reais do cotidiano. Alguns estudos recentes tem sugerido o uso da termometria timpânica para avaliar a lateralização de funções cognitivas e emocionais mediante a realização de testes comportamentais (PARR e HOPKINS, 2000; TOMAZ e cols., 2003). Essa técnica foi empregada no presente estudo e assim será abordada em mais detalhe a seguir.

#### **1.4. Temperatura da membrana timpânica**

A termometria timpânica é uma técnica não-invasiva para detecção da temperatura da membrana timpânica (TMT) por uso de um termômetro auricular infravermelho. Em humanos, essa técnica teve início na área médica com o objetivo de auxiliar o diagnóstico de doenças vasculares, inflamações, tumores e distúrbios metabólicos, bem como anormalidades da temperatura central (ACHARYA e cols., 2010; ANBAR, 1998; LEVY e cols., 2010; SOULEN e cols., 1972). Contudo, ainda é um procedimento pouco utilizado na rotina clínica, tanto da medicina humana, como veterinária (BERGEN e KENNEDY, 2000; PEREIRA e BARROS, 2015; ROBINSON e cols., 1998; STAVEM e cols., 2000). Sua aplicabilidade para detectar e inferir mudanças na atividade cerebral, em nível hemisférico, foi inicialmente demonstrado por MEINERS e DABBS (1977).

O canal auditivo divide-se em três porções: o ouvido externo, o ouvido médio e o ouvido interno. O tímpano é uma membrana fina localizada no final do ouvido externo, separando essa porção do ouvido médio. Tem como principal função a conversão e amplificação de vibrações detectadas no ar para um fluido, contribuindo para o processo de audição. A membrana timpânica contém vasos sanguíneos finos advindos de ramos das artérias carótidas interna e externa (GRAY, 1991).

Considerando suas características anatômicas e perfusão sanguínea, a TMT parece refletir mudanças no fluxo sanguíneo das artérias carótidas, que por sua vez tem uma correlação positiva com variações ipsilaterais no fluxo sanguíneo cerebral e a temperatura do SNC gerada pela atividade neuronal (CHU e cols., 2000; GUR e cols., 1994; SCHUMAN e cols., 1999). De fato, sabe-se que a ativação dos neurônios gera calor como subproduto do uso de energia. O calor produzido pode então ser dissipado pelo crânio, mas a principal forma parece ser via trocas com a circulação sanguínea (GUR e cols., 1994). Portanto, a medida que a atividade cerebral aumenta, há uma maior produção de calor e conseqüente elevação no fluxo sanguíneo das carótidas para o hemisfério ativo, o que leva a um resfriamento da TMT no mesmo lado (SWIFT, 1991). A TMT parece então ser capaz de indicar uma lateralização na ativação neuronal em nível hemisférico (BOYCE e cols., 1996; CHERBUIN e BRINKMAN, 2004; SWIFT, 1991).

Estudos em humanos tem demonstrado que a realização de tarefas que induzem uma maior ativação de um dos hemisférios cerebrais leva a uma redução ipsilateral na TMT. Em crianças e/ou adultos, padrões comportamentais negativos e de cautela foram correlacionados à valores mais elevados da TMT direita, enquanto um padrão positivo e impulsivo estava relacionado a uma TMT mais elevada no lado esquerdo (BOYCE e cols., 2002; HELTON, 2010). Em tarefas cognitivas realizadas em voluntários sadios também foi demonstrado que a TMT diminuiu no ouvido esquerdo com a ativação do hemisfério ipsilateral induzida por tarefas verbais (CHERBUIN e BRINKMAN, 2004, 2007; MEINERS e DABBS, 1977). Em humanos também já foram vistas assimetrias na

TMT quando há preferências por processamento sensorial no lado direito ou esquerdo (JACKSON, 2011) e nas respostas ao estresse (BOYCE e cols., 1996) e a estímulos emocionais (HELTON e cols., 2009; PROPPER e cols., 2010, 2013).

O uso da TMT em PNH tem demonstrado resultados similares aos vistos em humanos. Em chimpanzés, a TMT esquerda e direita se mostrou mais fria durante tarefas verbais e espaciais, respectivamente (HOPKINS e FOWLER, 1998). Em calitriquídeos confrontados com um experimentador humano, a TMT de cada lado também diferiu, indicando que o lado direito teve uma ativação mais significativa que o esquerdo (TOMAZ e cols., 2003). Contudo, PARR e HOPKINS (2000) avaliaram a TMT de chimpanzés vendo vídeos retratando eventos negativos, positivos ou neutros, e relataram um aumento no lado direito durante a situação com valência negativa. Em macacos rhesus, a TMT direita foi 0,6°C inferior à que foi obtida no lado esquerdo (BOYCE e cols., 1996), assim como em micos-estrela houve uma diferença de 0,3°C em termos dos valores vistos nos ouvidos direito e esquerdo em resposta ao estresse de captura (TOMAZ e cols., 2003).

Em conjunto, esses estudos sugerem que, ao se comparar a TMT detectada nos ouvidos direito e esquerdo é possível avaliar diferenças funcionais entre os hemisférios cerebrais (SCHUMAN e cols., 1999). Contudo, a aferição da TMT com termômetro infravermelho apresenta algumas desvantagens. Se empregada de forma inadequada a técnica pode afetar a medida, sendo contraindicado para sujeitos com fraturas na região maxilolofacial, na base do crânio ou otorragias (PRANSKY, 1991). Além disso, em várias espécies de animais ainda não há um procedimento padrão para sua obtenção. O valor real pode sofrer influência da temperatura do ambiente e o cerúmen pode gerar medidas incorretas. Ainda, a imobilização cervical em determinadas espécies dificulta a realização do procedimento.

Apesar disso, a aferição da TMT é um método não-invasivo e assim não oferece riscos de lesões traumáticas ou por repetição. Em PNH, parece ser uma ferramenta de rápida execução, de baixo custo, e com alto grau de segurança e confiabilidade para se

determinar em tempo real a atividade neuronal em nível hemisférico (PARR E HOPKINS, 2000; TOMAZ e cols., 2003).

### **1.5. Medo, ansiedade e resposta ao estresse**

Muitas situações cotidianas podem causar medo ou ansiedade. Em mamíferos, particularmente, essas respostas contribuem para o comportamento de defesa contra diferentes tipos de ameaças (KIM e GORMAN, 2005).

A ansiedade, em particular, é vista como uma resposta emocional normal e adaptativa, tendo como função geral detectar e reagir de forma adaptativa a um possível perigo ou ameaça no ambiente (MIGUEL e cols., 2011). Assim, é caracterizada como uma resposta mais vaga/difusa e prolongada, gerada pela expectativa ou antecipação a um evento adverso (DALGALARRONDO, 2008; RODGERS e cols., 1997). Ela atua no sentido de estimular o organismo a tomar medidas necessárias para impedir a ameaça ou, no mínimo, reduzir suas consequências (BRANDÃO, 2001). No homem, é definida, em geral, como um estado emocional desagradável de apreensão em relação ao futuro e de inquietação. Inclui manifestações autonômicas (p.ex., cefaléia, dispnéia, taquicardia, tremores, vertigem, sudorese, náusea e diarreia) e psicológicas (p.ex., inquietação interna, insegurança, irritabilidade e dificuldade para se concentrar; SADOCK e SADOCK, 2010).

O medo, embora seja uma resposta emocional semelhante a ansiedade, parece estar mais relacionado a uma ameaça externa advinda de um evento ou objeto pontual, seja esse real/concreto ou não (LEDOUX, 1996, 1998). Assim, configura como uma resposta emocional frente a uma condição súbita e específica que representa perigo, mas que atua de forma transitória.

Porém, vale destacar que o medo e a ansiedade têm uma relação importante, pois ambos participam da resposta a uma situação que ameaça à integridade do organismo, objetivando colocar o indivíduo em segurança (LEDOUX, 2001). O medo e a ansiedade constituem, portanto, uma forma normal de advertência sobre danos

físicos, dor, punições, separação social, entre outras situações (STANFORD e cols., 2000). Assim, no presente trabalho, não será feita uma distinção formal entre essas duas respostas.

Para DARWIN (1872), MCNAUGHTON (1997) e NESSE (1999), o medo/ansiedade tem um papel adaptativo incontestável, tendo sido selecionado e modificado ao longo do tempo por processos de seleção natural. Contudo, sabe-se também que essas respostas variam ao longo da vida do indivíduo, de acordo com o modo que uma mesma situação é detectada e interpretada, e assim podem ser alteradas ao longo de diferentes pontos do desenvolvimento (MIGUEL e cols., 2011). A resposta apresentada pode ainda ser específica para a situação e/ou ser uma reação mais geral (WEITEN, 2008), variando inclusive entre os indivíduos, visto que depende da forma com que os mesmos captam, processam e armazenam tais informações (MIGUEL e cols., 2011).

De acordo com WEITEN (2008), as respostas de medo/ansiedade possuem três grandes componentes: psicológico-cognitivo, comportamental e fisiológico. Em termos psicológicos e cognitivos, faz-se uma avaliação da situação ou do estímulo, os quais podem ou não ser comparados a experiências previamente vividas, gerando respostas automática/inatas ou flexíveis/aprendidas, respectivamente (STARFORD e cols., 2000). Aqui, diferentes aspectos referentes à situação são captados em nível dos diferentes sistemas sensoriais e em seguida processados no SNC. Avalia-se os contextos espacial, temporal e emotivo, para uma melhor organização da resposta (LABRADOR e CRESPO, 1994).

Em linhas gerais, as respostas comportamentais em mamíferos podem ser de avaliação de risco (monitoramento/vigilância), enfrentamento (ataque defensivo), evitação (fuga) e imobilidade (congelamento), as últimas duas a depender da existência ou não de rotas de fuga (LABRADOR e CRESPO, 1994). Em termos da resposta fisiológica, frequentemente ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que resulta na liberação de cortisol, além de aumento da sudorese e alterações

cardiovasculares, respiratórias e gastrointestinais (BEAR e cols., 2006; SADOCK e SADOCK, 2010).

Para uma rápida e correta avaliação dos diferentes tipos de estímulos emocionais captados do ambiente, é necessário um processamento complexo por diferentes estruturas neurais, como a amígdala e o sistema septo-hipocampal. Essas, de uma forma geral, permitem comparar informações obtidas no ambiente com aquelas já armazenadas em diferentes locais do SNC e planos de ação gerados pelo córtex pré-frontal (RIBEIRO, 2000).

A amígdala, mais especificamente, não apenas detecta e organiza respostas às ameaças naturais, como também pode ser o centro de aprendizado associativo de novas ameaças (condicionamento clássico; LEDOUX, 1996). De acordo com TOMAZ e cols. (1993), a amígdala permite relacionar aspectos emocionais e cognitivos, e em havendo uma discrepância entre essas informações, gera-se uma inibição comportamental. A amígdala também possui conexões com outras áreas cerebrais, como o hipotálamo e regiões do tronco encefálico, resultando em respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (LEDOUX, 1998).

O hipotálamo é uma pequena massa de substância cinzenta agrupada em núcleos, localizada no diencéfalo, e que possui ampla e complexas conexões recebendo projeções do sistema límbico (amígdala, hipocampo, córtex pré-frontal, matéria cinzenta periaquedutal) e da hipófise (STANFORD e cols., 2000; MACHADO, 2006). No medo/ansiedade, essa estrutura coordena as respostas neuroendócrinas, atuando via ativação do eixo HPA (GRAEFF, 1996; KIM e GORMAN 2005; MACHADO, 2006; STANFORD e cols., 2000). Inclusive, de acordo com VANITALLIE (2002), a elevação crônica do cortisol pode interferir com a atividade do hipocampo, produzindo alterações na memória.

O hipocampo, localizado no lobo temporal medial, possui um importante papel na memória e no comportamento (aprendido) (GAZZANIGA, 2006), incluindo as respostas de medo/ansiedade. Recebe informações de diversas áreas do cérebro

(p.ex., outras áreas corticais e estruturas do tronco encefálico), o que lhe permite “conferir/comparar” informações sensoriais provenientes dos sistemas sensoriais com informações já armazenadas. Quando há coerência entre as informações recebidas e armazenadas, as atividades comportamentais seguem seu curso normal. Entretanto, quando ocorre alguma incompatibilidade entre os eventos ambientais e o que está armazenado, o hipocampo pode vir a gerar uma inibição comportamental, acompanhada de um aumento na atenção e vigilância em direção a estímulos potencialmente perigosos (GRAY, 2000).

O medo/ansiedade variam tanto em termos quantitativos, como qualitativos (STANFORD e cols., 2000). Uma preocupação diária persistente é diferente de uma expectativa a um de episódios agudos de medo intenso. Essas repostas podem ser consideradas normais quando em condições apropriadas, porém, em vários momentos podem vir a ser consideradas anormais.

De fato, para alguns indivíduos, o medo/ansiedade ocorrem em momentos indevidos e/ou de forma exacerbada, adquirindo características de uma resposta mais patológica, e assim possivelmente necessitam de uma intervenção terapêutica. Neste caso, a resposta emocional torna-se inadequada ao estímulo em virtude de sua intensidade e/ou duração. Essas distorções podem prejudicar a resposta apropriada, como também interferir no aprendizado por diminuir a atenção e prejudicar a capacidade de memória (BRANDÃO, 2001).

Os transtornos mentais associados à ansiedade são classificados essencialmente com base nos sintomas apresentados, além da intensidade e duração dos mesmos. Podem também afetar diferentes estruturas do SNC e funções específicas relacionadas ao medo/ansiedade (KIM e GORMAN, 2005; STANFORD e cols., 2000). Assim, há várias patologias já descritas, como: ansiedade generalizada, pânico, fobias e estresse pós-traumático (DSM-V, 2013). Seu diagnóstico tem sido feito em indivíduos de diferentes faixas etárias, incluindo crianças, sendo que alguns tipos (p.ex., ansiedade generalizada) ocorre mais frequentemente em mulheres do que homens. Segundo

VORKAPIC e RANGÉ (2011), os transtornos de ansiedade estão cada vez mais frequentes na população adulta em geral e vem crescendo entre os diferentes tipos de transtornos mentais, com prevalências estimadas em 12,5% ao longo da vida e crescimento de 7,6% ao ano.

### **1.6. Testes em animais para o estudo do medo/ansiedade e estresse**

Um modelo experimental é uma representação de um fenômeno real e complexo, geralmente em uma forma mais simples. A partir dessa perspectiva, torna-se possível simular o fenômeno, ainda pouco conhecido, por meio de sistemas mais estabelecidos. Possui assim grande valor heurístico, uma vez que permite testar hipóteses a partir de um conjunto de conhecimentos produzido acerca dessa realidade. O avanço na compressão de um fenômeno complexo realmente pode se dar por meio de pequenos passos, tendo sempre em suas primeiras etapas a simulação do fenômeno em condições mais simples (CRUZ e cols., 2012).

De fato, a elucidação da existência de diversos comportamentos, regiões cerebrais e vias neurotransmissoras associados as respostas de medo/ansiedade foi em grande parte auxiliada pela realização de estudos em animais. Tal abordagem baseia-se essencialmente na manipulação experimental de estímulos ansiogênicos e/ou estressantes e na análise do repertório comportamental e das respostas fisiológicas resultantes (GILBERT, 1996; HALL, 1994).

Modelos animais fundamentados principalmente em reações de defesa frente a estímulos ou situações (naturalmente) aversivas passaram a ocupar um lugar de destaque no estudo da ansiedade (BLANCHARD e BLANCHARD, 1998). Entre alguns dos testes empregados atualmente em roedores, por exemplo, estão o campo aberto, o labirinto em cruz elevado, o estresse de predação e a interação/isolamento social (CRUZ e cols., 2012). Esse último configura uma importante fonte de estresse psicossocial. Como o protocolo experimental desses testes não requer treinamento prévio, em se tratando de estímulos naturalmente aversivos, sugere-se que os aspectos

neurobiológicos e os efeitos de manipulações farmacológicas das respostas comportamentais e fisiológicas se confundem menos com os de outras funções (p.ex., aprendizagem e memória; STANFORD, 2000). Além disso, as respostas ativadas em decorrência desses estímulos ansiogênicos são utilizadas como indicadores para se inferir um estado de ansiedade e geralmente apresentam grande potencial de correspondência com as reações vistas no homem (TREIT, 1985).

Contudo, outros estímulos também podem ser usados para gerar respostas de medo/ansiedade e/ou estresse em animais. Nesse sentido, aspectos mais relacionados ao ambiente físico já foram avaliados, a exemplo da exposição ao frio. Além disso, há o choque elétrico nos membros/patas, a privação de alimento e a contenção física ou química (revisado em CRUZ e cols., 2012). Alguns protocolos estão baseados ainda em respostas condicionadas, envolvendo mecanismos de aprendizado e memória associativa (p.ex., condicionamento aversivo). Nesses testes, o sujeito é treinado a associar um estímulo inicialmente neutro (p.ex., som, luz ou contexto) com um outro que é naturalmente aversivo (p.ex., choque elétrico), fazendo com que o primeiro passe agora a também induzir uma resposta emocional negativa (TORRES, 2010).

Vários animais têm sido empregados no estudo do medo/ansiedade, incluindo roedores e PNH (revisado em CRUZ e cols., 2012). Historicamente, o foco tem sido em ratos e camundongos. Mas, para minimizar possíveis dificuldades translacionais entre roedores e humanos, o uso de PNH tem aumentado nos últimos anos (p.ex., DAM e DEYN, 2014). A proximidade filogenética desses animais com o homem possibilita uma extrapolação mais fidedigna para humanos dos dados encontrados em experimentos realizados com esses animais (BONTROP, 2001).

Em PNH, vários procedimentos empregando tanto respostas condicionadas (p.ex., choque ou puff de ar nos olhos; ROWLETT e cols., 2005), como respostas inatas já foram validados. Nesse sentido, pode-se citar a ameaça humana (CAREY e cols., 1992), o confronto com predador (BARROS e cols., 2000), a interação social (CILIA e PIPER, 1997) e a exposição a ambientes novos (CAGNI e cols., 2012).

Os testes de Ameaça Humana e de Confronto com Predador são procedimentos que se baseiam na interação presa-predador como fonte indutora de medo/ansiedade, uma vez que esses animais são exclusivamente dependentes de estratégias comportamentais para se defenderem de predadores (BARROS e cols., 2004). O teste de Ameaça Humana foi inicialmente desenvolvido e validado no gênero *Callithrix* por COSTALL e cols. (1998). Baseia-se no fato da presença de um observador humano ser capaz de induzir respostas associadas ao medo/ansiedade. Contudo, a influência da domesticação de animais cativos pode levar a uma habituação ao estímulo (homem), que por sua vez reduz o número de comportamentos indicativos. Aponta-se também para o fato do repertório comportamental específico não ter sido evolutivamente selecionado, visto que o homem não é um predador natural desses animais (BARROS e TOMAZ, 2002).

Por outro lado, o teste de Confronto com Predador consiste em expor o animal a um predador taxidermizado (BARROS e cols., 2000). Um confronto agudo gera uma menor proximidade ao estímulo, assim como eleva os níveis de vigilância, locomoção e/ou vocalização de alarme (BARROS e cols., 2004) – comportamentos característicos de uma exposição a um predador. A resposta induzida nesse teste parece ser melhor quando o confronto ocorre em um local familiar (viveiro de moradia) e durante um curto intervalo de tempo (5 min) (CAGNI, 2008), se assemelhando às condições onde tais encontros ocorrem na natureza (FERRARI e FERRARI LOPES, 1990). Exposições repetidas podem levar a um efeito de habituação que varia entre as diferentes respostas apresentadas (BARROS e cols., 2004).

PNH também apresentam padrões de interação social variados. Dependendo da espécie, demonstram desde uma preferência pela formação de pares monogâmicos, até a poligamia (EDGAR, 2014). Essa flexibilização na estrutura social pode até ter contribuído para a ocupação de diferentes nichos ecológicos (p.ex., florestas, caatinga, cerrado, savanas; WILLIAMS e BERNSTEIN, 1995), possibilitado que grupos de PNH reajam de forma altamente articulada à desafios ambientais (KUMMER, 1971). Nesses

animais, a depender da espécie, tanto o isolamento social (p.ex., SMITH e cols., 1998), como a interação entre indivíduos (TAYLOR e cols., 2014), aplicados de forma aguda ou crônica, podem induzir respostas de estresse (aumento de cortisol) e ansiedade (aumento na locomoção). Para o isolamento social, os animais são privados de contato visual, tátil, auditivo e/ou olfativo com o seu parceiro/grupo. No teste de interação social, também conhecido com confronto com co-específico, animais do mesmo ou do sexo oposto são colocados juntos durante um determinado período.

No entanto, testes de isolamento/interação social podem gerar respostas diferentes do esperado, considerando questões inerentemente impostas pelo ambiente de cativeiro. Nessas condições, PNH podem ter limitadas possibilidades de interação e/ou mais tempo livre do que normalmente teriam para se relacionarem visto que a obtenção de alimento é facilitada e o risco de predação é reduzido (RAPCHAN, 2010). Mas, isso também pode configurar em uma vantagem ao permitir a análise controlada e isolada do fator social sob o medo/ansiedade e estresse (BEZERRA, 2016).

Em alguns procedimentos já foi demonstrando que a exposição a um ambiente físico até então desconhecido também gera respostas de medo/ansiedade e estresse em PNH. Durante um evento desse tipo, calitriquídeos se locomovem mais e emitem mais vocalizações de contato, havendo uma maior ativação do eixo HPA e liberação de cortisol (DETLING, 2002; FRENCH e cols., 2007; GERBER e cols., 2002; NORCROSS e NEWMAN, 1999; RUKSTALIS e FRENCH, 2005; SMITH e cols., 1998). Segundo BARROS e cols. (2012), ambientes novos podem demandar maiores níveis de monitoramento visual por potencialmente representar uma situação com maior risco de predação e menor possibilidade de se conhecer as rotas de fuga. Uma exposição repetida ao ambiente em questão gera um efeito de habituação (BARROS e cols., 2004).

### **1.7. Calitriquídeos como modelos animais**

Diferentes estudos têm demonstrado similaridades entre humanos e indivíduos do gênero *Callithrix* em termos de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse

social, tais como separação mãe-filhote (PRYCE e cols., 2004; 2005), separação do par heterossexual (JOHNSON e cols., 1996; LEÃO, 2001; NORCROSS e NEWMAN, 1999) e mudanças de ambiente (ROCHA, 2010). De fato, espécies desse grupo vivem em grupos estáveis, podendo assumir diferentes sistemas sociais, como: monogamia, poliginia e poliandria (ABBOTT e cols., 1993). Alguns – como no caso do mico-estrela – vivem em grupos familiares estendidos de 3 a 15 indivíduos, incluindo um casal reprodutor com descendentes e/ou familiares de diferentes faixas etárias (STEVENSON e RYLANDS, 1988).

Calitriquídeos também tem um elevado risco de serem predados, o que parece ter exercido uma grande pressão seletiva sobre o seu repertório comportamental (CAINE, 1993; HART, 2007). Eles são, na verdade, susceptíveis a uma grande variedade de potenciais predadores, incluindo aves de rapina, serpentes e felinos (EMMONS, 1987; HEYMANN, 1987, 1990).

Comparado a outros PNH, os calitriquídeos tem baixo custo de manutenção em cativeiro, são de fácil manejo e apresentam uma alta taxa reprodutiva. Seu período gestacional é de 147-180 dias, podendo nascer de 1-3 filhotes (até duas vezes ao ano), com longevidade de 10-16 anos em cativeiro (NOWAK e PRADISO, 1983). Eles pesam 250-400 g e medem de 20-30 cm quando adultos.

Indivíduos do gênero *Callithrix* submetidos a um estressor modificam seu perfil comportamental e também podem exibir respostas autonômicas e endócrinas (p.ex., SOUSA e cols., 2002). Além disso, esses símios exibem similaridades anatômicas e funcionais em regiões do SNC envolvidas nas respostas ao medo/ansiedade e estresse vistos no homem (HONESS e MARIN, 2006). Portanto, este PNH constitui um bom modelo experimental para estudos sobre medo, ansiedade e estresse induzidos por diferentes fatores, incluindo estresse psicossocial (NORCROSS e NEWMAN, 1999; SOUSA e cols., 2002; GALVÃO-COELHO e cols., 2008) e de predação (BARROS e cols., 2003; CAGNI, 2008).

O mico-estrela, em particular, é uma espécie de primata neotropical arborícola, de pequeno porte e hábitos diurnos, não-ameaçado de extinção e que se adapta facilmente ao ambiente de cativeiro (STEVENSON e RYLANDS, 1988). Ele predomina no bioma do Cerrado (RYLANDS, 2000). Apresentam tufo pré-auriculares longos e negros e uma pelagem de coloração mista de cinza, preto e amarelo-avermelhado. Além disso, exibem uma característica mancha branca na testa em formato de estrela, de onde se deu o seu nome popular (DE VIVO, 1991; AURICCHIO, 1995). São animais onívoros, exibindo uma estratégia generalista na obtenção de recursos (RYLANDS e FARIAS, 1993). Se alimentam de uma grande variedade de matéria vegetal (exsudatos/goma, sementes, flores, frutos, néctar) e animal (artrópodes, moluscos, filhotes de aves e mamíferos, anfíbios e pequenos répteis) (FERRARI e LOPES FERRARI, 1989; VILELA e FARIA, 2002). Indivíduos dessa espécie têm sido estabelecidos como sujeito experimental em investigações biomédicas, comportamentais e neuropsicofarmacológicas (BARROS e TOMAZ, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo geral comparar o padrão de atividade neuronal, em nível hemisférico, em micos-estrela (*Callithrix penicillata*) adultos em situações potencialmente estressantes e/ou ansiogênicas. Com o estabelecimento desse padrão de atividade nos hemisférios cerebrais direito versus esquerdo, obtido via a aferição da TMT, visou-se então estabelecer uma possível lateralização hemisférica para eventos aversivos nessa espécie de PNH.

### **2.2. Objetivos específicos**

Especificamente, esse trabalho se propôs a:

- a) determinar a TMT direita e esquerda de micos-estrela adultos antes e depois de serem submetidos, de forma experimental, à diferentes situações aversivas, a saber: (1) ameaça humana, (2) confronto com predador, (3) estresse de contenção, (4) privação alimentar, (5) isolamento social e (6) exposição à ambientes novos;
- b) correlacionar as modificações na TMT com as respostas comportamentais e/ou os níveis de cortisol circulante induzidos pelas diferentes condições aversivas indicadas acima;
- c) comparar a TMT esquerda versus direita nas diferentes condições avaliadas, visando estabelecer uma possível lateralização hemisférica no processamento de informações emocionais aversivas da espécie estudada;
- d) comparar a forma com que os diferentes tipos de estímulos aversivos são processados em nível hemisférico; e
- e) corroborar o uso da termometria da TMT como um potencial indicador indireto, rápido, não-invasivo e de baixo custo da ativação neuronal em tempo real e em nível hemisférico em PNH.

### 3. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA E ORIGINALIDADE

Os seguintes aspectos contribuem para evidenciar o mérito científico do presente trabalho:

- a) transtornos da ansiedade são altamente prevalentes na nossa sociedade, acometendo ambos os gêneros, diversas faixas etárias (incluindo crianças e idosos) e níveis sócio-econômicos;
- b) distúrbios emocionais acarretam prejuízos significativos aos indivíduos acometidos, envolvendo aspectos clínicos, familiares, sócio-econômicos, dentre outros;
- c) dada sua grande complexidade, os mecanismos neuroquímicos, as estruturas anatômicas e as respostas fisiológicas/comportamentais relacionadas ao processamento de informações emocionais precisam ser melhor esclarecidos, podendo assim facilitar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dos diferentes transtornos associados;
- d) considerando a diversidade de respostas comportamentais, autonômicas e hormonais relacionadas ao medo/ansiedade, faz-se necessário uma avaliação dos efeitos induzidos por diferentes fontes potencialmente ansiogênicas, uma vez que cada tipo pode estar induzindo aspectos distintos, mas complementares, de um mesmo fenômeno;
- e) várias funções neurais (como as emoções) parecem ter uma lateralização hemisférica, a qual pode ser detectada via técnicas de EEG, PET *scan* e RMf, porém vale ressaltar que tais técnicas são de alto custo, requerem tempo para sua realização e não podem ser medidas em situações reais do cotidiano, sendo a aferição da TMT uma possível alternativa barata, rápida, não-invasiva, segura e confiável;
- f) estudos em animais permitem investigar elementos específicos de forma controlada e sistemática, sendo que PNH possuem um papel ímpar, uma vez que,

comparados a outras espécies de animais, geram dados mais translacionais para a condição humana.

De fato, o presente estudo forneceu uma contribuição inédita para elucidação da forma com que informações emocionais aversivas são processadas em nível hemisférico, haja vista que: (1) mensurou a atividade neuronal em uma espécie de PNH submetida a diferentes eventos potencialmente estressantes e/ou ansiogênicos; (2) correlacionou respostas comportamentais e/ou hormonais induzidas por diferentes tipos de eventos ansiogênicos/aversivos com a atividade hemisférica em PNH de pequeno porte, como o mico-estrela; (3) desenvolveu uma abordagem metodológica ainda pouco explorada para o estudo de ansiedade (i.e., aferição da TMT) – um procedimento que pode ser facilmente empregado em outros modelos animais e com grande potencial translacional para seres humanos; e (4) corroborou o uso da aferição da TMT como uma ferramenta experimental rápida, não-invasiva, de baixo custo, segura e confiável para indicar a atividade neuronal em tempo real e em nível hemisférico em PNH.

## 4. ASPECTOS METODOLÓGICOS GERAIS

### 4.1. Aspectos éticos

Os procedimentos descritos abaixo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (protocolo UnB no. 6/2017). Uma cópia da declaração da CEUA encontra-se no Anexo 1. Os procedimentos seguiram a regulamentação brasileira para o uso científico de animais de laboratório (Lei Arouca 11.794/2008), bem como as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório do CONCEA/Brasil e do NIH/EUA. Durante a realização do trabalho houve um acompanhamento permanente de todos os animais por médicos veterinários.

### 4.2. Sujeitos e condições gerais de alojamento

Neste trabalho foram utilizados como sujeitos indivíduos adultos (>18 meses) da espécie *Callithrix penicillata*, popularmente chamado de mico-estrela (Figura 4.1), com peso mínimo de 250 g. Todos os sujeitos foram mantidos em cativeiro e testados nas dependências do Centro de Primatologia da UnB (CPUnB). Esse é um criadouro científico para fins de pesquisa científica autorizado pelo IBAMA (no. registro: 1/53/1999/000006-2). Os micos que participaram do trabalho já faziam parte do plantel permanente, tendo sido repassados pelo IBAMA ou nascidos no próprio local.



**Figura 4.1.** Indivíduo adulto da espécie *Callithrix penicillata* no Centro de Primatologia da Universidade de Brasília. Foto: Marília Barros.

Todos os micos adultos do CPUUnB são implantados com um microchip de radiofrequência (134 kHz) com capacidade de detecção da temperatura e um código de identificação composto por 15 dígitos (BioThermo 985 LifeChip, Destron Fearing, South St. Paul, EUA). Os microchips são implantados subcutaneamente entre as escápulas, usando uma seringa descartável estéril fornecida pelo fabricante. Este procedimento não requer anestesia e o microchip permanece no sujeito até o seu óbito, não sendo reaproveitado. O uso de microchips permite que os sujeitos sejam rápida e precisamente identificados, além da aferição de sua temperatura subcutânea com o uso de um leitor manual portátil. Os animais receberam os microchips pelo menos dois meses antes do início dos experimentos descritos abaixo.

Todos os sujeitos foram mantidos de acordo com as condições de alojamento e manejo de calitriquídeos do CPUUnB. Esse centro está localizado na Fazenda Água Limpa da UnB, uma área de preservação ambiental, estando os viveiros que alojam os animais circundados por mata de galeria. O Pavilhão de Calitriquídeos do CPUUnB é composto por dois corredores paralelos, de 12 viveiros/cada, separados por um corredor central de segurança (Figura 4.2). A disposição dos viveiros permite o contato acústico e olfativo entre os animais, porém, impede o contato visual entre eles. O pavilhão é coberto por telha opaca, intercalada com telha de acrílico (translúcida), situadas 50-100 cm acima da tela superior dos viveiros. Essa telha cobre todo o corredor central de segurança e 2/3 dos corredores de viveiros, ficando 1/3 dos viveiros descoberto. Desta forma, os animais foram alojados em condições naturais de luminosidade, temperatura e umidade.

Os micos foram alojados aos pares ou grupos mistos/familiares de 3-4 indivíduos, em viveiros para calitriquídeos do CPUUnB. Cada viveiro, de 1 x 2 x 2 m (L x P x A), era formado por duas paredes laterais de concreto que separavam dois viveiros adjacentes, e uma tela metálica que formava a parte da frente, de trás e de cima (Figura 4.2). O piso de cada viveiro, por sua vez, era de concreto lavável. Cada viveiro foi provido com: (1) uma caixa-ninho feita de bambu natural pendurada da tela superior; (2) vários poleiros de madeira fixados em diferentes alturas; (3) um suporte metálico para um recipiente contendo alimento fresco; (4) um cano de PVC pendurado da tela superior contendo ração seca; e (5) e um bebedouro.



**Figura 4.2.** Fotografias do Pavilhão dos Calitriquídeos do CPUUnB. (a) Vista frontal, com a porta central de acesso; (b) Vista interna, a partir do corredor central de segurança e com a disposição dos dois corredores paralelos de 12 viveiros; e (c, d) vistas externas laterais (fotos: Marília Barros).

A dieta dos animais consistiu em frutas, legumes e verduras, acrescido de ovos cozidos, sementes/nozes, larvas de tenébrio e/ou peito de frango e carne moída cozidos. Esses alimentos frescos foram fornecidos diariamente às 07:00 h e as sobras retiradas às 17:00 h. Além disso, água e ração para primatas estavam disponíveis *ad libitum*. As condições descritas acima para o alojamento e a manutenção dos animais

estão de acordo com as normas e regulamentos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

#### **4.3. Aferição e análise da temperatura da membrana timpânica (TMT)**

A TMT esquerda e direita de cada sujeito foi aferida imediatamente antes e logo após cada sessão experimental dos testes comportamentais descritos abaixo. Para tanto, foi empregado um termômetro auricular digital infravermelho clínico (IFR 100 Dual Mode, Microlife, Brasil), cuja aplicabilidade para uso em pequenos primatas neotropicais já foi demonstrada (BOERE e cols., 2005; LONG e cols., 2011; PEREIRA e BARROS, 2016; TOMAZ e cols., 2003). O aparelho possui uma faixa de operação de 10 a 50°C, uma sensibilidade de 0,1°C e uma precisão de  $\pm 0,2^\circ\text{C}$  (entre 32,0 – 42,2°C).

Após a captura e contenção manual do animal, a orelha do mico foi puxada suavemente para trás e o termômetro inserido no ouvido direito ou esquerdo, iniciando a mensuração que levou aproximadamente 2 s. Foram realizadas de quatro a seis aferições, dependendo do experimento, em intervalos de 5 s: 2-3 no ouvido direito e 2-3 no esquerdo. Essas medidas foram realizadas uma de cada vez, sempre alternando o lado entre cada aferição, sendo que o primeiro lado a ser avaliado foi estabelecido de forma aleatória. Apenas a temperatura mais elevada foi registrada, visando assim minimizar possíveis erros ao posicionar o termômetro no ouvido. A TMT é mais elevada que a temperatura dos demais tecidos ao redor (HEUSCH e cols., 2006). Após o seu uso, o termômetro foi devidamente higienizado antes de ser empregado em um novo sujeito.

Para minimizar a influência de possíveis diferenças interindividuais nos valores iniciais basais da TMT (dados pré-teste), o valor observado antes do teste foi subtraído da medida registrada após o respectivo teste, gerando assim um escore de diferença (*difference score*):  $\Delta = \text{temperatura pós-teste} - \text{temperatura pré-teste}$  (em graus Celsius). Um valor positivo de  $\Delta$  indica que a temperatura aumentou durante a sessão experimental, enquanto um escore negativo revela que esse parâmetro diminuiu.

## 5. ESTUDO 1: AMEAÇA HUMANA E CONFRONTO COM PREDADOR

### 5.1. Aspectos gerais

Este primeiro estudo teve como objetivo verificar se diferentes tipos de estímulos aversivos são capazes de induzir uma resposta de estresse em micos-estrela adultos, e se essa resposta é processada predominantemente por um dos hemisférios cerebrais. Para tanto, comparou-se dois testes experimentais amplamente empregados em PNH, e em micos em particular: *Ameaça Humana* e *Confronto com Predador*. Esses dois testes foram brevemente discutidos na seção 1.6. Em micos, esses dois protocolos experimentais parecem refletir diferentes aspectos do estado emocional do animal: respostas inatas versus respostas aprendidas (CAGNI e cols., 2009). Nesse sentido, pode-se inferir que esses testes possam ser processados por mecanismos neurais distintos. Apesar desse aspecto ainda não ter sido investigado, há relatos de que manipulações farmacológicas geram alterações comportamentais distintas em cada um desses testes (CAGNI e cols., 2009).

Assim, no presente estudo, estabeleceu-se a TMT direita e esquerda dos sujeitos antes e após os testes de ansiedade de *Ameaça Humana* e *Confronto com Predador*, correlacionando as mudanças observadas na TMT com as respostas comportamentais e os níveis de cortisol observados ao final de cada teste.

Os resultados desse estudo já foram publicados (*Physiology and Behavior* 195: 112-117, 2018; doi: 10.1016/j.physbeh.2018.07.027).

### 5.2. Procedimento experimental

#### 5.2.1. Sujeitos

Foram utilizados 12 micos-estrela adultos (*C. penicillata*, seis machos, seis fêmeas), com idade entre 4,5-8,0 anos e pesando  $360 \pm 12$  g no início dos experimentos (média  $\pm$  sem; variação: 325-455 g). Nenhuma fêmea estava prenha no momento dos procedimentos ou tinha tido filhotes recentemente. Os micos usados foram alojados aos pares, sendo testados em seus próprios viveiros de moradia do CPUUnB. Contudo, nesse

experimento, somente um animal de cada viveiro foi utilizado como sujeito experimental, sendo avaliado o seu comportamento, nível de cortisol sanguíneo e TMT. Apesar do outro mico do viveiro também ter sido exposto ao procedimento descrito a seguir, não foram registrados dados para esse animal.

Ademais, vale ressaltar que animais silvestres podem ser vistos nas proximidades do CPUUnB, embora felinos selvagens nunca foram vistos. Além disso, somente pessoas envolvidas na rotina diária de manejo e de pesquisa tiveram acesso aos animais.

### **5.2.2. Aferição das temperaturas da membrana timpânica e subcutânea**

As TMT direita e esquerda dos micos foram aferidas imediatamente antes e após o procedimento experimental descrito abaixo, conforme a metodologia descrita acima na Seção 4.3. Para todos os sujeitos, foram realizadas quatro aferições em cada uma das etapas, em intervalos de 5 s: duas no ouvido esquerdo e duas no ouvido direito.

A leitura da temperatura subcutânea (TSC) também foi aferida após o teste para estabelecer se possíveis mudanças na TMT estavam relacionadas a um efeito geral na temperatura corporal.

### **5.2.3. Coleta e análise dos dados comportamentais**

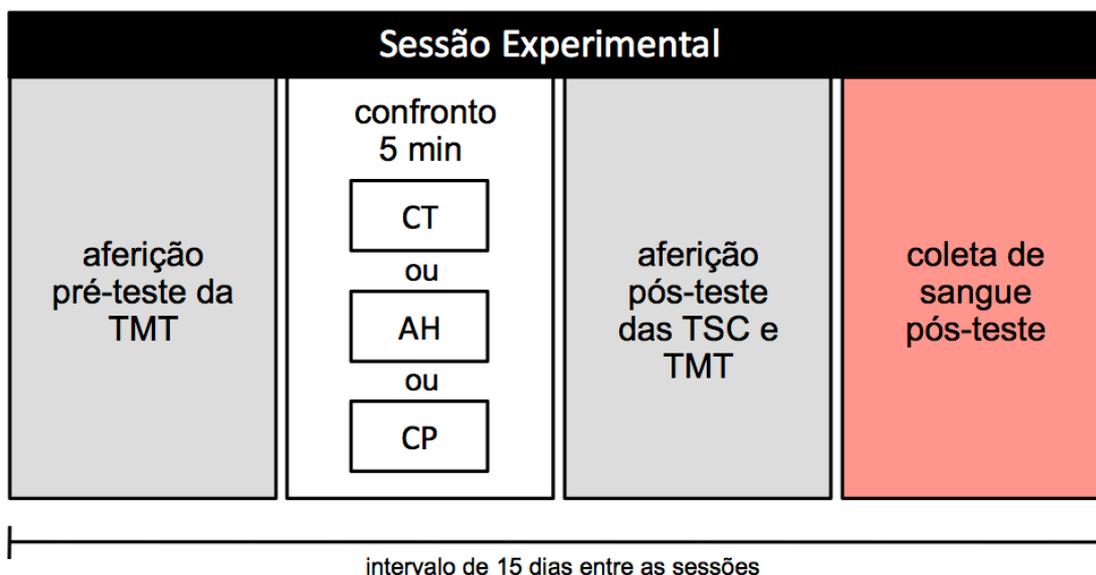
Cada sujeito foi submetido a três sessões experimentais, realizadas em intervalos de 15 dias (Figura 5.1). Em cada sessão o mico foi confrontado com: (1) um observador humano (teste de *Ameaça Humana*, AH); (2) um gato-do-mato taxidermizado (*Leopardus tigrinus*; teste de *Confronto com Predador*, CP); ou (3) nenhum estímulo aversivo (sessão controle, CT). Esses estímulos aversivos já foram usados anteriormente para induzir medo e ansiedade nessa mesma espécie (BARROS e cols., 2008; CAGNI e cols., 2009). Para cada sujeito, a sequência específica das três sessões foi estabelecida de forma aleatória. Além disso, em cada dia de experimento, os sujeitos foram testados seguindo uma ordem aleatória, sendo que as sessões foram

realizadas entre às 12:00 e 16:30 h quando a temperatura corporal geral dos micos e o padrão de atividade permanece constante (HETHERINGTON, 1978; HOFFMANN e cols., 2012).

Antes de iniciar cada sessão, uma cortina foi colocada no corredor central do Pavilhão dos Calitriquídeos do CPUUnB de forma a isolar a área em frente ao viveiro de moradia do sujeito sendo testado, minimizando assim a possibilidade de que os animais dos demais viveiros visualizassem os procedimentos sendo feitos. Contudo, não houve um isolamento acústico ou olfativo. A cortina foi retirada ao final da sessão.

Independente do estímulo específico que foi testado, cada sessão foi dividida em três fases consecutivas, a saber: (1) aferição pré-teste da TMT, (2) confronto de 5 min, e (3) aferição pós-teste da TMT (Figura 5.1). Em cada sessão o mico foi capturado em seu viveiro de moradia, sendo então aferida a sua TMT pré-teste, conforme o procedimento descrito acima (Etapa 1). Em seguida, o animal foi colocado de volta em seu viveiro de origem. O tempo necessário para capturar o sujeito foi registrado, levando-se  $41 \pm 5$ ,  $42 \pm 4$  e  $49 \pm 10$  s (média  $\pm$  epm) para as sessões CT, AH e CP, respectivamente.

Em seguida, o estímulo aversivo pré-estabelecido foi posicionado dentro da área de isolamento em frente ao viveiro do sujeito, dando-se início aos 5 min da fase de confronto (Etapa 2). Para a sessão do teste AH, um observador humano familiar e que usava as mesmas luvas de couro utilizadas para captura dos animais, ficou parado a 50 cm da tela frontal do viveiro. Durante o período do confronto, o observador procurou manter contato visual com o sujeito. Para a sessão do teste CP, o gato-do-mato foi colocado em cima de um suporte metálico de 1,5 m de altura, também posicionado a 50 cm da tela frontal do viveiro. Para a sessão CT, nenhum estímulo aversivo foi apresentado ao sujeito.



**Figura 5.1.** Representação esquemática da sequência das fases do procedimento do Estudo 1, incluindo ao final a etapa de coleta de sangue, realizada para cada uma das três diferentes condições experimentais: sessão controle (CT), sessão do teste de ameaça humana (AH), sessão do teste de confronto com predador (CP). Todos os sujeitos (n=12) foram avaliados nas três condições, sendo as sessões realizadas em intervalos de 15 dias. A ordem específica das três sessões variou aleatoriamente para cada sujeito.

Após a fase de confronto, o estímulo aversivo (quando presente) foi retirado e o sujeito novamente capturado em seu viveiro de moradia. Realizou-se então a aferição pós-teste da TMT e TSC, seguindo o mesmo procedimento já descrito anteriormente (Etapa 3). O tempo para capturar o sujeito nesse segundo momento foi de  $35 \pm 5$ ,  $35 \pm 4$  e  $41 \pm 7$  s (média  $\pm$  epm) para as sessões CT, AH e CP, respectivamente. O sujeito foi então levado para uma sala de procedimento, adjacente ao Pavilhão de Calitriquídeos do CPUUnB, onde foi realizada a coleta de sangue conforme descrição abaixo.

Durante a fase de confronto de cada sessão, um observador ficou sentado 1 m atrás do estímulo para registrar a resposta comportamental do sujeito. Este observador, que tinha uma confiabilidade intra-observador de 95%, registrou os seguintes comportamentos no programa AnyMaze (Stoelting, EUA): (1) Olhar direto, frequência do movimento de direcionar o olhar e a cabeça rapidamente ( $< 2$  s) em direção ao estímulo aversivo; (2) *Head-cock*, frequência de movimentos repetitivos da cabeça, de um lado para o outro, direcionado ao estímulo aversivo; (3) Locomoção: tempo em movimento por um intervalo  $> 2$  s; (4) Proximidade ao estímulo: tempo de permanência

em contato com a tela frontal do viveiro; (5) *Swaying*: movimentos pendulares laterais, rápidos e repetitivos, do corpo todo; (6) Vocalização *tsik-tsik*: duração da emissão desse tipo de vocalização de alarme; e (7) Vigilância: varredura contínua ou outros movimentos visíveis de cabeça enquanto o animal permaneceu parado. Os comportamentos registrados foram baseados em etogramas (STEVENSON e RYLANDS, 1988) e estudos anteriores realizados nessa mesma espécie (BARROS e cols., 2004; CAGNI e cols., 2009, 2012).

#### **5.2.4. Coleta de sangue e dosagem do cortisol sérico**

Ao longo do procedimento comportamental descrito acima foram coletadas três amostras de sangue de cada sujeito (Figura 5.1). Cada amostra foi obtida imediatamente após a aferição pós-teste das TMT e TSC de cada sessão. Todas as amostras foram obtidas por um médico veterinário do CPUUnB.

Para cada coleta de sangue, o animal foi levado para uma sala de procedimento, localizada em uma área adjacente aos viveiros de moradia dos micos. Lá o animal foi anestesiado por via inalatória com isoflurano (Fluorane®) usando um vaporizador universal fixado em 2% e com um fluxo de 1 L/min de oxigênio. Uma vez que o animal foi anestesiado, coletou-se uma amostra de 0,5 mL de sangue via punção da veia femoral. A amostra foi transferida para um tubo de 4 mL contendo ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Brasil) e mantida resfriada até seu processamento inicial. Após recuperar do efeito da anestesia (1-2 min), o sujeito foi levado de volta ao seu viveiro de moradia e monitorado por mais 15-30 min.

O tempo para obter cada amostra de sangue foi registrado para verificar se o procedimento de coleta de sangue teve influência no nível de cortisol detectado. Esse parâmetro compreendeu o intervalo de tempo entre a entrada no viveiro de moradia para a captura do sujeito e o final do procedimento de venopunção, incluindo, portanto, o tempo necessário para a aferição pós-teste da TMT. Desta forma, foi necessário  $4,59 \pm 0,12$ ,  $5,10 \pm 0,20$  e  $5,03 \pm 0,09$  min (média  $\pm$  epm) para se obter as amostras de

sangue após as sessões CT, AH e CP, respectivamente. Em micos, amostras de sangue obtidas em até 5 min não parecem influenciar significativamente os níveis de cortisol (SALTZMAN e cols., 1994). Além disso, apesar do conhecido efeito do isoflurano nas concentrações de cortisol em animais e humanos, isso só é significativo após exposições mais prolongada a esse anestésico (>30 min; NISHIYAMA e cols., 2005; ZARDOOZ e cols., 2010).

Cada amostra de sangue foi centrifugada a 3.000 rpm, por 5 min e a temperatura ambiente e o sobrenadante (soro) transferido para um tubo de polipropileno de 0,5 mL. A amostra foi então diluída 1:50 com diluente específico (soro:diluente; Multi-diluent, Siemens, Brasil), para em seguida ser determinada a concentração sérica de cortisol via um único ensaio imunológico quimioluminescente (chemiluminescence immunoassay, CLIA) usando um kit comercial para o sistema automatizado ADVIA Centaur® XP (Siemens, Brasil). O fator de diluição usado foi baseado em um estudo similar (DUARTE e cols., 2015). A sensibilidade do ensaio foi de 1 µg/dL e os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 9,8% e 7,5%, respectivamente. A dosagem de cortisol foi realizada com o apoio do Laboratório Sabin (Brasília, DF).

#### **5.2.5. Análise estatística**

Os dados comportamentais e os níveis de cortisol foram analisados para determinar possíveis diferenças entre os gêneros e as sessões. Para tanto, utilizou-se uma análise de variância (ANOVA) de duas vias de desenho misto (*mixed-design two-way Analysis of Variance*), com 'sexo' (machos x fêmeas) como o fator independente e 'sessão' (CT x AH x CP) como a variável dependente. Para cada sexo, uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas foi empregada para se estabelecer uma possível diferença entre os hemisférios cerebrais e as sessões em termos do escore  $\Delta$  da TMT. Aqui, os fatores 'hemisfério cerebral' (esquerdo x direito) e 'sessão' (CT x AH x CP) foram usados com a variável de medida repetida. No caso de um resultado significativo, os dados foram analisados em seguida como o teste de Tukey. Ademais, os valores de

escores  $\Delta$  das TMT também foram comparados ao nível do acaso (valor de zero) usando o teste t de uma amostra (*one-sample t test*).

Baseado em estudos anteriores (CLARA e cols., 2008; CROSS e ROGERS, 2006), o teste de correlação de Pearson foi utilizado para estabelecer a relação entre a vocalização *tsik-tsik* e os níveis de cortisol no teste CP. Esse mesmo teste também foi empregado para estabelecer a relação entre os seguintes parâmetros: (1) a concentração de cortisol e o tempo necessário para se obter a respectiva amostra de sangue; (2) a TMT pré/pós-teste e o tempo necessário para capturar os animais; e (3) a TMT pós-teste e a TSC pós-teste. Em todas as análises descritas acima, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

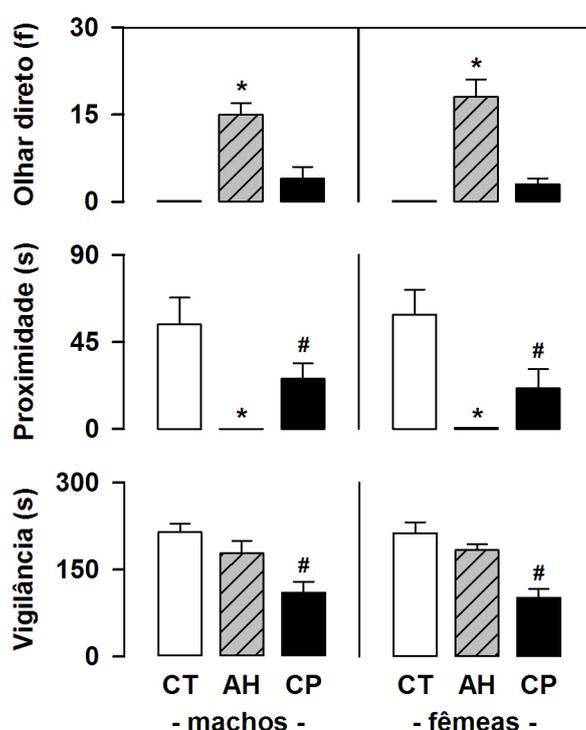
### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Resposta comportamental nas sessões experimentais

Quando os micos foram confrontados com o observador humano (teste AH) eles olharam significativamente mais para esse estímulo, independente do sexo, comparado ao que foi registrado para o gato-do-mato (teste CP) e na sessão controle (CT) [fator gênero:  $F(1,10)=0,02$ ;  $p=0,91$ ; fator sessão:  $F(2,20)=37,85$ ;  $p < 0,001$ ; interação:  $F(2,20)=1,00$ ;  $p=0,38$ ; Figura 5.2]. Ademais, eles passaram significativamente menos tempo em contato com a tela frontal do seu viveiro de moradia (i.e., proximidade ao estímulo), comparado as sessões CP e CT. Inclusive, os níveis de proximidade observados durante o teste CP também foram significativamente menores que os da sessão controle (CT) [fator gênero:  $F(1,10)=0,01$ ;  $p=0,98$ ; fator sessão:  $F(2,20)=13,52$ ;  $p=0,003$ ; interação:  $F(2,20)=0,02$ ;  $p=0,92$ ; Figura 5.2].

Por outro lado, durante o teste CP, os micos machos e fêmeas realizaram significativamente mais comportamentos de *head-cock*, vocalizações do tipo *tsik-tsik*, *swaying* e atividade locomotora, comparado aos baixos níveis visto para esses comportamentos durante o teste AH e na sessão CT [*Head-cock* – fator gênero:  $F(1,10)=0,55$ ;  $p=0,47$ ; fator sessão:  $F(2,20)=27,10$ ;  $p < 0,001$ ; interação:  $F(2,20)=0,25$ ;

$p=0,69$ ; *Vocalização tsik-tsik* – fator gênero:  $F(1,10)=0,01$ ;  $p=0,97$ ; fator sessão:  $F(2,20)=23,94$ ;  $p < 0,001$ ; interação:  $F(2,20)=0,01$ ;  $p=0,95$ ; *Swaying* – fator gênero:  $F(1,10)=0,02$ ;  $p=0,90$ ; fator sessão:  $F(2,20)=13,24$ ;  $p=0,004$ ; interação:  $F(2,20)=0,09$ ;  $p=0,78$ ; *Locomoção* – fator gênero:  $F(1,10)=0,04$ ;  $p=0,84$ ; fator sessão:  $F(2,20)=5,61$ ;  $p=0,01$ ; interação:  $F(2,20)=0,04$ ;  $p=0,96$ ; Figura 5.3]. Além disso, para machos e fêmeas, o tempo de vigilância foi significativamente menor durante o teste CP, do que nas sessões AH e CT [fator gênero:  $F(1,10)=0,03$ ;  $p=0,85$ ; fator sessão:  $F(2,20)=18,09$ ;  $p < 0,001$ ; interação:  $F(2,20)=0,17$ ;  $p = 0,81$ ; Figura 5.2].

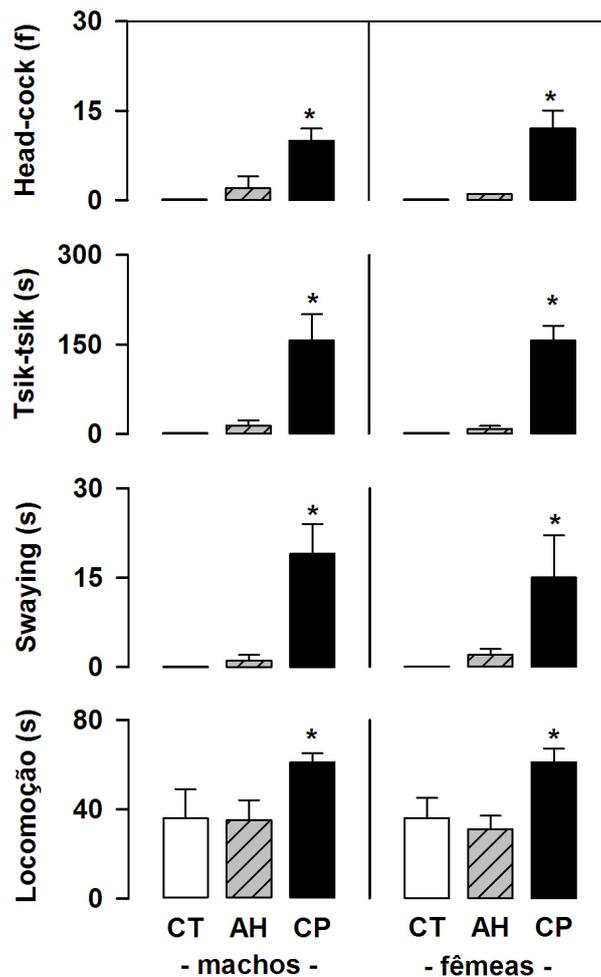


**Figura 5.2.** Resposta comportamental dos micos machos e fêmeas durante a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT): olhar direto (frequência), proximidade e vigilância (em segundos).  $n=6/\text{gênero}$ ; dados expressos como a média+epm; \* $p < 0,05$  vs. sessões CT e CP, # $p < 0,05$  vs. sessões CT e AH.

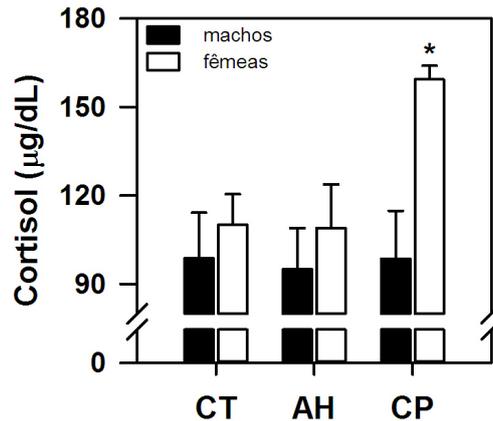
### 5.3.2. Concentração de cortisol pós-teste

A concentração de cortisol foi significativamente maior no teste CP do que a vista na sessão CT, mas isso apenas para as fêmeas [fator gênero:  $F(1,10)=2,06$ ;  $p=0,19$ ; fator sessão:  $F(2,20)=11,19$ ;  $p=0,003$ ; interação:  $F(2,20)=9,48$ ;  $p=0,005$ ; Figura 5.4]. Nessa mesma sessão, e também apenas para as fêmeas, a concentração de cortisol

estava correlacionada, negativamente, aos níveis de vocalização *tsik-tsik* [machos:  $r=0,28$ ;  $p=0,58$ ; fêmeas:  $r=-0,84$ ;  $p=0,03$ ]. Além disso, a concentração de cortisol em ambos os sexos não estava relacionada ao tempo requerido para obter a amostra de sangue [machos – CT:  $r= -0,41$ ;  $p=0,43$ ; AH:  $r=0,55$ ;  $p=0,25$ ; CP:  $r=0,13$ ,  $p=0,81$ ; fêmeas – CT:  $r=0,63$ ;  $p=0,25$ ; AH:  $r=0,21$ ;  $p=0,69$ ; CP:  $r=0,46$ ;  $p=0,37$ ].



**Figura 5.3.** Resposta comportamental dos micos machos e fêmeas durante a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT): *head-cock* (frequência), vocalização de alarme *tsik-tsik*, *swaying* e locomoção (em segundos).  $n=6$ /gênero; dados expressos como a média+epm; \* $p<0,05$  vs. sessões CT e AH.



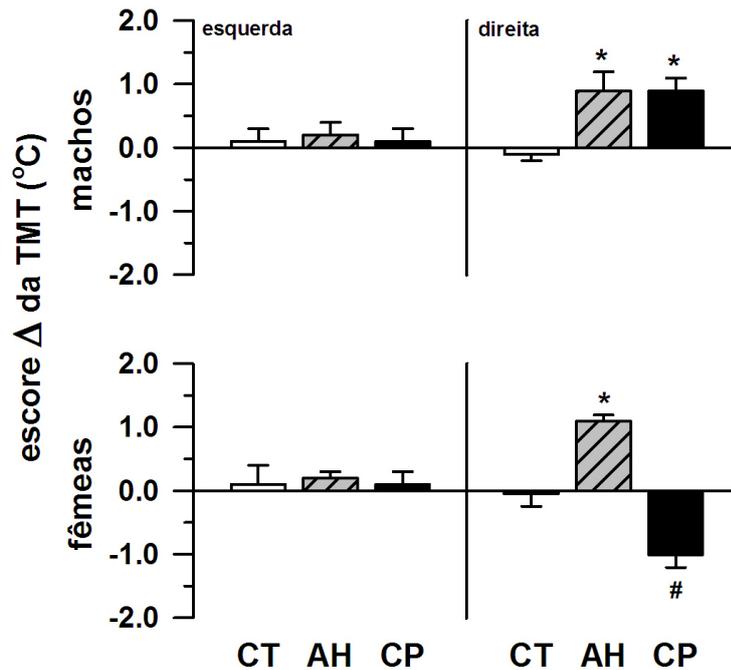
**Figura 5.4.** Concentração de cortisol (média+epm) dos micos machos e fêmeas logo após a fase de 5 min de confronto do teste de Ameaça Humana (AH) e Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT). n=6/gênero; \*p<0,05 vs. sessões CT e AH (nas fêmeas).

### 5.3.3. Temperatura da membrana timpânica (TMT)

Quando os machos foram confrontados com o observador humano e o gato-domato, houve um aumento significativo na TMT direita, mas durante a sessão CT este parâmetro permaneceu inalterado. A TMT esquerda dos machos também permaneceu constante, independente da condição experimental ao qual foi submetido [fator lado:  $F(1,10)=4,51$ ;  $p=0,07$ ; fator sessão:  $F(2,20)=6,00$ ;  $p=0,01$ ; interação:  $F(2,20)=5,07$ ;  $p=0,02$ ; Figura 5.5]. Este perfil foi corroborado pelos resultados do teste t de uma amostra (*one-sample t-test*). Essa análise indicou que, apenas nos testes AH e CP, os escores  $\Delta$  da TMT direita estavam significativamente acima de zero [escore  $\Delta$  TMT esquerda – teste CT:  $t(5)=0,34$ ;  $p=0,75$ ; teste AH:  $t(5)=0,73$ ;  $p=0,50$ ; teste CP:  $t(5)=0,54$ ;  $p=0,61$ ; escore  $\Delta$  TMT direita – teste CT:  $t(5)=-1,45$ ;  $p=0,18$ ; teste AH:  $t(5)=3,45$ ;  $p=0,02$ ; teste CP:  $t(5)=4,20$ ;  $p=0,008$ ; Figura 5.5].

Nas fêmeas, por sua vez, a TMT direita aumentou significativamente no teste AH e diminuiu no teste CP. Isso diferiu significativamente da temperatura que permaneceu inalterada durante a sessão CT. Ademais, no ouvido esquerdo das fêmeas, nenhuma alteração de temperatura foi observada em nenhuma das sessões experimentais [fator lado:  $F(1,10)=0,01$ ;  $p=0,92$ ; fator sessão:  $F(2,20)=9,89$ ;  $p=0,003$ ; interação:  $F(2,20)=8,00$ ;  $p=0,006$ ; Figura 5.5]. Os resultados do teste t de uma amostra indicaram

que, apenas no ouvido direito, os escores  $\Delta$  da TMT diferiram significativamente de zero, com uma diferença positiva ocorrendo no teste AH e uma negativa no teste CP [escore  $\Delta$  TMT esquerda – teste CT:  $t(5)=0,20$ ;  $p=0,85$ ; teste AH:  $t(5)=1,14$ ;  $p=0,17$ ; teste CP:  $t(5)=0,47$ ;  $p=0,66$ ; escore  $\Delta$  TMT direita – teste CT:  $t(5)= -0,17$ ;  $p=0,87$ ; teste AH:  $t(5)=7,27$ ;  $p=0,005$ ; teste CP:  $t(5)= -4,28$ ;  $p=0,008$ ; Figura 5.5].



**Figura 5.5.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos machos e fêmeas, durante a fase de 5 min de confronto no teste de Ameaça Humana (AH) e Confronto com Predador (CP), e na condição controle quando nenhum estímulo aversivo estava presente (CT). Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C;  $n=6$ /gênero; \* $p<0,05$  vs. sessão CT (ouvido direito), \*\* $p<0,05$  vs. sessões CT e AH (ouvido direito).

Vale ressaltar que o tempo necessário para capturar os micos em seus viveiros de moradia não estava correlacionado aos valores absolutos das TMT pré- ou pós-teste (Tabela 5.1). Da mesma forma, a TMT pós-teste não estava correlacionada a TSC pós-teste (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Relação entre o valor absoluto da temperatura da membrana timpânica (TMT) e o tempo de captura no viveiro de moradia ou a temperatura subcutânea (TSC) registrados antes e/ou depois das sessões controle (CT), de ameaça humana (AH) e de confronto com predador (CP), expressa como o valor de  $r$  da correlação de *Pearson* (e o respectivo valor de  $p$ ).

Comparação	Sessão experimental		
	CT	AH	CP
<i>Tempo captura x TMT esquerda</i>			
pré-teste	-0,12 (0,72)	-0,05 (0,90)	0,22 (0,50)
pós-teste	0,26 (0,40)	0,16 (0,63)	0,25 (0,45)
<i>Tempo captura x TMT direita</i>			
pré-teste	-0,13 (0,70)	0,25 (0,46)	-0,10 (0,76)
pós-teste	0,33 (0,29)	0,28 (0,41)	0,45 (0,12)
<i>TSC x TMT esquerda</i>			
pós-teste	0,50 (0,10)	0,37 (0,26)	0,01 (0,98)
<i>TSC x TMT direita</i>			
pós-teste	0,42 (0,17)	0,28 (0,41)	0,10 (0,78)

#### 5.4. Discussão

Em PNH, um estresse de predação é capaz de induzir alterações adaptativas de curto prazo em termos das respostas comportamentais, hormonais e autonômicas. De fato, ISBELL (2006) propôs que esse tipo de evento aversivo contribuiu para a evolução do SNC dos primatas. No caso específico dos micos, diferentes e complexas estratégias antipredação são relatadas, tendo em vista que esses pequenos primatas apresentam altas taxas de predação (BARROS e cols., 2002; PETRACCA e CAINE, 2013). Essa diversidade de estratégias está mais baseada nas respostas comportamentais dos micos, havendo principalmente um efeito de hiperlocomoção, emissão de vocalizações de alarme, evitação-proximidade ao estímulo (*mobbing*) (BARROS e cols., 2003). Contudo, dependendo do tipo de predador, os micos apresentam respostas específicas (BARROS e cols., 2002; CAGNI e cols., 2009; PETRACCA e CAINE, 2013), o que

demonstra que esses primatas são vulneráveis a uma grande variedade de predadores (p.ex., serpentes, felinos e aves de rapina).

Os resultados do presente estudo corroboram com a hipótese de que a variabilidade vista no padrão de resposta dos micos pode ser atribuída, em parte, ao tipo de estímulo aversivo. Além disso, os dados vistos aqui também corroboram com o fato dos níveis de cortisol nem sempre refletirem corretamente como esses primatas percebem/interpretam estímulos ameaçadores. Vale destacar ainda que, nesta espécie de PNH, eventos aversivos são possivelmente processados de forma assimétrica pelos dois hemisférios cerebrais, conforme visto no presente estudo.

Aqui, a resposta comportamental dos machos aos diferentes eventos ansiogênicos foi equivalente à das fêmeas, como também visto por CAGNI e cols. (2009) ao usar os mesmos estímulos. No entanto, o teste AH induziu significativamente mais olhares diretos e menos proximidade ao estímulo do que a outra condição experimental (CAGNI e cols., 2009; CAREY e cols., 1992; COSTALL e cols., 1992), enquanto que o predador taxidermizado induziu altos níveis de *head-cock*, *swaying*, locomoção e vocalizações do tipo *tsik-tsik* (CAGNI e cols., 2009). Em calitriquídeos, acredita-se que o comportamento de *head-cock* reflita uma exploração geral do ambiente (KAPLAN e ROGERS, 2006), já os demais parâmetros citados acima estão mais relacionados ao medo (BARROS e cols., 2002; FERRARI e LOPES, 1990; PETRACCA e CAINE, 2013).

Na verdade, quando os micos foram expostos ao predador taxidermizado eles demonstraram uma resposta comportamental de *mobbing*, a qual é uma reação de conflito. Essa pôde ser evidenciada por haver concomitantemente uma reação de aproximação e de evitação ao estímulo, uma vez que houve um nível intermediário de proximidade com altos níveis de locomoção, assim como a emissão de vocalizações do tipo *tsik-tsik* que são tipicamente exibidas em resposta a uma ameaça terrestre (BARROS e cols., 2002; CORRÊA e COUTINHO, 1997; FERRARI e LOPES, 1990). Essa resposta de *mobbing* pode atuar como um sinal de alerta para outros indivíduos a

respeito de um perigo potencial no ambiente e/ou induzir no grupo uma reação coordenada de ataque defensivo contra o estímulo aversivo (TEIXEIRA e cols., 2016). RUKSTALIS e FRENCH (2005) sugerem ainda que o *mobbing* atua no sentido de minimizar (*buffer*) a resposta hormonal ao estresse.

Além disso, no presente estudo, os baixos níveis de vigilância observados durante o teste CP podem, na verdade, estar associados a relação negativa entre esse comportamento e o efeito de hiperlocomoção tipicamente induzido durante eventos ansiogênicos (BARROS e cols., 2016).

Ao contrário da resposta comportamental, houve um aumento na atividade do eixo HPA apenas nas fêmeas confrontadas com o predador taxidermizado. Nas sessões AH e CT, os níveis de cortisol foram equivalentes, tanto nos machos como nas fêmeas. Nessas sessões, as concentrações observadas foram, inclusive, semelhantes as já indicadas na literatura para indivíduos não-estressados (Lima e cols., 2008; PRYCE e cols., 2002; SALTZMAN e ABBOTT, 2011). Vale ressaltar que os níveis de cortisol observados no presente estudo não estavam relacionados ao possível estresse gerado pelo próprio procedimento de coleta de sangue.

Nas fêmeas, já foi relatado um aumento na concentração plasmática de cortisol após um confronto com um modelo de ave de rapina (SALTZMAN e ABBOTT, 2011). Por outro lado, em ambos os sexos, os níveis de cortisol detectados na saliva diminuíram após um confronto com um modelo de cobra de madeira (CROSS e ROGERS, 2006). Essa redução na atividade do eixo HPA foi atribuída pelos pesquisadores a um possível efeito de *buffering* induzido pela emissão de vocalizações do tipo *tsik-tsik*, conforme já mencionado acima (CROSS e ROGERS, 2006). De fato, no caso das fêmeas que foram submetidas ao teste CP no presente estudo, quanto maior a emissão desse tipo específico de vocalização, menor foi a liberação de cortisol. Portanto, uma redução dos níveis de cortisol parece depender da quantidade de vocalizações emitidas pelos micos em resposta ao estímulo aversivo (CROSS e ROGERS, 2006). Tal fato corrobora ainda mais a ideia de haver um efeito de *buffering*

(*vocal buffering*), em que indivíduos com uma resposta comportamental mais pró-ativa teriam uma resposta hormonal mais atenuada à eventos ansiogênicos (estresse de predação: CLARA e cols., 2008; CROSS e ROGERS, 2006; isolamento social: RUKSTALIS e FRENCH, 2005).

No entanto, características inerentes de cada estímulo podem ter contribuído para a variabilidade das respostas comportamental e hormonal que foi observada no presente estudo. Nesse sentido, interações negativas com seres humanos parecem ser constantemente reforçadas via mecanismos de medo aprendido, e assim tal situação passa a ser vista como um evento aversivo consistente. Por outro lado, o gato taxidermizado pode induzir uma resposta de medo mais inata ou ser algo mais socialmente aprendido. Mas, nas condições em que foi apresentado, esse estímulo pode constituir uma ameaça altamente ambígua, uma vez que o mesmo não emite reações explícitas de ataque que são tipicamente associadas a um predador na natureza (CAGNI e cols., 2009). Ademais, foi visto no presente estudo que as respostas comportamental e hormonal nem sempre coincidiram conforme o esperado e, portanto, uma análise apenas dos níveis de cortisol nem sempre parece refletir de forma precisa como esses primatas reagem a eventos aversivos. Assim, um ser humano e um predador taxidermizado, que são frequentemente empregados como estímulos aversivos para micos, podem estar associados a aspectos distintos do estado emocional desses animais (i.e., resposta inata x aprendida).

Os resultados comportamentais e hormonais observados no presente estudo devem ser generalizados com cautela, considerando que foi usado um número pequeno de sujeitos, que o observador que registrou os dados não era cego para qual sessão experimental estava sendo realizada, e que a presença de outros indivíduos no viveiro durante os testes pode ter influenciado a resposta dos sujeitos. Todos esses aspectos também podem ter contribuído para as diferenças observadas entre os sexos em termos da liberação de cortisol.

Um resultado de grande relevância no presente estudo foi a alteração detectada apenas na TMT direita em resposta aos estímulos aversivos. Portanto, tais eventos parecem ser processados preferencialmente pelo hemisfério direito do cérebro dessa espécie de PNH, visto que a TMT não estava relacionada ao tempo de captura ou alterações gerais na temperatura corporal (i.e., TSC). A TMT parece então refletir mudanças ipsilaterais no fluxo sanguíneo e na temperatura do cérebro (p.ex., humanos: CHU e cols., 2000; animais: BAKER e cols., 1972) induzidas pelo aumento da atividade neuronal (GUR e cols., 1994; YABLONSKIY e cols., 2000). Acredita-se que o hemisfério direito esteja preferencialmente envolvido no processamento de eventos aversivos em humanos e animais (revisado em GAINOTTI, 2012; ROGERS, 2009), incluindo calitriquídeos (TMT: TOMAZ e cols., 2003; preferência manual: CAMERON e ROGERS, 1999; expressão facial e vocalização: HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998; conteúdo neuroquímico: SOUZA SILVA e cols., 2007) e outros PNH (chimpanzés: Fernández-CARRIBA e cols., 1990; Hopkins e Bennett, 1994; PARR e HOPKINS, 2000; rhesus: BOYCE e cols., 1996; KALLIN e cols., 1998; babuínos: CASPERD e DUNBAR, 1996; WALLEZ e VAUCLAIR, 2011).

No entanto, estímulos positivos, negativo e neutros não foram comparados diretamente no presente estudo e, portanto, os resultados aqui apresentados não devem ser considerados como evidência para corroborar um dos modelos teóricos sobre a lateralização hemisférica das emoções (i.e., hipótese da valência x hipótese do hemisfério direito; DAVIDSON, 1992; GAINOTTI, 2012).

Vale ressaltar ainda que, nas fêmeas, a TMT direita aumentou no teste AH e diminuiu no teste CP, enquanto nos machos esse mesmo parâmetro aumentou em ambas as sessões. Em PNH, tanto para um aumento (PARR e HOPKINS, 2000), como uma diminuição na TMT (BOYCE e cols., 1996) já foi atribuído a maior atividade neuronal durante eventos aversivos. De fato, sabe-se que a temperatura do cérebro pode oscilar em direções opostas, dependendo de onde a atividade está ocorrendo predominantemente (i.e., estruturas mais profundas x áreas corticais mais superficiais;

SUKSTANSKII e YABLONSKIY, 2006). Além disso, a discrepância que foi vista em termos da direção com que a TMT oscilou (i.e., aumento x diminuição) pode estar relacionada à: (1) diferenças na temperatura basal/inicial; (2) uma concomitante lateralização hemisférica de funções cognitivas, que podem estar relacionadas a resposta emocional (inata x aprendida); e/ou (3) características inerentes ao indivíduo e/ou espécie (PROPPER e BRUNYÉ, 2013; SUKSTANSKII e YABLONSKIY, 2006). Ainda, uma possível diferença entre os sexos em termos do processamento de eventos emocionais em nível hemisférico não foi suficientemente avaliada em PNH, sendo que estudos já publicados não relataram efeitos significativos (FAGOT e VAUCLAIR, 1991; KALIN e cols., 1998; TOMAZ e cols., 2003; YABLONSKIY e cols., 2000).

Desta forma, fica em aberto o significado funcional da direção específica das alterações na TMT que foram observadas, assim como o efeito do sexo no processamento de estímulos aversivos. HANBURY e cols. (2013) argumentam, inclusive, que pode ser mais importante identificar mudanças na TMT em si, do que interpretar o significado funcional da direção específica em que a temperatura oscilou.

## **5.5. Conclusão**

Os resultados do presente estudo indicam que, embora micos-estrela adultos reagem rapidamente a estímulos aversivos encontrados em seu ambiente, o perfil da resposta apresentado varia de acordo com características inerentes do estímulo. Essa variabilidade faz com que que esses primatas tenham, na verdade, uma diversidade de respostas especializadas e independentes, e assim suas reações podem ser mais flexíveis e adaptativas aos diferentes desafios encontrados no ambiente (TAYLOR e cols., 2014).

Além disso, foi demonstrado novamente que as respostas comportamental e hormonal nem sempre coincidem. Isso indica, por sua vez, que a análise de apenas um desses parâmetros nem sempre indica corretamente como micos interpretam e reagem a um determinado evento aversivo.

Mas, vale destacar que os dois estímulos aversivos analisados no presente estudo foram processados de forma assimétrica pelo SNC dos micos. As mudanças ocorridas apenas na TMT direita sugerem ainda uma predominância do hemisfério direito no processamento de estímulos aversivos, como no caso da ameaça humana ou de um estresse de predação por um predador taxidermizado. Os resultados também corroboram o uso da termometria da membrana timpânica como um indicador indireto, rápido, não-invasivo e de baixo custo para avaliar a ativação neuronal de animais em tempo real.

## 6. ESTUDO 2: ESTRESSE DE CONTENÇÃO

### 6.1. Aspectos gerais

O segundo estudo teve como objetivo determinar se um evento de estresse de contenção, com breve isolamento social, é capaz de induzir uma resposta de estresse em micos-estrela adultos, e se essa resposta é processada predominantemente por um dos hemisférios cerebrais. A contenção aguda é uma forma amplamente empregada para se avaliar os efeitos do estresse em animais. Ela consiste em restringir os movimentos de forma física ou química, ou limitar significativamente o espaço para se realizar movimentos voluntários (BUYNITSKY e MOSTOFSKY, 2009). Portanto, é um procedimento simples, indolor, reversível e de baixo custo. A contenção pode gerar um estresse no animal, levando a alterações comportamentais, fisiológicas e/ou neuroendócrinas, tais como a ativação do eixo HPA, imunossupressão, déficits cognitivos e diminuição na motivação (BUYNITSKY e MOSTOFSKY, 2009; GLAVIN e cols., 1994).

Vale ressaltar que episódios recorrentes desse tipo de estresse acabam sendo necessários na rotina de manejo de animais em cativeiro. Em micos, a contenção é comumente usada durante procedimentos rápidos, como a injeção de substâncias/medicamentos ou a obtenção de amostras (p.ex., sangue; SCHULTZ-DARKEN, 2003). Mas ela também é empregada durante períodos um pouco mais prolongados, como o isolamento em caixas de confinamento para transporte ou remanejo de recintos (SCHULTZ-DARKEN e cols., 2004).

Nesse estudo, estabeleceu-se a TMT direita e esquerda dos micos-estrela adultos antes e após um intervalo de 15 e 30 min de contenção em uma pequena caixa de transporte e em isolamento social. As alterações na TMT foram correlacionadas aos níveis de cortisol determinados logo após o evento aversivo.

Os resultados desse estudo já foram publicados (*Frontiers in Neuroscience* 13: 913, 2019; doi: 10.3389/fnins.2019.00913).

## **6.2. Procedimento experimental**

### **6.2.1. Sujeitos**

Quinze micos-estrela adultos (*C. penicillata*; 7 machos, 8 fêmeas), com idade entre 4,5-8,0 anos, foram utilizados nesse estudo. Os micos pesavam  $357 \pm 10$  g (média $\pm$ sem; variação: 310-435 g) no início do estudo, e nenhuma fêmea estava prenha no momento dos procedimentos ou tinha tido filhotes recentemente. Todos os sujeitos foram alojados aos pares no CPUUnB, conforme condições detalhadas acima na Seção 4.

Vale ressaltar que os sujeitos já haviam sido submetidos a procedimentos veterinários de rotina envolvendo captura e contenção por intervalos variáveis. Apesar de não ter sido possível determinar a experiência prévia que cada sujeito tinha em relação a contenção, estima-se que os animais do presente estudo já passaram por um procedimento similar ao que foi usado no presente estudo em mais de 50 ocasiões.

### **6.2.2. Aferição das temperaturas da membrana timpânica e subcutânea**

As TMT direita e esquerda dos micos foram aferidas imediatamente antes e após o procedimento experimental descrito abaixo, seguindo a metodologia geral descrita na Seção 4.3. No presente estudo, foram feitas seis leituras da TMT de cada sujeito, em intervalos de 5s: três no ouvido esquerdo e três no ouvido direito.

A TSC também foi aferida antes e logo após o teste para estabelecer se possíveis mudanças na TMT estavam relacionadas a um efeito geral na temperatura corporal. A mesma pessoa realizou todas as aferições.

Nesse estudo, o valor inicial da TMT e da TSC, observado logo antes do procedimento (dados pré-teste), foi subtraído da medida registrada após o teste, gerando assim *escores* de diferença (*difference score*):  $\Delta$  = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste (em °C). Um valor positivo de  $\Delta$  indica que a temperatura aumentou durante a sessão experimental, enquanto um *escore* negativo revela que esse parâmetro diminuiu.

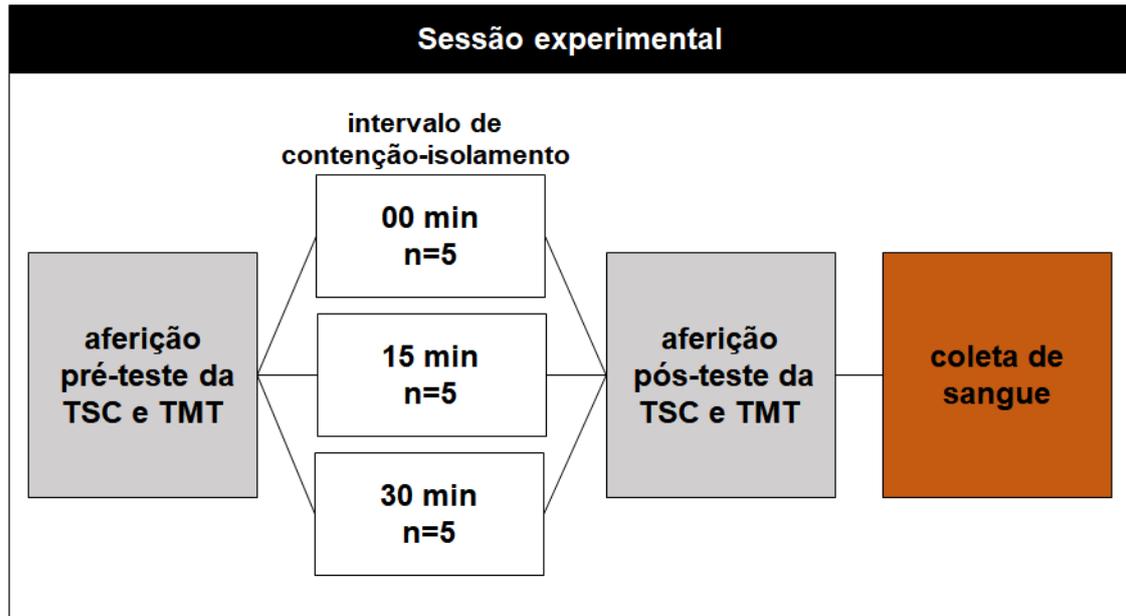
### **6.2.3. Procedimento do estresse de contenção-isolamento (ECI)**

Os sujeitos foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, cada um sendo submetido a um período de estresse de contenção-isolamento (ECI) diferente: 0, 15 ou 30 min (grupos ECI-0, ECI-15 e ECI-30, respectivamente). Esse evento foi assim denominado uma vez que, por um determinado intervalo de tempo, a amplitude dos movimentos voluntários dos animais foi reduzida pelo fato do animal estar dentro de uma caixa de contenção pequena, havendo também uma separação do sujeito do seu ambiente social. O procedimento foi realizado entre às 14:00 e 16:30 h, quando a temperatura geral do corpo e o padrão de atividade dos micos permanecem constantes (HETHERINGTON, 1978; HOFFMANN e cols., 2012).

Cada sujeito foi testado apenas uma vez, sendo a sessão experimental dividida em três etapas consecutivas: (1) aferição pré-teste das temperaturas corporais, (2) período de ECI, e (3) aferição pós-teste das temperaturas corporais (Figura 6.1). Nesse estudo, a resposta comportamental dos sujeitos não foi registrada.

Cada sujeito foi capturado em seu viveiro de moradia, contido manualmente e as TSC e TMT pré-teste aferidas logo em seguida (Etapa 1), conforme procedimento já descrito. O tempo gasto na captura e aferição das temperaturas corporais pré-teste do sujeito foi registrado. O mico foi então colocado dentro de uma caixa de contenção (35 x 20 x 23 cm; L x P x A).

Para os grupos ECI-15 e ECI-30, a caixa de contenção foi levada para uma sala localizada a aproximadamente 50 m dos viveiros de moradia dos sujeitos. Os animais desses dois grupos permaneceram dentro da caixa e nesse local durante o intervalo de ECI pré-estabelecido (15 ou 30 min; Etapa 2). Nesse período, eles não tiveram contato visual ou olfativo com os demais animais do Pavilhão de Calitriquídeos do CPUUnB. Ao final do intervalo de ECI, o sujeito foi levado de volta ao pavilhão de moradia. Lá, foi retirado da caixa de contenção e as TSC e TMT pós-teste foram aferidas (Etapa 3), conforme o procedimento já descrito.



**Figura 6.1.** Representação esquemática da sequência das fases do procedimento do Estudo 2, incluindo ao final a etapa de coleta de sangue, que foi realizada para cada um dos três grupos experimentais. Todos os grupos passaram por todas as etapas, diferindo apenas o intervalo de estresse contenção-isolamento.

Para o grupo controle ECI-0, o mico foi retirado imediatamente da caixa de contenção e as mesmas duas medidas de temperatura corporal pós-teste foram registradas. Assim, para esse grupo, não foi realizada a Etapa 2 do procedimento.

O tempo que levou para obter as temperaturas corporais pós-teste dos sujeitos também foi registrado. Em seguida, o mico foi levado para uma sala de procedimento ao lado do Pavilhão de Calitriquídeos do CPUUnB, onde foi realizada a coleta de uma amostra de sangue.

#### **6.2.4. Coleta de sangue e dosagem do cortisol sérico**

Para cada sujeito, foi obtida uma única amostra de sangue. Essa amostra foi coletada logo após a aferição pós-teste da TMT. Para tanto, o animal foi anestesiado com isoflurano (Fluorane®), por via inalatória, utilizando um vaporizador universal portátil (Brasmed Vetcase, São Paulo, Brasil) fixado em 2% e com um fluxo de 1 L/min de oxigênio. Em seguida, uma amostra de 0,5 mL de sangue foi obtida por meio de uma punção da veia femoral. A amostra foi transferida para um tubo de 4 mL contendo ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Brasil) e mantida resfriada até seu

processamento inicial. Após recuperar do efeito da anestesia (1-2 min), o sujeito foi levado de volta ao seu viveiro de moradia e monitorado por mais 15-30 min. O tempo para obter cada amostra de sangue foi registrado para verificar se esse procedimento influenciou o nível de cortisol detectado (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental nos micos submetidos a um evento de estresse de contenção-isolamento por 0, 15 ou 30 minutos (média± epm).

Etapa do procedimento	Estresse de contenção-isolamento		
	00-min	15-min	30-min
captura no viveiro pré-teste (s)	19±7	12±3	26±7
aferição pré-teste da temperatura (s)	50±2	49±1	49±1
aferição pós-teste da temperatura (s)	51±2	50±2	48±1
coleta de sangue pós-teste (min)	3,0±0,4	2,5±0,3	3,6±0,4

Cada amostra de sangue foi centrifugada por 5 min, a 3.000 rpm e a temperatura ambiente, e o soro transferido para um frasco (ependorf) de polipropileno de 0,5 mL. O soro foi então analisado quanto ao seu conteúdo de cortisol via um único ensaio imunológico quimioluminescente (*chemiluminescence immunoassay*, CLIA) usando um kit comercial para o sistema automatizado ADVIA Centaur® XP (Siemens, Brasil) e uma diluição de 1:50 (soro:diluyente; Multi-diluent 3, Siemens, Brasil). O fator de diluição que foi usado foi baseado em um estudo anterior nesta mesma espécie, utilizando o mesmo procedimento de coleta de sangue e dosagem hormonal (PEREIRA e cols., 2018). A sensibilidade do ensaio de cortisol foi de 1 µg/dL e os coeficientes de variação inter- e intra-ensaio foram 9,8% e 7,5%, respectivamente. A dosagem de cortisol foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas Sabin (Brasília, DF).

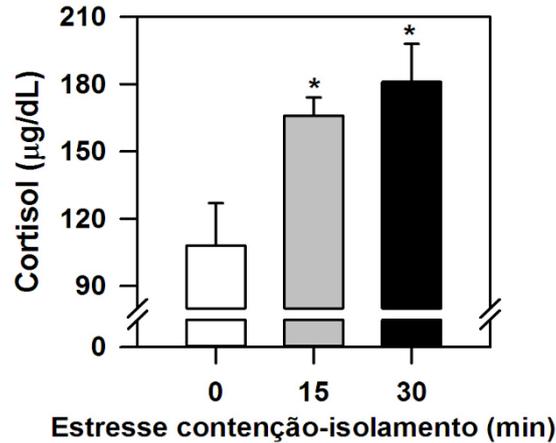
### 6.2.5. Análise estatística

Os dados sobre a TMT foram analisados para estabelecer possíveis diferenças entre os lados esquerdo e direito, e entre os diferentes intervalos do ECI. Para isso, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de duas vias de desenho misto (*mixed-design two-way Analysis of Variance*), com o escore  $\Delta$  da TSC como covariante, 'intervalo' (0 x 15 x 30 min) como o fator independente, e 'lado' (ouvido esquerdo x direito) como a variável dependente. Os dados referentes a concentração de cortisol, ao peso corporal inicial e ao escore  $\Delta$  da TSC foram analisados para detectar possíveis diferenças entre os grupos (ECI-0 x ECI-15 x ECI-30) usando uma ANOVA de uma via. No caso de um resultado significativo, os dados foram analisados em seguida com o teste de Tukey.

O teste de correlação de Pearson foi usado para estabelecer a relação entre: (1) o escore  $\Delta$  da TMT e a concentração de cortisol; (2) o escore  $\Delta$  da TMT e o tempo gasto na captura ou aferição da temperatura; (3) a TMT pré-teste e tempo de captura no viveiro; (4) os escores  $\Delta$  da TMT e da TSC; e (5) a concentração de cortisol e o tempo necessário para obter a amostra de sangue. O nível de significância adotado para todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

### 6.3. Resultados

Os micos que foram submetidos a 15 e 30 min de ECI apresentaram concentrações de cortisol semelhantes, que por sua vez foram significativamente mais elevadas que os valores vistos no grupo controle ECI-0 [ $F(2,14)=5,61$ ;  $p=0,02$ ; Figura 6.2]. É importante ressaltar que os níveis de cortisol não foram correlacionados ao tempo necessário para obter a amostra de sangue [Tabela 6.1; ECI-0:  $r=-0,06$ ;  $p=0,92$ ; ECI-15:  $r=-0,10$ ;  $p=0,88$ ; ECI-30:  $r=-0,39$ ;  $p=0,52$ ).

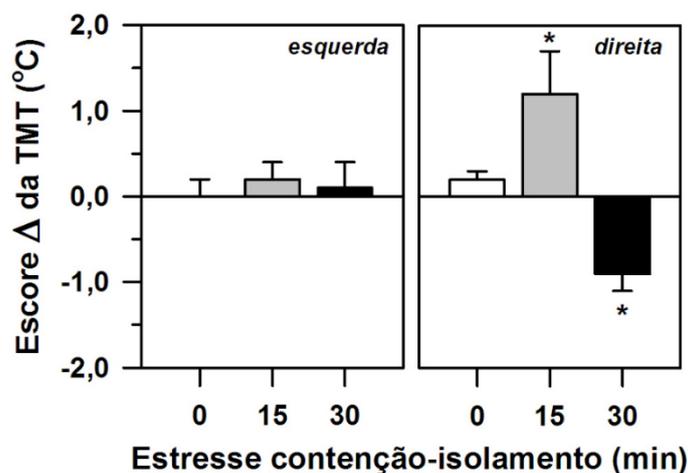


**Figura 6.2.** Concentração de cortisol (média+epm) detectada nos micos logo após um intervalo de estresse de contensão-isolamento de 0-, 15- ou 30-min. n=5/grupo; \*p<0,05 grupos 15- e 30-min vs. grupo 0-min.

Além disso, os dois intervalos de ECI alteraram significativamente a TMT dos micos, mas isso apenas no ouvido direito [fator intervalo:  $F(2,11)=5,34$ ;  $p=0,02$ ; fator lado:  $F(1,11)=0,20$ ;  $p=0,66$ ; interação:  $F(2,11)=5,56$ ;  $p=0,02$ ; Figura 6.3), não tendo um efeito significativo do escore  $\Delta$  da TSC [ $F(1,11)=0,10$ ;  $p=0,76$ ]. A TMT direita aumentou significativamente no grupo ECI-15, enquanto diminuiu no grupo ECI-30. Isto diferiu do grupo ECI-0, uma vez que nesse grupo a TMT direita permaneceu inalterada. Ademais, a TMT esquerda também permaneceu constante, independente do intervalo de ECI. A concentração de cortisol não estava associada ao escore  $\Delta$  da TMT esquerda [ECI-0:  $r=-0,76$ ;  $p=0,13$ ; ECI-15:  $r=0,41$ ;  $p=0,49$ ; ECI-30:  $r=0,10$ ;  $p=0,88$ ] ou direita [ECI-0:  $r=-0,71$ ;  $p=0,18$ ; ECI-15:  $r=-0,25$ ;  $p=0,69$ ; ECI-30:  $r=-0,08$ ;  $p=0,90$ ].

É importante ressaltar que, tanto a TMT pré-teste [*tempo de captura*: x TMT esquerda –  $r=0,38$ ;  $p=0,14$ ; x TMT direita –  $r=0,19$ ;  $p=0,49$ ], quanto os escores  $\Delta$  da TMT não estavam relacionados ao tempo gasto na captura dos micos em seus viveiros de moradia [Tabela 6.1; *tempo de captura*: x escore  $\Delta$  da TMT esquerda –  $r=-0,41$ ;  $p=0,13$ ; x escore  $\Delta$  da TMT direita –  $r=-0,48$ ;  $p=0,08$ ]. Os escores  $\Delta$  da TMT também não tiveram relação com o tempo necessário para aferir a temperatura corporal antes ou após o procedimento experimental [Tabela 6.1.; *escore  $\Delta$  da TMT esquerda*: x

aferição pré-teste –  $r=0,21$ ;  $p=0,46$ ; x aferição pós-teste –  $r=0,13$ ;  $p=0,64$ ; *escore  $\Delta$  TMT direita*: x aferição pré-teste –  $r=0,70$ ;  $p=0,81$ ; x aferição pós-teste –  $r=0,11$ ;  $r=0,20$ ].



**Figura 6.3.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos durante um intervalo de estresse de contensão-isolamento de 0-, 15- ou 30-min. Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C;  $n=5$ /grupo; \* $p<0,05$  vs. 0-min (TMT direita).

As alterações observadas na TMT também não se correlacionaram as da TSC [Tabela 6.2; *escore  $\Delta$  da TSC x escore  $\Delta$  da TMT*: lado esquerdo –  $r=0,35$ ;  $p=0,20$ ; lado direito –  $r=0,29$ ;  $p=0,30$ ]. Os escores  $\Delta$  da TSC [ $F(2,14)=0,81$ ;  $p=0,47$ ] e o peso corporal inicial também não diferiram entre os três grupos experimentais [ $F(2,14)=1,29$ ;  $p=0,31$ ; Tabela 6.2].

**Tabela 6.2.** Peso corporal inicial e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos submetidos a um evento de estresse de contensão-isolamento por 0, 15 ou 30 minutos (média $\pm$  epm).

Parâmetro	Estresse de contensão-isolamento		
	00-min	15-min	30-min
peso corporal (g)	372 $\pm$ 20	334 $\pm$ 12	364 $\pm$ 12
escore $\Delta$ da TSC (°C) <sup>a</sup>	-0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,2

<sup>a</sup> escore  $\Delta$  = temperatura aferida pós-teste – temperatura aferida pré-teste

#### 6.4. Discussão

Os micos fazem parte uma família de PNH que vem sendo empregada cada vez mais como modelo translacional para várias patologias humanas, e assim houve um aumento significativo no número de animais mantidos em cativeiro para realização de estudos pré-clínicos (t HART e cols., 2012). Para aumentar a possibilidade de se replicar os dados obtidos com esses animais, as fontes de estresse induzidas pelo ambiente de cativeiro devem ser avaliadas e, se possível, atenuadas (RENNIE e BUCHANAN-SMITH, 2006). Portanto, diferentes tipos de estresse relacionados ao manejo de calitriquídeos em cativeiro já foram estudados (p.ex., ruídos muito altos: KAPLAN e cols., 2012; isolamento social: TAYLOR e cols., 2014; interação com humanos: PEREIRA e cols., 2018).

Neste estudo foi observado que a contenção e/ou o isolamento social de micos-estrela por um curto período de tempo e em uma pequena caixa de contenção aumentou significativamente os níveis circulantes de cortisol dos animais. Os micos dos grupos ECI-15 e ECI-30 tiveram concentrações séricas de cortisol significativamente maiores que os indivíduos do grupo controle ECI-0. As concentrações de cortisol neste último grupo foram semelhantes aos níveis observados em estudos anteriores com animais não-estressados (LIMA e cols., 2008; PRYCE e cols., 2002; SALTZMAN e ABBOTT, 2011). Além disso, os níveis de cortisol detectados no presente estudo não estavam relacionados ao tempo necessário para obter as amostras de sangue, sendo o procedimento de coleta feito em <5 min (SALTZMAN e cols., 1994).

Períodos curtos (15-50 min) e mais prolongados (11 h) de contenção podem aumentar significativamente as concentrações de cortisol em micos (AUBERT e cols., 2013; SALTZMAN e ABBOTT, 2011; SMITH e FRENCH, 1997). Em outras espécies de PNH, os níveis de cortisol também aumentaram devido a um evento agudo de contenção (p. ex., LAHOZ e cols., 2007; MORROW-TESCH e cols., 1993; RODAS-MARTÍNEZ e cols., 2013) ou ao observar outros animais sendo contidos (GILBERT e

BAKER, 2011). Um aumento na atividade do eixo HPA também já foi relatado em roedores (revisado em BUYNITSKY e MOSTOFISKY, 2009).

Por outro lado, episódios recorrentes de contenção podem levar à uma resposta cada vez menor do eixo HPA, sendo isso uma possível adaptação fisiológica a altas concentrações de glicocorticóides durante períodos mais prolongados (PARAMASTRI e cols., 2007; RUYS e cols., 2004). Ademais, a liberação aguda de cortisol, induzida por um episódio de contenção, pode ser influenciada pela intensidade e/ou duração do estresse, pela idade do sujeito ou por características inerentes ao indivíduo (revisado em BUYNITSKY e MOSTOFISKY, 2009). Em resposta a um evento de isolamento e/ou contenção, micos machos também tiveram uma maior liberação de cortisol do que as fêmeas (SMITH e FRENCH, 1997). Diferenças entre os sexos também já foram relatadas em termos de um estresse de predação (CROSS e ROGERS, 2006; PEREIRA e cols., 2018; SALTZMAN e ABBOTT, 2011).

Contudo, no presente estudo, não foi possível realizar uma análise comparativa entre machos e fêmeas devido ao número reduzido e variável de animais de cada sexo em cada grupo experimental (i.e., 2-3 indivíduos). Também não foi possível determinar com precisão o número de eventos de contenção que cada sujeito já havia tido antes do presente estudo. Porém, é importante ressaltar que a contenção dos animais no CPUUnB não é um procedimento feito de forma sistemática ou previsível. De acordo com DALLMAN (2007), a ocorrência frequente de episódios de contenção contribui para uma habituação a esse tipo de procedimento. Portanto, os micos avaliados no presente estudo parecem responder a um episódio de ECI, mesmo que por um período curto, como sendo um evento aversivo. Esse evento parece ter tido intensidade e/ou duração suficiente para ativar uma resposta neuroendócrina tipicamente vista em tais situações.

A TMT direita dos animais submetidos ao ECI também alterou significativamente. Contudo, no ouvido esquerdo desses micos e nos animais do grupo controle, a TMT permaneceu inalterada. As alterações observadas na TMT não foram correlacionadas a temperatura geral do corpo (i.e., TSC), sendo que essa permaneceu constante durante

o período de ECI. A TMT tampouco estava relacionada ao tempo de captura ou de aferição da temperatura corporal. Vale destacar ainda que, em termos do peso corporal dos micos, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais.

As alterações vistas na TMT do ouvido direito podem estar refletindo, na verdade, alterações ipsilaterais na temperatura e do fluxo sanguíneo cerebral (BAKER e cols., 1972; SCHUMAN e cols., 1999; YABLONSKIY e cols. 2000) decorrentes de um aumento da atividade neuronal (SCHIFFER e cols., 1999). Uma alteração na TMT vem sendo vista como um índice indireto, e em tempo real, de alterações na atividade cerebral em nível hemisférico (CHERBUIN e BRINKMAN, 2007; PROPPER e BRUNYÉ, 2013). De fato, em estudos empregando técnicas de neuroimagem em pessoas saudáveis que estão observando estímulos aversivos, foi observado um aumento no fluxo sanguíneo apenas no hemisfério direito (CANLI e cols., 1998).

Desta forma, os diferentes intervalos de ECI que foram avaliados no presente estudo podem ter sido processados preferencialmente pelo hemisfério direito. De fato, o estresse de contenção parece exigir um processamento neural complexo (MURISON e OVERMIER, 1993; VAN DE KAR e cols., 1991). TOMAZ e cols. (2003), usando esse mesmo parâmetro e a mesma espécie, obtiveram resultados semelhantes ao que foi visto no presente estudo. Contudo, HANBURY e cols. (2011) detectaram um aumento bilateral na TMT em uma espécie de prossímio (*Otolemur garnettii*) submetida a um estresse de contenção de curta duração (6 min). Portanto, a duração desse tipo de estresse e/ou diferenças entre as espécies podem estar contribuindo para essa discrepância.

Em humanos e em vários animais, os mecanismos neurais responsáveis pelo processamento de respostas emocionais negativas parecem estar lateralizados no lado direito do cérebro (revisto em GAINOTTI, 2012; ROGERS, 2009). Uma especialização do hemisfério direito para o processamento desse tipo de informação também já foi relatada em micos expostos a captura/contenção (TOMAZ e cols., 2003), a situações

novas (CAMERON e ROGERS, 1999) e a diferentes estímulos relacionados a predadores (HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998; PEREIRA e cols., 2018; SOUZA SILVA e cols., 2007). Em outras espécies de PNH, eventos sociais aversivos também foram processados preferencialmente pelo hemisfério direito (chimpanzés: PARR e HOPKINS, 2000; babuínos: WALLEZ e VAUCLAIR, 2011; macacos rhesus: KALIN e cols., 1998). Acredita-se que essa lateralização do processamento das emoções pode levar a respostas comportamentais e fisiológicas mais rápidas e duradouras (HAUSER, 1993; KALIN e cols., 1998; PARR e HOPKINS, 2000; WITTLING e ROSCHMANN, 1993).

No entanto, cabe ressaltar que o tamanho amostral do presente estudo foi pequeno e não foi feita uma análise comparativa entre estímulos com diferentes valências (p.ex., negativa, positiva e neutra). Portanto, os resultados não devem ser vistos como uma evidência clara que corrobore qualquer um dos modelos teóricos propostos atualmente sobre a lateralização hemisférica das emoções (i.e., hipótese da valência *versus* hipótese do hemisfério direito; revisado em GAINOTTI, 2012).

Outro ponto interessante, em termos dos resultados do presente estudo, consiste na direção específica da alteração vista na TMT direita. O efeito observado variou de acordo com a duração do evento de ECI, havendo um aumento na temperatura após um intervalo de 15 min e uma diminuição após 30 min. Em PNH (gálago: HANDBURY e cols., 2011, 2013; chimpanzé: PARR e HOPKINS, 2000) e em humanos (p.ex., PROPPER e BRUNYÉ, 2013), um aumento na TMT tem sido frequentemente associado a um aumento ipsilateral da atividade hemisférica induzida por um estresse emocional. No entanto, uma redução na temperatura cerebral já foi relatada em macacos rhesus após uma estimulação direta do sistema límbico (HAYWARD e BAKER, 1968), assim como uma diminuição na TMT de micos-estrela após um episódio agudo de estresse de predação (dados da presente tese publicados em PEREIRA e cols., 2018). O horário do dia em que os sujeitos foram avaliados não coincidiu com os dois picos diários em que eles se dedicam a atividades de

fornecimento (NUNES e cols., 2010). Assim, uma menor disponibilidade de energia não parece ter contribuído para a diminuição vista na TMT, principalmente no grupo ECI-30. Os mecanismos responsáveis por alterar a temperatura cerebral, em função de mudanças na atividade neuronal, ainda não estão totalmente elucidados. Da mesma forma, ainda não se sabe como se dá a relação entre a TMT e a atividade neuronal hemisférica.

Contudo, diferentes aspectos podem ser apontados para tentar explicar a discrepância observada no presente estudo em termos da direção com que a TMT mudou após os diferentes intervalos de ECI. Por exemplo, a temperatura do cérebro e os mecanismos responsáveis pela dissipação de calor são diferentes entre áreas superficiais e regiões mais profundas (SUKSTANSKII e YABLONSKIY, 2006). Assim, diferentes estruturas neurais podem ter sido ativadas após diferentes intervalos, inclusive em um mesmo hemisfério. Por outro lado, algumas áreas cerebrais podem ser temporariamente desativadas, levando a um menor fluxo sanguíneo para aquela região (RAICHLE e cols., 2001). Outro fator importante que deve ser considerado é a assimetria hemisférica em termos das funções cognitivas. Considerando que os micos usados no presente estudo tinham experiência prévia com o procedimento de ECI, é possível que uma lateralização do processamento de informações cognitivas, ocorrendo concomitantemente ao processamento das informações emotivas, pode ter influenciado a variação detectada na TMT. A TMT direita diminuiu dependendo do tipo de teste de memória empregado em chimpanzés (HOPKINS e FOWLER, 1998) e humanos (MEINERS e DABBS, 1977; no entanto, vide CHERBUIN e BRINKMAN, 2007). Por fim, vale ressaltar que mecanismos autonômicos de termorregulação também controlam a temperatura e o fluxo sanguíneo cerebral (p.ex., HAYWARD e BAKER, 1968). Assim, aspectos não relacionados diretamente a atividade neural também podem ter contribuído para a direção com que a TMT mudou no presente estudo, principalmente depois do intervalo mais longo de 30 min.

Outro ponto que deve ser considerado é se a TMT, usada aqui como um indicador indireto da atividade neuronal hemisférica, reflete igualmente dissipação de calor e mudanças locais no fluxo sanguíneo, e qual o curso temporal de cada um desses efeitos. Tais aspectos ainda não foram sistematicamente investigados. Apesar do fato que estímulos aversivos podem induzir respostas duradouras, sugere-se que a TMT indica, de maneira confiável, mudanças na atividade hemisférica ocorridas em até 10 a 20 min (CHERBUIN e BRINKMAN, 2007; PARR e HOPKINS, 2000). Estudos empregando técnicas de neuroimagem, que também estão baseadas em mudanças no fluxo sanguíneo, indicam que esse intervalo pode ser ainda mais restrito (p.ex.. HERVÉ e cols., 2013). Portanto, os resultados do grupo ECI-30 devem ser analisados com cautela.

## **6.5. Conclusão**

Os resultados do presente estudo indicam que um episódio agudo de ECI é capaz de induzir, em micos-estrela adultos, respostas neuroendócrinas (i.e., cortisol) tipicamente associadas a estímulos aversivos. Ademais, esses primatas parecem processar esse tipo de evento aversivo de forma assimétrica, uma vez que houve alterações apenas na TMT direita.

Porém, não foi possível determinar a experiência prévia dos sujeitos com esse tipo de procedimento, ou ainda estabelecer possíveis diferenças entre os sexos devido ao número reduzido e variável de machos/fêmeas em cada grupo experimental. A liberação de cortisol induzida pelo estresse (p.ex., PEREIRA e cols., 2018) e a assimetria hemisférica podem variar entre os sexos (revisto em ROGERS, 2014). De fato, os hormônios gonadais podem atuar durante o desenvolvimento e/ou modular circuitos neurais na fase adulta, além de poder exercer uma influência mais indireta (p.ex., via diferenças comportamentais e/ou cognitivas entre os sexos; ROGERS, 2014). Assim, deve-se ter cautela ao generalizar esses resultados, sendo necessário realizar mais estudos para se ter um melhor entendimento sobre essa variável.

Os resultados do presente estudo também corroboram outros trabalhos que indicam que a termometria da TMT pode ser um indicador indireto, rápido, não-invasivo e de baixo custo da atividade neuronal hemisférica em tempo real em pequenos primatas. Os dados também indicam que, ao usar caixas de contenção na atividade clínica e na pesquisa, assim como na rotina de manejo desses primatas em cativeiro (i.e., transporte, isolamento), o fator estresse deve ser levado em consideração em termos do bem-estar dos animais.

Ainda fica em aberto esclarecer como o cortisol e a TMT respondem a exposições repetidas a um ECI. Além disso, não está claro como as alterações na TMT – as vezes em direções opostas – se relacionam com a atividade neuronal hemisférica durante eventos aversivos. O significado funcional da direção com que a TMT altera durante tais eventos (i.e., aumentando ou diminuindo) ainda precisa ser estabelecido.

## **7. ESTUDO 3: PRIVAÇÃO ALIMENTAR**

### **7.1. Aspectos gerais**

O terceiro estudo teve como objetivo determinar se um evento de privação alimentar é capaz de induzir uma resposta de estresse em micos-estrela adultos, e se essa resposta é processada predominantemente por um dos hemisférios cerebrais. No caso de uma privação alimentar, o animal é capaz e quer comer, mas não consegue devido a uma falta de alimento causado por eventos que fogem ao seu controle (McCUE, 2010). Esse tipo de estresse vem sendo empregado para avaliar, de forma experimental, os efeitos decorrentes de um estresse emocional, mas o mesmo também pode ser gerado quando há uma alteração em rotinas de manejo já bem estabelecidas.

Portanto, nesse estudo, o fornecimento de alimento aos sujeitos foi retido por um intervalo de 3 ou 6 h, contado a partir do horário matutino normal de fornecimento diário de comida ao plantel dos calitriquídeos do CPUUnB. Alterações na TMT direita e esquerda foram estabelecidas e empregadas como um indicador indireto da atividade neuronal em nível hemisférico, enquanto a concentração de cortisol no sangue foi determinada e usada como uma medida da resposta hormonal ao estresse.

Os resultados desse estudo já foram publicados (*Frontiers in Behavioral Neuroscience* 14: 123, 2020; doi: 10.3389/fnbeh.2020.00123).

### **7.2. Procedimento experimental**

#### **7.2.1. Sujeitos**

Nesse estudo foram utilizados 24 micos-estrela adultos (*C. penicillata*; 14 machos, 10 fêmeas) com idade entre 4,5-8,0 anos. Os micos pesavam  $335 \pm 9$  g (média $\pm$ sem; variação: 295-490 g) no início do estudo, e nenhuma fêmea estava prenha no momento dos procedimentos ou tinha tido filhotes recentemente. Todos os sujeitos foram alojados aos pares no CPUUnB, conforme condições detalhadas anteriormente na Seção 4.

Contudo, em termos da rotina diária de alimentação, vale destacar que os animais receberam alimento fresco uma vez ao dia. Na cozinha do CPUUnB, a dieta foi preparada diariamente e separada nos respectivos recipientes de cada viveiro. Esses recipientes, já prontos, foram então levados para o Pavilhão de Calitriquídeos e imediatamente distribuídos pelo tratador para o seu respectivo viveiro, seguindo uma ordem aleatória. Esse procedimento geralmente leva <5 min para ser concluído, sendo realizado de acordo com uma rotina regular do CPUUnB, com início às 07:00 h (+10 min). Os itens que não foram consumidos ao longo do dia foram retirados do viveiro às 17:00 h.

### **7.2.2. Aferição das temperaturas da membrana timpânica e subcutânea**

As TMT direita e esquerda dos micos foram aferidas antes e após o procedimento experimental indicado abaixo, seguindo a metodologia geral descrita na Seção 4.3. No presente estudo, foram feitas seis leituras da TMT de cada sujeito, em intervalos de 5 s – três no ouvido esquerdo e três no ouvido direito – seguindo o mesmo procedimento empregado anteriormente no Estudo 2.

A TSC também foi aferida antes e logo após o término da sessão experimental, com o intuito de verificar se possíveis mudanças na TMT não estariam relacionadas a um efeito geral na temperatura corporal.

Além disso, os valores da TMT e da TSC observados logo antes do procedimento (dados pré-estresse), foram subtraídos da medida registrada logo após a sessão, gerando assim um *escore* de diferença (*difference score*):  $\Delta$  = temperatura pós-estresse – temperatura pré-estresse (em °C). Assim como nos estudos anteriores, um valor positivo de  $\Delta$  indica que a temperatura aumentou durante a sessão experimental, enquanto um *escore* negativo revela que esse parâmetro diminuiu.

### 7.2.3. Procedimento do estresse por privação alimentar (PA)

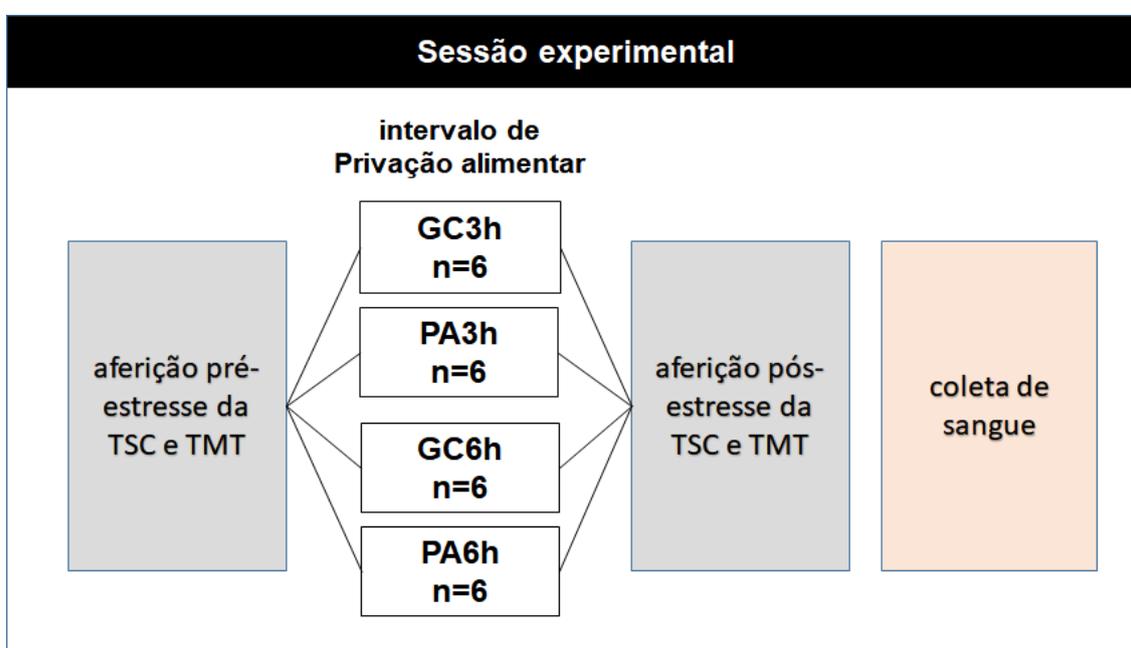
Os micos foram divididos em quatro grupos experimentais (n=6/grupo). Dois grupos foram privados de alimento (PA), recebendo sua dieta padrão de alimento fresco e ração somente depois de um período de 3 ou 6 h além do horário normal de fornecimento: grupos PA3h e PA6h, respectivamente. Em cada um desses grupos havia quatro machos e duas fêmeas. Os outros dois grupos foram empregados como controle (GC), um para cada intervalo de PA avaliado no presente estudo: grupos GC3h (para o intervalo de 3 h) e GC6h (para o intervalo de 6 h). Em cada um desses grupos havia três machos e três fêmeas. Os animais desses grupos não foram privados de alimento e, portanto, receberam sua dieta diária de alimento fresco e ração no horário habitual (07:05 h). Água também permaneceu disponível *ad libitum* para todos os micos.

É importante ressaltar que os sujeitos dos quatro grupos diferiram em termos do horário de fornecimento da alimentação, mas todos foram submetidos ao mesmo procedimento experimental indicado abaixo. Ainda, os animais pertencentes a um mesmo viveiro de moradia foram obrigatoriamente indicados para o mesmo grupo experimental, além de terem sido testados simultaneamente. Para tanto, cada sujeito foi avaliado por uma equipe diferente.

Cada sujeito foi testado apenas uma vez. Porém, nem todos os membros de um mesmo grupo foram avaliados no mesmo dia. Uma representação esquemática resumida do procedimento pode ser vista na Figura 7.1. No dia antes da realização da sessão teste, todo o alimento fresco que não foi consumido naquele dia foi removido normalmente do viveiro de moradia às 17:00 h, juntamente com o recipiente contendo ração.

No dia seguinte, às 07:00 h (i.e., no dia do teste e no horário normal do fornecimento de alimento), os dois micos de um mesmo viveiro de moradia foram capturados e contidos manualmente. Em seguida, as TSC e TMT pré-estresse foram aferidas, conforme descrito anteriormente, e o mico levado de volta ao seu viveiro de moradia. Para os animais dos grupos controle (GC3h e GC6h), a dieta padrão de

alimento fresco e ração foram então fornecidos normalmente à aproximadamente 07:05 h. Para os animais dos grupos de privação (PA3h e PA6h), a alimentação foi retida durante todo o período pré-estabelecido de privação alimentar (3 h e 6 h, respectivamente). Durante as próximas 3 h (grupos GC3h e PA3h) ou 6 h (grupos GC6h e PA6h), os sujeitos permaneceram em seus respectivos viveiros de moradia sem serem incomodados, com ou sem acesso à alimentação, de acordo com seu grupo experimental. Ao final do intervalo pré-estabelecido, cada sujeito foi novamente capturado em seu viveiro de moradia, contido manualmente e sua TSC e TMT pós-estresse aferidas.



**Figura 7.1.** Representação esquemática do procedimento geral do Estudo 3 que realizado com cada um dos quatro grupos experimentais: privação alimentar de 3 h (PA3h), grupo controle da PA3h (GC3h), privação alimentar de 6 h (PA6h) e grupo controle da PA6h (GC6h). Cada sujeito foi avaliado uma única vez.

Em seguida, os micos foram levados para uma sala de procedimento, adjacente ao Pavilhão de Calitriquídeos, onde foram submetidos a coleta de uma amostra sangue para então serem liberados em seu viveiro de moradia. Após o retorno ao viveiro, os animais dos grupos PA3h e PA6h receberam sua dieta padrão de alimento fresco e ração; i.e., aproximadamente 10:05 h para o grupo PA3h e às 13:05 h para o grupo PA6h.

Foi registrado o tempo que levou para capturar cada sujeito em seu viveiro de moradia, assim como aferir as suas temperaturas corporais pré- e pós-estresse (Tabela 7.1). Nesse estudo, as respostas comportamentais dos sujeitos não foram registradas.

**Tabela 7.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental nos micos submetidos a um episódio de estresse de privação de alimento de 0 (não-privado), 3 ou 6 horas (média±epm, em segundos).

Etapa do procedimento	Intervalo de estresse de privação de alimento			
	3 horas		6 horas	
	Não-privado	Privado	Não-privado	Privado
<i>Pré-teste</i>				
captura no viveiro	26±6	38±10	35±10	32±10
aferição da temperatura	62±9	68±11	53±21	48±18
<i>Pós-teste</i>				
captura no viveiro	30±7	32±6	39±11	27±10
aferição da temperatura	54±7	47±12	43±12	39±12
coleta de sangue	136±35	129±24	170±82	181±21

#### 7.2.4. Coleta de sangue e dosagem do cortisol sérico

Para cada sujeito, foi obtida uma única amostra de sangue. Essa amostra foi coletada logo após a aferição da TMT pós-estresse (Figura 7.1). Os sujeitos que pertenciam a um mesmo viveiro de moradia também foram submetidos simultaneamente a esse procedimento, o qual foi realizado por equipes diferentes.

Cada animal foi anestesiado com isoflurano (Fluorane®), por via inalatória, utilizando um vaporizador universal portátil (Brasmed Vetcase, São Paulo, Brasil) fixado em 2% e com um fluxo de 1 L/min de oxigênio. Em seguida, uma amostra de 0,5 mL de sangue foi obtida por meio de uma punção da veia femoral. A amostra foi transferida para um tubo de 4 mL contendo ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Brasil) e mantida resfriada até seu processamento inicial.

Depois de se recuperar do efeito da anestesia (1-2 min), o sujeito foi levado de volta ao seu viveiro de moradia e monitorado por mais 30 min. O tempo que levou para obter cada amostra de sangue foi registrado para verificar se esse procedimento teria influenciado o nível de cortisol detectado (Tabela 7.1).

Cada amostra de sangue foi processada e analisada utilizando o mesmo procedimento descrito acima no Estudo 2. A dosagem de cortisol foi realizada com o apoio do Laboratório Sabin (Brasília, DF).

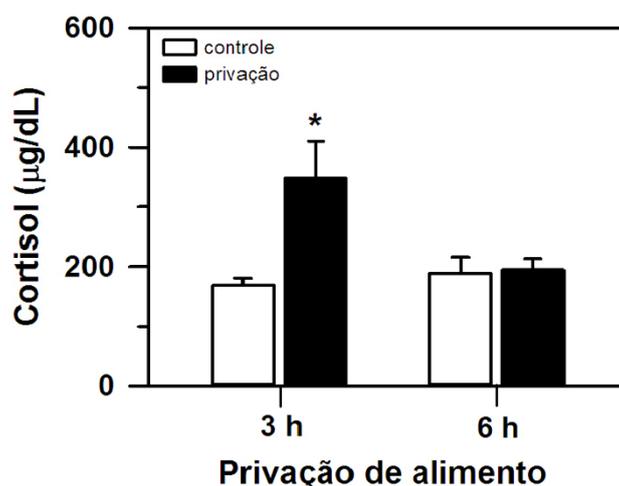
### **7.2.5. Análise estatística**

Os dados do escore  $\Delta$  da TMT para cada intervalo de PA foram analisados separadamente para se estabelecer possíveis diferenças entre os lados esquerdo e direito e entre os grupos experimentais. Assim, foi realizada uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mixed-design two-way Analysis of Variance*), com o escore  $\Delta$  da TSC como covariante, bem como o 'grupo' (GC x PA) como o fator independente, e 'lado' (ouvido esquerdo x direito) como a variável dependente. Os dados referentes a concentração de cortisol, a massa corporal e ao escore  $\Delta$  da TSC foram analisados para detectar possíveis diferenças entre os grupos usando uma ANOVA de uma via. No caso de um resultado significativo, os dados foram analisados em seguida com o teste de Tukey.

Além disso, o teste de correlação de Pearson foi usado para estabelecer a relação entre: (1) escore  $\Delta$  da TMT e concentração de cortisol; (2) TMT e tempo para captura no viveiro; (3) TMT e tempo para aferição das temperaturas corporais; (4) escores  $\Delta$  da TMT e TSC; e (5) concentração de cortisol e tempo necessário para obter a amostra de sangue. O nível de significância adotado para todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

### 7.3. Resultados

Ao final da sessão experimental, os micos que haviam sido privados de alimento por 3 h (grupo PA3h) tiveram uma concentração de cortisol mais elevada que a dos demais grupos testados [fator grupo:  $F(1,20)=6,23$ ;  $p=0,02$ ; fator intervalo:  $F(1,20)=3,24$ ;  $p=0,09$ ; interação:  $F(1,20)=5,49$ ;  $p=0,03$ ; Figura 7.2]. Para os animais que foram privados de alimento por 6 h (PA6h) e nos dois grupos controle não-privados, foi observada uma concentração de cortisol semelhante e mais baixa que a do grupo PA3h. Vale ressaltar que os níveis de cortisol detectados não foram correlacionados ao tempo necessário para obter a amostra de sangue [GC3h:  $r=0,60$ ;  $p=0,21$ ; PA3h:  $r=0,10$ ;  $p=0,72$ ; GC6h:  $r=-0,43$ ;  $p=0,40$ ; PA6h:  $r=-0,48$ ;  $p=0,35$ ; Tabela 7.1].

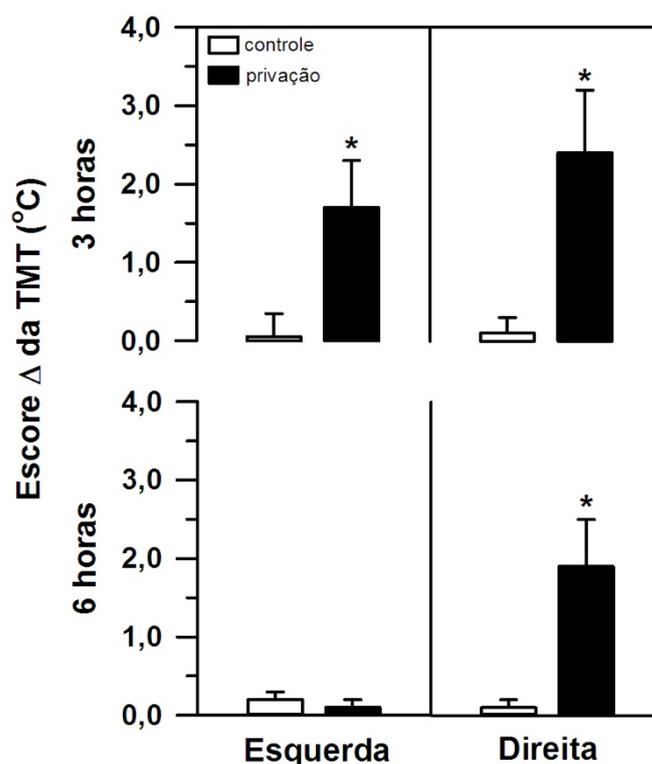


**Figura 7.2.** Concentração de cortisol (média+epm) detectada nos micos logo após o procedimento experimental do Estudo 3 realizado em cada um dos quatro grupos experimentais. Os dois grupos controle não foram privados de alimento, enquanto que os outros dois grupos foram privados de alimento por 3 ou 6 h além do horário normal de fornecimento.  $n=6$ /grupo; \* $p<0,05$  vs. demais grupos.

Por sua vez, o estresse de PA alterou significativamente a TMT dos micos, sendo que o efeito observado em cada ouvido diferiu entre os dois intervalos (3 h x 6 h). Nos micos que foram privados de alimento por 3 h, foi detectado um aumento significativo na TMT esquerda e direita. Já no respectivo grupo controle (GC3h), o qual recebeu alimento normalmente mas teve o cortisol avaliado 3 h depois, esse parâmetro permaneceu inalterado em ambos os lados [fator grupo:  $F(1,9)=38,42$ ;  $p<0,01$ ; fator

lado:  $F(1,9)=0,02$ ;  $p=0,89$ ; interação:  $F(1,9)=0,24$ ;  $p=0,64$ ; Figura 7.3], não havendo aqui uma influencia do escore  $\Delta$  da TSC [ $F(1,9)=2,00$ ;  $p=0,19$ ].

Nos animais privados de alimento por 6 h, a TMT direita aumentou significativamente, enquanto no lado esquerdo essa temperatura permaneceu constante. Esse padrão de resposta diferiu significativamente do que foi observado no grupo controle (GC6h), uma vez que para esses animais a TMT permaneceu inalterada em ambos os lados [fator grupo:  $F(1,9)=3,65$ ;  $p=0,09$ ; fator lado:  $F(1,9)=6,54$ ;  $p=0,03$ ; interação:  $F(1,9)=6,76$ ;  $p=0,03$ ; Figura 7.3]. O escore  $\Delta$  da TSC também não influenciou esse resultado [ $F(1,9)=0,98$ ;  $p=0,35$ ].



**Figura 7.3.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore  $\Delta$ ; média+epm) dos micos durante um episódio de estresse de privação alimentar de 3 ou 6 h. Os dois grupos controle não foram privados de alimento, enquanto que os outros dois grupos foram privados de alimento por 3 ou 6 h além do horário normal de fornecimento. Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste em °C;  $n=6$ /grupo; \* $p<0,05$  grupo com privação vs. respectivo grupo controle.

Não foi observada uma correlação entre os valores da TMT esquerda ou direita e a duração do procedimento de captura no viveiro de moradia [captura pré-estresse – vs. TMT esquerda pré-estresse:  $r=-0,06$ ;  $p=0,77$  e vs. TMT direita pré-estresse:  $r=-0,04$ ;

$p=0,85$ ; *captura pós-estresse* – vs. TMT esquerda pós-estresse:  $r=0,27$ ;  $p=0,20$  e vs. TMT direita pós-estresse:  $r=0,07$ ;  $p=0,75$ ; Tabela 7.1]. Os valores da TMT esquerda e direita também não estavam correlacionados ao tempo necessário para aferir as temperaturas corporais [*tempo aferição temperatura pré-estresse* – vs. TMT esquerda pré-estresse:  $r=0,61$ ;  $p=0,77$  e vs. TMT direita pré-estresse:  $r=0,32$ ;  $p=0,13$ ; *tempo aferição temperatura pós-estresse* – vs. TMT esquerda pós-estresse:  $r=-0,02$ ;  $p=0,92$  e vs. TMT direita pós-estresse:  $r=0,03$ ;  $p=0,88$ ; Tabela 7.1]. Além disso, não houve uma correlação entre a concentração de cortisol e os escores  $\Delta$  da TMT esquerda [GC3h:  $r=0,46$ ;  $p=0,36$ ; PA3h:  $r=-0,26$ ;  $p=0,62$ ; GC6h:  $r=0,10$ ;  $p=0,85$ ; PA6h:  $r=0,40$ ;  $p=0,44$ ] ou da TMT direita [GC3h:  $r=-0,39$ ;  $p=0,44$ ; PA3h:  $r=0,06$ ;  $p=0,91$ ; GC6h:  $r=-0,60$ ;  $p=0,21$ ; PA6h:  $r=0,40$ ;  $p=0,44$ ].

Não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais ou intervalos de estresse em termos dos escores  $\Delta$  da TSC [fator intervalo:  $F(1,20)=0,04$ ;  $p=0,85$ ; fator grupo:  $F(1,20)=0,03$ ;  $p=0,87$ ; interação:  $F(1,20)=0,42$ ;  $p=0,52$ ; Tabela 7.2]. Além disso, esse mesmo parâmetro e os escores  $\Delta$  da TMT esquerda e direita não estavam correlacionados [*escore  $\Delta$  da TSC* – vs. *escore  $\Delta$  da TMT esquerda*:  $r=0,24$ ;  $p=0,28$  e vs. *escore TMT direita*:  $r=0,28$ ;  $p=0,19$ ]. Por fim, para a massa corporal dos micos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ou intervalos de estresse [fator intervalo:  $F(1,20)=1,98$ ;  $p=0,18$ ; fator grupo:  $F(1,20)=0,33$ ;  $p=0,57$ ; interação:  $F(1,20)=3,15$ ;  $p=0,09$ ; Tabela 7.2].

**Tabela 7.2.** Massa corporal e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos submetidos a um episódio de estresse de privação de alimento de 0, 3 ou 6 horas (média $\pm$ epm).

Parâmetro	Intervalo de estresse de privação de alimento			
	3 horas		6 horas	
	Controle	Privação	Controle	Privação
massa corporal (g)	340 $\pm$ 9	318 $\pm$ 8	322 $\pm$ 13	376 $\pm$ 29
escore $\Delta$ da TSC ( $^{\circ}$ C) <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup> escore  $\Delta$  = temperatura aferida pós-estresse – temperatura aferida pré-estresse

#### **7.4. Discussão**

Padrões de forrageamento (i.e., a busca e obtenção de alimentos) e a ingestão de alimentos são induzidos e controlados por mecanismos neurais que buscam garantir a sobrevivência de um indivíduo. Contudo, importantes mecanismos mnemônicos e motivacionais também controlam o comportamento alimentar (HOLLAND e PETROVICH, 2005; BERRIDGE e cols., 2010). Enquanto o primeiro mecanismo promove o balanço energético homeostático de longo-prazo, os últimos dois correspondem a um controle cognitivo e hedônico, respectivamente (WILSON e cols., 2014).

Assim, os alimentos possuem propriedades reforçadoras naturais, que por sua vez contribuem significativamente para o processo de aprendizado sobre o alimento em si, além de sua disponibilidade espacial e/ou temporal (WEBB e cols., 2009). Por exemplo, quando a ingestão de um determinado alimento ocorre repetidamente em um determinado horário do dia, um indivíduo pode então vir a esperar ou até mesmo antecipar o horário que esse alimento se tornará disponível novamente (revisado em MISTLBERGER, 2011). Desta forma, diferentes estratégias de forrageio podem ser adotadas, em horários específicos do dia, a fim de otimizar a ingestão de alimentos e minimizar o gasto energético para sua obtenção (ARMSTRONG, 1980).

Essa habilidade de detectar, reter e usar informações sobre o contexto temporal dos alimentos é frequentemente vista em animais mantidos em cativeiro. Nessa situação, o animal raramente terá controle total sobre sua rotina alimentar, sendo o horário de fornecimento de alimentos muitas vezes imposto pelos cuidadores (BASSETT e BUCHANAN-SMITH, 2007). Como a maioria dos criadouros possui rotinas de manejo pré-estabelecidas para o fornecimento diário de alimento, essa atividade provavelmente se tornará temporalmente previsível. Porém, uma vez estabelecida, a perda de previsibilidade relacionada a um evento apetitivo pode gerar frustração e estresse psicológico (BASSETT e BUCHANAN-SMITH, 2007), conforme parece ter ocorrido nos micos do presente estudo.

De fato, um atraso na rotina diária de fornecimento de alimento parece ter induzido uma resposta de estresse nos micos-estrela. Aqueles que receberam seu alimento 3 h além do horário habitual apresentaram níveis de cortisol mais elevados, comparado ao grupo controle (PA3h x GC3h). Os animais do grupo controle receberam sua dieta padrão diária no horário normal, mas tiveram seus níveis de cortisol avaliados apenas 3 h depois, como foi feito para o grupo PA3h. Vale ressaltar que os níveis de cortisol detectados não estavam correlacionados ao tempo necessário para obter as amostras de sangue e que a concentração desse hormônio nos animais não-privados foi semelhante aos descritos na literatura para micos não-estressados (CHROUSOS e cols., 1982; PRYCE e cols., 2002; SALTZMAN e ABBOTT, 2011).

Uma hiperatividade do eixo HPA também já foi vista em macacos rhesus que tiveram um breve atraso (<3 h) no fornecimento diário de alimento (HELMREICH e cols., 1993; LADO-ABEAL e cols., 2000). Comportamentos agonísticos, anormais e estereotipados já foram observados em macacos (*Macaca arctoides*) mantidos em cativeiro quando o alimento foi disponibilizado um pouco depois do que era previsto na rotina alimentar (<1 h; WAITT e BUCHANAN-SMITH, 2001). Efeitos parecidos a esses foram relatados em diferentes animais submetidos a condições experimentais semelhantes as do presente estudo (bezerros: JOHANNESSEN e LADEWIG, 2000; NORMANDO e cols., 2013; cavalos: ZUPAN e cols., 2019; galinhas: BEUVING e cols., 1989; ovelhas: YAYOU e cols., 2009).

Porém, em roedores alimentados de forma *ad libitum*, os níveis de corticosterona aumentaram apenas 24 h depois da interrupção do fornecimento de ração (GALICICH e cols., 1963; HUANG e cols., 2016; JOHANSSON e cols., 2008; NOWLAND e cols., 2011). Nesse tipo de esquema alimentar, a disponibilidade de alimento geralmente não acaba sendo associada a um determinado horário do dia (STEPHAN, 2002), e portanto, não se espera que um atraso no seu fornecimento induza uma sensação imediata de frustração e estresse. Por outro lado, sob condições mais experimentais, a troca de um esquema previsível de reforçamento com alimento por um esquema imprevisível (i.e.,

esquema de tempo fixo vs. razão fixa) gerou um aumento imediato nos níveis de corticosterona de roedores (COE e cols., 1983; DAVIS e cols., 1976; GOLDMAN e cols., 1973; LEVINE e cols., 1972). Uma mudança em esquemas de reforçamento se assemelha mais as condições que os micos do presente estudo foram submetidos. Alterações parecidas também levaram a um aumento na concentração de cortisol e induziram alterações comportamentais relacionadas ao estresse em diferentes espécies de PNH (GOTTLIEB e cols., 2013; LYONS e cols., 2000; ULYAN e cols., 2006; porém vide BLOOMSMITH e LAMBETH, 1995). Quando a alimentação já ocorre de forma mais imprevisível, ou quando já se usa um esquema imprevisível de reforçamento (i.e., razão fixa), os níveis circulantes de glicocorticóides podem não ser muito afetados por flutuações na ingestão diária de alimento (macacos: MARTÍNEZ-MOTA e cols., 2016) ou por mudança para um esquema previsível de reforçamento (ratos: LEVINE e cols., 1972), respectivamente.

Portanto, a perda súbita de previsibilidade temporal, relacionada a rotina de fornecimento diário de alimento, pode ter sido um elemento chave que desencadeou a resposta hormonal de estresse observada nos micos do presente estudo. Essa hipótese deve ser interpretada com cautela, uma vez que não é possível descartar a possibilidade que a elevação da concentração de cortisol do grupo PA3h também possa estar refletindo uma resposta homeostásica de mobilização de estoques de energia devido a um menor nível de glicose no sangue causado pela privação alimentar (McCUE, 2010).

É importante ressaltar que o aumento de cortisol visto após 3 h de PA no presente estudo foi possivelmente revertido ao se prolongar ainda mais esse evento aversivo. Depois de um intervalo de 6 h, os níveis de cortisol dos micos que tinham sido privados e dos que não tinham sido privados não diferiram mais (grupo PA6h vs. GC3h e GC6h). Esse retorno a níveis mais basais pode ser um mecanismo de adaptação fisiológico. Altas concentrações circulantes de cortisol por período prolongados afetam negativamente vários sistemas fisiológicos do corpo, como por exemplo, o crescimento, a reprodução e a resposta imune (HABIB e cols., 2001). De fato, a liberação de cortisol

pode variar de acordo com a duração do evento estressor (MILLER e cols., 2007). Porém, os dados do presente estudo não permitem determinar o efeito que períodos mais prolongados de estresse (>6 h) terão sobre o eixo HPA dos micos. A duração desse efeito pode variar entre diferentes PNH, visto que em uma outra espécie de PNH, os níveis de cortisol ainda estavam elevados 20 h depois de se interromper a rotina de fornecimento diário de alimento (MEDHAMURTHY e cols., 2007). Novos estudos são necessários para se realizar uma análise comparativa mais detalhada sobre a resposta hormonal de PNH a um evento de PA.

Em termos da TMT dos micos, foi detectado um aumento significativo na temperatura, mas apenas naqueles que foram submetidos a PA (PA3h e PA6h). No entanto, as TMT não estavam relacionadas a temperatura geral do corpo (i.e., TSC), ou com os tempos de captura dos micos ou de aferição da sua temperatura corporal. Na verdade, a TSC permaneceu constante ao longo do estudo e, como também visto em termos do peso corporal, não houve diferença entre os grupos.

Por outro lado, a TMT parece refletir a temperatura cerebral (MARIAK e cols., 1994; SCHUMAN e cols., 1999). Mudanças na TMT basal correspondem a alterações ipsilaterais no fluxo sanguíneo cerebral e na temperatura do cérebro (BAKER e cols., 1972; SCHUMAN e cols., 1999; YABLONSKIY e cols., 2000) induzidas por alterações na atividade dos neurônios (SCHIFFER e cols., 1999). Considerando que estímulos emocionais negativos podem induzir um aumento na atividade neuronal e no fluxo sanguíneo regional (CANLI e cols., 1998), acredita-se que o aumento na TMT dos micos do presente estudo pode corresponder a um aumento ipsilateral na atividade cerebral detectado em nível hemisférico. Resultados semelhantes já foram observados em estudos realizados em humanos (p.ex., PROPPER e BRUNYÉ, 2013) e PNH (chimpanzé: PARR e HOPKINS, 2000; gálgalo: HANDBURY e cols., 2011, 2013; macacos rhesus: BOYCE e cols., 1996; micos: dados da presente tese publicados em PEREIRA e cols., 2019).

Vale ressaltar que, no presente estudo, a TMT aumentou bilateralmente depois do intervalo de PA de 3 h, enquanto no grupo privado por 6 h o aumento observado foi exclusivamente no lado direito. Eventos estressores, como o de PA, constituem em uma resposta complexa do cérebro que envolve diferentes sistemas (van OORT e cols., 2017). Para que a resposta mais apropriada possa ocorrer, e no momento mais indicado, os sistemas emocional, autonômico, neuroendócrino e cognitivo devem interagir, cada um tendo possivelmente o seu próprio padrão de assimetria funcional (GERENDAI e HALÁSZ, 1997; HAGEMANN e cols., 2003; VOGELS e cols., 1994). Como diferentes estruturas (sub)corticais são recrutadas e/ou inativadas em diferentes momentos (CARLSON e cols., 1988; RAICHLE e cols., 2001), o padrão de atividade neuronal dos micos parece ter mudado ao longo do tempo.

Desta forma, o aumento bilateral na TMT sugere que um padrão de ativação neuronal mais amplo ocorreu depois do intervalo mais curto de PA. Por outro lado, vale mencionar que essa atividade bilateral proeminente pode ter ocultado um padrão de atividade ainda mais robusto no lado direito. A TMT direita aumentou, em média, 0,7°C a mais do que a que foi registrada no ouvido esquerdo. Apesar dessa diferença de temperatura entre os lados direito e esquerdo não ter sido significativa no presente estudo, um efeito similar foi observado em crianças submetidas a um estresse de isolamento social (DAWSON e cols., 1992).

A medida que a duração do evento estressor aumentou, diferentes áreas cerebrais devem ter sido inativadas (p.ex., menor ativação do eixo HPA diminuindo a liberação de cortisol no grupo PA6h). Tais alterações acabaram levando a uma nítida lateralização da TMT e da atividade hemisférica no lado direito. O processamento de estímulos aversivos é frequentemente associado ao hemisfério direito (revisado em GAINOTTI, 2012). Tal especialização, por sua vez, pode levar a respostas mais duradouras (p.ex., KALIN e cols., 1998).

Apesar de não haver estudos prévios relacionados ao padrão de atividade neuronal durante um estresse de PA em PNH, uma alteração tempo-dependente,

semelhante a que foi vista nos micos, já foi relatada para outros tipos de eventos aversivos. Por exemplo, a TMT aumentou de forma bilateral após um curto período de estresse de contenção (gálagos: HANDBURY e cols., 2011). Porém, depois de intervalos mais longos (micos: dados da presente tese publicados em PEREIRA e cols., 2019) ou de episódios recorrentes (micos: TOMAZ e cols., 2003), essa ativação ocorreu exclusivamente no lado direito. Um evento curto de estresse de predação foi processado assimetricamente pelo hemisfério direito (micos: HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998; SOUZA SILVA e cols., 2007), mas a resposta a uma tarefa de obtenção de alimento associada a um modelo de predador foi menor após lesões unilaterais em qualquer um dos hemisférios cerebrais (macacos rhesus: IZQUIERDO e MURRAY, 2004).

Portanto, durante o processamento de estímulos emocionais, outros aspectos além da duração do evento podem estar contribuindo para a variabilidade vista em termos da lateralização hemisférica ou até mesma para a ausência de uma assimetria. Nesse contexto pode-se citar: o tipo de estímulo (p.ex., estresse de contenção vs. predação), a espécie de PNH (p.ex., resposta de micos vs. macacos rhesus a um humano desconhecido; IZQUIERDO e MURRAY, 2004; PEREIRA e cols., 2018), e traços individuais (p.ex., temperamento mais medroso; KALIN e cols., 1998).

Além disso, sabe-se que áreas mais superficiais e profundas do cérebro podem diferir em termos de sua temperatura, mecanismos de dissipação de calor e fluxo sanguíneo regional (SUKSTANSKII e YABLONSKIY, 2006). O processamento emocional e termoregulatório também interagem de forma bidirecional (HAGEMANN e cols., 2003), o que sugere que aspectos não relacionados as emoções também podem influenciar a regulação da temperatura cerebral e do fluxo sanguíneo (p.ex., HAYWARD e BAKER, 1968). Portanto, os mecanismos responsáveis pelas mudanças vistas na TMT e na atividade neuronal hemisférica dos micos ao longo do tempo ainda precisam ser esclarecidos.

## 7.5. Conclusão

Os resultados do presente estudo sugerem que a perda súbita de previsibilidade temporal sobre a rotina diária de fornecimento de alimento induz, nos micos, uma resposta neuroendócrina (i.e., cortisol) tempo-dependente tipicamente relacionada ao estresse, conforme já foi detectado em outras espécies. Esse resultado tem grande implicação para o bem-estar de micos mantidos em cativeiro, especialmente quando se avalia os procedimentos diários de manejo, como no caso do fornecimento de alimento.

O estresse de PA parece constituir um evento emocional negativo para os micos. Esse evento foi inicialmente processado pelo cérebro de forma mais simétrica, conforme indicado pelo aumento bilateral da TMT após um período de 3 h de privação. Após um intervalo maior (i.e., até 6 h), a TMT aumentou exclusivamente no lado direito, sugerindo que a atividade hemisférica passou então a ser predominantemente assimétrica. Ainda é necessário elucidar os mecanismos neurais que subsidiam as alterações na temperatura do cérebro e no fluxo sanguíneo, ocasionadas por um aumento na atividade neuronal, assim como a relação entre mudanças na TMT basal e na atividade hemisférica ao longo do tempo devido a exposição a estímulos aversivos.

## **8. ESTUDO 4: AMBIENTE NOVO E ISOLAMENTO SOCIAL**

### **8.1. Aspectos gerais**

O quarto estudo teve como objetivo estabelecer se a exposição a um ambiente novo, com ou sem isolamento social, é capaz de induzir uma resposta de estresse em micos-estrela adultos e se essa resposta é processada predominantemente por um dos hemisférios cerebrais. A exposição a um ambiente desconhecido tem sido usada com frequência como uma estratégia experimental para o estudo do medo e da ansiedade em diversas espécies de animais (PRUT e BELZUNG, 2003). De fato, ambientes novos, em que não há possibilidade de fuga devido a presença de barreiras/paredes, podem ser um evento aversivo para PNH, incluindo os micos (p.ex., CAGNI e cols., 2012). Nessas condições, respostas de estresse, medo e/ou ansiedade podem ocorrer devido a falta de rotas de fuga, locais de proteção e/ou do isolamento social (p.ex., BARROS e cols., 2004). Mas, sabe-se que o ambiente social vivido pelo indivíduo durante esse tipo de evento pode vir a aumentar ou amenizar a resposta comportamental e hormonal ao estresse (LEVINE, 1993), inclusive em micos (p.ex., SMITH e cols., 1998).

Nesse último estudo, os micos foram expostos por 30 min a um ambiente novo (aparato do campo aberto) ou a um ambiente altamente familiar (seu próprio viveiro de moradia). Durante o período em que permaneceu nesse ambiente, o animal ficou o tempo todo sozinho ou esteve nesse local juntamente com o outro membro da díade de seu viveiro. As TMT direita e esquerda foram aferidas antes e após o intervalo de exposição. Uma mudança em termos dos níveis basais desse parâmetro foi empregada como um indicador indireto da atividade neuronal em nível hemisférico. A concentração de cortisol no sangue também foi determinada ao final desse intervalo e usada como uma medida da resposta hormonal ao evento estressor.

Os resultados desse estudo foram submetidos para publicação em periódico científico internacional (*Brain Research*, no prelo, doi: 10.1016/j.brainres.2020.147198).

## **8.2. Procedimento experimental**

### **8.2.1. Sujeitos**

Vinte e quatro micos-estrela adultos (*C. penicillata*; 15 machos e 9 fêmeas), com idade entre 4,5 - 8,0 anos, foram utilizados nesse estudo. Os micos pesavam  $344 \pm 6$  g (média  $\pm$  sem; variação: 280-410 g) no início do estudo e nenhuma fêmea estava prenha no momento dos procedimentos ou tinha tido filhotes recentemente. Os sujeitos do presente estudo foram alojados aos pares no CPUUnB, conforme as condições que foram detalhadas anteriormente na Seção 4. Os pares usados aqui foram formados há pelo menos dois anos antes do início do estudo, consistindo em díades heterossexuais ou em indivíduos do mesmo sexo.

### **8.2.2. Aferição das temperaturas da membrana timpânica e subcutânea**

As TMT direita e esquerda dos micos foram aferidas antes e após o procedimento experimental detalhado abaixo, seguindo a metodologia geral descrita na Seção 4.3. Para cada aferição do presente estudo, foram feitas seis leituras da TMT de cada sujeito, em intervalos de 5 s – três no ouvido esquerdo e três no ouvido direito – seguindo o mesmo procedimento empregado anteriormente no Estudo 2. Ademais, conforme realizado nos Estudos 2 e 3, a TSC também foi aferida antes e logo após o término da sessão experimental, com o intuito de verificar se possíveis mudanças na TMT não estariam relacionadas a um efeito geral na temperatura corporal. Nesse experimento, também foi calculado o *score* de diferença (*difference score*;  $\Delta$ ), conforme descrito anteriormente nos Estudos 2 e 3.

### **8.2.3. Procedimento para exposição a um ambiente novo, com ou sem isolamento social**

Os sujeitos foram divididos em quatro grupos experimentais. Esses diferiram em termos do tipo de ambiente físico (familiar ou novo) e do ambiente social (com parceiro ou isolado) a que os animais foram submetidos durante o procedimento experimental.

O ambiente físico familiar consistiu no próprio viveiro de moradia do sujeito, enquanto o ambiente físico novo foi um aparato de Campo Aberto (CA). Esse consistiu em uma arena retangular (130 x 75 x 40 cm; C x L x A) branca, suspensa a 1 m do chão por um suporte metálico (Figura 8.1). O CA tinha um chão de tela metálica, três paredes de chapa de alumínio, e a quarta parede e o teto eram de vidro transparente de aproximadamente 4 mm de espessura. Uma porta do tipo-guilhotina, localizada centralmente na parede de metal oposta a parede de vidro, serviu de ponto de entrada e saída desse aparato. O aparato foi instalado em uma sala de experimento, localizada a aproximadamente 50 m do Pavilhão de Calitriquídeos do CPUnB onde estavam localizados os viveiros de moradia dos animais. Portanto, cada sujeito foi levado do seu viveiro de moradia até a sala de experimento, e depois de volta a seu viveiro, usando uma caixa-transporte (35 x 20 x 23 cm; C X L x A). Essa caixa, feita de alumínio, podia ser acoplada diretamente na frente da porta do CA (Figura 8.1).



**Figura 8.1.** Fotografias do aparato do Campo Aberto utilizado no estudo. *À Esquerda:* Vista lateral do aparato, com a caixa-transporte acoplada diretamente em frente a porta do tipo-guilhotina e evidenciando o teto e a parede (ao fundo) de vidro transparente; *À Direita:* Vista superior do aparato, evidenciando as três paredes de chapa de alumínio, o piso de tela metálica, e a porta do tipo-guilhotina. (Foto: Clarissa Vannuchi).

O ambiente social familiar consistiu em deixar o sujeito com o outro membro da sua díade durante toda a sessão experimental. Por outro lado, o ambiente de isolamento social foi induzido ao separar o sujeito do seu companheiro de viveiro (i.e., o mico ficou sozinho). Os sujeitos submetidos a essa condição de isolamento social não tiveram

contato visual, tátil ou olfativo com seu companheiro de viveiro durante toda a sessão experimental.

Desta forma, os quatro grupos experimentais do presente estudo foram (n=6/grupo):

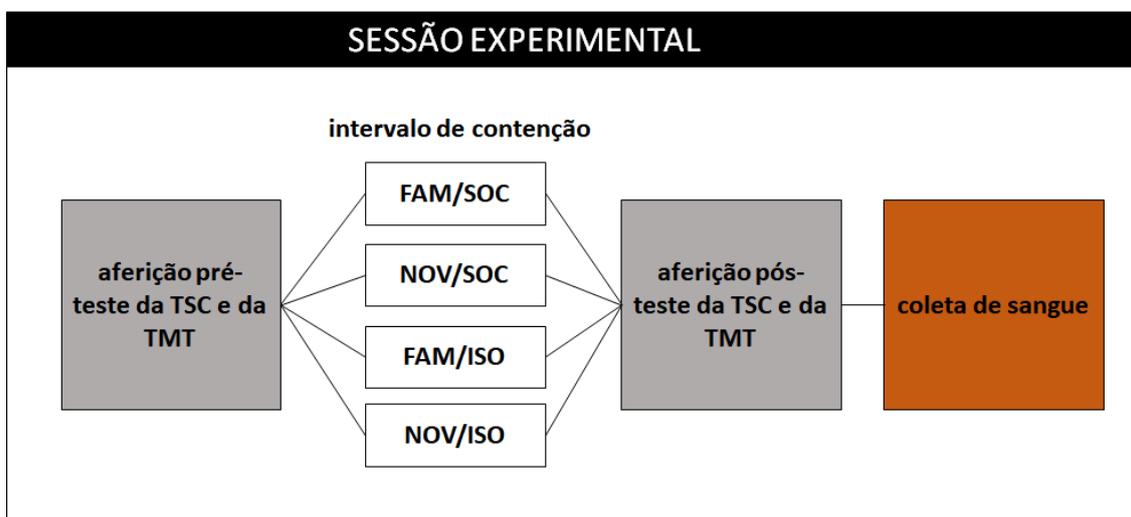
- 1) FAM+SOC: ambiente físico familiar + ambiente social habitual (controle);
- 2) FAM+ISO: ambiente físico familiar + isolamento social;
- 3) NOV+SOC: ambiente físico novo + ambiente social habitual;
- 4) NOV+ISO: ambiente físico novo + isolamento social.

É importante ressaltar que os animais do grupo FAM+SOC foram formados, obrigatoriamente, por díades de um mesmo viveiro de moradia, assim como os membros do grupo NOV+SOC. Para formar os outros dois grupos, as díades foram separadas, sendo um animal indicado para o grupo FAM+ISO, enquanto o outro fez parte do grupo NOV+ISO. Vale destacar também que os membros de cada díade desse estudo foram testados simultaneamente, cada animal por uma equipe diferente.

Cada sujeito foi submetido a uma única sessão experimental de 30 min. Contudo, nem todos os membros de um mesmo grupo foram avaliados no mesmo dia. Uma representação esquemática resumida do procedimento geral pode ser vista na Figura 8.2. No dia do teste, independente do grupo experimental, os dois micos de um mesmo viveiro de moradia foram capturados, contidos manualmente e as TSC e TMT pré-teste aferidas imediatamente, conforme descrito anteriormente.

Em seguida, os animais do grupo NOV+SOC foram colocados juntos dentro da caixa transporte e levados até a sala de experimento. Já os animais do grupo NOV+ISO foram separados do seu par e transportados isoladamente na caixa de transporte até essa mesma sala. Os animais desses dois grupos foram então imediatamente liberados no CA (juntos no caso do grupo NOV+SOC; sozinho no caso do grupo NOV+ISO), dando início a sessão experimental de 30 min. Durante esse intervalo, os sujeitos tiveram acesso irrestrito a todo o aparato sem serem incomodados. Ao final da sessão, os sujeitos foram levados, juntos ou sozinhos, dependendo do grupo, de volta ao

Pavilhão de Calitriquídeos na caixa de transporte. Lá foram retirados dessa caixa, contidos manualmente e as TSC e TMT pós-teste aferidas.



**Figura 8.2.** Representação esquemática do procedimento geral do Estudo 4, realizado em cada um dos quatro grupos experimentais (FAM+SOC (grupo controle); FAM+ISO; NOV+SOC e NOV+ISO). FAM = sujeito permaneceu em seu ambiente físico familiar (i.e., no seu próprio viveiro de moradia); NOV = sujeito foi exposto ao ambiente novo do aparato do campo aberto; SOC = sujeito permaneceu sempre com o seu companheiro habitual; e ISO = sujeito foi isolado socialmente do seu companheiro habitual (i.e., permaneceu sozinho); n = 6/grupo.

Os animais dos grupos FAM+SOC e FAM+ISO foram liberados de volta em seu viveiro de moradia logo após a aferição das temperaturas corporais pré-teste. No caso do grupo FAM+SOC, os dois membros da díade permaneceram juntos, enquanto no grupo FAM+ISO o animal ficou sozinho uma vez que seu par foi levado e testado no aparato do CA. Os sujeitos desses dois grupos permaneceram nos seus viveiros de moradia por 30 min, sem ser incomodados. Ao final desse intervalo, cada sujeito foi novamente capturado, contido manualmente e as TSC e TMT pós-teste aferidas.

Após a aferição pós-teste, os micos foram levados para uma sala de procedimento, adjacente ao Pavilhão de Calitriquídeos, onde foram submetidos a coleta de uma amostra sangue e então liberados em seu viveiro de moradia.

O procedimento foi realizado entre às 13:00 e 17:00 h, quando a temperatura geral do corpo e o padrão de atividade dos micos permanecem constantes (HETHERINGTON, 1978; HOFFMANN e cols., 2012). Ainda, o aparato do CA foi

higienizado com álcool 70% após cada sessão realizada. Foi registrado o tempo que levou para capturar cada sujeito em seu viveiro de moradia, assim como aferir as suas temperaturas corporais pré- e pós-teste (Tabela 8.1). Nesse estudo, a resposta comportamental dos sujeitos não foi registrada.

**Tabela 8.1.** Tempo necessário para realizar diferentes etapas do procedimento experimental com os micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (social) ou ausência (isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (média±epm, em segundos).

Etapa do procedimento	Grupo experimental			
	Ambiente físico familiar		Ambiente físico novo	
	Social	Isolado	Social	Isolado
captura no viveiro pré-teste	31±6	44±4	33±6	41±12
aferição pré-teste da temperatura	70±6	75±5	71±7	70±6
aferição pós-teste da temperatura	79±6	81±7	80±4	72±6
coleta de sangue	145±29	140±22	134±23	179±20

#### 8.2.4. Coleta de sangue e dosagem do cortisol sérico

Para cada sujeito, foi obtida uma única amostra de sangue. Essa amostra foi coletada logo após a aferição pós-teste da TMT. O procedimento para a coleta de sangue foi o mesmo que o empregado no Estudo 3. O tempo para obter cada amostra de sangue foi registrado para verificar se esse procedimento influenciou o nível de cortisol detectado (Tabela 8.1).

#### 8.2.5. Análise estatística

Os dados do escore  $\Delta$  da TMT foram analisados para se estabelecer possíveis diferenças entre os hemisférios esquerdo e direito, e entre os quatro grupos experimentais. Assim, foi realizada uma ANOVA de duas vias de desenho misto (*mixed-design two-way Analysis of Variance*), com o escore  $\Delta$  da TSC como covariante, assim como o 'grupo' (FAM+SOC x FAM+ISO x NOV+SOC x NOV+ISO) como o fator

independente e 'lado' (ouvido esquerdo x direito) como a variável dependente. Os dados referentes a concentração de cortisol, a massa corporal e o escore  $\Delta$  da TSC foram analisados usando uma ANOVA de uma via para detectar possíveis diferenças entre os grupos. No caso de um resultado significativo, os dados foram então analisados com o teste de Tukey.

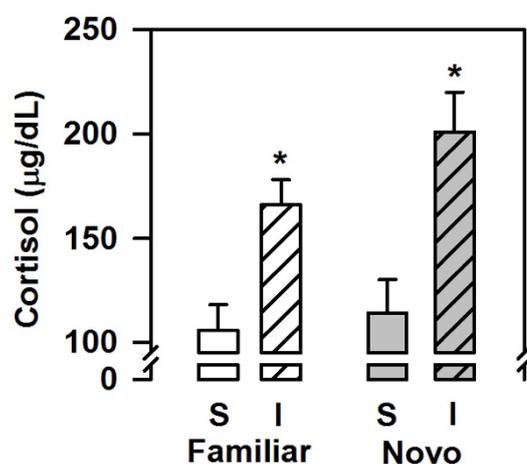
Ademais, o teste de correlação de Pearson foi usado para estabelecer a relação entre: (1) o escore  $\Delta$  da TMT e a concentração de cortisol; (2) o valor da TMT pré-teste e a concentração de cortisol; (3) o valor da TMT e o tempo para captura no viveiro; (4) o valor da TMT e o tempo para aferição das temperaturas corporais; (5) os escores  $\Delta$  da TMT e TSC; e (6) a concentração de cortisol e o tempo necessário para obter a amostra de sangue. O nível de significância adotado para todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

### **8.3. Resultados**

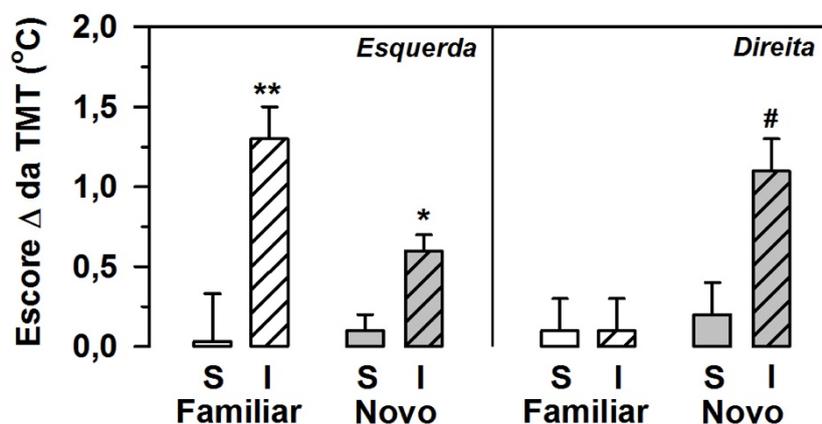
A concentração sanguínea de cortisol dos micos, detectada logo após a sessão experimental, diferiu significativamente entre os grupos experimentais [ $F(3,23)=9,88$ ;  $p=0,001$ ; Figura 8.3]. Os micos que estavam sozinhos no ambiente familiar do viveiro de moradia (grupo FAM+ISO) ou no ambiente novo (grupo NOV+ISO) tiveram níveis de cortisol semelhantes, os quais foram significativamente mais elevados que os níveis dos grupos expostos a esses mesmos ambientes mas junto com o outro membro do viveiro (grupos FAM+SOC e FAM+ISO, respectivamente). Para esses dois grupos, a concentração de cortisol foi semelhante, estando em níveis mais baixos. Vale ressaltar que os níveis de cortisol detectados não foram correlacionados ao tempo necessário para obter a amostra de sangue [ $r=0,38$ ;  $p=0,10$ ; Tabela 8.1].

Em termos da TMT, também se observou uma diferença significativa entre os grupos experimentais, sendo que o padrão de resposta variou entre os lados esquerdo e direito [fator grupo:  $F(3,18)=7,81$ ;  $p=0,002$ ; fator lado:  $F(1,18)=1,16$ ;  $p=0,30$ ; interação:  $F(1,18)=4,35$ ;  $p=0,02$ ; Figura 8.4]. O escore  $\Delta$  da TSC não influenciou esse resultado

[F(1,18)=0,01; p=0,95]. Para os sujeitos que estavam sozinhos no ambiente familiar do viveiro de moradia (grupo FAM+ISO), a TMT esquerda aumentou, enquanto no lado direito essa temperatura permaneceu inalterada. Por sua vez, a TMT do grupo NOVO+ISO aumentou nos dois lados. Os efeitos vistos nesses grupos diferiram significativamente da resposta observada nos micos que foram expostos a esses mesmos dois ambientes, mas na presença do outro membro do viveiro (grupos FAM+SOC e NOV+SOC). Para esses animais, as TMT esquerda e direita permaneceram inalteradas ao longo da sessão experimental (Figura 8.4).



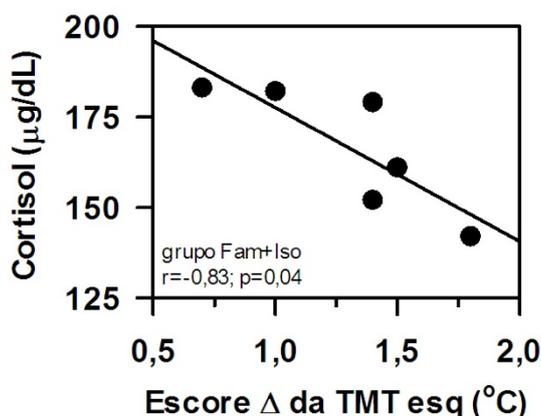
**Figura 8.3.** Concentração sérica de cortisol (média+epm) detectada logo após os micos serem expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (S; social) ou ausência (I; isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia. n=6/grupo; \*p<0,05 vs. grupos Familiar+S e Novo+S.



**Figura 8.4.** Alteração na temperatura da membrana timpânica esquerda e direita (TMT; escore Δ; média+epm) nos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (S; social) ou ausência (I; isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia. Escore Δ da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste. n=6/grupo; \*p<0,05 vs. grupo Novo+S (esquerda); \*\*p<0,05 vs. grupos Familiar+S e Novo+S (esquerda); #p<0,05 vs. demais grupos (direita).

Não foi observada uma correlação entre os valores pré-teste da TMT e a duração correspondente do procedimento de captura no viveiro de moradia [tempo de captura vs. TMT esquerda:  $r=0,05$ ;  $p=0,84$  e vs. TMT direita:  $r=0,07$ ;  $p=0,75$ ; Tabela 8.1]. Os valores pré- e pós-teste da TMT também não estavam correlacionados ao tempo necessário para aferir as temperaturas corporais [tempo aferição temperatura pré-teste – vs. TMT esquerda pré-teste:  $r=-0,06$ ;  $p=0,76$  e vs. TMT direita pré-teste:  $r=-0,14$ ;  $p=0,53$ ; tempo aferição temperatura pós-teste – vs. TMT esquerda pós-teste:  $r=-0,03$ ;  $p=0,90$  e vs. TMT direita pós-teste:  $r=-0,05$ ;  $p=0,79$ ; Tabela 8.1].

Além disso, não teve uma correlação entre a concentração de cortisol e os valores pré-teste da TMT [cortisol vs. TMT esquerda:  $r=-0,10$ ;  $p=0,64$  e vs. TMT direita:  $r=0,03$ ;  $p=0,90$ ]. Porém, teve uma correlação negativa entre os níveis de cortisol e os escores  $\Delta$  da TMT esquerda, mas isso apenas nos sujeitos que foram permaneceram sozinhos no ambiente familiar do viveiro de moradia (grupo FAM+ISO; Figura 8.5) [FAM+SOC – cortisol vs. TMT esquerda:  $r=0,17$ ;  $p=0,75$  e vs. TMT direita:  $r=-0,49$ ;  $p=0,32$ ; FAM+ISO – cortisol vs. TMT esquerda:  $r=-0,83$ ;  $p=0,04$  e vs. TMT direita:  $r=0,61$ ;  $p=0,20$ ; NOV+SOC – cortisol vs. TMT esquerda:  $r=-0,59$ ;  $p=0,22$  e vs. TMT direita:  $r=0,27$ ;  $p=0,61$ ; NOVO+ISO – cortisol vs. TMT esquerda:  $r=0,51$ ;  $p=0,30$  e vs. TMT direita:  $r=-0,45$ ;  $p=0,38$ ].



**Figura 8.5.** Correlação negativa entre a concentração sérica de cortisol e a mudança de temperatura na membrana timpânica esquerda (escore  $\Delta$  da TMT esq) nos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar na ausência do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (grupo Fam+Iso). Escore  $\Delta$  da TMT = temperatura pós-teste – temperatura pré-teste.

Por fim, os quatro grupos experimentais não diferiram em termos do escore  $\Delta$  da TSC [F(3,23)=0,59; p=0,63; Tabela 8.2], sendo que esse mesmo parâmetro e os escores  $\Delta$  da TMT não estavam correlacionados [TSC vs. TMT esquerda: r=0,02; p=0,94 e vs. TMT direita: r=0,13; p=0,54]. Os quatro grupos experimentais também apresentaram valores similares em termos de sua massa corporal [F(3,23)=0,09; p=0,96; Tabela 8.2].

**Tabela 8.2.** Massa corporal e alteração na temperatura subcutânea (escore  $\Delta$  da TSC) dos micos que foram expostos por 30 min a um ambiente físico familiar ou novo, na presença (social) ou ausência (isolado) do outro indivíduo do seu viveiro de moradia (média $\pm$  epm).

Parâmetro	Grupo experimental			
	Ambiente físico familiar		Ambiente físico novo	
	Social	Isolado	Social	Isolado
massa corporal (g)	343 $\pm$ 17	350 $\pm$ 12	341 $\pm$ 8	343 $\pm$ 15
escore $\Delta$ da TSC ( $^{\circ}$ C) <sup>a</sup>	-0,2 $\pm$ 0,2	-0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1

<sup>a</sup> escore  $\Delta$  = temperatura aferida pós-teste – temperatura aferida pré-teste

#### 8.4. Discussão

Ao se deparar com um ambiente novo, um indivíduo deve ser capaz de identificar rapidamente novas fontes de alimento, parceiros sociais, rotas de fuga e/ou locais para se proteger e descansar. Para tanto, é necessário estabelecer novas relações espaciais entre diferentes elementos desse ambiente. Assim, há uma forte tendência natural de se explorar o local, o que induz uma resposta de aproximação à diferentes elementos ali presentes. Ao mesmo tempo, há também uma emoção inata de medo, o que por sua vez gera uma resposta de fuga e/ou de esquiva/evitação. Somadas, essas duas respostas geram um conflito interno de aproximação-esquiva que pode ser uma fonte de estresse para vários animais (p.ex., roedores: ENNACEUR e cols., 2006; macacos: CAGNI e cols., 2012; CAMERON e ROGERS, 1999).

No presente estudo, os micos que foram expostos tanto ao ambiente novo (i.e., aparato do CA), como o lugar bem familiar (i.e., próprio viveiro de moradia), mas na ausência do parceiro social, apresentaram níveis elevados de cortisol no sangue,

comparado aos animais submetidos a esses mesmos locais mas na presença do seu parceiro social de longa data. Nesses indivíduos, foram detectados níveis de cortisol semelhantes e bem mais baixos, correspondendo a concentrações relatadas na literatura para micos não estressados (CHROUSOS e cols., 1982; PRYCE e cols., 2002; SALTZMAN e ABBOTT, 2011). Além disso, os níveis de cortisol do presente estudo não estavam relacionados ao tempo que levou para coletar a amostra de sangue. Esses resultados são semelhantes ao de outros estudos que também avaliaram o efeito do isolamento social de micos em um ambiente novo (CININI e cols., 2014; FRENCH e cols., 2007; SMITH e cols., 1998) e no próprio viveiro de moradia (DUARTE e cols., 2018). Também há relatos similares em estudos realizados em outras espécies de PNH e em roedores (revisado em HENNESSY, 1997).

No entanto, ao separar um par social de micos, o fato de estar em um ambiente familiar versus um local desconhecido, parece ser capaz de minimizar a sua resposta comportamental, cardiovascular (GERBER e cols., 2002) e hormonal (SMITH e cols., 1998). Isso também parece ter ocorrido no presente estudo, uma vez que os animais do grupo FAM+ISO tiveram concentrações de cortisol mais baixos que os vistos no grupo NOVO+ISO, apesar de não ter atingido níveis significativos. No presente estudo, os micos que foram avaliados estavam completamente isolados em seus viveiros de moradia, tendo pouco e nenhum contato com seu parceiro. Por outro lado, os sujeitos do estudo de SMITH e cols. (1998) permaneceram no viveiro junto com outros membros da família (i.e., filhotes e/ou irmãos) e ainda tiveram contato visual, olfativo e auditivo com o parceiro que foi removido. Isso pode ter contribuído para os níveis de cortisol mais baixos vistos no estudo de SMITH e cols. (1998). Portanto, a presença de outros membros do grupo e/ou a quantidade de contato residual com o parceiro social parecem influenciar como esses pequenos primatas respondem a perturbações no seu ambiente social e físico (DUARTE e cols., 2018).

Vale destacar que a ativação do eixo HPA foi bloqueada quando os micos estavam no ambiente novo, mas junto com seu parceiro social. De fato, há vários relatos

de que a presença física e/ou o contato auditivo com um coespecífico familiar podem atenuar (*buffer*) a liberação de cortisol induzida pelo estresse nesses animais (CAVANAUGH e cols., 2016; CLARA e cols., 2008; CROSS e ROGERS, 2006; PEREIRA e cols., 2018; RUKSTALIS e FRENCH, 2005; SMITH e cols., 1998), minimizando assim os efeitos deletérios que episódios recorrentes e/ou prolongados de estresse podem causar em termos do crescimento, da resposta imunológica e da reprodução (HABIB e cols., 2001). Interações sociais positivas, como no caso da presença de um coespecífico familiar, podem ter propriedades ansiolíticas (SMITH e cols., 2011), reduzir a percepção do nível de perigo de um evento estressor e diminuir a resposta fisiológica a tais situações (LEVINE, 1993). Esse tipo de apoio social pode exercer um importante efeito protetor (*buffer*) contra os constantes desafios presente no ambiente (DeVRIES e cols., 2003).

Em termos da TMT, foi registrado um aumento significativo de temperatura quando os sujeitos estavam isolados no ambiente novo ou no ambiente familiar. Contudo, não houve alteração na TMT quando o parceiro estava junto com o sujeito nesses mesmos dois tipos de ambientes. Esses resultados não estavam relacionados a temperatura geral do corpo (TSC), a qual permaneceu constante ao longo da sessão experimental, tampouco ao tempo necessário para capturar o sujeito em seu viveiro de moradia ou para aferir as temperaturas corporais. Na verdade, os micos do presente estudo apresentaram valores similares em termos de sua TSC e peso corporal.

A mudança vista na TMT basal pode estar, novamente, refletindo um aumento ipsilateral da atividade hemisférica cerebral, como indicado nos Estudos 1-3 e conforme já observado em outras investigações com humanos (p.ex., PROPPER e BRUNYÉ, 2013) e outros PNH (BOYCE e cols., 1996; HANBURY e cols., 2011, 2013; PARR e HOPKINS, 2000). Uma alteração na TMT basal parece indicar a ocorrência de uma mudança no fluxo sanguíneo cerebral e na temperatura do tecido nervoso (BAKER e cols., 1972; MARIK e cols., 1994; SCHUMAN e cols., 1999). Essas mudanças, por sua vez, estariam sendo induzidas por alterações na atividade cerebral (SCHIFFER e cols.,

1999; YABLONSKIY e cols., 2000). Estímulos emocionais negativos, como os eventos de estresse induzidos no presente estudo, são de fato capazes de aumentar a atividade neuronal e o fluxo sanguíneo regional (CANLI e cols., 1998).

A TMT aumentou bilateralmente em resposta a exposição ao ambiente novo com isolamento social. O fato de ter ocorrido, ao mesmo tempo, dois tipos diferentes de estresse pode ter contribuído para indução de um padrão mais amplo de ativação neuronal. Uma resposta a eventos aversivos realmente requer a ativação de vários sistemas neurais complexos (VAN OORT e cols. 2017). Esses sistemas relacionados a aspectos emocionais, autonômicos, neuroendócrinos e cognitivos – cada qual com seu próprio padrão de lateralização hemisférica (GERENDAI e HALÁSZ, 1997; HAGEMANN e cols., 2003; VOGELS e cols., 1994) – precisam interagir constantemente para gerarem a resposta mais adaptativa para uma determinada situação.

Por outro lado, o hemisfério direito parece ser o lado predominantemente responsável pelo processamento de estímulos aversivos e pela emissão de respostas de fuga e esquiva/evitação. Já o lado esquerdo do cérebro processa mais os estímulos emocionais positivos, sendo assim mais responsável pela emissão de respostas de aproximação (DAVIDSON, 1992; porém ver GAINOTTI, 2012). Como ambientes novos induzem, simultaneamente, esses dois tipos de resposta (roedores: ENNACEUR e cols. 2006; micos: CAGNI e cols., 2012; CAMERON e ROGERS, 1999), a atividade bilateral detectada no presente estudo pode estar refletindo, em parte, esse conflito emocional. A presença do outro membro da díade durante a exposição ao ambiente novo parece ter atenuado esse conflito interno, como ocorreu para a resposta do eixo HPA, uma vez que aqui a TMT basal não foi alterada.

Porém, no grupo NOV+ISO, a atividade proeminente do lado esquerdo pode ter contribuído para mascarar uma ativação neuronal ainda mais pronunciada no lado direito. De fato, a mudança na TMT basal direita foi em média 0,5°C maior que a do ouvido esquerdo. Um efeito similar foi relatado por DAWSON e cols. (1992) ao analisarem o EEG de crianças que haviam sido separadas de suas mães por um curto

intervalo de tempo. Conforme mencionado acima, o hemisfério direito pode estar mais ativo durante eventos emocionais negativos (DAVIDSON, 1992). Além disso, esse mesmo lado desempenha um papel importante no aprendizado de novas relações espaciais (MACNEILAGE e cols., 2009), algo importante durante a exposição a ambientes desconhecidos.

No grupo que permaneceu sozinho no próprio viveiro de moradia, houve um aumento significativo na TMT basal apenas no lado esquerdo. Em vários PNH, o processamento de aspectos relacionados ao ambiente social do indivíduo tem sido associados mais frequentemente ao hemisfério direito, mas a maioria dos estudos realizados focaram apenas em interações agressivas e/ou negativas (PARR e HOPKINS, 2000; KALIN e cols., 1998; WALLEZ e VAUCLAIR, 2011). Em micos, em particular, o isolamento social geralmente induz um aumento na emissão de vocalizações de contato social (*long calls*; DUARTE e cols., 2018; FRENCH e cols. 2007; GERBER e cols., 2002; RUKSTALIS e FRENCH, 2005; SMITH e cols., 1998). A produção desse tipo de chamado conta com uma maior participação do lado direito da boca, refletindo assim uma maior atividade do lado esquerdo do cérebro (HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998). Esse mesmo tipo de assimetria para emissão de vocalizações sociais, que não estão associadas a respostas de medo, já foi visto em outras espécies de PNH (HAUSER e ANDERSSON, 1994; HAUSER e cols., 1998; HEFFNER e HEFFNER, 1984; LOSIN e cols., 2008; PETERSEN e cols., 1978), assim com em humanos (p.ex., GRAVES e cols., 1982).

Apesar dessa vocalização social (*long call*) ser considerada uma resposta de aproximação, capaz de atenuar a liberação de cortisol induzida pelo estresse (RUKSTALIS e FRENCH, 2005), no presente estudo não foi possível registrar a reação comportamental dos micos. Além disso, os níveis de cortisol do grupo FAM+ISO foram mais elevados que os do grupo FAM+SOC, indicando que, mesmo em havendo a emissão de vocalização de contato social durante o período de isolamento, essa resposta não foi capaz de bloquear a ativação do eixo HPA nesse grupo, contrariando

estudos anteriores. Porém, apenas os dados comportamentais poderiam realmente confirmar esse resultado.

Contudo, quanto maior foi a ativação no lado esquerdo, menor foi o nível de liberação de cortisol sanguíneo, mas isso apenas para os animais que estavam isolados em seus próprios viveiros de moradia (i.e., grupo FAM+ISO). Um efeito similar foi relatado em macacos rhesus por KALIN e cols. (1998). Uma maior ativação do hemisfério esquerdo tem sido associada a uma maior propensão de se ver uma resposta de aproximação em micos (BRACCINI e CAINE, 2009; CAMERON e ROGERS, 1999; HOOK-COSTIGAN e ROGERS, 1998) e outras espécies de PNH (HANBURY e cols., 2013; HOPKINS e BENNETT, 1994; WESTERGAARD e cols., 2002), além de se ter um temperamento mais positivo no caso de humanos (DAVIDSON, 1992). Um temperamento mais pró-ativo e uma menor ativação do eixo HPA também foram vistos em macacos que apresentavam um hemisfério esquerdo mais ativo que o direito em termos de atividade basal (KALIN e cols., 1998). Mas, no presente estudo, os valores basais da TMT não estavam relacionados aos níveis de cortisol sanguíneo vistos nos micos após o evento estressor.

Os resultados observados aqui devem ser generalizados com cautela, considerando que vários aspectos estão envolvidos no processamento de estímulos emocionais. Por exemplo, determinadas estruturas corticais e subcorticais são recrutadas e/ou inativadas em diferentes momentos (CARLSON e cols., 1988; RAICHLE e cols., 2001). Portanto, o padrão de atividade neuronal pode variar ao longo do tempo (PARR e HOPKINS, 2000). Além disso, estímulos aversivos induzem uma resposta mais rapidamente do que eventos emocionais positivos (KALIN e cols., 1998; WITTLING e ROSCHMANN, 1993). Fatores como a natureza do estímulo (p.ex., dados da presente tese publicados em PEREIRA e cols., 2018), a espécie estudada (ROGERS, 2014) e características inerentes do indivíduo (KALIN e cols., 1998) também podem influenciar o padrão de ativação neuronal. Ainda, a temperatura, os mecanismos de dissipação de calor e o fluxo sanguíneo local podem variar entre estruturas mais superficiais e

profundas do cérebro (SUKSTANSKII e YABLONSKIY, 2006). Vale ressaltar que a temperatura do cérebro e o fluxo sanguíneo cerebral também são alterados por mecanismos do Sistema Nervoso Autônomo, podem agir de forma dependente e independente do processamento das emoções (p.ex., HAYWARD e BAKER, 1968). Portanto, os mecanismos responsáveis pelas alterações vistas na TMT e atividade hemisférica ainda precisam ser melhor esclarecidos.

## 8.5. Conclusão

No presente estudo ficou demonstrado mais uma vez que um ambiente novo e alterações no ambiente social são importantes fontes de estresse para PNH. Além disso, os dados relacionados as mudanças na TMT basal fornecem a primeira evidência de como esses eventos aversivos podem estar sendo processados em nível hemisférico.

No caso de o mico ser exposto sozinho a um ambiente novo, o padrão de ativação parece ser bilateral. Esse padrão pode estar associado a um conflito emocional gerado pela tendência natural do indivíduo querer, ao mesmo tempo, se aproximar e evitar o ambiente novo. Já no caso de estar sozinho em um ambiente altamente familiar, a atividade neuronal ocorreu predominante do hemisfério esquerdo. Essa atividade assimétrica estava negativamente relacionada a liberação de cortisol no sangue. Isso pode estar refletindo uma característica inerente do indivíduo ter ou não um temperamento mais positivo e pró-ativo.

A ocorrência de interações sociais positivas, como no caso da presença de um co-específico familiar, parece reduzir a percepção do nível de perigo de um evento estressor, alterando o padrão de ativação neural em nível dos hemisférios cerebrais e bloqueado a resposta hormonal ao estresse. Esse padrão corresponde, de fato, a um efeito de *buffering* social já demonstrado em micos.

Estudos futuros, analisando o padrão de atividade em intervalos mais frequentes, podem fornecer dados temporais importantes para a elucidação dos

mecanismos neurais que subsidiam o processamento e a resposta a eventos aversivos, particularmente em nível de especialização de um dos hemisférios cerebrais.

## 9. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do presente estudo indicam que micos-estrela adultos reagem rapidamente a diferentes tipos de eventos aversivos e/ou estressantes. Em todas as situações que foram avaliadas (i.e., ameaça humana, confronto com predador, estresse de contenção, restrição alimentar, isolamento social, e exposição a novos ambientes) os animais apresentaram a resposta neuroendócrina típica para tais situações – uma elevação dos níveis circulantes de cortisol. Porém, vale ressaltar que essa resposta hormonal a eventos aversivos: (1) nem sempre reflete o que é visto em termos da resposta comportamental (Estudo 1); (2) pode diferir entre machos e fêmeas (Estudo 1); (3) varia em termos da intensidade e da duração do estímulo, geralmente tendo uma diminuição da resposta do eixo HPA ao longo do tempo (Estudos 2 e 3); e (4) pode ser atenuada (*buffered*) por interações sociais positivas (i.e., estar em um ambiente social altamente familiar; Estudo 4).

Em termos da resposta comportamental, avaliada apenas no Estudo 1, o perfil demonstrado tende a variar de acordo com as características inerentes do estímulo, mesmo entre situações aversivas aparentemente similares (humano vs. predador natural taxidermizado). Isso pode estar indicando que estímulos distintos são processados de forma diferenciada pelo SNC, havendo relatos semelhantes em estudos anteriores com primatas, incluindo micos. Tal fato permite que esses primatas tenham uma diversidade de respostas, especializadas e independentes, fazendo com que suas reações se tornem mais flexíveis e adaptativas frente aos diferentes desafios encontrados no seu ambiente.

Ainda, a emissão de vocalizações por parte desses primatas parece estar associada à sua resposta hormonal ao estresse. No Estudo 1, níveis menores de vocalização de alarme do tipo *tsik-tsik* estavam correlacionados a níveis maiores de cortisol no sangue das fêmeas logo após o período de confronto com um predador taxidermizado. Contudo, conforme já mencionado acima, a resposta comportamental e hormonal nem sempre coincidem, indicando que a análise de apenas um desses

parâmetros pode não indicar corretamente como micos interpretam e reagem a um determinado evento aversivo.

No presente estudo é importante destacar que os diferentes tipos de eventos aversivos/estressantes avaliados foram, na sua maior parte, processados de forma assimétrica pelo SNC dos micos, não havendo uma correlação entre a TMT e as respostas comportamental e/ou hormonal. Com a exposição a uma ameaça humana, predador taxidermizado e estresse de contenção, houve uma ativação lateralizada do hemisfério direito, visto que as mudanças ocorridas na TMT basal dos micos se deram predominantemente nesse lado (Estudos 1 e 2). De fato, os mecanismos neurais responsáveis por detectar, processar e responder a estímulos emocionais negativos em humanos e vários animais parecem estar geralmente lateralizados nesse lado do cérebro.

Porém, o processamento de informações relacionadas a estímulos emocionais negativos parece ser mais complexo do que inicialmente sugerido em estudos prévios na literatura. Um estresse de privação de 3 vs. 6 h (Estudo 3) e a exposição sozinho a um ambiente novo gerou uma alteração bilateral (Estudo 4), enquanto o isolamento social em um local bem familiar levou a uma mudança apenas no hemisfério esquerdo dos micos (Estudo 4). De fato, o padrão de lateralização hemisférica em micos, e possivelmente outros PNH, pode depender, em parte, da natureza e da duração do evento aversivo. Além disso, a lateralização hemisférica de funções cognitivas também pode ter influenciado o padrão de ativação hemisférica observado, contribuindo para a divergência entre os diferentes tipos de estímulos avaliados no presente estudo.

Os resultados obtidos também corroboram o uso da termometria da membrana timpânica como um indicador indireto, rápido, não-invasivo e de baixo custo para avaliar a ativação neuronal em tempo real em animais. Em todos os experimentos realizados, essa medida indireta da atividade hemisférica demonstrou ser potencialmente sensível a mudanças na temperatura cerebral induzida por alterações na atividade neuronal. Contudo, mais estudos são necessários para que se possa esclarecer o significado

funcional da direção (i.e., aumento vs. diminuição) na qual a TMT muda durante eventos como os que foram analisados aqui. Ao longo do presente estudo, assim como visto em outras espécies de PNH, foi observado tanto um aumento, como uma diminuição da TMT basal dos micos, novamente dependendo do tipo de estímulo, da duração do evento e possivelmente do sexo.

Considerando que o processamento de estímulos emocionais depende de vários aspectos relacionados tanto ao estímulo (p. ex., tipo, intensidade, duração e frequência), como ao indivíduo (p. ex., espécie, responsividade intrínseca), diferentes áreas neurais podem ser ativadas/inativadas, e esse perfil pode mudar ao longo do tempo e em resposta a exposições repetidas. Portanto, os mecanismos responsáveis pelas alterações vistas na TMT e na atividade hemisférica ainda precisam ser melhor esclarecidos, podendo contribuir de forma significativa para o nosso conhecimento sobre a lateralização de diferentes funções do SNC.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W. M., Callow, A., Moore, W., Rutherford, R., Veith, F. & Weinberg, S. (1993). Evaluation and performance standards for arterial prostheses. *J Vasc Surg.* 17, 46-56.
- Acharya, U.R., Ng, E.Y., Tan, J.H. & Sree, S.V. (2012). Thermography based breast cancer detection using texture features and support vector machine. *J Med Syst.* 36, 1503-1510.
- Adolphs, R., Damasio, H., Tranel, D. & Damasio, A. R. (1996). Cortical systems for the recognition of emotion in facial expressions. *J Neurosci.* 16, 7678–7687.
- American Psychiatric Association (1994). *DSM-IV: manual de diagnóstico e estatística das doenças mentais.* (4ª edição). Lisboa: Climepsi Editores.
- Amunts, K., Lenzen, M., Friederici, A.D., Schleicher, A., Morosan, P., Palomero-Gallagher, N., and Zilles, K. (2010). Broca's region: novel organizational principles and multiple receptor mapping. *PLoS Biol.* 8, e1000489.
- Anbar, M. (1998). Clinical thermal imaging today: shifting from phenomenological thermography based thermal imaging. *IEEE: Open J Eng Med Biol.* 17, 25-33.
- Armstrong, M. (1980). *The nature of mind and other essays.* Australian: University of Queensland Press.
- Auricchio, P. (1995). *Primatas do Brasil.* São Paulo: Terra Brasilis.
- Babinski, J., Langer, K. G., & Levine, D. N. (2014). Contribution to the study of the mental disorders in hemiplegia of organic cerebral origin (anosognosia). *Cortex.* 61, 5-8.
- Baciadonna, L., Nawroth, C., Briefer, E. F. & McElligott, A. G. (2019). Perceptual lateralization of vocal stimuli in goats. *Curr Zool.* 65, 67-74.
- Baker, A. L., Kaplan, M. M., Benz, W. C., Sidel, J. S. & Wolfe, H. J. (1972). Polyarteritis associated with Australia antigen-positive hepatitis. *Gastroenterology.* 62, 105-110.
- Barrett, G. V. & Morris, S. B. (1993). Sex stereotyping in price waterhouse v. Hopkins. *American Psychologist.* 48, 54-55.
- Barros, M., Boere, V., Huston, J. P. & Tomaz, C. (2000). Measuring fear and anxiety in the marmoset (*Callithrix penicillata*) with a novel predator confrontation model: effects of diazepam. *Behav Brain Res.* 108, 205-211.
- Barros, M. & Tomaz, C. (2002). Non-human primate models for investigating fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 26, 187-201.
- Barros, M., Boere, V., Huston, J. P. & Tomaz, C. (2004). Multibehavioral analysis of fear and anxiety before, during, and after exply induced predatory stress in *Callithrix penicillata*. *Pharmacol Biochem Behav.* 78, 357-67.
- Bassett, L. & Buchanan-Smith, H. M. (2007). Effects of predictability on the welfare of captive animals. *Appl Anim Behav Sci.* 102, 223-245.

- Bergen, R.D. & Kennedy, A.D. (2000). Relationships between vaginal and tympanic membrane temperature in beef heifers. *Can J Anim Sci.* 80, 515-8.
- Berridge, K. C., Ho, C. Y., Richard, J. M. & DiFelice, A. G. (2010). The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res.* 1350, 43-64.
- Beuving, G., Jones, R. B. & Blokhuis, H. J., (1989). Adrenocortical and heterophil/lymphocyte responses to challenge in hens showing short or long tonic immobility reactions. *Poult Sci.* 30, 175-184.
- Bisazza, A., Facchin, L., Pignatti, R. & Vallortigara, G. (1998). Lateralization of detour behaviour in poeciliid fish: the effect of species, gender and sexual motivation. *Behav Brain Res.* 91, 157-64.
- Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. (1998). Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: the mouse defense test battery. *Physiol Behav.* 65, 201-209.
- Blonder, L. X., Bowers, D. & Heilman K. M. (1991). The role of the right hemisphere in emotional communication. *Brain* 114, 1114-27.
- Bloomsmith, M. A. & Lambeth, S. P. (1995). Effects of predictable versus unpredictable feeding schedules on chimpanzee behaviour. *Appl Anim Behav Sci.* 44, 65-74.
- Boere, V., Pinheiro, E. C., De Oliveira E Silva, I., Paludo, G. R., Canale, G., Pianta, T., Welker, A. & Rocha-De-Moura, R. C. (2005). Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). *J Med Primatol.* 34, 156-162.
- Bontrop, R. E. (2001). Non-human primates: essential partners in biomedical research. *Immunol Rev.* 183, 5-9.
- Borod, J.C., Haywood, C.S. & Koff, E. (1997). Neuropsychological aspects of facial asymmetry during emotional expression: A review of the normal adult literature. *Neuropsychol Rev.* 7, 41-60.
- Borod, J. C., Cicero, B. A., Obler, L. K., Welkowitz, J., Erhan, H. M. & Santschi, C. (1997). Right hemisphere emotional perception: evidence across multiple channels. *Neuropsychology* 12, 446-458.
- Bowers, D., Blonder, L. X. & Heilman, K. M. (1991). The role of the right hemisphere in emotional communication. *Brain* 114, 1115-11127.
- Boyce, W. T., Hihley, J. D., Jeremin, J. J., Champoux, M., & Suomi, S. J. (1996). Tympanic temperature asymmetry and stress behavior in rhesus monkeys and children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 150, 518-523.
- Braccini, S. N. & Caine, N. G. (2009). Hand preference -redicts reactions to novel foods and predators in marmosets (*Callithrix geoffroyi*). *J Comp Psychol.* 123, 18-25.
- Brandão, M. L. (2001). *As bases biológicas do comportamento.* São Paulo: EPU.
- Broadbent, D. E. (1958). The effects of noise on behaviour. In: Broadbent, D. E. *Perception and communication.* Oxônia: Pergamon Press. pp. 81–107.

- Buynitsky, T. & Mostofsky, D. I. (2009). Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 33, 1089-1098.
- Cagni, P., Komorowski, M., Melo, G. C., Lima, T. & Barros, M. (2012). Diazepam-induced decrease in anxiety-like behaviors of marmoset monkeys exposed to a novel open-field. *Pharmacol Biochem Behav.* 100, 518-521.
- Caine, N. G. (1993). Flexibility and co-operation as unifying themes in *Saguinus* social organization and behaviour: role predation pressures. In: Rylands, A. B. (edit.). *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology* New York: Oxford University Press. pp. 200-219.
- Cameron, R. & Rogers, L. J. (1999). Hand preference of the common marmoset (*Callithrix jacchus*): problem solving and responses in a novel setting. *J Comp Psychol.* 113, 149-157.
- Canli, T., Desmond, J. E., Zhao, Z., Glover, G., & Gabrieli, J. D. E. (1998). Hemispheric asymmetry for emotional stimuli detected with fMRI. *Neuroreport* 9, 3233-3239.
- Carey, G. J., Costall, B., Domeney, A. M., Jones, D. N. C. & Naylor, R. J. (1992). Behavioural effects of anxiogenic agents in the common marmoset. *Pharmacol Biochem Behav.* 42, 143-153.
- Carneiro C. (2002). Lateralidade, percepção e cognição. *Cérebro & Mente* 15.
- Casperd, J. M. & Dunbar, R. I. M. (1996). Asymmetries in the visual processing of emotional cues during agonistic interactions by gelada baboons. *Behav Process.* 37, 57-65.
- Cherbuin, N. & Brinkman, C. (2004). Cognition is cool: Can hemispheric activation be assessed by tympanic membrane thermometry? *Brain Cogn.* 54, 228-31.
- Cherbuin, N. & Brinkman, C. (2007). Sensitivity of functional tympanic membrane thermometry (fTMT) as an index of hemispheric activation in cognition. *Laterality* 12, 239-61.
- Chrousos, G. P., Vingerhoeds, A., Brandon, D., Eil, C., Pugeat, M. & DeVroede, M. (1982). Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *J Clin Invest.* 69, 1261-1269.
- Chu, S.C., Chou, Y.C. & Liu, J.Y. (2000). Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci.* 64, 2299-306.
- Cinini, S. M., Barnabe, G. F., Galvão-Coelho, N. L. & Medeiros, M. (2014). Social isolation disrupts hippocampal neurogenesis in young non-human primates. *Front Neurosci.* 8, 45.
- Clara, E., Tommasi, L. & Rogers, L. J. (2008). Social mobbing calls in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): effects of experience and associated cortisol levels. *Anim Cogn.* 11, 349-358.
- Coe, C. L., Stanton, M. E. & Levine, S. (1983). Adrenal responses to reinforcement and extinction: role of expectancy versus instrumental responding. *Behav Neurosci.* 97, 654-657.

- Corballis, M. C. (1998). Hemispheric specialisation in animals and humans. USA.
- Corballis, M. C. (2009). The evolution of language. *Ann NY Acad Sci.* 1156, 19-43.
- Corrêa, H. K. M. & Coutinho, P. E. G. (1997). Fatal attack of a pit viper, *Bothrops jararaca*, on an infant buffy-tufted ear marmoset. *Primates* 38, 215-217.
- Cross, N. & Rogers, L. J. (2006). Mobbing vocalizations as a coping response in the common marmoset. *Horm Behav.* 49, 237-245.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J. & Carneiro, P. C. S. (2012). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV: Imprensa Universitária.
- Dalgalarrodo, P. (2008). Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais. (2ª edição). Porto Alegre: Artmed.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., La Fleur, S. E., Warne, J.P., Ginsberg, A. B., Akana, S. F., Laugero, K. C., Houshyar, H., Strack, A. M., Bhatnagar, S. & Bell, M. E. (2007). Glucocorticoids, chronic stress and obesity. *Prog Brain Res.* 153, 75-105.
- Vermeiren, Y., Dam, D. V., Aerts, T., Engelborghs, S. & Deyn, P. P. (2014). Brain region-specific monoaminergic correlates of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 41, 819-833.
- Davidson, R. L. (1992). Anterior cerebral asymmetry and the nature of emotion. *Brain Cogn.* 20, 125-151.
- Darwin, C. (1872). The expression of the emotions in man and animals. London: John Murray.
- Davis, H., Memmott, J., MacFadden, L. & Levine, S. (1976). Pituitary-adrenal activity under different appetitive extinction procedures. *Physiol Behav.* 17, 687-690.
- De Vivo, M. (1991). Taxonomia de *Callithrix* Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates). Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- DeVries, A.C., Glasper, E.R., Detillion, C.E., 2003. Social modulation of stress responses. *Physiol Behav.* 79, 399-407.
- De Renzi, E. & Spinnler, H. (1966). Visual recognition in patients with unilateral cerebral disease. *J Nerv Ment.* 142, 515-525.
- Dettling, A. C., Feldon, J. & Pryce, C. R. (2002). Early deprivation and behavioral and physiological responses to social separation/novelty in the marmoset. *Pharmacol Biochem Behav.* 73, 259-269.
- Devinsky, O. (2000). Right cerebral hemisphere dominance for a sense of corporeal and emotional self. *Epilepsy Behav.* 1, 60-73.
- Duarte, R.B., Maior, R.S., & Barros, M., 2018. Behavioral and cortisol responses of adult marmoset monkeys (*Callithrix penicillata*) to different home-cage social disruption intervals. *Appl Anim Behav Sci.* 201, 117-124.
- Duarte, R.B.M., Patrono, E., Borges, A.C., Tomaz, C., Ventura, R., Gasbarri, A., Puglisi-Allegra, S., & Barros, M., 2015. High versus low fat/sugar food affects the behavioral,

but not the cortisol response of marmoset monkeys in a conditioned-place-preference task. *Physiol Behav.* 139, 442-448.

Ennaceur, A., Michalikova, S., Van Rensburg, R. & Chazot, P. L. (2006). Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. *Behav Brain Res.* 174, 9-38.

Fagot, J. & Vauclair, J. (1991). Manual laterality in nonhuman primates: a distinction between handedness and manual specialization. *Psychol Bull.* 109, 76-89.

Fernández-Carriba, S., Loeches, A., Morcillo, A. & Hopkins, W. D. (2002a). Asymmetry in facial expression of emotions by chimpanzees. *Neuropsychologia* 40, 1523-1533.

Fernández-Carriba, S., Loeches, A., Morcillo, A. & Hopkins, W. D. (2002b). Functional asymmetry of emotions in primates: new findings in chimpanzees. *Brain Res Bull.* 57, 561-564.

Fitch, W. T. & Braccini, S. N. (2013). Primate laterality and the biology and evolution of human handedness: a review and synthesis. *Ann NY Acad Sci.* 1288, 70-85.

French, J.A., Fite, J.E., Jensen, H., Oparowski, K., Rukstalis, M.R., Fix, H., Jones, B., Maxwell, H., Pacer, M., Power, M.L., & Schulkin, J. (2007). Treatment with CRH-1 antagonist antalarmin reduces behavioral and endocrine responses to social stressors in marmosets (*Callithrix kuhlii*). *Am J Primatol.* 69, 877-889.

Gainotti, G. (1972). Emotional behavior and hemispheric side of lesion. *Cortex* 8, 41-55.

Gainotti, G. (2012). Unconscious processing of emotions and the right hemisphere. *Neuropsychologia* 50, 205-218.

Galicich, J. H., Halberg, F. & French, L. A. (1963). Circadian adrenal cycle in C mice kept without food and water for a day and a half. *Nature* 197, 811-813.

Galvão-Coelho, N. L., Silva, H. P. A., Leão, A. C. & Souza, M. B. (2008). Common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a potential animal model for studying psychological disorders associated with high and low responsiveness of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Nat Rev Neurosci.* 19, 187-201.

Gazzaniga, M. S., Ivry, R. B. & Mangun, G. R. (2006). *Neurociência cognitiva: a biologia da mente.* 2ª edição. Porto Alegre: Artmed.

Gerber, P., Schnell, C.R., & Anzenberger, G. (2002). Behavioral and cardiophysiological responses of common marmosets (*Callithrix jacchus*) to social and environmental changes. *Primates* 43, 201-216.

Gerendai, I. & Halász, B. (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol.* 18, 354-381.

Gil-da-Costa, R. & Hauser, M. D. (2006). Vervet monkeys and humans show brain asymmetries for processing conspecific vocalizations, but with opposite patterns of laterality. *Proc Royal Soc B.* 273, 2313-2318.

Gilbert, M.H., & Baker, K.C. (2011). Social buffering in adult male rhesus macaques (*Macaca mulatta*): effects of stressful events in single vs. pair housing. *J Med Primatol.* 40, 71-78.

Glavin, G.B., Paré, W.P., Sandbak, R., Bakke, H.K., & Murison, R. (1994). Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev.* 18, 223-249.

Glick S. D., Roos, D. A., & Hough L.B. (1982). Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brian Res.* 234, 53-62.

Gray, B. & Wood, D. J. (1991). Toward a Ccmprehensive theory of collaboration. *J Appl Behav.* 27, 139-162.

Gray H. (2000). *Anatomy of human body.* Philadelphia: Bartleby Com.

Gur, R.C., Skolnick, B.E., & Gur, R.E. (1994). Effects of emotional discrimination tasks on cerebral blood flow: regional activation and its relation to performance. *Brain Cognit.* 25, 271-286.

Habib, K.E., Gold, P.W., & Chrousos, G.P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30, 695-728.

Hagemann, D., Waldstein, S. R. & Thayer, J. F. (2003). Central autonomic nervous system integration in emotion. *Brain Cogn.* 52(1), 79-87.

Hanbury, D. B., Edens, K. D., Legg, C. E., Fontenot, M. B., & Watson, S. L. (2011). Food reinforcement effects on tympanic membrane temperature in response to restraint stress in Garnett's bushbaby (*Otolemur garnettii*). *J Med Primatol.* 40, 354-356.

Hanbury, D. B., Edens, K. D., Fontenot, M. B., Greer, T. F., McCoy, J. G., & Watson, S. L. (2013). Handedness and lateralised tympanic membrane temperature in relation to approach-avoidance behaviour in Garnett's bushbaby (*Otolemur garnettii*). *Laterality* 18, 120-133.

Hauser, M. D. (1993). Right hemisphere dominance for the production of facial expression in monkeys. *Science* 261, 475-477.

Hauser, M. D. & Andersson, K. (1994). Left hemisphere dominance for processing vocalizations in adult, but not infant, rhesus monkeys: field experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3946-3948.

Hauser, M. D. & Akre, K. (2001). Asymmetries in the timing of facial and vocal expressions by rhesus monkeys: implications for hemispheric specialization. *Anim Behav.* 61, 391-400.

Hayward, J. N. & Baker, M. A. (1968). A comparative study of the role of the cerebral arterial blood in the regulation of brain temperature in five mammals. *Brain Res.* 16, 417-440.

Heffner, H.E., & Heffner, R.S. (1984). Temporal lobe lesions and perception of species-specific vocalizations by macaques. *Science* 226, 75-76.

Helmreich, D. L., Mattern, L. G., & Cameron, J. L. (1993). Lack of a role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fasting-induced suppression of luteinizing

hormone secretion in adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 132, 2427-2437.

Helton, W. S., Matthews, G. & Warm, J. S. (2009). Impulsive responding and the sustained attention to response task. *Acta Psychologica* 130, 204-213.

Hennessy, M.B. (1997). Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to brief social separation. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 11-29.

Hervé, P.Y., Zago, L., Petit, L., Mazoyer, B., & Tzourio-Mazoyer, N. (2013). Revisiting human hemispheric specialization with neuroimaging. *Trends Cogn. Sci.* 17, 69-80.

Hetherington, C.M. (1978). Circadian oscillations of body temperature in the marmoset, *Callithrix jacchus*. *Lab. Anim.* 12, 107-108.

Heusch, A. I., Suresh, V. & McCarthy, P. W. (2006). The effect of factors such as handedness, sex and age on body temperature measured by an infra-red 'tympanic' thermometer. *J Med Eng Technol.* 30, 235-241.

Hoffmann, K., Coolen, A., Schlumbohm, C., Meerlo, P., & Fuchs E. (2012). Remote long-term registrations of sleep-wake rhythms, core body temperature and activity in marmoset monkeys. *Behav Brain Res.* 235, 113-123.

Honess, P. E. & Marin, C. M. (2006). Enrichment and aggression in primates. *Neurosci. Biobehav Rev.* 30, 413-436.

Hook-Costigan, M. A. & Rogers, L. J. (1995). Hand, mouth and eye preferences in the common marmoset. *Folia Primatol.* 64, 180-191.

Hook-Costigan, M. A. & Rogers, L. J. (1998). Lateralized use of the mouth in production of vocalizations by marmosets. *Neuropsychologia*, 36, 1265-1273.

Hopkins, W. D. & Bennett, A. J. (1994). Handedness and approach avoidance behavior in chimpanzees (*Pan*). *J Exp Psychol Anim B.* 20, 413-418.

Hopkins, W. D. & Fowler, L. A. (1998). Lateralized changes in tympanic membrane temperature in relation to different cognitive tasks in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Behav Neurosci*, 112(1), 83-88.

Huang, C. C., Chou, D., Yeh, C. M., & Hsu, K. S. (2016). Acute food deprivation enhances fear extinction but inhibits long-term depression in the lateral amygdala via ghrelin signaling. *Neuropharmacology* 101, 36-45.

Ifune, C. K., Vermeire, B. A. & Hamilton, C. D. (1984). Hemispheric differences in split-brain monkeys viewing and responding to videotape recordings. *Behav Neurol Biol.* 41, 231-235.

Izquierdo, A. & Murray, E. A. (2004). Combined unilateral lesions of the amygdala and orbital prefrontal cortex impair affective processing in rhesus monkeys. *J Neurophysiol.* 91, 2023-39.

Jansari, A., Adolphs, R. & Tranel, D. (2000). Hemispheric perception of emotional valence from facial expressions. *Neuropsychology* 15, 516-524.

- Johannesson, T. & Ladewig, J. (2000). The effect of irregular feeding times on the behaviour and growth of dairy calves. *Appl Anim Behav Sci.* 69, 103-111.
- Johansson, A., Fredriksson, R., Winnergren, S., Hulting, A. L., Schiöth, H. B., & Lindblom, J. (2008). The relative impact of chronic food restriction and acute food deprivation on plasma hormone levels and hypothalamic neuropeptide expression. *Peptides* 29, 1588-1595.
- Kalin, N. H., Larson, C. & Shelton, S. E. (1998). Asymmetrical frontal brain activity, cortisol, and behavior associated with fearful temperament in rhesus monkeys. *Behav. Neurosci.* 112, 286-292.
- Kalin, N. H., Davidson, R. J. & Jackson, D. C. (2000). Emotion, plasticity, context, and regulation: perspectives from affective neuroscience. *Psychol Bull.* 126, 890-909.
- Kaplan, D., Pines, M.K., & Rogers, L.J. (2012). Stress and stress reduction in common marmosets. *Appl Anim Behav Sci.* 137, 175-182.
- Kaplan, G., Rogers, L.J., 2006. Head-cocking as a form of exploration in the common marmoset and its development. *Dev Psychobiol.* 48, 551-560.
- Killgore, W. D. S. & Yurgelun-Todd, D. A. (2007). The right-hemisphere and valence hypotheses: could they both be right (and sometimes left)? *Soc Cogn Affect.* 2, 240-250.
- Kim, J. & Gorman, J. (2005). The psychobiology of anxiety. *Basic Clin Neurosci.* 4, 335-47.
- Kounios, J. & Beeman, M. (2000). The cognitive Neuroscience of insight. *Ann Rev Psychol.* 65, 71-93.
- Kummer, H. (1971). *Primate societies: group techniques of ecological adaptation.* Chicago: Aldine Pub.
- Lado-Abeal, J., Hickox, J. R., Cheung, T. L., Veldhuis, J. D., Hardy, D. M., and Norman, R. L. (2000). Neuroendocrine consequences of fasting in adult male macaques: effects of recombinant rhesus macaque leptin infusion. *Neuroendocrinology* 71, 196-208.
- Lahoz, M.M., Nagle, C.A., Porta, M., Farinati, Z., & Manzur, T.D. (2007). Cortisol response and ovarian hormones in juvenile and cycling female *Cebus* monkeys: effect of stress and dexamethasone. *Am J Primatol.* 69, 551-561.
- Le May, M. (1976). *Origins and evolution of language and speech.* S.R. Hamad, H.D. Stekiis, J. Lancaster (eds.), New York, Academy of Sciences, 349, New York.
- LeDoux, J. E. (1996). *The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life.* Simon & Schuster.
- Levine, S., Goldman, L. & Coover, G. (1972). Expectancy and the pituitary-adrenal system. *Ciba Found Symp.* 8, 281-91.
- Levy, E.D. (2010) Cell signaling: signaling through cooperation. *Science,* 328, 983-984.
- Levy, J., & Trevarthen, C. (1976). Metacognition of hemispheric function in human split-brain patients. *J Exp Psychol Hum Percept Perform.* 2, 299-312.

- Lima, D., Spíndola, D.B., Dias, L.O., Tomaz, C., & Barros, M. (2008). Effects of acute systemic cocaine administration on the cortisol, ACTH and prolactin levels of black tufted-ear marmosets. *Psychoneuroendocrinology* 33, 321-327.
- Long, C.T., Pacharinsak, C., Jampachaisri, K., McKeon, G.P., Howard, A.M., Albertelli, M.A., & Felt, S.A. (2011). Comparison of rectal and tympanic core body temperature measurement in adult Guyanese squirrel monkeys (*Saimiri sciureus sciureus*). *J Med Primatol.* 40, 135-141.
- Losin, E.A.R., Russell, J.L., Freeman, H., Meguerditchian, A., & Hopkins, W.D. (2008). Left hemisphere specialization for oro-facial movements of learned vocal signals by captive chimpanzees. *PLoS One* 3, e2529.
- Machado, A. B. (2006). *Neuroanatomia funcional*. São Paulo: Atheneu.
- MacNeilage, P. F., Rogers, L. J. & Vallortigara, G. (2009). Origins of the left and right brain. *Sci Am.* 301, 60-67.
- Manning, L. & Thomas-Anterion, C. (2011). Marc Dax and the discovery of the lateralisation of language in the left cerebral hemisphere. *Rev Neurol.* 167, 868-872.
- Mariak, Z., Lewko, J., Luczaj, J., Polocki, B. & White, M. D. (1994). The relationship between directly measured human cerebral and tympanic membrane temperatures during changes in brain temperatures. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 69, 545-549.
- Martínez-Mota, R., Righini, N. & Palme, R. (2016). Fluctuations in daily energy intake do not cause physiological stress in a Neotropical primate living in a seasonal forest. *Oecologia.* 182, 973-984.
- McCue, M. D. (2010). Starvation physiology: reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp Biochem Physiol.* 156, 1-18.
- Medhamurthy, R., Priyanka, G., Vinuthan, M. K. & Manjunatha, A. M. (2007). Short-term fasting leads to inhibition of responsiveness to LH-stimulated testosterone secretion in the adult male bonnet monkey. *Am J Primatol.* 69, 791-801.
- Meiners, M. L., & Dabbs, J. M. (1977). Ear temperature and brain blood flow: laterality effects. *Psychon Bull Rev.* 10, 194-196.
- Miller, G. E., Chen, E. & Zhou, E. S. (2007). If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol. Bull.* 133, 25-45.
- Mistlberger, R. E. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiol. Behav.* 104, 535-545.
- Morrow-Tesch, J. L.; Mcglone, J. J. & Norman, R. L. (1993). Consequences of restraint stress on natural killer activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 18, 383-395.
- Murison, R., & Overmier, J.B. (1993). Some psychosomatic causal factors of restraint-in-water stress ulcers. *Physiol. Behav.* 53, 577-581.
- Natale, M., Gur, R. E. & Gur, R. C. (1983). Hemispheric asymmetries in processing emotional expressions. *Neuropsychologia.* 21, 555-565.

- Nesse, R. M. (1999). What Darwinian medicine offers psychiatry. In: V. W. Thevathan, E. O. Smith, & J. J. McKenna, J. J. (eds.). *Evolutionary medicine*. New York: Oxford University Press.
- Niedermeyer, E. & Lopes da Silva, F.H. (2004). *Electroencephalography: basic principles, clinical applications, and related fields*. Lippincott New York: Williams & Wilkins.
- Norcross, J. L., Newman, J. D. & Cofrancesco, L. M. (1999). Context and sex differences exist in the acoustic structure of phee calls by newly-paired common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Primatol.* 49, 165-181.
- Normando, S., Mantovani, R., Marinelli, L. & Gabai, G. (2013). Effects of a delay in feed delivery on behaviour, milk yield and hematological parameters of dairy cows. *Ital J Anim Sci.* 12, e24.
- Nowak, R. M. & Paradiso J. L. (1983). *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Nowland, M. H., Hugunin, K. M. S. & Rogers, K. L. (2011). Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. *Comp. Med.* 61, 138-144.
- Nunes, D.M., Gonçalves Jr., I., Emile, N., & Barros, M. (2010). Bimodal temporal organization of specific vigilance behaviors in captive black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*). *Behav Proc.* 84, 629-631.
- Ocklenburg, S. & Güntürkün, O. (2012). Hemispheric asymmetries: the comparative view. *Front Psychol.* 3, 5.
- Paramastri, Y., Royo, F., Eberova, J., Carlsson, H. E., Sajuthi, D., Fernstrom, A. E., Pamungkas, J. & Hau, J. (2007). Urinary and fecal immunoglobulin A, cortisol and 11-17 dioxoandrostanes, and serum cortisol in metabolic cage housed female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol.* 36, 355-364.
- Parr, L. A. & Hopkins, W. D. (2000). Brain temperature asymmetries and emotional perception in chimpanzees, *Pan troglodytes*. *Physiol Behav.* 71, 363-371.
- Pereira, L. C. & Barros, M. (2016). Relationship between body temperature, weight and hematological parameters of black tufted-ear marmosets (*Callithrix penicillata*). *J Med Primatol.* 45, 118-125.
- Pereira, L. C., Duarte, R. B., Maior, R. S., & Barros, M. (2018). Natural predator and a human stimulus differently affect the behavior, cortisol and cerebral hemisphere activity of marmoset monkeys. *Physiol Behav.* 195, 112-117.
- Petersen, M. R., Beecher, M. D., Zoloth, S. R., Moody, D. B., & Stebbins, W. C. (1978). Neural lateralization of species-specific vocalizations by Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Science* 202, 324-327.
- Petracca, M. M., & Caine, N. G. (2013). Alarm calls of marmosets (*Callithrix geoffroyi*) to snakes and perched raptors. *Int J Primatol.* 34, 337-348.
- Propper, R. E., Brunyé, T. T. (2013). Lateralized difference in tympanic membrane temperature: emotion and hemispheric activity. *Front Psychol.* 4, 104.

- Prut, L. & Belzung, C. (2013). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463(1), 3-33.
- Pryce, C. R., Palme, R. & Feldon, J. (2002). Development of pituitary-adrenal endocrine function in the marmoset monkey: infant hypercortisolism is the norm. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 691–9.
- Raichle, M. E., MacLeod, A. M., Snyder, A. Z., Powers, W. J., & Gusnard, D. A. (2001). A default mode of brain function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 676-682.
- Rapchan, E. S. (2010). Sobre o comportamento de chimpanzés: o que antropólogos e primatólogos podem ensinar sobre o assunto? *Horiz Antropol.* 16, 227-66.
- Rennie, A. E. & Buchanan-Smith, H. M. (2006). Refinement of the use of non-human primates in scientific research: part II: housing, husbandry and acquisition. *Anim Welf.* 15, 215-238.
- Reuter-Lorenz, P. & Davidson, R.J. (1981). Differential contributions of the cerebral hemispheres to the perception of happy and sad faces. *Neuropsychologia* 19, 609-613.
- Robilotta, C. C. (2006) A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. *Pan Am J.* 20, 134-142.
- Rodas-Martínez, A. Z., Canales, D., Brousset, D. M., Swanson, W. F., & Romano, M. C. (2013). Assessment of adrenocortical and gonadal hormones in male spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) following capture, restraint and anesthesia. *Zoo Biol.* 32, 641-647.
- Rodgers, R. J., Cao, B., Dalvi, A. & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 30, 289-304.
- Rogers, L. J. (2009). Hand paw preferences in relation to the lateralised brain. *Philos T Roy Soc B.* 364, 943-954.
- Rogers, L. J. (2014). Asymmetry of brain and behavior in animals: its development, function and human relevance. *Genesis.* 52, 555-571.
- Rowlett, J. K., Platt, D. M., Lelas, S., Atack, J. R. & Dawson, G. R. (2005). Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 915-920.
- Rukstalis, M. & French, J. A. (2005). Vocal buffering of the stress response: exposure to conspecific vocalizations moderates urinary cortisol excretion in isolated marmosets. *Horm. Behav.* 47, 1-7.
- Ruys, J. D., Mendoza, S. P., Capitanio, J. P., and Mason, W. A. (2004). Behavioral and physiological adaptation to repeated chair restraint in rhesus macaques. *Physiol. Behav.* 82, 205-213.
- Rylands, A. B. & Faria, D. S. (1993). Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*, pp. 262-272. In: A. B. Rylands (ed.), *Marmosets and Tamarins. Systematics, Behaviour and Ecology.* Oxford University Press, Oxford.

- Sackeim, H. A., Greenberg, M. S., Weiman, A. L., Gur, R. C., Hungerbuhler, J. P. & Geschwind, N. (1982). Hemispheric asymmetry in the expression of positive and negative emotions: neurologic evidence. *Arch Neurol.* 39, 210-218.
- Sadock, B. J. & Sadock, V. A. (2007). *Compêndio de psiquiatria: ciência do comportamento e psiquiatria clínica*, 9 edição. Porto Alegre: Artmed.
- Saltzman, W., Schultz-Darken, N. J., Scheffler, G., Wagner, F. & Abbott, D. (1994). Social and reproductive influences on plasma cortisol in female marmoset monkeys. *Physiol Behav.* 56, 801-810.
- Saltzman, W. & Abbott, D. H. (2011). Hormonal and behavioral responses to stress in lactating and non-lactating female common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Physiol. Behav.* 104, 446-453.
- Schiffer, F., Anderson, C. M. & Teicher, M. H. (1999). Electroencephalogram, bilateral ear temperature and affect changes induced by lateral visual field stimulation. *Compr Psychiatry.* 40, 221-225.
- Schultz-Darken, N. J., Abbott, D. H., Barnett, D. K., Colman, R. J. & Yamamoto, M. E. (2003). Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. *Comp Med.* 53, 339-350.
- Schultz-Darken, N. J., Pape, R. M., Tannenbaum, P. L., Saltzman, W. & Abbott, D. H. (1994). Novel restraint system for neuroendocrine studies of socially living common marmoset monkeys. *Lab Anim.* 38(4), 393-405.
- Schuman, M. U., Suhr, D. F., Gosseln, H. H., Brauer, A., Jantzen, J. P. & Samii, M. (1999). Local brain surface temperature compared to temperatures measured at standard extracranial monitoring sites during posterior fossa surgery. *J Neurosurg Anesthesiol.* 12, 90-95.
- Smith, T. E. & French, J. A. (1998). Psychosocial stress and urinary cortisol excretion in marmoset monkeys (*Callithrix kuhlii*). *Physiol Behav.* 62, 225-232.
- Stevenson, M. F. & Rylands, A. B. (1988). The marmosets, genus *Callithrix*. In: R.A. Mittermeier; A.B. Rylands; A.F. Coimbra-Filho & G.A.B. Fonseca (Eds). *Ecology and behavior of neotropical primates*. Washington, World Wildlife Fund. p.131-211.
- Souza Silva, M. A., Topic, B., Lamounier-Zepter, V., Huston, J. P., Tomaz, C. & Barros, M. (2007). Evidence for hemispheric specialization in the marmoset (*Callithrix penicillata*) based on lateralization of behavioral/neurochemical correlations. *Brain Res Bull.* 74, 416-428.
- Sukstanskii, A. L. & Yablonskiy, D. A. (2006) Theoretical model of temperature regulation in the brain during changes in functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12144-12149.
- Sullivan, R. M., Moriceau, S., Roth, T. L. & Okotoghaide, T., (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *Int J Develop Neurosci.* 22, 415-422.
- Stephan, F. K. (2002). The "other" circadian system: food as a zeitgeber. *J Biol Rhythms.* 17, 284-292.

- Swift, A. B. (1991). Tympanic thermometry: an index of hemispheric activity. *Percept. Mot Skills* 73, 275-293.
- Taylor, J. H., Mustoe, A. C., & French, J. A. (2014). Behavioral responses to social separation stressor change across development and are dynamically related to HPA activity in marmosets. *Am J Primatol.* 76, 239-248.
- Toga, A. W. & Thompson, P. (2003). Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci.* 4, 37-48.
- Tomaz, C., Dicknson-Anson, H., McGaugh, J. L., Souza-Silva, M. A., Viana, M. B. & Graeff, F. G. (1993). Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. *Behavi Brain Res.* 58, 99-105.
- Tomaz, C., Verburg, M. S., Boere, V., Pianta, T. F. & Belo, M. (2003). Evidence of hemispheric specialization in marmosets (*Callithrix penicillata*) using tympanic membrane thermometry. *Braz J Med Biol Res.* 36, 913-918.
- Treisman, A. M. (1960). Contextual cues in selective listening. *Q J Exp Psychol.* 12, 242-248.
- Treisman, A. (1964a). Monitoring and storage of irrelevant messages in selective attention. *J Verbal Learning Verbal Behav.* 3, 449-459.
- Treisman, A. (1964b). Selective attention in man. *Br Med Bull.* 20, 12-16.
- Treit, D. (1985). Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 9, 203-222.
- Vallortigara, G. & Rogers, L. J. (2005). Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behav Brain Sci.* 28, 575-633.
- Van de Kar, L., Piechowski, R. A., Rittenhouse, P. A., & Gray, T. S. (1991). Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* 54, 89-95.
- Vanitallie, T. (2002). Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism*, 51, 40-45.
- Vilela, S. L. & Farias, D. S. (2002). Dieta do *Callithrix penicillata* (Primates, Callithrichidae) em áreas de cerrado no Distrito Federal, Brasil. *Neotropical Primates.* 10 (1), 17-20.
- Vogels, R., Saunders, R. C. & Orban, G. A. (1994). Hemispheric lateralization in rhesus monkeys can be task-dependent. *Neuropsychologia.* 32, 425-438.
- Waite, C. & Buchanan-Smith, M. (2001). What time is feeding? How delays and anticipation of feeding schedules affect stump-tailed macaque behavior. *Appl Anim Behav Sci.* 75, 75-85.
- Wallez, C. & Vauclair, J. (2011). Right hemisphere dominance for emotion processing in baboons. *Brain Cog.* 75, 164-169.
- Weiten, W. (2008). *Introdução à psicologia: temas e variações*, 7 edição. São Paulo: Cengage.

Westergaard, G. C., Suomi, S. J. & Higley, J. D. (2002). Handedness is associated with immune functioning and behavioural reactivity in rhesus macaques. *Laterality* 7, 359-369.

Wilson, T. D., Reinhard, D. A., Westgate, E. C., Gilbert, D. T., Ellerbeck, N. & Hahn, C. (2014). Just think: the challenges of the disengaged mind. *Science*. 345, 75-77.

Wittling, W., & Roschmann, R. (1993). Emotion-related hemisphere asymmetry: subjective emotional responses to laterally presented films. *Cortex* 29, 431-438.

Yablonskiy, D. A., Ackerman, J. J. H. & Raichle, M. E. (2000). Coupling between changes in human brain temperature and oxidative metabolism during prolonged visual stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7603-7608.

Yayou, K., Nakamura, M. & Ito, S. (2009). Effects of AVP V1a and CRH receptor antagonist on psychological stress responses to frustrating condition in sheep. *J Vet Med Sci*. 71, 431-439.

Zardooz, H., Rostamkhani, F., Zaringhalam, J. & Shahrivar, F. F. (2010). Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO<sub>2</sub> in male rats. *Physiol Res*. 59, 973-978.

Zupan, M., Stuhec, I. & Jordan, D. (2019). The effect of an irregular feeding schedule on equine behavior. *J Appl Anim Welf Sci*. 23, 156-163.

# ANEXO 1



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 9 de março de 2017.

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DA MEMBRANA TIMPÂNICA DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS (CALLITHRIX PENICILLATA) EM TESTES COMPORTAMENTAIS DE MEMÓRIA E ANSIEDADE", Protocolo n.º 6/2017, sob responsabilidade da Professora Marília Barros foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: Callithrix penicillata (24). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/03/2017 a 1º/03/2021.



*Paula Diniz Galera*

Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.