



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LAÍS RESQUE RUSSO PEDROSA

**Modelo de hemiparkinsonismo por 6-hidroxidopamina em
primatas *Sapajus apella*: características comportamentais e
histológicas**

Belém – PA

2024

LAÍS RESQUE RUSSO PEDROSA

Modelo de hemiparkinsonismo por 6-hidroxidopamina em primatas *Sapajus apella*: características comportamentais e histológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular - Área de Concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes

Co-Orientador (a): Prof. Dra. Lane Viana Krejčová

Belém – PA

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

P372m Pedrosa, Laís Resque Russo Pedrosa.
Modelo de hemiparkinsonismo por 6-hidroxidopamina em primatas *Sapajus apella* : características comportamentais e histológicas / Laís Resque Russo Pedrosa Pedrosa. — 2024.
74 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes Gomes
Coorientador(a): Prof. Dr. Lane Viana Krejčová
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia celular, Belém, 2024.

1. Hemiparkinsonismo. 2. Modelo experimental. 3.
6-hidroxidopamina. 4. Primatas não humanos. I. Título.

CDD 612.8

LAÍS RESQUE RUSSO PEDROSA

Modelo de hemiparkinsonismo por 6-hidroxidopamina em primatas *Sapajus apella*: características comportamentais e histológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular - Área de Concentração: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes

Co-Orientador (a): Prof. Dra. Lane Viana Krejčová

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes (Orientador)
Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas

Prof. Dra. Lane Viana Krejčová (Co-orientadora)
Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências das Artes

Prof. Dr. Givago da Silva Souza (1º Membro)
Universidade Federal do Pará – Núcleo de Medicina Tropical

Prof. Dr. José Augusto Pereira Carneiro Muniz (2º Membro)
Instituto Evandro Chagas – Centro Nacional de Primatas

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha (Membro suplente)
Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas

Dedico esta monografia,
Às mulheres eternas da minha vida, minha mãe, minha avós e minha madrinha,
por seus afãs que me fizeram ser quem eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Lia Resque, e vó, Sandra Pinheiro, por sempre estarem ao meu lado durante essa difícil caminhada. Eu devo minha vida e minhas conquistas a vocês, serei eternamente grata por tudo;

Ao meu padrasto, Osvaldo Kato, por todo auxílio e incentivo para seguir a área de pesquisa e docência;

À minha falecida vó, Siméa Pedrosa, e madrinha, Érika Pedrosa, por serem meu exemplo profissional e por todo amor materno;

Ao meu pai, Antônio Laércio, por todo auxílio;

Ao meu amigo de trabalho, Leon Leal, pelo companheirinho e aprendizagem intensos durante esses anos difíceis;

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Lane Viana Krejcová, que nunca mediu esforços para que esse trabalho acontecesse. Agradeço imensamente pela oportunidade e compartilhamento de lições de vida;

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Bruno Duarte Gomes, por aceitar esse desafio junto conosco e por toda orientação que me foi dada;

Ao Prof^o Dr^o José Augusto Pereira Carneiro Muniz, pelos ensinamentos de cuidado e manuseio com os primatas e pela sua exímia colaboração necessária para o êxito desse trabalho;

Às minhas colegas de trabalho, Juliana Duarte, Savana, Isluane e Sabrina pela companheirismo e partilha durante tempos difíceis;

Aos meus amigos de graduação, pós-graduação e de vida, Milena Letícia Martins, Caroline Lima, Victor Gabriel, Isadora Monteiro, Emanuelle Resque e David Tavares. Começamos juntos e seguimos juntos;

Ao Centro Nacional de Primatas e ao Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Oswaldo Cruz pela estrutura e oportunidade para realização deste trabalho;

E a todos que, de certa forma, passaram pelo meu caminho até aqui.

RESUMO

O tratamento para Doença de Parkinson (DP), com inúmeros efeitos colaterais e efetividade decrescente com o curso temporal, tem sido o mesmo há mais de 50 anos e ainda diversos aspectos da fisiopatologia da doença permanecem incompreendidos. O desenvolvimento de novas terapias e elucidação sobre mecanismos relacionados à doença estão entre os maiores desafios atuais de pesquisa em neurociências. Nesse contexto, modelos experimentais primatas não humanos (PNH) são de grande relevância pela elevada proximidade filogenética, taxa de encefalização e complexo repertório motor e comportamental, que conferem elevado poder de previsibilidade clínica. O modelo de parkinsonismo por inoculação de 6-hidroxidopamina mimetiza características relevantes da DP e pode representar, em primatas, um importante refinamento experimental. O presente estudo buscou desenvolver um modelo de indução de hemiparkinsonismo em primatas *Sapajus apella*, com caracterização de aspectos comportamentais e histológicos. Para isso, macacos *Sapajus apella* machos adultos foram submetidos a testes motores para observação do desempenho motor antes e após a inoculação unilateral de 6-OHDA nas vias nigroestriatais em concentrações de 4 (N=1), 10 (N=1) e 40 (N=1) mg/μl no hemisfério dominante. Como controle cirúrgico (N=1), um animal foi submetido a cirurgia contendo somente o solvente. As coordenadas estereotáxicas para os 12 sítios de inoculação de 6-OHDA foram calculadas com base em imagens individuais por Ressonância Magnética (RM). Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) foi realizada em secções coronais do mesencéfalo a 50 μm. Como análise estatística, ANOVA de duas vias para verificar possíveis diferenças nos parâmetros comportamentais e contagem neuronal entre os grupos, considerando os hemisférios dominante (portanto afetado) e não dominante de um mesmo animal. Houveram alterações significativas dos padrões motores de dominância e preferência manual após a intervenção cirúrgica. A indução por 6-OHDA nas vias nigroestriatais parece ser um bom método de indução de parkinsonismo com indução de sintomas detectáveis em primatas *Sapajus apella*, assim como sinais de histológicos de morte neuronal dopaminérgica.

Palavras-chaves: Hemiparkinsonismo; modelo experimental; 6-hidroxidopamina; PNH.

ABSTRACT

Despite considerable side effects and decreasing effectiveness over time, the treatment for Parkinson's disease (PD) has remained largely unchanged for over 50 years. However, several aspects of the disease's pathophysiology remain poorly understood. The development of new therapies and the elucidation of mechanisms related to the disease are among the biggest current challenges in neuroscience research. In this context, non-human primate (NHP) experimental models are particularly relevant due to their high phylogenetic proximity, encephalization rate, and complex motor and behavioral repertoire, confer high predictive power for clinical outcomes. The 6-hydroxydopamine inoculation model of parkinsonism mimics relevant features of PD and may represent an important experimental refinement in primates. The present study aimed to develop a model of hemiparkinsonism induction in *Sapajus apella* primates, characterizing the behavioral and histological aspects. For this purpose, adult male *Sapajus apella* monkeys were subjected to motor tests to observe motor performance before and after unilateral injection of 6-OHDA in the nigrostriatal pathways at concentrations of 4 (N=1), 10 (N=1) and 40 (N=1) mg/ μ l in the dominant hemisphere. As a surgical control (N=1), one animal underwent surgery containing only solvent. Stereotaxic coordinates for the 12 6-OHDA inoculation sites were calculated based on individual Magnetic Resonance Imaging (MRI) images. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) was performed on 50 μ m coronal sections of the midbrain. As a statistical analysis, two-way ANOVA was used to verify possible differences in behavioral parameters and neuronal exclusion between groups, considering the dominant (therefore affected) and non-dominant hemispheres. There were significant changes in motor patterns of dominance and manual preference after surgical intervention. 6-OHDA induction in the nigrostriatal pathways appears to be a good method of inducing parkinsonism with the induction of detectable symptoms in primates.

Keywords: Hemiparkinsonism; experimental model; 6-hydroxydopamine; NHP.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 ASPECTOS GERAIS | 16 |
| 1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE DP | 17 |
| 1.2.1 MPTP (4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina)..... | 18 |
| 1.2.2 6-HIDROXIDOPAMINA | 19 |
| 1.3 SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA CIRCUITARIA DOS NÚCLEOS DA BASE 21 | |
| 1.4 MODELO USANDO PRIMATAS NÃO HUMANOS..... | 23 |
| 1.4.1 MODELOS DE INDUÇÃO COM 6-OHDA EM PNHs | 24 |
| 1.4.2 MODELO DE HEMIPARKINSONISMO | 25 |
| 1.4.3 ASPECTOS ÉTICOS | 25 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 27 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 ANIMAIS | 28 |
| 4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 28 |
| 4.2.1 HABITUAÇÃO AO EXPERIMENTADOR..... | 29 |
| 4.2.2 TESTES COMPORTAMENTAIS | 30 |
| 4.2.2.1 TESTE <i>Staircase</i> | 30 |
| 4.2.2.2 TESTE DO TUBO..... | 31 |
| 4.3 PLANEJAMENTO CIRÚRGICO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA | 31 |
| 4.4 INDUÇÃO DE HEMIPARKINSONISMO POR 6-OHDA E AVALIAÇÃO CLÍNICA | 31 |
| 4.5 PREPARO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE..... | 32 |
| 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 33 |
| 5. RESULTADOS | 34 |
| 5.1 CÁLCULO DAS COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS PARA CIRURGIA DE INDUÇÃO DE HEMIPARKINSONISMO POR 6-OHDA..... | 34 |
| 5.2 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM O COMPORTAMENTO MOTOR..... | 37 |
| 5.3 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM O ÍNDICE DE DESEMPENHO MOTOR | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM DIFERENTEMENTE A HISTOLOGIA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.. | 45 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 47 |
| 6.1. CÁLCULO DAS COORDENADAS CIRÚRGICAS INDIVIDUAIS | 47 |
| 6.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DA INFLUCÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA NAS VIAS NIGROESTRIATAIS..... | 48 |
| 6.3 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA TÊM DIFERENTES INFLUÊNCIAS NOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS | 50 |
| 7. CONCLUSÃO | 51 |
| 8. REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO I - TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS..... | 58 |
| ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO | 59 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de neurodegeneração por estresse oxidativo induzido por MPTP e 6-OHDA. O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizado em MPP⁺ pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) nas células gliais e depois no composto tóxico ativo. o MPP⁺ é então absorvido pelo transportador de dopamina, onde prejudica a respiração mitocondrial ao inibir o complexo i da cadeia de transporte de elétrons, causando estresse oxidativo e ativação de vias moleculares programadas de morte celular. a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) atravessam facilmente a membrana celular através do transportador de dopamina e também podem exercer a sua toxicidade, em parte, atacando as mitocôndrias com a subsequente produção de ero e quinonas, causando a degeneração dos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais. MPTP, 4-propiloxi-4-fenil-n-metilpiperidina; MPP⁺ 1-metil-4-fenilpiridínio; MAO-B, monoamina oxidase b; VMAT, transporte vesicular de monoaminas; DA, dopamina; ATP, adenosina trifosfato ; ERO, espécie reativa de oxigênio. criado por biorender.com.20

Figura 2. Mecanismo clássico da circuitaria dos núcleos da base de controle motor. D1: receptor dopaminérgico excitatório; D2: receptor dopaminérgico inibitório; GPe: globo pálido externo; SNc: substância negra pars compacta; GPi: globo pálido interno; STN: núcleo subtalâmico; VA: núcleo ventro-anterior; VL: núcleo ventral-lateral. Adaptado de (Lanciego et al., 2012). 22

Figura 3. Após duas semanas de habituação e treinamento e duas semanas de testes motores para referência basal do desempenho motor que consistem nos testes staircase, tabuleiro de brinkman e tubo. os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de indução de HP utilizando a 6-OHDA com concentrações de 4, 8, 10 e 40 mg/ml conforme o grupo 6-ohda operado (N= 3), o grupo SHAM (N=1) foi submetido somente a microinjeção contenco veículo (ácido ascórbico), grupo SHAM não foi submetido a cirurgia. O modelo de indução de dp foi induzido por injeções unilaterais de 6-OHDA na snpc e cd no hemisfério dominante de cada sujeito. Por fim, os animais serão eutanasiados e perfundidos para posterior análise histológica. HP, hemiparkinsonismo, 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; DP, doença de parkinson; SNpc, substância negra parte compacta; CD, núcleo caudado; TH, tirosina hidroxilase. 39

Figura 4. Desempenho motora por meio do teste do *Staircase* apreendidas durante 120 sessões do teste do staircase. SHAM, grupo controle cirúrgico; grupo com intervenção cirúrgica em diferentes concentrações de 4, 10 e 40 mg/ml de 6-OHDA. (A) Latência da primeira recompensa LD, em segundos (s). (B) Latência da primeira recompensa LND, em segundos (s). (C) Tempo de recuperação de todas as recompensas LD, em segundos (s). (D) Tempo de recuperação de todas as recompensas LND, em segundos (s). (E) Uso de mão trocada do LD, em número. (F) Uso de mão trocada do LND, em número. (G) Perda de recompensa LD, em número. (H) Perda de recompensa do LND, em número. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Teste de Wilcoxon). *Comparado ao grupo sham ($p < 0.01$) 38

Figura 5. Desempenho motora durante 25 sessões do teste do tubo. (A) Número de pegadas do LD. (B) Número de pegadas do LND. (C) Tempo total de pegadas do LD, em segundos (s). (D) Tempo total de pegadas do LND, em segundos (s). (E) Pegadas com indicador, em números. (F) Pegadas com outros, em números. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Teste de Wilcoxon). * Comparação intragrupo antes e depois, $p < 0.01$ 40

Figura 6. Índice de desempenho motor considerando comportamentais antes e depois da intervenção cirúrgica nos diferentes grupos no teste *Staircase*. (A) Latência da primeira recompensa do LD, tempo em segundos (s). (B) Latência da primeira recompensa do LND, tempo em segundos (s). (C) Tempo total de recuperação de todas as recompensas do LD, tempo sem segundos (s). (D) Tempo total de recuperação de todas as recompensas do LND, tempo sem segundos (s). (E) Uso de mão trocada do LD. (F) Uso de mão trocada do LND. (G) Perda de recompensa do LD. (H) Perda de recompensa do LND. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Anova two-way, pós teste de Tukey). * Comparado ao controle, $p < 0.01$; ** comparado ao controle, $p < 0.05$. Azul, grupo SHAM; verde, grupo 4 mg/ml; vermelho, grupo 10 mg/ml, roxo, grupo 40 mg/ml..... 42

Figura 7. Índice de desempenho motor antes e depois da intervenção cirúrgica nos diferentes grupos no teste do tubo. (A) número de pegadas do LD. (B) número de pegadas do LND. (C) Tempo total utilizando o LD. (D) Tempo total utilizando o LND. (E) Tipo de pegada indicador. (F) Tipo de pegada outro. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Anova two-way, pós teste de Tukey). *Comparado ao controle, $p < 0.01$; ** comparado ao controle, $p < 0.05$. azul, grupo SHAM; verde, grupo 4 mg/ml; vermelho, grupo 10 mg/ml, roxo, grupo 40 mg/ml. 44

Figura 8. Imagens representativas de neurônios imunorreativos a TH no SNpc. A barra de escala representa 250 μ m. grupo CTRL, não submetido a intervenção cirúrgica; grupo SHAM, submetido a intervenção cirúrgica somente com veículo; grupo 4 mg/ml, 10 mg/ml e 40 mg/ml, submetidos a intervenção cirúrgica nas respectivas concentrações de 6-OHDA.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas cirúrgicas para indução de HP, com base na lateralidade de dominância manual de cada animal. SN= Substância Negra; CD = Núcleo Caudado; AP = sentido anteroposterior; DV = sentido dorsoventral; ML = sentido médio-lateral.
.....35

Tabela 2. Margem de erro cirúrgico . SN= Substância Negra; CD = Núcleo Caudado; AP = sentido anteroposterior; DV = sentido dorsoventral; ML = sentido médio-lateral.
..... 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNH – Primata não humano

DP – Doença de Parkinson

MPTP - 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina

NB2 – Nível de biossegurança 2

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

BHE - Barreira hematoencefálica

MAO-A - Monoamina oxidase do tipo A

MAO-B - Monoamina oxidase do tipo B

VMAT - Transporte vesicular de monoaminas

ATP - Adenosina trifosfato

ERO - Espécies reativas de oxigênio

PTP - Poro de transição de permeabilidade

MCC - Múltiplos canais de condutância

DA - Dopamina

DOPA - Diidroxifenilalanina

ATV – Área tegumentar ventral

Gpi - Globo pálido interno

Gpe - Globo pálido externo

SNe - Substância negra porção compacta

STN - Núcleo subtalâmico

GABA – Ácido γ -aminobutírico

CENP - Centro Nacional de Primatas

HP - Hemiparkinsonismo

PFA – Paraformolaldeído

PB – Tampão fosfato

TH - Tirosina hidroxilase

SN – Substância negra

CD – Núcleo Caudado

AP – Anteroposterior

DV – Dorsoventral

ML - Médio-lateral.

LD – Lado dominante

LND – Lado não dominante

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva caracterizada morte de neurônios dopaminérgicos, principalmente nas vias nigroestriatais (POEWE et al., 2017). A neurodegeneração resultante da diminuição de dopamina leva a téttrade de sintomas motores: bradicinesia (lentidão de movimento), tremor em repouso, rigidez muscular e instabilidade postural. Além dos sintomas motores, a DP está associada a sintomas não motores que podem aparecer nos estágios pré-clínicos da doença que incluem distúrbio comportamental do sono REM, transtornos de humor, constipação, disfunção cognitiva, disfunção sensorial principalmente anosmia (perda do olfato) que impactam significativamente a qualidade de vida (RANA et al., 2015).

Considerada por alguns autores como uma pandemia mundial, a DP doença afeta cerca de 1% a 2% da população acima de 60 anos (TYSNES; STORSTEIN, 2017). É estimado ainda que em 2030 a incidência mundial de pessoas com DP seja duplicada (Tysnes and Storstein 2017). Altos impactos econômicos tendem a ocorrer à medida que os dados de prevalência da doença aumente no decorrer dos anos (DODEL et al., 1998). No Brasil, estima-se gasto médio de 18 mil reais por ano por paciente incluindo aquisição de medicamentos, consultas, custos com cuidador, adaptações nas residências e equipamentos que auxiliam a vida cotidiana (BOVOLENTA et al., 2017)

O processo de neurodegeneração é uma proteinopatia marcada pelo acúmulo de proteínas como alfa-sinucleína mal enoveladas dentro dos neurônios, o que leva à auto-agregação da proteína e então ela se deposita em corpos de Lewy (STEFANIS, 2012). Causado por diversos fatores, o mal enovelamento com aumento de folhas β pregueadas altera as propriedades físico-químicas dessas proteínas que tendem a ser mais resistente aos sistemas de proteólise. Seguindo um modelo de disseminação priônica, esse agregados proteicos são disseminados neurônio-a-neurônio por diversas vias secretoras e são capazes de recrutar novos monômeros malformados na nova célula infectada antes se serem transmitidos novamente (BOUSSET et al., 2013).

Em 2003, Braak e colaboradores postularam a hipótese que a progressão priônica da DP seguia no eixo caudorrostral do encéfalo, sendo observado pela formação e

acúmulo de corpos de Lewy (BRAAK et al., 2003b). O início dessa neurodegeneração se daria no bulbo mesencefálico e no núcleo motor somático dorsal do nervo vago seguindo para demais áreas até chegar no mesencéfalo, especialmente na substância negra. Em estágios mais avançados da DP, observam-se acúmulos de alfa-sinucleína no prosencéfalo e, tardiamente, neurodegeneração em regiões corticais cerebrais (BRAAK et al., 2004).

Com exceção da DP monogênica, a DP é um distúrbio multifatorial em que diversos fatores genéticos e ambientais podem influenciar para a manifestação da patologia (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016). Porém, a causa dos seus mecanismos fisiopatológicos ainda é pouco esclarecida, o que dificulta o avanço de testes de diagnóstico e novas abordagens terapêuticas.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE DP

Assim como outras doenças ainda não completamente elucidadas, a Doença de Parkinson (DP) necessita de mais estudos utilizando modelos pré-clínicos para a compreensão de sua fisiopatologia, fatores intervenientes e possíveis intervenções. Esses modelos, que reproduzem aspectos da condição neurodegenerativa da DP em humanos, permitem a elucidação do funcionamento de novas drogas candidatas para o tratamento da doença, assim como a identificação de novas abordagens terapêuticas promissoras para estudos clínicos posteriores com excelente grau de previsibilidade. Atualmente, dois modelos clássicos de DP baseados em neurotoxinas seletivas (MPTP e 6-OHDA) são amplamente utilizados para estudo de terapias sintomáticas (Hamadjida et al., 2019).

O metabólito oxidado da neurotoxina 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina (MPTP) é neurotóxico e facilmente ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE), necessitando de estruturas laboratoriais de nível de biossegurança 3 (NB3) para seu manuseio (PRZEDBORSKI et al., 2001). Diferentemente, por não ultrapassar a BHE, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é captada por receptores específicos dos neurônios dopaminérgicos e causa estresse oxidativo via liberação de radicais livres somente quando injetada localmente, sendo mais largamente utilizada pelo fácil manuseio.

1.2.1 MPTP (4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina)

O primeiro indício de que 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina (MPTP) poderia causar algum distúrbio neurológico em humanos foi reportado em um relato de caso (Davis et al., 1979), embora o MPTP não fosse formalmente identificado naquele momento. Posteriormente, estudos experimentais comprovariam que a administração de MPTP induzia síndrome parkinsoniana em modelos de primatas não humanos (PNHs) de diferentes espécies, entre elas, macaco-cheiro (*Saimiri sciureus*) (LANGSTON; LANGSTON; FORNO, 1984) sagui comum (*Callithrix jacchus*) (Jenner et al., 1984); macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e no macaco-prego (*Sapajus apella*) (Baltazar Gomez-Mencilla & Paul J. Bédard, 1993; Gaspar et al., 1993). Já em modelos murinos, a sensibilidade ao MPTP é menor que aquela observada nos primatas, e essa diferença de sensibilidade pode ser decorrente do metabolismo do MPTP no SNC (PRZEDBORSKI et al., 2001).

A distribuição de monoamina oxidase do tipo A e do tipo B (MAO-A e MAO-B) são diferentes entre roedores e PNHs. Nas vias nigroestriatais de roedores, a dopamina (DA) é essencialmente metabolizada pela MAO-A, enquanto que em primatas não humanos é metabolizada pela MAO-B, tal como ocorre em humanos. O metabólito neurotóxico responsável pelo parkinsonismo induzido é produto da oxidação de MPTP, 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), pela monoamina oxidase do tipo B (MAO-B) (LANGSTON; LANGSTON; FORNO, 1984).

A administração de MPTP não reproduz o elemento neuropatológico central da DP idiopática. Apesar de haver uma indução de parkinsonismo severo e agudo independentemente do modelo de administração de MPTP, essa difere da DP idiopática cuja progressão do fenótipo parkinsoniano é lenta e gradual. Embora as agregações de α -sinucleína ocorram após a administração de MPTP, essas agregações não configuram corpos de Lewy (WILLIAMS; WILKINS, 2000).

No parkinsonismo induzido por MPTP, o processo neurodegenerativo não se limita ao SNC, o sistema nervoso periférico, incluindo o sistema nervoso autônomo, também é afetado (G. MICIELI et al., 2003; KOICHI WAKABAYASHI; HITOSHI TAKAHASHI, 1997). A denervação simpática do coração ocorre na DP (GOLDSTEIN et al., 2000, 2003), mas não no macaco lesionado por MPTP (DAVID S GOLDSTEIN,

2003). Isso sugere que o MPTP pode não reproduzir todas as alterações que ocorrem na DP idiopática fora do sistema nervoso central. Não obstante, o modelo de indução de parkinsonismo por MPTP é atualmente um dos melhores modelos para estudos biomédicos da DP. Em primatas não humanos, tem se demonstrado ser esse o modelo com melhores resultados preditivos da resposta clínica a fármacos para tratamento da DP.

1.2.2 6-HIDROXIDOPAMINA

6-OHDA é um metabólito oxidativo que possui similaridades estruturais com a família das catecolaminas. Sendo assim, apresenta afinidade com receptores de membrana dopaminérgicos e noradrenérgicos no SNC (GALINDO et al., 2014). A 6-OHDA inicia o processo de neurodegeneração do sistema induzindo a morte dos neurônios catecolaminérgicos por três mecanismos principais: geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por auto-oxidação intra ou extracelular; formação de peróxido de hidrogênio pela atividade enzimática da monoamina oxidase (MAO); e inibição da cadeia respiratória mitocondrial (BLUM et al., 2001) (Figura 1).

Quando injetada sistemicamente, a 6-OHDA não se acumula no parênquima cerebral sob concentração neurotóxica suficiente, uma vez que essa neurotoxina pouco ultrapassa a barreira hematoencefálica (Simola. Nicola et al., 2007; Tieu, 2011). Dessa forma, a injeção intracerebral de 6-OHDA é utilizada para a produção de lesões nigroestriatais associadas à apoptose de neurônios dopaminérgicos na SN e subsequente depleção do sistema dopaminérgico (BOVÉ et al., 2005). Ademais, alterações motoras ipsilaterais foram observadas em lesão induzida no corpo estriado em primatas (Poirier et al., 1966).

Muitos dos efeitos moleculares causados pela 6-OHDA são similares ao que ocorrem no encéfalo de pacientes com DP, o que valida o modelo pré-clínico que utiliza a neurotoxina. Fundamentalmente, a 6-OHDA diminui os níveis de enzimas antioxidantes no estriado (glutathiona total e superóxido dismutase), e assim, interage diretamente com complexo I e V da cadeia respiratória (KUNIKOWSKA; JENNER, 2001) .

Os mecanismos pelos quais a 6-OHDA causa disfunção mitocondrial ainda não são elucidados, mas sabe-se que o tratamento com 6-OHDA *in vitro* induziu a ativação da liberação de citocromo c, importante ativador de pró-caspases (GOMEZ-LAZARO et

al., 2008). Apesar da 6-OHDA não atuar diretamente nas proteínas complexas do poro de transição de permeabilidade (PTP) da membrana, é capaz de ativar múltiplos canais de condutância (MCC) presentes na membrana interna da mitocôndria (JORDÁN et al., 2004). MCC permanece fechado em condições fisiológicas e a sua ativação acarreta despolarização do potencial transmembranara interno mitocondrial, importante marcador da apoptose, além da redução do volume mitocondrial (ARBUSTINI et al., 1998; ICHIZO NISHINO et al., 1998)

Dessa forma, quando injetada intracerebralmente, a 6-OHDA induz a degeneração de neurônios dopaminérgicos via estresse oxidativo e injúria mitocondrial. Isso acarreta um desbalanço das vias nigroestriatais que produz distúrbios motores característicos da DP. Portanto, trata-se de um modelo de baixo risco de toxicidade e fácil manipulação e com alto valor preditivo para descoberta de novas abordagens terapêuticas para a DP.

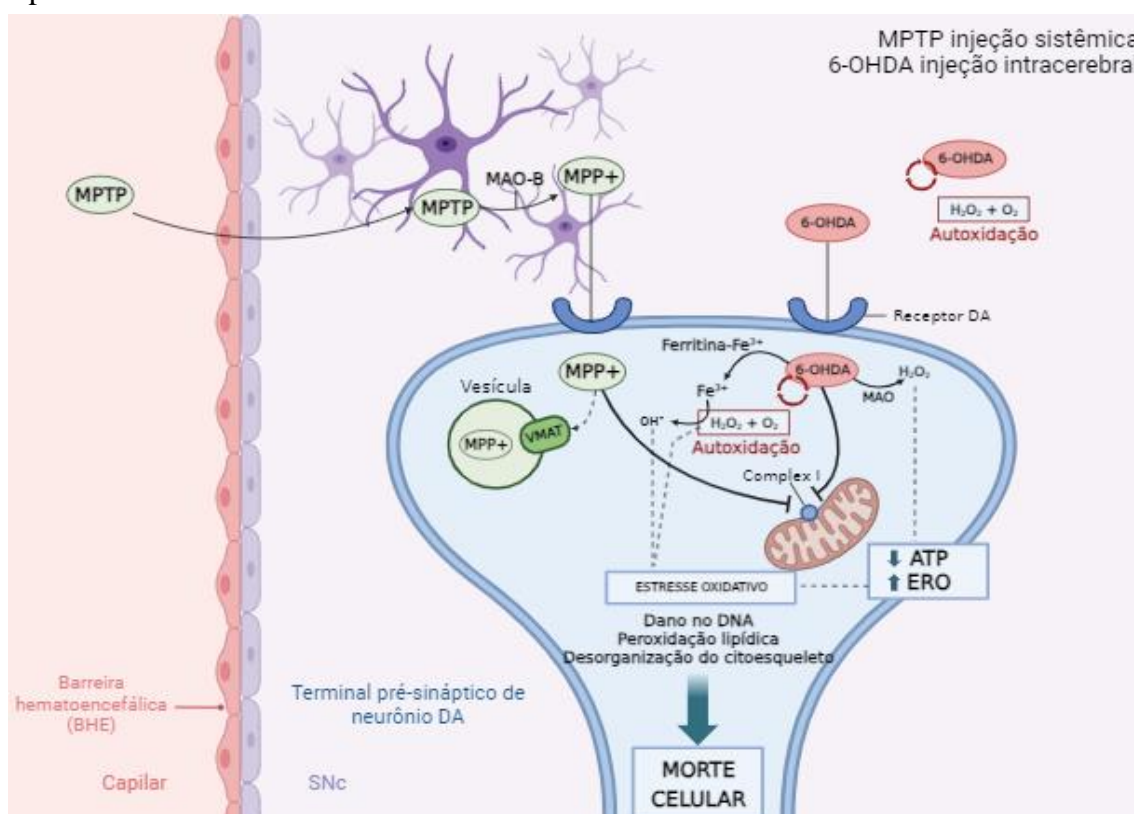


Figura 1. Mecanismo de neurodegeneração por estresse oxidativo induzido por MPTP e 6-OHDA. O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizado em MPP⁺ pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) nas células gliais e depois no composto tóxico ativo. O MPP⁺ é então absorvido pelo transportador de dopamina, onde prejudica a respiração mitocondrial ao inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, causando estresse oxidativo e ativação de vias moleculares programadas de morte

celular. A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) atravessam facilmente a membrana celular através do transportador de dopamina e também podem exercer a sua toxicidade, em parte, atacando as mitocôndrias com a subsequente produção de ERO e quinonas, causando a degeneração dos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais. MPTP, 4-propiloxi-4-fenil-N-metilpiperidina; MPP⁺ 1-metil-4-fenilpiridínio; MAO-B, monoamina oxidase B; VMAT, transporte vesicular de monoaminas; DA, dopamina; ATP, adenosina trifosfato; ERO, espécie reativa de oxigênio. Criado por biorender.com.

1.3 SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA CIRCUITARIA DOS NÚCLEOS DA BASE

A dopamina (DA) é um neurotransmissor monoaminérgico originado da dupla conversão do aminoácido tirosina, pela enzima tirosina hidroxilase que o converte em diidroxifenilalanina (DOPA) que é, posteriormente, convertida em DA pela DOPA-descarboxilase. Apesar de ter sido a última da família de catecolaminas descoberta por Sir Henry Dale em 1952, a DA atua em importantes circuitos que influenciam na atividade motora do sistema extrapiramidal.

Dentre as circuitarias dopaminérgicas, destaca-se as mesencefálicas ascendentes: a via nigroestriatal, oriunda de neurônios da substância negra (SN), e as vias mesocortical/mesolímbica, oriunda de neurônios da área tegumentar ventral (ATV). A via nigroestriatal é composta majoritariamente por axônios de neurônios da SN pars compacta que possuem projeções para porções mais dorsais e posteriores do núcleo caudado e putâmen (conhecidos conjuntamente como núcleo estriado (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012)).

Em um esquema de modelo clássico da circuitaria dos núcleos da base (ver Figura 1), o estriado é o principal núcleo de entrada dos sinais do córtex cerebral, especialmente o córtex motor. No núcleo estriado existem dois tipos de receptores de dopamina: o receptor D1 (que é excitatório) e o receptor D2 (que é inibitório), os quais modulam a atividade motora do sistema extrapiramidal. Destaca-se um importante componente desse sistema que são os núcleos da base, envolvendo estruturas de controle motor: o globo pálido interno (GPi), globo pálido externo (GPe), a porção compacta da substância negra (SNc) e núcleo subtalâmico (STN).

A morte de neurônios dopaminérgicos, principalmente na SNc e, conseqüentemente, perda das projeções aferentes dopaminérgicas no núcleo estriado

resulta no aumento da atividade elétrica nos circuitos GPi/SNr, levando a disfunção dos circuitos inibitórios relacionados ao neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA). Esses, por sua vez, projetam-se para o tálamo, levando à inibição das células do tálamo, o que resulta na diminuição da capacidade das projeções tálamo-corticais ativarem o córtex pré-motor, diminuindo a atividade motora voluntária de indivíduos com DP (BRAAK et al., 2003a). Assim, a DP estabelecida é caracterizada pelo desbalanço funcional dessa circuitaria, o que causa os sintomas motores e não motores característico da doença, ver Figura 2.

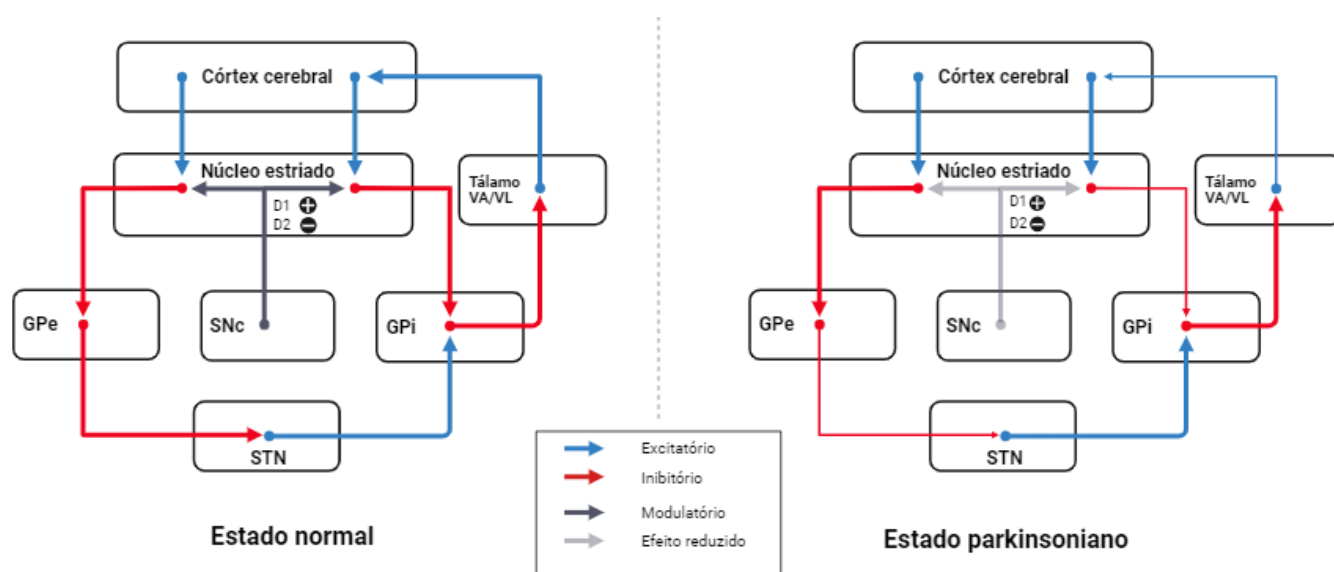


Figura 2. Mecanismo clássico da circuitaria dos núcleos da base de controle motor. D1: receptor dopaminérgico excitatório; D2: receptor dopaminérgico inibitório; Gpe: globo pálido externo; SNc: substância negra pars compacta; Gpi: globo pálido interno; STN: núcleo subtalâmico; VA: núcleo ventro-anterior; VL: núcleo ventral-lateral. Adaptado de (Lanciego et al., 2012).

Na fase prodrômica da doença, quando os sintomas motores ainda não são evidentes, é sugerida a presença de um mecanismo de compensação na circuitaria dos núcleos da base (HAMADJIDA et al., 2019). Os sintomas parkinsonianos característicos tendem a aparecer somente quando há a perda de 60 a 80% dos neurônios dopaminérgicos na SNc.

1.4 MODELO USANDO PRIMATAS NÃO HUMANOS

Primatas não humanos em pesquisas biomédicas são modelos de valor inestimável para entendimento de mecanismos moleculares, celulares e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas por conta da proximidade filogenética aos humanos. Estudos de evolução da organização encefálica em mamíferos indicam que os sistemas corticais de processamento tornam-se cada vez mais complexos, tornando-se evidente nos primeiros primatas. O processo de encefalização dos grandes mamíferos apresenta uma organização cortical modular semelhante, ou seja, os encéfalos estabilizaram de tamanho e as modificações ocorreram dentro de cada área cortical, com mais módulos ou colunas, com maior processamento computacional (KAAS, 2008). Em investigações das neurociências, especialmente doenças neurodegenerativas, o uso de PNH como modelo animal torna-se ainda mais relevante quando observamos questões que envolvem comportamentos complexos e habilidades neurais mais sofisticadas, pois para além de semelhanças anatômicas, estudos funcionais revelam similaridades nas funções e circuitos nervosos entre os encéfalos de PNH e humanos (ARNASON; CLAUSEN, 2016; CHUDASAMA; ROBBINS, 2006).

De forma geral, há uma preferência pelo uso de macacos do velho mundo, por conta das diversas similaridades citadas, em especial da espécie *Macaca mulatta* (JOERS et al., 2014). Os macacos do velho mundo, como os do gênero *Macaca*, são nativos do continente asiático, podendo ser mais facilmente encontrados em colônias no Japão (HAYAISHI; KAWAMOTO, 2006), Estados Unidos (VEGAS et al., 2016), Afeganistão, China, Índia e Laos (Southwick C. et al., 1996). Além disso, alguns macacos do novo mundo são amplamente utilizados pela facilidade de manuseio que são os do *Callithrix* (ANDO et al., 2017; SANTANA et al., 2014). Entretanto, são espécies de menor encefalização e desenvolvimento do córtex pré-frontal, não sendo as mais próximas filogeneticamente aos humanos, portanto com baixo valor preditivo.

Em se tratando de macacos do novo mundo, os mais evolutivamente próximos a seres humanos são os do gênero *Cebus* e *Sapajus* (macacos-prego). Eles são abundantes no continente americano, com destaque para a Região Norte do Brasil, sendo facilmente disponíveis na natureza e em centros de pesquisas como o Centro Nacional de Primatas (CENP), localizado em Ananindeua-PA. Estes primatas, endêmicos da América Latina, apesar de não serem tradicionalmente os mais utilizados em pesquisas em neurociências,

consistem em excelentes modelos experimentais por conta de diversas questões que envolvem seu manejo, facilidade de adaptação e reprodutibilidade em cativeiro, bem como complexidade comportamental e de circuitaria neural.

1.4.1 MODELOS DE INDUÇÃO COM 6-OHDA EM PNHS

As espécies mais comumente utilizada na indução de parkinsonismo usando 6-OHDA são *Callithrix jacchus* (macaco sagui) e *Macaca mulatta* (macaco Rhesus). Os locais de injeção usados para induzir parkinsonismo em NHPs foram o feixe nigrostriatal (ANNETT et al., 1997; ESLAMBOLI, 2003a; GAREA-RODRÍGUEZ et al., 2012; RIDLEY et al., 2006), feixe medial do prosencéfalo (HENDERSON et al., 2005; SANTANA et al., 2014) e a combinação de substância negra e estriado (Ando et al., 2017; Eslamboli, 2003).

A injeção de 6-OHDA por cirurgia estereotáxica induz significativa perda neuronal com alteração da morfologia celular que inclui aumento do volume neuronal, aumento do volume nucleolar, entre outras características inerentes da morte celular (SIMOLA. NICOLA; MORELLI; CARTA, 2007; TIEU, 2011), juntamente com astroglioses (MARINOVA-MUTAFCHIEVA et al., 2009; MORALES et al., 2016). A penetrância e magnitude da neurodegeneração induzida por essa neurotoxina é dependente da dose e dos sítios da injeção (HEALY-STOFFEL et al., 2014; PRZEDBORSKI; TIEU, 2005).

De modo geral, os principais alvos de injeção são a substância negra, feixe medial do prosencéfalo (via nigroestriatal) e corpo estriado (BOVÉ et al., 2005; JAGMAG et al., 2016). Tipicamente, a injeção de 6-OHDA é feita unilateralmente (modelo de hemiparkinsonismo) e, conseqüentemente, o lado não lesionado configura como controle interno (YUN et al., 2016). A injeção bilateral de 6-OHDA é debilitante, o que induz alta taxa de mortalidade, com grande enfraquecimento do animal, afagia acentuada, adipsia e convulsões, e requer atenção mais cuidadosa no pós-operatório (Ungerstedt, 1971; Yun et al., 2016).

Concentrações de 4mg/ml e 8mg/ml de 6-OHDA dissolvido em 0,01% de ascorbato/solução salina, mimetizaram os últimos estágios da DP em saguis (Garea-Rodríguez et al. 2012, 2016). Os sintomas induzidos incluíram negligência do membro afetado, distonia, rigidez, redução da atividade espontânea do animal, marcha

descoordenada, comprometimento do equilíbrio, alterações na postura, bradicinesia, congelamento, hipocinesia, marcha prejudicada, habilidades motoras grossas e finas e vocalizações, hipocinesia, dificuldade em escalar e déficits de percepção e memória.

1.4.2 MODELO DE HEMIPARKINSONISMO

Modelo de hemiparkinsonismo em primatas comumente utilizado é a lesão unilateral da substância negra por 6-OHDA. Essa lesão mimetiza a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra, região cerebral central no sistema motor basal. Estudos utilizando primatas Marmosets demonstraram com sucesso a reprodução de diversos sintomas motores da DP, como bradicinesia, rigidez muscular, tremor e instabilidade postural (ESLAMBOLI, 2003b; VERMILYEA; EMBORG, 2018)

Os testes motores em modelos de hemiparkinsonismo em PNHs são essenciais para avaliar a eficácia de novas terapias e entender a progressão da doença. Esses testes incluem avaliações de comportamento espontâneo, como a observação de movimentos de membros afetados, bem como testes específicos de alcance e pegada, que avalia a destreza e a precisão dos movimentos (ESLAMBOLI, 2003b; SCHMIDLIN et al., 2011). A análise comportamental detalhada permite não apenas a quantificação da severidade dos sintomas, mas também a monitoração de alterações na resposta a futuros tratamentos experimentais, como a administração de agentes neuroprotetores.

A utilização de modelos de hemiparkinsonismo em primatas e os testes motores associados têm contribuído significativamente para o avanço do conhecimento sobre a doença de Parkinson (ARNASON; CLAUSEN, 2016). Esses modelos permitem a investigação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à neurodegeneração e à neuroplasticidade, proporcionando conhecimentos valiosos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e personalizadas. Portanto, a continuidade da pesquisa em primatas não-humanos é vital para melhor compreensão e novas abordagens terapêuticas da doença de Parkinson.

1.4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Apesar da relevância científica dos resultados de pesquisas obtidas em modelos PNHs, os dilemas éticos envolvidos, associados aos elevados custos de manutenção, elevam a carga de responsabilidades de pesquisadores que desempenham estudos

utilizando estes animais como modelos. Assim, como em todas as pesquisas com animais, mas de forma ainda mais acentuada, os estudos com PNH devem obedecer e seguir criteriosamente o princípio dos 3Rs de Russel e Burch (*reduction, refinement, replacement* – redução, refinamento e substituição) (KIRK, 2018). Nesse contexto, o planejamento dos experimentos em animais deve ser pautado em reduzir a um número mínimo possível os animais necessários ao estudo, bem como refinar os procedimentos de forma a maximizar o bem-estar animal, além de demonstrar claramente a plausibilidade do modelo animal escolhido em relação ao delineamento do objetivo científico proposto pelo trabalho, maximizando/otimizando dentro dos limites possíveis seus resultados (PRESCOTT et al., 2017).

Visando o segundo “R” de refinamento, o modelo de indução experimental de hemiparkinsonismo em *Sapajus apella* será baseado em imageamento por ressonância magnética como ferramenta de planejamento pré-cirúrgico. A falta de um atlas estereotáxico do gênero *Sapajus* (S. MANOCHA; TOTADA R. SHANTHA; GEOFFREY H. BOURNE, 1968), bem como a necessidade de considerar as diferenças neuroanatômicas intraespécie, o cálculo das coordenadas cirúrgicas baseadas em imagens individuais minimiza possíveis erros cirúrgicos. Dessa forma, o refinamento experimental compreende as abordagens que visam evitar ou minimizar potenciais estímulos nocivos, nociceptivos, estresse ou qualquer outro efeito adverso, físico ou psicológico que visem aumentar o bem-estar dos mesmos.

O presente trabalho visa criar um protocolo de indução de hemiparkinsonismo em modelo PNH *Sapajus apella*. No melhor do nosso conhecimento, ainda não existem relatos da indução de hemiparkinsonismo nessa espécie, a que apresenta potenciais características que podem configurar um excelente modelo experimental para o estudo da DP, por possuir uma elevada taxa de encefalização, associado ao repertório motor e comportamental complexo (BORTOFF; STRICK, 1993), conforme explicitado anteriormente.

2. JUSTIFICATIVA

Os modelos experimentais de injeção de 6-OHDA em primatas não humanos também mimetizam os sintomas característicos da DP humana e não apresentam os altos riscos de contaminação ao manuseio, necessitando apenas de um laboratório NB1, o que

viabiliza esse método de indução para os estudos da DP. Ainda, a possibilidade de indução de parkinsonismo unilateral apresenta vantagens éticas com relação ao número de animais, cumprindo com o princípio bioético de redução de Russell e Burch.

Além disso, a espécie *Sapajus apella* é endêmica da Região Norte, tratando-se de um primata do Novo Mundo com características morfológicas e comportamentais complexas evolutivamente semelhante aos humanos. Desse modo, o desenvolvimento de um modelo de hemiparkinsonismo em *Sapajus apella* por indução de 6-OHDA pode representar um modelo experimental relevante para a compreensão da DP. Este estudo configura esforço inédito na utilização da espécie em questão para indução unilateral de DP por 6-OHDA. O modelo experimental desenvolvido permitirá avaliar resultados com elevado valor preditivo para o cenário clínico.

Diante do exposto, a hipótese a ser testada é a de que o *Sapajus apella* pode ser um bom modelo animal para indução de parkinsonismo usando 6-OHDA. As evidências para testar essa hipótese terão origem em análise comportamental e histológica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar o modelo experimental de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA em primata *Sapajus Apella* a nível comportamental e histológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Verificar o efeito comportamental e perda neuronal de diferentes concentrações de 6-OHDA em *Sapajus apella*;

B) Descrever o comportamento motor e características histológicas como referência basal para comparação dos grupos alterados pelo modelo de hemiparkinsonismo;

C) Analisar a relação entre diferentes concentrações de 6-OHDA e suas respectivas alterações comportamentais e histológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

06 macacos-prego (*Sapajus Apella*) machos com idades entre 15 e 27 anos ($19,66 \pm 5,75$), peso médio de $4,300 \pm 0,99$ kg. Os animais foram mantidos nas dependências do CENP (Ananindeua-PA), em um ciclo regular 12/12h claro-escuro, com acesso à alimentação adequada para primatas do novo mundo e água *ad libitum*, e mantidos sob os cuidados dos veterinários e técnicos do CENP. Os sujeitos foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo controle (N =1); Grupo SHAM operado (N =1) e Grupo operado (N =3). Todos os procedimentos estão de acordo com as regulamentações da União Europeia (2010/63/EC) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IEC – certificados n^{os} 45/2016, 37/2018 e 04/2021110), ver Anexo I.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Consistiam, inicialmente, em período de habituação dos primatas ao experimentador seguido de testes comportamentais para determinação de lateralidade e obtenção de linhas de base de desempenho motor. Posteriormente, foi realizada a indução de hemiparkinsonismo (HP) com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a partir de planejamento cirúrgico baseado em imagens de Ressonância Magnética. Em seguida, foram feitos testes comportamentais para avaliar se houve alguma mudança no desempenho motor de cada sujeito. O layout experimental descreve os procedimentos feitos em sequência pode ser visto na Figura 3.

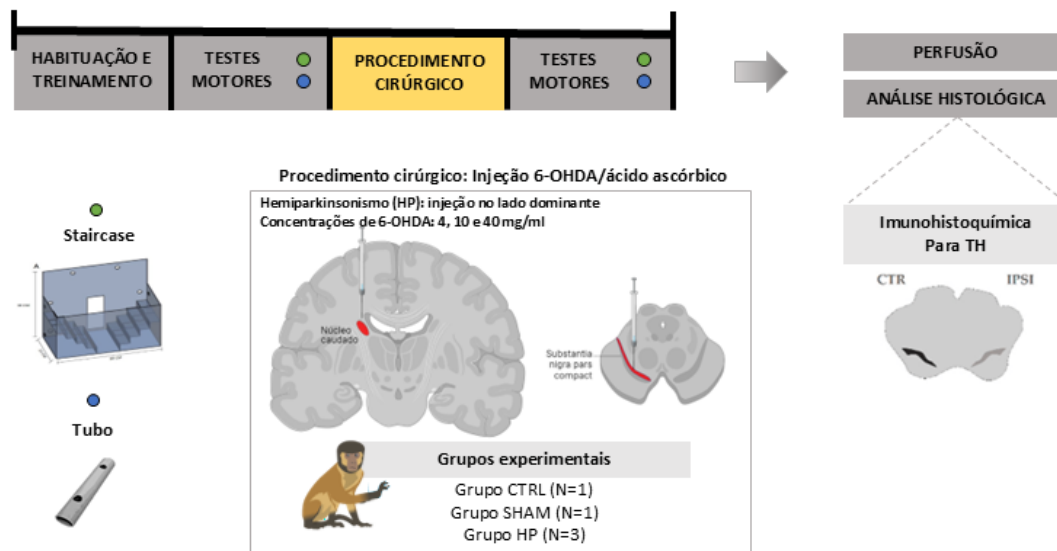


Figura 3. Após período de habituação e treinamento e duas semanas de testes motores para referência basal do desempenho motor que consistem nos testes *Staircase* e Tubo. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de indução de HP utilizando a 6-OHDA com concentrações de 4, 8, 10 e 40 mg/ml conforme o grupo 6-OHDA operado (N= 3), o grupo SHAM (N=1) foi submetido somente a micro injeção contendo veículo (ácido ascórbico), grupo SHAM não foi submetido a cirurgia. O modelo de indução de DP foi induzido por injeções unilaterais de 6-OHDA na SNpc e CD no hemisfério dominante de cada sujeito. Por fim, os animais foram eutanasiados e perfundidos para posterior análise histológica. HP, hemiparkinsonismo, 6-OHDA, 6-hidroxi dopamina; DP, doença de Parkinson; SNpc, substância negra parte compacta; CD, núcleo caudado; TH, tirosina hidroxilase.

4.2.1 HABITUAÇÃO AO EXPERIMENTADOR

Os animais foram submetidos a dois meses de sessões diárias de condicionamento por reforço positivo para habituação ao experimentador. Para o reforçamento positivo, utilizamos a técnica do “clicker” que consiste em estabelecer uma ligação temporal entre o reforçador positivo (recompensa comestível) e o reforçador condicionante (clicker). Para isso, nas primeiras sessões de treinamento apresentamos o estímulo condicionante seguido imediatamente do reforçador positivo e o som do “click”. Quando houver os comportamentos desejados, o experimentador emite o som com o “clicker” seguido da oferta de uma pequena recompensa comestível para o animal. Cada sessão teve duração máxima

de duas horas e as recompensas comestíveis serão variadas. Quando o animal demonstra rejeição a uma determinada recompensa a mesma é descartada. As recompensas que os animais demonstraram preferência foram utilizadas nos períodos posteriores para a realização dos testes comportamentais.

4.2.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Após período de habituação e treinamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais os quais buscam avaliar a função motora bilateral, especificamente coordenação motora fina e global. A preferência lateral dos membros superiores também foi determinada nos testes comportamentais conforme previamente descrito por Leal et al., 2021.

Cada animal foi submetido aos testes, individualmente, três vezes por semana, de maneira alternada, não podendo ser feito depois da refeição diária dos sujeitos. Os testes comportamentais foram realizados em uma janela antes e após o procedimento cirúrgico como referência basal e análise das alterações motoras, respectivamente. Os testes utilizados estão descritos a seguir.

4.2.2.1 TESTE *Staircase*

O teste *Staircase* adaptado para primatas foi feito utilizando um aparato de acrílico com abertura central para acesso às recompensas dispostas em cada nível das escadas, situadas em ambos os lados (MARSHALL; BAKER; RIDLEY, 2002). Na versão *valley*, as escadas sobem em direção às laterais do aparato com o orifício de acesso localizado ao centro do aparato experimental, de modo que o animal alcance com o membro superior esquerdo os degraus do lado direito e vice-versa.

Foram realizados 120 sessões antes e após a intervenção cirúrgica com o tempo de até 3 minutos para recuperação de todas as recompensas. Foram avaliados parâmetros: a) latência da primeira recompensa (tempo que o animal leva para pegar a primeira recompensa, registrado separadamente para a mão direita ou a esquerda); b) Tempo de recuperação de todas as recompensas (tempo que o animal recupera todas as recompensas de um lado do aparato, sendo registrado cada lado individualmente); c) Uso de mão trocada (número de vezes que o animal utiliza a mão contrária ao lado correto referido pelo aparato, registrando

cada lado individualmente); d) Perda de recompensa (número de recompensas em que o animal deixa cair no trajeto de retirada do aparato, registrando cada lado individualmente).

4.2.2.2 TESTE DO TUBO

Para o teste do Tubo, foi utilizado um tubo com duas aberturas superiores que dá acesso à recompensa que está contida no interior do tubo. Durante um período de um minuto e meio, o animal tem livre acesso para utilizar membro superior de ambos os lados para prender a recompensa. Foram realizadas 25 sessões antes e após a intervenção cirúrgica, para avaliar dos seguintes parâmetros: a) tempo utilizando o lado dominante e lado não dominante, b) número de pegadas do lado dominante e não dominante; c) frequência do uso do dedo indicador e d) frequência do uso de outros dedos.

4.3 PLANEJAMENTO CIRÚRGICO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Para o planejamento da cirurgia de indução de hemiparkinsonismo por 6-OHDA, foi levado em consideração as individualidades anatômicas intra-especies. Dessa forma, todos os animais incluídos no estudo foram submetidos a um exame de ressonância magnética para posterior planejamento de suas coordenadas cirúrgicas, conforme descrito previamente por Pedrosa et al., 2024.

O planejamento cirúrgico consistiu no cálculo das coordenadas de 12 alvos subcorticais nas vias nigroestriatais (4 pontos distribuídos ao longo da substância negra e 8 pontos ao longo do núcleo caudado). Os cálculos das coordenadas estereotáxicas foram realizados individualmente, sendo calculada a margem de erro cirúrgico.

4.4 INDUÇÃO DE HEMIPARKINSONISMO POR 6-OHDA E AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais foram submetidos ao protocolo de administração intracerebral unilateral de 6-OHDA hidrocloreídrica (4, 10 e 40 mg/ml base de peso livre dissolvido em 0,01% ascorbato ascórbico/salina). Antes do início da cirurgia de indução de hemiparkinsonismo, foram administrados uma dose intramuscular de xilasina (100 mg/ml) e ketamina (100 mg/ml), para a realização da tricotomia e posicionamento do animal no estereotáxico. Após o posicionamento correto do animal no aparato estereotáxico, o mesmo recebeu uma injeção intravenosa de xilasina (100 mg/ml) e ketamina (100 mg/ml).

A determinação do lado da lesão pela 6-OHDA na substância negra ou núcleo estriado foi através dos resultados dos testes motores que determinaram a lateralidade do animal, sendo escolhido o hemisfério cerebral oposto à preferência lateral do animal. Assim, buscou-se lesionar a funcionalidade do lado dominante (lado lesionado).

Com auxílio do veterinário, foi realizada uma incisão médiolateral para expor a caixa craniana. Em seguida, com auxílio de uma broca neurocirúrgica, foi realizada a abertura de uma janela craniana no hemisfério de interesse para exposição do encéfalo. Essa janela foi determinada a partir das coordenadas cirúrgicas individuais, considerando os pontos extremos dos eixos ântero-posterior e medio-lateral.

A indução de hemiparkinsonismo ocorreu por microinjeções intra encefálicas em 12 sítios de injeções na substância negra e núcleo caudado com auxílio da bomba de infusão operando em uma taxa de 0,5 μ l/ml totalizando 2 μ l/sítio. O grupo HP foi submetido às diferentes concentrações de 6-OHDA (4, 10 e 40 mg/ml base de peso livre dissolvido em 0,01% ascorbato ascórbico/salina). E o grupo SHAM foi submetido apenas a microinjeções de ácido ascórbico a 0,1% nos mesmo 12 sítios cirúrgicos.

Após a intervenção cirúrgica, os animais foram monitorados diariamente, e avaliados através da escala unificada de avaliação para a doença de Parkinson (UPDRS) adaptada para primatas (SANTANA et al., 2014), sendo avaliadas 16 categorias motoras como tremor em repouso e em movimentos, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural.

4.5 PREPARO HISTOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE

Após o término dos experimentos os animais foram sacrificados por sobredose anestésica com associação de cloridrato de ketamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (50 mg/kg). Para fixação do tecido nervoso, os sujeitos foram perfundidos com solução tampão fosfato (PB) 0,1M e salina (0,9%) seguida da solução de paraformaldeído (PFA) 4% em PB. Para perfusão, foi realizada uma abertura torácica seguida de obliteração da aorta descendente (usando uma pinça hemostática), seguida da injeção intraventricular de Heparina sódica (Hemofol). Posteriormente, com a cânula posicionada no ventrículo esquerdo, teve prosseguimento com a perfusão de 500ml de tampão fosfato (0,1M) e salina 0,9% (PBS; pH 7,4) seguido de 800ml de PFA tamponado 4%. Após a perfusão, os encéfalos

foram retirados da caixa craniana e guardados em PFA 4% (pH 7,2 – 7,4) a 4 °C. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados no plano coronal, a 50 µm de espessura com auxílio do vibrátomo (Vibratome Serie 1000 - Ted Pella Inc, USA). Os cortes foram recolhidos em solução PB 0,1M (pH 7,2 - 7,4).

Para imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH), as secções foram pré-tratadas para recuperação dos antígenos com solução de ácido bórico a 0,3% e lavados três vezes em PBS por 5 minutos. Posteriormente, foram incubados por 20 minutos em bloqueio com soro a 10%. Em seguida, as secções foram incubadas em solução contendo anticorpo primário anti-Tirosina-Hidroxilase - 1:1000 em PBS Ph 7,2 – 7,4 durante 72 horas (Anti-TH (Ab-5) Rabbit pA (PC38-100ul - Santa Cruz Biotechnology, Inc). Após isso, as secções foram retiradas da solução contendo o anticorpo primário e receberam quatro lavagens em PB 0,1M por 5 minutos cada. Então, foram incubadas em em anticorpo secundário overnight. No dia seguinte, foram lavadas três vezes em PBS 0,1M por 5 minutos cada, seguido do bloqueio da peroxidase por peróxido de hidrogênio 0,3% H₂O₂ em PB 0,1M durante 10 minutos. Após três novas lavagens, as secções foram incubadas em solução contendo o complexo enzimático avidina-biotina (kit ABC PK-4000, Vector, Burlingame, CA) por 1 hora. Em seguida, foram submetidas a nova lavagem e à reação para revelação da peroxidase. O cromógeno utilizado para revelar o produto da reação foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich, Inc). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para verificar a distribuição gaussiana dos dados, foi feito o teste D' Agostino-Pearson. Em seguida, os dados quantitativos que refletem as sequências motoras foram analisados estatisticamente com base no teste não-paramétrico de Wilcoxon para análise intragrupo comparando a janela antes e depois da intervenção cirúrgica. ANOVA de duas vias foi feito para análise intergrupo. Foi utilizado o software *GraphPad Prism 9*. O nível de significância considerado foi de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 CÁLCULO DAS COORDENADAS ESTEREOTÁXICAS PARA CIRURGIA DE INDUÇÃO DE HEMIPARKINSONISMO POR 6-OHDA

Esses resultados geraram o primeiro artigo desse projeto publicado na *Frontiers in Neuroscience* (Anexo II). Para a determinação das coordenadas cirúrgicas a partir do ponto zero, foram realizadas por meio do cálculo da distância entre dois pontos ($D = P0 - FX$) nos três eixos anatômicos, onde o ponto zero (P0) e ponto do alvo cirúrgico (X). Os resultados para as coordenadas dos alvos e suas respectivas margens de erro cirúrgicos, baseado nas aquisições por RM de cada animal, estão descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

| Animal | Eixo | Substância negra | | | | Núcleo caudado | | | | | | | |
|--------|------|------------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | SN1 | SN2 | SN3 | SN4 | ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | ST5 | ST6 | ST7 | ST8 |
| AM BBH | AP | 12,85 | 12,52 | 12,2 | 11,58 | 27,32 | 20,04 | 24,53 | 23,71 | 27,39 | 24,86 | 20,22 | 24,27 |
| | DV | 6,13 | 6,13 | 6,13 | 6,13 | 17,44 | 37,4 | 17,44 | 37,4 | 16,57 | 16,62 | 16,57 | 16,57 |
| | ML | 0,83 | 1,89 | 2,94 | 3,68 | 3,35 | 8,7 | 2,71 | 9,94 | 3,77 | 5,36 | 2,677 | 2,04 |
| AM BEN | AP | 6 | 7,41 | 8,9 | 8,83 | 22,51 | 21,23 | 19,23 | 16,94 | 16,24 | 16,24 | 16,24 | 16,24 |
| | DV | 13,63 | 13,63 | 13,63 | 11,3 | 22,18 | 22,18 | 22,18 | 22,18 | 22,74 | 21,19 | 19,85 | 18,54 |
| | ML | 6,12 | 4,87 | 3,15 | 3,99 | 4,64 | 4,21 | 3,7 | 3,92 | 4,77 | 3,67 | 2,52 | 1,89 |
| AM BEG | AP | 10,04 | 10,68 | 2,53 | 11,17 | 23,46 | 26,5 | 25,54 | 24,33 | 17,81 | 17,81 | 17,81 | 17,81 |
| | DV | 12,24 | 12,24 | 12,24 | 12,24 | 21,24 | 21,24 | 21,24 | 21,24 | 24,23 | 22,91 | 22,91 | 22,14 |
| | ML | 6,03 | 5,15 | 9,75 | 3,75 | 4,77 | 3,97 | 3,4 | 3,32 | 4,3 | 3,29 | 3,29 | 1,5 |
| AM AOR | AP | 0,37 | 1,15 | 1,92 | 2,82 | 10 | 6 | 4 | 4 | 2,77 | 9,57 | 6,92 | 1,7 |
| | DV | 6 | 6 | 6 | 6 | 19,34 | 18,74 | 19,82 | 18,74 | 17,72 | 19,03 | 20,03 | 18,56 |
| | ML | 7,33 | 5,96 | 4,19 | 3,38 | 8,85 | 7,06 | 7,9 | 5,75 | 7,06 | 7,06 | 7,9 | 7,9 |
| AM AQX | AP | 5,72 | 6,44 | 7,28 | 8,34 | 45,68 | 8,43 | 9,42 | 9,42 | 10,42 | 10,42 | 10,42 | 10,42 |
| | DV | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 21,68 | 20,02 | 21,64 | 20,48 | 22,09 | 20,65 | 19,45 | 18,42 |
| | ML | 5,16 | 4,02 | 2,82 | 7,56 | 5,94 | 4,71 | 6,65 | 5,1 | 6,7 | 5,28 | 4,16 | 3,36 |

Tabela 1. Coordenadas cirúrgicas para indução de HP, com base na lateralidade de dominância manual de cada animal. SN= Substância Negra; CD = Núcleo Caudado; AP = sentido anteroposterior; DV = sentido dorsoventral; ML = sentido médio-lateral.

| Animal | Eixo | Substância negra | | | | Núcleo caudado | | | | | | | |
|--------|------|------------------|------|------|-------|----------------|-------|------|------|------|------|------|------|
| | | SN1 | SN2 | SN3 | SN4 | ST1 | ST2 | ST3 | ST4 | ST5 | ST6 | ST7 | ST8 |
| AM BBH | AP | 0 | 0,13 | 0,25 | 0,15 | 0,14 | 0,19 | 0,17 | 0,06 | 0,09 | 0,03 | 0,17 | 0,12 |
| | DV | 0,28 | 0,32 | 0,32 | 0,29 | 0,35 | 0,17 | 0,26 | 0,32 | 0,32 | 0,27 | 0,34 | 0,41 |
| | ML | 0 | 0,07 | 0,12 | 0,12 | 0,11 | 0,13 | 0,15 | 0,09 | 0,15 | 0,22 | 0,03 | 0,02 |
| AM BEN | AP | 0,16 | 0,61 | 0,39 | 0,49 | 0,59 | 0,25 | 0,64 | 0,6 | 0,95 | 0,27 | 0,81 | 0,19 |
| | DV | 0,21 | 0,3 | 0,06 | 0,22 | 0,15 | 0,43 | 0,74 | 0,24 | 0,39 | 0,21 | 0,68 | 0,59 |
| | ML | 0 | 0,07 | 0,15 | 0,44 | 0,06 | 0,02 | 0,05 | 0,05 | 0,11 | 0,04 | 0,26 | 0,1 |
| AM BEG | AP | 0,04 | 0,12 | 0,21 | 0,048 | 0,54 | 0,09 | 0,39 | 0,25 | 0,13 | 0,14 | 0,18 | 0,11 |
| | DV | 0,29 | 0,05 | 0,11 | 0,06 | 0,47 | 0,37 | 0,48 | 0,11 | 0,27 | 0,21 | 0,21 | 0,3 |
| | ML | 0,01 | 0,26 | 0,25 | 0,11 | 0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,05 | 0,11 | 0,34 | 0,14 | 0,16 |
| AM AOR | AP | 0,33 | 0,26 | 0,18 | 0,14 | 0,36 | 0,026 | 0,09 | 0,09 | 0,37 | 0,02 | 0,27 | 0,12 |
| | DV | 0,08 | 0,31 | 0,21 | 0,2 | 0,48 | 0,28 | 0,49 | 0,43 | 0,33 | 0,28 | 0,31 | 0,31 |
| | ML | 0,02 | 0,25 | 0,07 | 0,09 | 0,32 | 0,09 | 0,04 | 0,12 | 0,32 | 0,09 | 0,52 | 0,11 |
| AM AQX | AP | 0 | 0,02 | 0,05 | 0,1 | 0,3 | 0,07 | 0 | 0,12 | 0,34 | 0,01 | 0,07 | 0,1 |
| | DV | 0,06 | 0,5 | 0,07 | 0,24 | 0 | 0 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,1 | 0,02 | 0,04 |
| | ML | 0,34 | 0,08 | 0,32 | 0,14 | 0,01 | 0,06 | 0,09 | 0,31 | 0,02 | 0 | 0,08 | 0,02 |

Tabela 2. Margem de erro cirúrgico. SN= Substância Negra; CD = Núcleo Caudado; AP = sentido anteroposterior; DV = sentido dorsoventral; ML = sentido médio-lateral.

5.2 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM O COMPORTAMENTO MOTOR

Cada sujeito do grupo HP foi submetido a microinjeções de diferentes concentrações de 6-OHDA. As análises dos testes *Staircase* e Tubo revelaram alterações na resposta motora do lado dominante (LD) afetado e também lado não dominante (LND). Observou-se que as diferentes respostas motoras são dependentes da concentração de 6-OHDA submetida.

No teste *Staircase*, a latência da primeira recompensa LD diminuiu significativamente no grupo 10 mg/ml de 6OHDA ($4,33 \pm 0,47$ vs $1,46 \pm 0,11$), podendo indicar comportamento tipo ansiedade. Diferentemente, esse parâmetro aumentou significativamente em 4 mg/ml ($2,08 \pm 0,17$ vs $3,05 \pm 0,34$) e 40 mg/ml ($4,33 \pm 0,47$ vs $1,46 \pm 0,11$) (Figura 5A). Por outro lado, a latência da primeira recompensa LND diminuiu significativamente em 4 ($12,43 \pm 0,85$ vs $8,008 \pm 0,58$) e aumentou em 10 mg/ml ($5,57 \pm 0,6$ vs $7,51 \pm 0,37$) e 40 mg/ml ($9,7 \pm 0,78$ vs $10,93 \pm 0,41$) de 6OHDA (Figura 5B). O tempo total de utilização LD do grupo 10 mg/ml diminuiu significativamente ($21,45 \pm 1,2$ vs $13,66 \pm 0,43$) (Figura 5C), enquanto que o tempo total LND diminuiu significativamente em 4 mg/ml e 10 mg/ml ($21,4 \pm 0,87$ vs $17,40 \pm 0,58$; $21,25 \pm 1,09$ vs $15,14 \pm 0,38$), mas aumentou em 40 mg/ml ($25,80 \pm 1,03$ vs $28,45 \pm 0,6$) (Figura 5D).

O uso de mão trocada LD aumentou em 10 mg/ml e diminuiu em 4 mg/ml e 40 mg/ml ($0,36 \pm 0,05$ vs $0,90 \pm 0,08$; $0,80 \pm 0,07$ vs $0,34 \pm 0,06$; $0,4 \pm 0,05$ vs $0,09 \pm 0,02$) (Figura 5E), indicando redução da preferência manual dominante. Porém, o uso de mão trocada LND aumentou nos grupos 4 e 40 mg/ml ($0,05 \pm 0,02$ vs $0,13 \pm 0,03$; $0,075 \pm 0,02$ vs $0,525 \pm 0,05$) e diminuiu em 10 mg/ml ($0,19 \pm 0,04$ vs 0 ± 0) (Figura 5F). Já a perda de recompensa LD parece ter aumentado significativamente de acordo com a concentração de 6-OHDA, indicando que a concentração afeta diretamente o desempenho motor nesse parâmetro (0 ± 0 vs $0,08 \pm 0,02$; $0,008 \pm 0,0008$ vs $0,09 \pm 0,02$; $0,008 \pm 0,0008$ vs $0,64 \pm 0,05$, respectivamente) (Figura 5G). A perda de recompensa LND aumentou significativamente em 10 mg/ml ($0,016 \pm 0,011$ vs $0,084 \pm 0,02$) (Figura 5H).

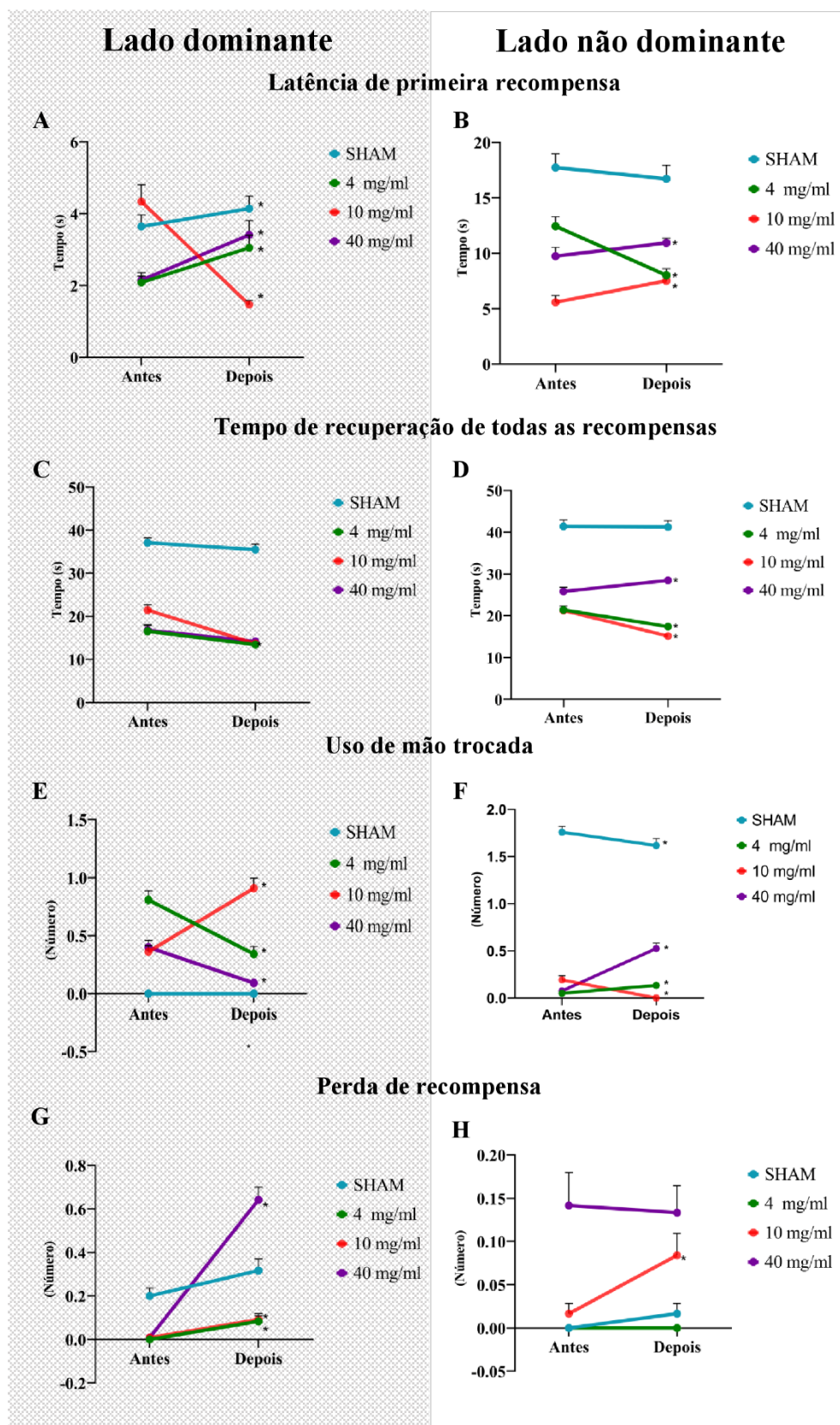


Figura 4. Análise motora por meio do teste do Staircase aprendidas durante 120 sessões do teste do Staircase. SHAM, grupo controle cirúrgico; grupo com intervenção cirúrgica em diferentes concentrações de 4, 10 e 40 mg/ml de 6OHDA. **(A)** Latência da primeira recompensa LD, em segundos (s). **(B)** Latência da primeira recompensa LND, em segundos (s). **(C)** Tempo de recuperação de todas as recompensas LD,

em segundos (s). **(D)** Tempo de recuperação de todas as recompensas LND, em segundos (s). **(E)** Uso de mão trocada do LD, em número. **(F)** Uso de mão trocada do LND, em número. **(G)** Perda de recompensa LD, em número. **(H)** Perda de recompensa do LND, em número. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Teste de Wilcoxon). *Comparado ao grupo SHAM ($p < 0,01$).

O teste do Tubo parece ser mais sensível para detecção de déficit motores, além de não necessitar de treinamento como no *Staircase*. O número de pegadas do LD diminuiu significativamente em 4 e 40 mg/ml ($43,08 \pm 2,48$ vs $11,28 \pm 0,45$; $23,88 \pm 2,48$ vs $27,56 \pm 1,47$) (Figura 6A). Em relação ao LND, houve um aumento significativo em 4 e 10 mg/ml ($2 \pm 0,87$ vs $6,79 \pm 0,27$; $5,20 \pm 1,23$ vs $6,08 \pm 0,33$) (Figura 6B). Em relação ao tempo total para a realização do teste do Tubo, para o LD, houve uma redução nos grupos 4 mg/ml e 10 mg/ml ($74,08 \pm 3,36$ vs $52,24 \pm 1,74$; $67 \pm 3,32$ vs $45 \pm 2,38$), mas houve um aumento em 40 mg/ml ($56,84 \pm 5,2$ vs $80 \pm 1,41$) (Figura 6C). Em relação ao tempo LND, de forma compensatória, aumentou significativamente nos grupos 4 e 10 mg/ml ($6 \pm 1,98$ vs $22,8 \pm 1,34$; $11,32 \pm 2,78$ vs $26,92 \pm 1,85$) (Figura 6D). Quanto ao tipo de pegada com o indicador, houve uma redução significativa em 10 mg/ml ($37 \pm 1,63$ vs $29 \pm 1,81$) (Figura 6E) e outro tipo de pegada aumentou significativamente em 40 mg/ml ($0 \pm 0,46$ vs $3 \pm 0,55$) (Figura 6F), indicando uma redução do movimento de pinça.

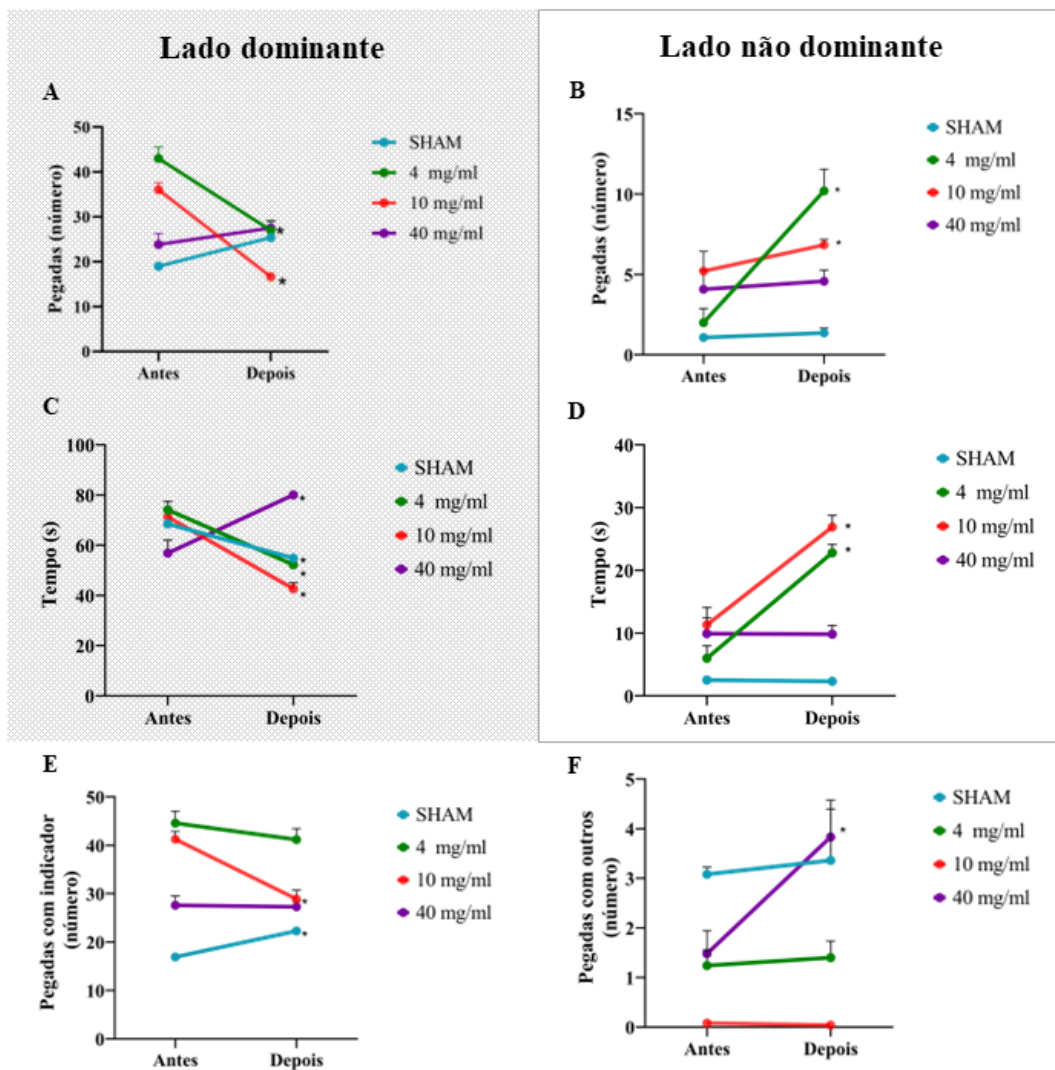


Figura 5. Análise motora durante 25 sessões do teste do Tubo. **(A)** Número de pegadas do LD. **(B)** Número de pegadas do LND. **(C)** Tempo total de pegadas do LD, em segundos (s). **(D)** Tempo total de pegadas do LND, em segundos (s). **(E)** Pegadas com indicador, em números. **(F)** Pegadas com outros, em números. Os dados são apresentados como média \pm DP. (Teste de Wilcoxon). * Comparação intragrupo antes e depois, $p < 0,01$.

5.3 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM O ÍNDICE DE DESEMPENHO MOTOR

Para facilitar a quantificação das alterações no desempenho motor dos mesmos testes, calculamos o índice de alteração entre os períodos anterior (baseline) e posterior à inoculação por 6-OHDA. Tal índice foi calculado por fórmula de porcentagem simples, tomando a média do desempenho anterior à cirurgia como base e calculando a

percentagem de aumento ou diminuição do desempenho para cada lado em cada um dos parâmetros analisados.

Em relação à latência da primeira recompensa do LD, o grupo 40 mg/ml foi mais lento e o grupo 10 mg/ml pareceu mais rápido (Figura 7A). De forma compensatória, o índice da latência de primeira recompensa do LND reduz significativamente no grupo 10 mg/ml e 40 mg/ml, mas no grupo 4 mg/ml aumentou (Figura 7B). Isso pode indicar uma inversão da habilidade e rapidez manual, favorecendo o lado não afetado.

O índice do tempo total de recuperação de todas as recompensas do LD melhorou significativamente em todos os grupos HP (Figura 7C). De forma semelhante, os grupos 4 e 10 mg/ml tiveram melhora do desempenho no LND em relação ao tempo, porém houve uma piora no grupo 40 mg/ml (Figura 7D).

Quanto ao uso de mão trocada do LD, o índice do grupo 4 mg/ml e 40 mg/ml piorou significativamente, indicando uma diminuição da preferência manual pela mão afetada, enquanto o grupo 10 mg/ml aumentou ainda mais a preferência pela mão dominante mesmo afetada (Figura 7E). O índice de mão trocada do LND reduziu significativamente nos grupos 4 mg/ml e 40 mg/ml, porém aumentou de forma semelhante ao LD no grupo 10 mg/ml (Figura 7F). Em relação à perda de recompensa do LD, os índices de desempenho parecem piorar gradualmente de acordo com o aumento da concentração de 6-OHDA, em que o grupo 40 mg/ml apresentou a maior piora em 7000%. A perda de recompensa do LND piorou somente no grupo 10 mg/ml, sendo um índice pouco conclusivo (Figura 7H).

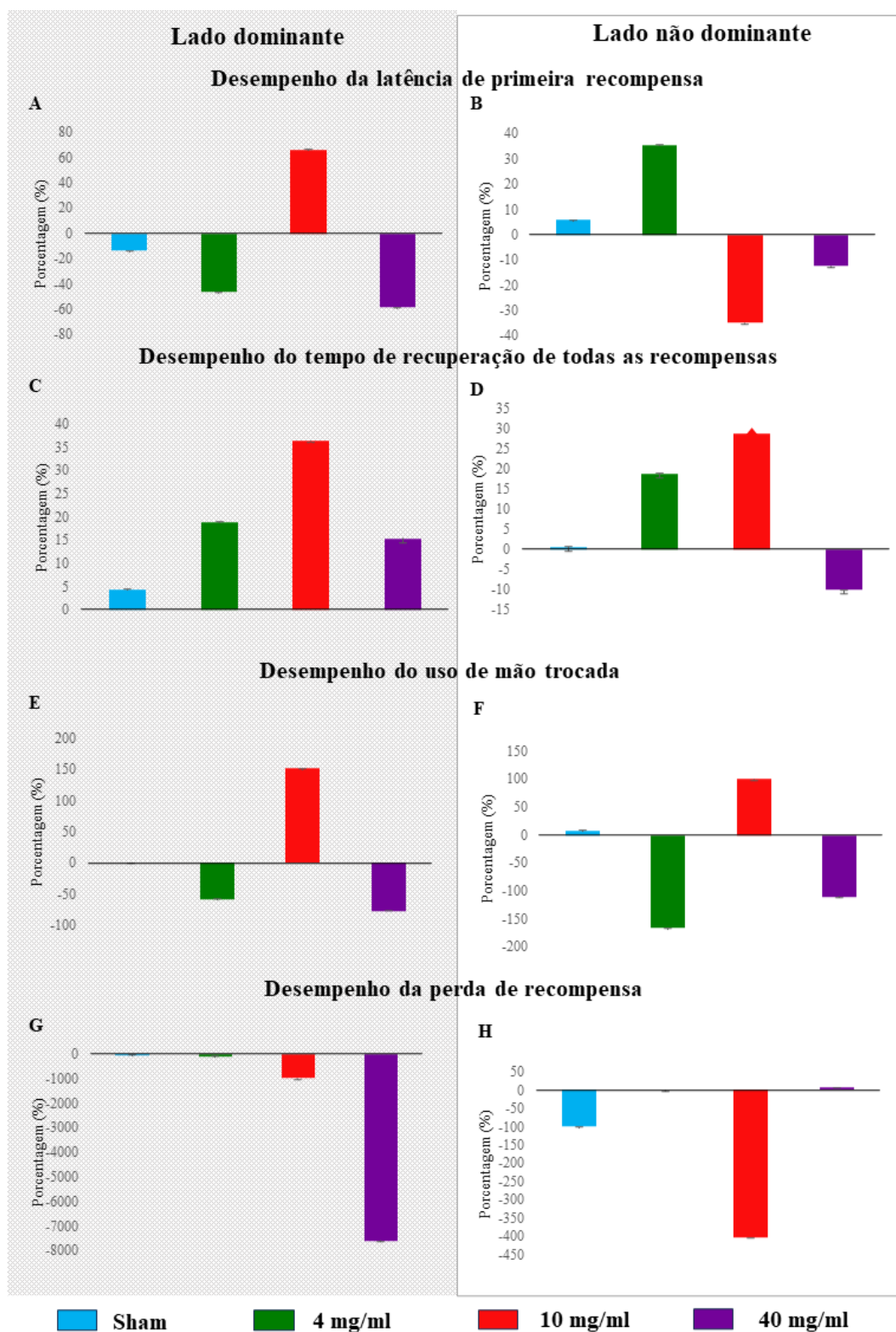


Figura 6. Índice de desempenho motor considerando comportamentais antes e depois da intervenção cirúrgica nos diferentes grupos no teste *Staircase*. **(A)** Latência da primeira recompensa do LD, tempo em segundos (s). **(B)** Latência da primeira recompensa do LND, tempo em segundos (s). **(C)** Tempo total de recuperação de todas as recompensas do LD, tempo sem segundos (s). **(D)** Tempo total de recuperação de todas as recompensas do LND, tempo sem segundos (s). **(E)** Uso de mão trocada do LD. **(F)** Uso de mão

trocada do LND. **(G)** Perda de recompensa do LD. **(H)** Perda de recompensa do LND. Os dados são apresentados como média \pm DP. (ANOVA two-way, pós teste de Tukey). * Comparado ao controle, $p < 0.01$; ** Comparado ao controle, $p < 0.05$. Azul, grupo SHAM; verde, grupo 4 mg/ml; vermelho, grupo 10 mg/ml, roxo, grupo 40 mg/ml.

Em relação ao teste do Tubo, foram observados diferentes índices de desempenho entre os grupos nos diferentes parâmetros analisados. O índice do número de pegadas do LD piorou nos grupos 4 e 10 mg/ml (Figura 8A). O índice do número de pegadas do LND reduziu significamente no grupo 4 mg/ml em relação aos demais grupos SHAM (Figura 8B). Em relação ao tempo total do LD, o grupo 4 e 10 mg/ml piorou, gastando menor tempo utilizando o lado afetado durante as sessões, com exceção do grupo 40 mg/ml (Figura 8C). De forma compensatória, o índice do tempo total do LND, nos os grupos 4 mg/ml e 10 mg/ml, diminuíram significamente (Figura 8D). Quanto à pegada do tipo indicador, o índice de desempenho diminuiu significativamente no grupo 4 e 10 mg/ml (Figura 8E). Em outros tipos de pegadas, grupo 40 mg/ml teve o pior índice (Figura 8F).

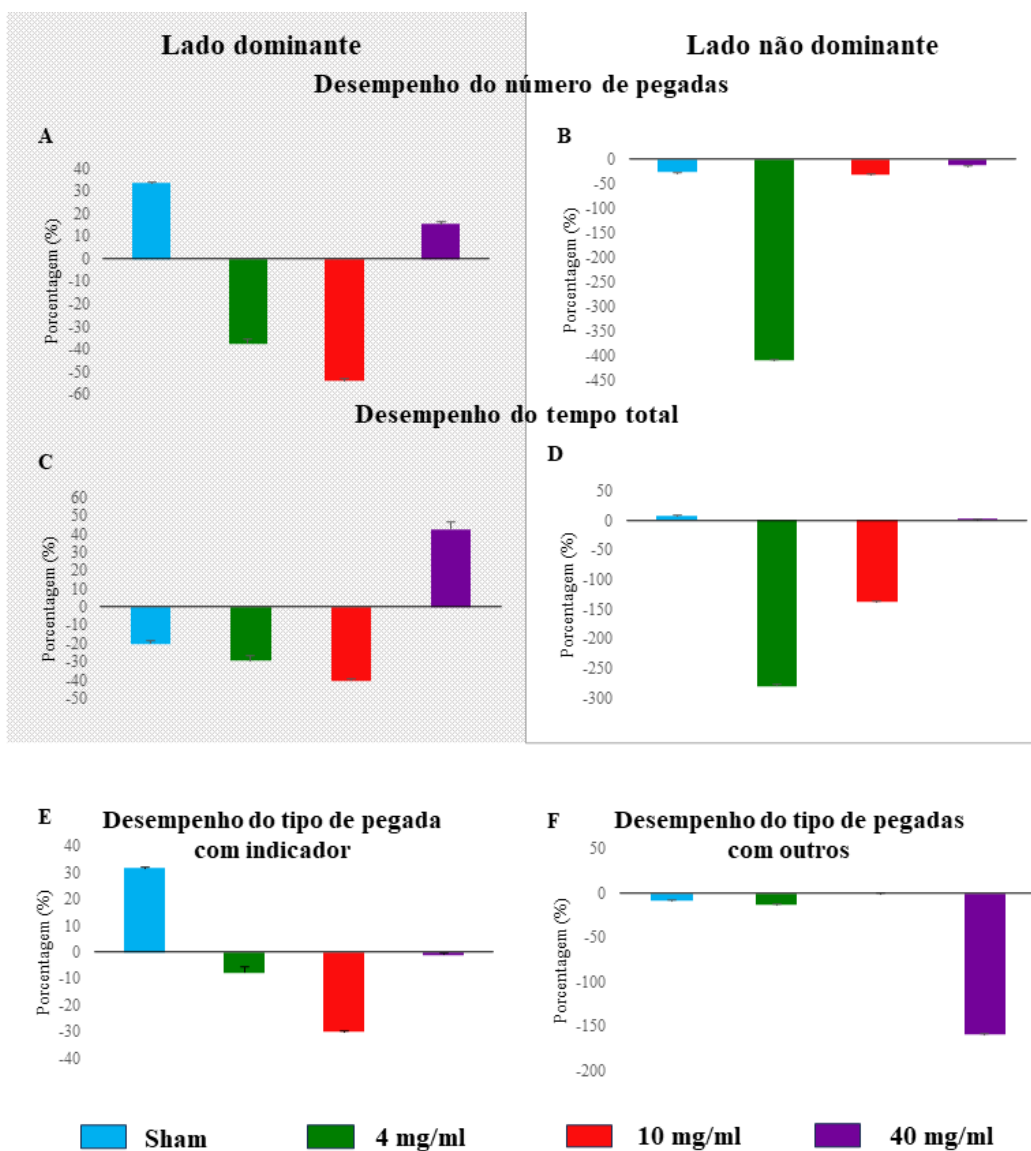


Figura 7. Índice de desempenho motor antes e depois da intervenção cirúrgica nos diferentes grupos no teste do Tubo. **(A)** Número de pegadas do LD. **(B)** Número de pegadas do LND. **(C)** Tempo total utilizando o LD. **(D)** Tempo total utilizando o LND. **(E)** Tipo de pegada indicador. **(F)** Tipo de pegada outro. Os dados são apresentados como média \pm DP. (ANOVA two-way, pós teste de Tukey). * Comparado ao controle, $p < 0.01$; ** Comparado ao controle, $p < 0.05$. Azul, grupo SHAM; verde, grupo 4 mg/ml; vermelho, grupo 10 mg/ml, roxo, grupo 40 mg/ml.

5.4 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA ALTERAM DIFERENTEMENTE A HISTOLOGIA DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

Com o intuito de associar as alterações motoras às possíveis perdas de neurônios dopaminérgicos, foi feita a análise histológica específica para neurônios dopaminérgicos. Foram analisados tecidos do núcleo de bases de todos os sujeitos submetidos à cirurgia de experimental, foi considerado os lados afetado e não afetado de cada um dos sujeitos (Figura 8). Para nível de comparação, foi feito também análise histológica de um sujeito controle.

A partir da análise representativa dos neurônios dopaminérgicos, é verificar que o grupo SHAM não aparenta ter mudanças significativas entre o lado afetado e não afetado. De forma similar, o grupo HP 4 mg/ml não apresentou mudanças significativas entre os lados, não afetado e afetado. Em contrapartida, os grupos 10 mg/ml e 40 mg/ml são os que mais é possível verificar uma aparente diferença entre o lado afetado e não afetado.

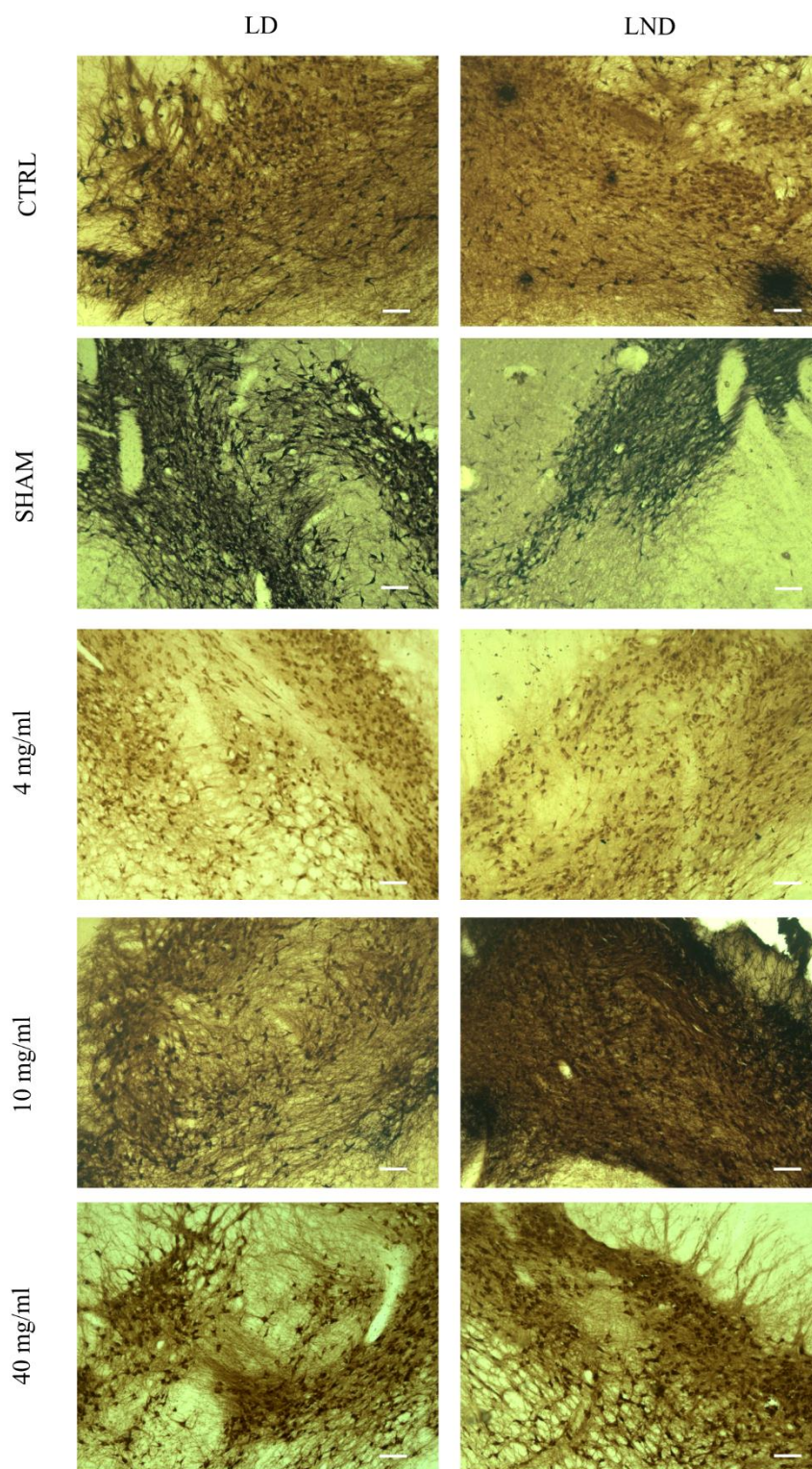


Figura 8. Imagens representativas de neurônios imunorreativos à TH na SNpc. A barra de escala representa 250 μ m. Grupo CTRL, não submetido a intervenção cirúrgica; grupo SHAM, submetido a intervenção cirúrgica somente com veículo; Grupos 4 mg/ml, 10 mg/ml e 40 mg/ml, submetidos à intervenção cirúrgica nas respectivas concentrações de 6-OHDA. LD, lado dominante; LND, lado não dominante.

6. DISCUSSÃO

6.1. CÁLCULO DAS COORDENADAS CIRÚRGICAS INDIVIDUAIS

Ao contrário dos roedores, cujas estruturas cerebrais exibem valores de tamanho e localização relativamente constantes, os cérebros dos NHPs podem ser altamente variáveis (BENTLEY et al., 2018). Portanto, variações nos fatores ambientais, como cuidados maternos, alimentação e estímulos ambientais, podem induzir uma ampla gama de fenótipos, refletindo no desenvolvimento do tamanho e formato do crânio (DE VAREILLES et al., 2022; IKONOMIDOU et al., 2001)

Sabe-se que o crescimento cerebral é acentuado durante o desenvolvimento inicial da vida. Após um período pós-natal altamente dinâmico, o crescimento cerebral estabiliza na idade adulta, quando as diferenças interindividuais se tornam bem estabelecidas. Estas diferenças resultam de padrões de crescimento variados e não lineares em diferentes estruturas cerebrais ao longo da vida (COUPÉ et al., 2017; DANIELSEN et al., 2020), levando a diferenças interindividuais no volume, forma, desenvolvimento e proporção do cérebro entre as estruturas cerebrais. a variação intraespécie aqui observada variou entre $4,04 \pm 1,03$ no anteroposterior, $3,88 \pm 0,58$ no dorsoventral e $1,42 \pm 0,62$ mm no mediolateral (ver Tabela 1). Assim, o uso da ressonância magnética para direcionamento melhora significativamente a precisão cirúrgica (PEDROSA et al., 2024)

No entanto, nos NHPs, a variabilidade dos volumes cerebrais é aproximadamente 5 vezes maior do que em roedores de laboratório e pode ser amplamente atribuída à alta variabilidade intersujeitos (OSE et al., 2022). Esta variabilidade significativa na morfologia e tamanho do cérebro apresenta um desafio único para a utilização de atlas cerebrais (PEREIRA-PEDRO et al., 2017; SANSALONE et al., 2020). Dada a considerável variabilidade exibida dentro das espécies, a análise morfométrica quantitativa em 3D mostrou resultados robustos no tamanho do cérebro da alometria geométrica e na variação da forma não associada ao tamanho em dois gêneros de Macacos do Novo Mundo. Portanto, pode ser inadequado utilizar valores médios para representar uma espécie inteira (MARROIG, 2007).

Com base nessas comparações, a margem de erro para cada coordenada nos três eixos foi calculada tomando-se a média das diferenças entre as coordenadas calculadas pelo software e as calculadas visualmente, juntamente com seu desvio padrão. Foi observado um erro médio de $0,02 \pm 0,01$ no ântero-posterior, $0,09 \pm 0,11$ no dorsoventral e $0,01 \pm 0,03$ mm no médio-lateral (ver Tabela 2). Isso pode ocorrer devido a fatores

como a resolução da ressonância magnética, possíveis artefatos de movimento descontrolado durante a aquisição da imagem e o desempenho do examinador durante o controle visual. No entanto, em comparação com o tamanho e o volume das estruturas anatômicas alvo, a margem de erro aqui obtida é insignificante e pode não estar associada a um erro cirúrgico. Por outro lado, a variação intraespécie aqui observada variou entre $4,04 \pm 1,03$ no anteroposterior, $3,88 \pm 0,58$ no dorsoventral e $1,42 \pm 0,62$ mm no mediolateral (ver Tabela 4), o que representa uma distância significativa que pode levar ao erro de direcionamento em abordagens neurocirúrgicas.

Em atlas de PNH da família Cebidae (S. MANOCHA; TOTADA R. SHANTHA; GEOFFREY H. BOURNE, 1968), as regiões de interesse aqui delimitadas, estriado e substância negra apresentam um volume estimado em centímetros. A substância negra apresenta área aproximada 9x8mm em seu maior corte e 3x4mm em seu menor, com profundidade de 12,5mm. E o núcleo caudado apresenta área 3x6mm em seu maior corte e 2x2mm em seu menor corte, com profundidade aproximada de 3,5mm. Logo a margem de erro considerada para cada um das coordenadas cirúrgicas individuais respeita os valores estimados (Tabela 1).

6.2 ANÁLISE COMPORTAMENTAL DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA NAS VIAS NIGROESTRIATAIS

A partir da análise dos testes comportamentais, é possível perceber que houve um déficit geral desempenho motor nos diferentes grupos após a inoculação de 6-OHDA. No teste *Staircase*, que exige maior habituação e treinamento, todos os grupos foram capazes de realizar o teste (Figura 4), porém a dinâmica dos dados indicativos dos fenômenos de preferência e dominância manuais foram alteradas. Paralelamente, é possível analisar o percentual de alteração da desempenho motor (Figura 6).

A latência do LD diminuiu no grupo 10 mg/ml de 6-OHDA enquanto que os grupos 4 mg/ml e 40 mg/ml foram significativamente mais lentos em relação à seus respectivos desempenhos antes da intervenção cirúrgica, o que denota uma característica de bradicinesia do parkinsonismo (VIALLET et al., 1981). Todavia, é importante considerar que a redução de latência no teste observada na primeira dosagem pode estar relacionada a possível quadro de estresse e/ou ansiedade do animal, que também são características sintomáticas da degeneração dopaminérgica (Figura 4A) (VIEIRA et al.,

2019), portanto necessitando melhor elucidação. O percentual de alteração motora da latência do LD demonstrou que houve uma piora dos grupos 4 mg/ml e 40 mg/ml, sendo esses os mais lentos para iniciar a tarefa (Figura 6A).

A latência do LND diminuiu nos grupos 4 e 10 mg/ml, o que pode ter ocorrido como um processo de compensação a nível inter-hemisférico (Figura 4B). Lesões do tipo unilateral da via-nigroestriatal podem induzir via de regulação e compensação por meio de projeções inter-hemisférica entre SN contralateral e corpo estriado ipsilateral (IYER et al., 2021). Porém de forma não compensatória, o grupo 40 mg/ml também aumentou significativamente a latência do LND devido à maior concentração de 6-OHDA (JOERS et al., 2012). O percentual de alteração do desempenho da latência do LND demonstrou piora no grupo 4 e uma melhora nos grupos 10 e 40 mg/ml (Figura 6B).

O tempo do LD reduziu consideravelmente no grupo 10 mg/ml com aumento do uso de mão trocada no LD (Figura 4C e 4E). Consequentemente, o percentual de alteração de desempenho do tempo LD melhorou no mesmo grupo, assim como no índice do uso de mão trocada (Figura 6C e 6E, respectivamente). Esses achados sustentam a hipótese do mecanismo compensatório do sistema nigroestriatal (BLESA, 2011). Obviamente, com o comprometimento da lateralidade obtido pela degeneração dopaminérgica induzida no hemisfério dominante, processos compensatórios levam a uma reconfiguração das características de preferência e dominância manuais, com nuances individuais relacionadas ao repertório motor e à neuroplasticidade que determinam os desfechos clínicos individuais. Isso pode explicar a redução do tempo de execução da tarefa para o LND para o grupo 10 mg/ml (Figura 4D), melhorando seu desempenho (Figura 6D). Além disso, houve uma redução do uso da mão trocada no LND no grupo 10 mg/ml (Figura 4F), o que confirma novamente uma melhora do desempenho motor (Figura 6F). Trata-se provavelmente de um mecanismo conjunto de compensação do lado lesionado pelo lado não lesionado (SNYDER; KELLER; ZIGMOND, 1990).

A perda de recompensa do LD parece ter sido um parâmetro dependente da concentração de 6-OHDA, os grupos tiveram um aumento significativo e o grupo 40 mg/ml aumentou de forma acentuada (Figura 4G). O percentual de alteração do desempenho motor confirma uma piora do grupo 40 mg/ml em relação aos demais (Figura 6G). A perda de recompensa do LND foi significativa em 10 mg/ml (Figura 4H), registrando o maior percentual de piora entre os grupos (Figura 6H). a perda de recompensa está diretamente relacionada à coordenação motora fina, que parece, quando

comparamos os resultados dos testes *Staircase* e teste do cano, ter sido mais claramente afetada pela intervenção.

O teste do Tubo parece ser mais sensível que o *Staircase* por se tratar de uma tarefa habitual dos primatas, sem necessitar de treinamento prévio (HOPKINS, 1995), bem como citado anteriormente, ser um teste quase em sua totalidade relacionado à coordenação motora fina, enquanto o teste *Staircase* está mais relacionado à coordenação motora global com elementos da coordenação fina. O número de pegadas LD reduziu de forma significativa nos grupos 4 e 10 mg/ml (Figura 5A), relatando uma piora do percentual de alteração motora (Figura 7A). De forma complementar, o grupo 4 mg/ml diminuiu de forma significativa o número de pegadas com o dedo indicador (Figura 5E e 7E), o que denota uma redução o movimento de pinça e, conseqüentemente do poder de preensão (LANDSMEER, 1962; NIEWOEHNER et al., 2003). De forma compensatória, o número de pegada do LND aumentou nos grupos 4 e 10 mg/ml, havendo uma alteração da preferência manual (Figura 5B e 7B) (CARVALHO et al., 2017).

Conjuntamente, o tempo utilizando o LD durante todo o teste diminuiu significativamente nos grupos 4 e 10 mg/ml (Figura 5C), enquanto o tempo do LND aumentou significativamente nos mesmos grupos. O resultado conjunto de redução do tempo do LD e aumento do tempo LND demonstra um mecanismo compensatório, em que o lado não afetado se torna mais ativo (ROEDTER et al., 2001).

6.3 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-OHDA TÊM DIFERENTES INFLUÊNCIAS NOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

As diferentes concentrações de 6-OHDA utilizadas para indução de hemiparkinsonismo apresentaram diferentes resultados histológicos, o que enfatiza a necessidade de determinar a concentração que melhor determina a perda significativa de neurônios dopaminérgicos característicos de modelo experimental parkinsoniano ((EMBORG, 2007). A análise histológica representativa demonstrou que o método é eficaz e causa morte neuronal visível a partir da concentração de 10 mg/ml (ver Figura 9). Esse achado corrobora com estudos posteriores em que concentrações de 1 a 4 mg/ml foram injetadas em *Callithrix jacchus* e nenhuma complicação motora ou alteração histológica foram detectadas(GAREA-RODRÍGUEZ et al., 2012).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho aborda a necessidade de elaborar protocolos de indução experimental para estudo de parkinsonismo em modelos de PNHs de forma robusta e específica, uma vez que não há estudos na literatura que utilizem a espécie *Sapajus apella*. O planejamento cirúrgico aborda a questão da variabilidade intraespecífica significativa no tamanho e formato do cérebro, uma grande fonte de viés em estudos baseados em atlas para cirurgia cerebral estereotáxica em NHPs (PEDROSA et al., 2024). Além disso, para espécies que são raramente usadas em pesquisas em neurociência, a falta de atlas cerebrais disponíveis pode ser superada.

Além disso, foi possível verificar que os diferentes níveis de alterações e desempenho motores induzidas 6-OHDA podem ser associados às alterações histológicas do lado afetado (IANCU et al., 2005). As concentrações de 10 e 40 mg/ml pareceram ser mais eficazes no sentido de indução de comprometimento motor e morte neuronal. Achados valiosos para fundamentar futuras descobertas acerca de modelos pré-clínicos para o estudo da DP.

Em resumo, nosso método de indução, de forma geral, pode ser altamente benéfico para áreas de pesquisa em neurociência que dependem de aparelhos estereotáxicos precisos, com complexidade processual mínima. Além disso, esperamos que nosso protocolo sirva como modelo para ambientes semelhantes, provando que contribuições científicas significativas podem emergir de regiões tradicionalmente sub-representadas em cenários de pesquisa globais.

8. REFERÊNCIAS

ANDO, K. et al. Differential effects of dopaminergic drugs on spontaneous motor activity in the common marmoset following pretreatment with a bilateral brain infusion of 6-hydroxydopamine. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 8, p. 670–680, 2017.

ANNETT, L. E. et al. Survival of Nigral Grafts within the Striatum of Marmosets with 6-OHda Lesions Depends Critically on Donor Embryo Age. **Cell Transplantation**, v. 6, n. 6, p. 557–569, 22 nov. 1997.

ARBUSTINI, E. et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 5, p. 1501–1510, 1998.

ARNASON, G.; CLAUSEN, J. On balance: weighing harms and benefits in fundamental neurological research using nonhuman primates. **Medicine, Health Care and**

Philosophy, v. 19, n. 2, p. 229–237, 1 jun. 2016.

BALTAZAR GOMEZ-MENCILLA; PAULJ. BÉDARD. Effect of Nondopaminergic Drugs on L-DOPA-Induced Dyskinesias in MPTP-Treated Monkeys. 1993.

BENTLEY, J. N. et al. A simple, inexpensive method for subcortical stereotactic targeting in nonhuman primates. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 305, p. 89–97, jul. 2018.

BLESA, J. Inter-hemispheric asymmetry of nigrostriatal dopaminergic lesion: a possible compensatory mechanism in Parkinson's disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, 2011.

BLUM, D. et al. **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease** *Progress in Neurobiology*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/pneurobio>.

BORTOFF, G. A.; STRICK, P. L. **Corticospinal Terminations in Two New-World Primates: Further Evidence That Corticomotoneuronal Connections Provide Part of the Neural Substrate for Manual Dexterity** *The Journal of Neuroscience*. [s.l: s.n.].

BOUSSET, L. et al. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 2575, 10 out. 2013.

BOVÉ, J. et al. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRX**, v. 2, n. 3, p. 484–494, jul. 2005.

BOVOLENTA, T. M. et al. **Systematic Review and Critical Analysis of Cost Studies Associated with Parkinson's Disease**. *Parkinson's Disease* Hindawi Limited, , 2017.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 3, p. 7–9, set. 2016.

BRAAK, H. et al. **Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease** *Neurobiology of Aging*. [s.l: s.n.].

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, mar. 2003b.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 24 out. 2004.

CARVALHO, W. A. et al. Interlimb Dynamic after Unilateral Focal Lesion of the Cervical Dorsal Corticospinal Tract with Endothelin-1. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 11, 13 out. 2017.

CHUDASAMA, Y.; ROBBINS, T. W. Functions of frontostriatal systems in cognition: Comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. **Biological Psychology**, v. 73, n. 1, p. 19–38, jul. 2006.

COUPÉ, P. et al. Towards a unified analysis of brain maturation and aging across the entire lifespan: A MRI analysis. **Human Brain Mapping**, v. 38, n. 11, p. 5501–5518, 24 nov. 2017.

DANIELSEN, V. M. et al. Lifespan trajectories of relative corpus callosum thickness: Regional differences and cognitive relevance. **Cortex**, v. 130, p. 127–141, set. 2020.

DAVID S GOLDSTEIN. **Pure autonomic failure and multiple system atrophy**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://neurology.thelancet.com>>.

DE VAREILLES, H. et al. Shape variability of the central sulcus in the developing brain: A longitudinal descriptive and predictive study in preterm infants. **NeuroImage**, v. 251, p. 118837, maio 2022.

DODEL, R. C. et al. Costs of drug treatment in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 13, n. 2, p. 249–254, 4 mar. 1998.

EMBORG, M. E. Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. **ILAR Journal**, v. 48, n. 4, p. 339–355, 1 jan. 2007.

ESLAMBOLI, A. Sensorimotor deficits in a unilateral intrastriatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 418–429, out. 2003a.

ESLAMBOLI, A. Sensorimotor deficits in a unilateral intrastriatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 418–429, out. 2003b.

G. MICIELI et al. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. 2003.

GALINDO, M. F. et al. 6-hydroxydopamine as preclinical model of parkinson's disease. Em: **Handbook of Neurotoxicity**. [s.l.] Springer New York, 2014. v. 2p. 639–651.

GAREA-RODRÍGUEZ, E. et al. Visualizing dopamine transporter integrity with iodine-123-FP-CIT SPECT in combination with high resolution MRI in the brain of the common marmoset monkey. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 210, n. 2, p. 195–201, set. 2012.

GASPAR, P.; FEBVRET, A.; COLOMBO, J. **Experimental Brain Research Serotonergic sprouting in primate MTP-induced hemiparkinsonism** *Exp Brain Res*. [s.l.: s.n.].

GOLDSTEIN, D. S. et al. **Cardiac Sympathetic Denervation in Parkinson Disease Background: In Parkinson disease, orthostatic hypotension can**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://annals.org/>>.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Sympathetic innervation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 855–860, 1 set. 2003.

GOMEZ-LAZARO, M. et al. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. **Journal of Neurochemistry**, v. 104, n. 6, p. 1599–1612, mar. 2008.

HAMADJIDA, A. et al. **Classic animal models of Parkinson's disease: A historical perspective.** **Behavioural Pharmacology** Lippincott Williams and Wilkins, , 1 jun. 2019.

HAYAISHI, S.; KAWAMOTO, Y. Low genetic diversity and biased distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Japanese macaque (*Macaca fuscata yakui*) on Yakushima Island. **Primates**, v. 47, n. 2, p. 158–164, 18 abr. 2006.

HEALY-STOFFEL, M. et al. Differential effects of intrastriatal 6-hydroxydopamine on cell number and morphology in midbrain dopaminergic subregions of the rat. **Brain Research**, v. 1574, p. 113–119, jul. 2014.

HENDERSON, J. M. et al. Behavioural effects of parafascicular thalamic lesions in an animal model of parkinsonism. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 2, p. 222–232, jul. 2005.

HOPKINS, W. D. Hand preferences for a coordinated bimanual task in 110 chimpanzees (*Pan troglodytes*): Cross-sectional analysis. **Journal of Comparative Psychology**, v. 109, n. 3, p. 291–297, 1995.

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1–10, jul. 2005.

ICHIZO NISHINO et al. **A NEW CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY WITH MITOCHONDRIAL STRUCTURAL ABNORMALITIES.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.gen.emory.edu/>>.

IKONOMIDOU, C. et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. Abbreviations: GABAA, γ -aminobutyric acid; NMDA; N-methyl-d-aspartate; PCP; phencyclidine; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 401–405, ago. 2001.

IYER, V. et al. The cross-hemispheric nigrostriatal pathway prevents the expression of levodopa-induced dyskinesias. **Neurobiology of Disease**, v. 159, p. 105491, nov. 2021.

JAGMAG, S. A. et al. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 19 jan. 2016.

JOERS, V. et al. Nonuniform Cardiac Denervation Observed by ¹¹C-meta-Hydroxyephedrine PET in 6-OHDA-Treated Monkeys. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35371, 23 abr. 2012.

JOERS, V. et al. Systemic administration of 6-OHDA to rhesus monkeys upregulates HLA-DR expression in brain microvasculature. **Journal of Inflammation Research**, v. 7, p. 139–149, 18 set. 2014.

JORDÁN, J. et al. Bcl-xL blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 1, p. 124–133, 2004.

KAAS, J. H. **The evolution of the complex sensory and motor systems of the human brain.** **Brain Research Bulletin**, 18 mar. 2008.

KIRK, R. G. W. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. **Science Technology and Human Values**, v. 43, n. 4, p. 622–648, 1 jul. 2018.

KOICHI WAKABAYASHI; HITOSHI TAKAHASHI. Neuropathology of Autonomic Nervous System in Parkinson's Disease. 1997.

KUNIKOWSKA, G.; JENNER, P. **6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc-and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase** **Brain Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bres>.

LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 12, 2012.

LANDSMEER, J. M. F. Power Grip and Precision Handling. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 21, n. 2, p. 164–170, 1 jun. 1962.

LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; FORNO, L. S. **-METHYL-4-PHENYLPYRIDINIUM ION (MPP+): IDENTIFICATION OF A METABOLITE OF MPTP, A TOXIN SELECTIVE TO THE SUBSTANTIA NIGRA** **Neuroscience Letters**. [s.l: s.n.].

MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L. et al. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 3, p. 966–975, 13 ago. 2009.

MARROIG, G. When size makes a difference: allometry, life-history and morphological evolution of capuchins (*Cebus*) and squirrels (*Saimiri*) monkeys (*Cebinae*, *Platyrrhini*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 20, 2007.

MARSHALL, J. W. B.; BAKER, H. F.; RIDLEY, R. M. **Contralesional neglect in monkeys with small unilateral parietal cortical ablations.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/bbr>.

MORALES, I. et al. The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 1, p. 81–95, 18 out. 2016.

NIEWOEHRNER, W. A. et al. Manual dexterity in Neanderthals. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 395–395, mar. 2003.

OSE, T. et al. Anatomical variability, multi-modal coordinate systems, and precision

targeting in the marmoset brain. **NeuroImage**, v. 250, p. 118965, abr. 2022.

PEDROSA, L. R. R. et al. From imaging to precision: low cost and accurate determination of stereotactic coordinates for brain surgery *Sapajus apella* using MRI. **Frontiers in Neuroscience**, v. 18, 1 fev. 2024.

PEREIRA-PEDRO, A. S. et al. Midsagittal Brain Variation among Non-Human Primates: Insights into Evolutionary Expansion of the Human Precuneus. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 90, n. 3, p. 255–263, 2017.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 23 mar. 2017.

POIRIER, L. J. et al. **STRIATAL AMINES, EXPERIMENTAL TREMOR AND THE EFFECT OF HARMALINE IN THE MONKEY**. [s.l: s.n.].

PRESCOTT, S. L. et al. **The skin microbiome: Impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming**. **World Allergy Organization Journal** BioMed Central Ltd, , 22 ago. 2017.

PRZEDBORSKI, S. et al. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1265–1274, 20 mar. 2001.

PRZEDBORSKI, S.; TIEU, K. Toxic animal models. Em: **Neurodegenerative Diseases**. [s.l.] Cambridge University Press, 2005. p. 196–221.

RANA, A. Q. et al. Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 549–562, 4 maio 2015.

RIDLEY, R. et al. Neglect of memory after dopaminergic lesions in monkeys. **Behavioural Brain Research**, v. 166, n. 2, p. 253–262, 30 jan. 2006.

ROEDTER, A. et al. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: Evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. **Journal of Comparative Neurology**, v. 432, n. 2, p. 217–229, 2 abr. 2001.

S. MANOCHA; TOTADA R. SHANTHA; GEOFFREY H. BOURNE. A stereotaxic atlas of the brain of the Cebus Monkey (*Cebus apella*). 1968.

SANSALONE, G. et al. Variation in the strength of allometry drives rates of evolution in primate brain shape. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1930, p. 20200807, 8 jul. 2020.

SANTANA, M. B. et al. Spinal Cord Stimulation Alleviates Motor Deficits in a Primate Model of Parkinson Disease. **Neuron**, v. 84, n. 4, p. 716–722, nov. 2014.

SCHMIDLIN, E. et al. Behavioral Assessment of Manual Dexterity in Non-Human Primates. **Journal of Visualized Experiments**, n. 57, 11 nov. 2011.

SIMOLA, NICOLA; MORELLI, M.; CARTA, A. **MECHANISMS OF NEUROTOXICITY OF 6-OHDA**. [s.l: s.n.].

SNYDER, G. L.; KELLER, R. W.; ZIGMOND, M. J. Dopamine efflux from striatal slices after intracerebral 6-hydroxydopamine: evidence for compensatory hyperactivity of residual terminals. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 253, n. 2, p. 867–76, maio 1990.

STEFANIS, L. -Synuclein in Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. a009399–a009399, 1 fev. 2012.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, set. 2011.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. **Epidemiology of Parkinson's disease**. **Journal of Neural Transmission** Springer-Verlag Wien, , 1 ago. 2017.

UNGERSTEDT, U. Striatal Dopamine Release after Amphetamine or Nerve Degeneration Revealed by Rotational Behaviour. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 82, n. S367, p. 49–68, 22 dez. 1971.

VEGAS, A. J. et al. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 345–352, 1 mar. 2016.

VERMILYEA, S. C.; EMBORG, M. E. The role of nonhuman primate models in the development of cell-based therapies for Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 3, p. 365–384, 22 mar. 2018.

VIEIRA, J. C. F. et al. Anxiety-like behavior induced by 6-OHDA animal model of Parkinson's disease may be related to a dysregulation of neurotransmitter systems in brain areas related to anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 371, p. 111981, out. 2019.

WILLIAMS, L.; WILKINS, &. **MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons**. [s.l: s.n.].

YUN, J.-W. et al. Behavior, PET and histology in novel regimen of MPTP marmoset model of Parkinson's disease for long-term stem cell therapy. **Tissue engineering and regenerative medicine**, v. 13, n. 1, p. 100–109, fev. 2016.

ANEXO I - TERMO DE APROVAÇÃO DO ESTUDO EXPERIMENTAL NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA



Certificado nº 14/2022

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Iuminando parkinson com optogenética: abordagens para o restabelecimento das funções dos núcleos da base em modelo primata**”, registro nº 44/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora Lana Viana Krejcová, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - através da carta datada de 25 de agosto de 2022 solicita prorrogação do prazo de execução do projeto para vigência até 15 de dezembro de 2023. Informamos que após análise da solicitação e justificativa o protocolo encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

Obs.: O Certificado nº 04/2021 de 25/03/2021, perde sua validade a partir desta data.

| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Vigência da autorização | 15 de dezembro de 2023 |
| Espécie/linhagem/raça | Macaco-prego – <i>Sapajus apella</i> |
| Nº de animais | 5 |
| Peso/Idade | 700g a 1Kg / adultos |
| Sexo | Macho |
| Origem | Centro Nacional de Primatas-CENP |

De acordo com Orientação Técnica nº 8, de 18 de março de 2016 do CONCEA

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 26 de agosto de 2022.

Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
Secretaria CEUA/IEC/MS

Daniela Cristiane da Cruz Rocha
Coordenadora Suplente CEUA/IEC/MS

ANEXO II – ARTIGO PUBLICADO



OPEN ACCESS

EDITED BY
Shengliang Liang,
Fujian University of Traditional Chinese
Medicine, China

REVIEWED BY
Ashik Banerjee,
University of Otago, New Zealand
David Schaeffer,
University of Pittsburgh, United States

*CORRESPONDENCE
Lane V. Krejcová
✉ lane@ufpa.br

RECEIVED 19 October 2023
ACCEPTED 17 January 2024
PUBLISHED 01 February 2024

CITATION
Pedrosa LRR, Leal LCP, Muniz JAPC,
Bastos COO, Gomes ID and
Krejcová LV (2024) From imaging to precision:
low cost and accurate determination of
stereotaxic coordinates for brain surgery
Sapajus apella using MRI.
Front. Neurosci. 18:1324669.
doi: 10.3389/fnins.2024.1324669

COPYRIGHT
© 2024 Pedrosa, Leal, Muniz, Bastos, Gomes
and Krejcová. This is an open-access article
distributed under the terms of the Creative
Commons Attribution License (CC BY). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

From imaging to precision: low cost and accurate determination of stereotaxic coordinates for brain surgery *Sapajus apella* using MRI

Lais Resque Russo Pedrosa¹, Leon C. P. Leal^{1,2},
José Augusto P. C. Muniz², Calo de Oliveira Bastos¹,
Bruno D. Gomes¹ and Lane V. Krejcová^{3*}

¹Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil, ²National Primate Center, Institute Evandro Chagas, Ananindeua, Brazil

The capuchin monkey (*Sapajus apella*), a New World monkey species, exhibits prominent characteristics that make it an ideal model for neuroscience research. These characteristics include its phylogenetic traits, telencephalization coefficient, anatomical structures and pathways, genetic profile, immune responses, cognitive abilities, and complex behavioral repertoires. Traditionally, methodologies for stereotaxic neurosurgery in research models have relied on the use of brain atlases. However, this approach can lead to errors due to the considerable variation in brain size and shape among individual monkeys. To address this issue, we developed a protocol for deriving individual coordinates for each monkey using a straightforward and relatively inexpensive method involving MRI imaging. Our protocol utilizes a specially designed, 3D-printed stereotaxic head-holder that is safe to use with an MR magnet, non-invasive placement of fiducial markers, and post-processing with open-source software. This approach enhances MRI data visualization, improves anatomical targeting, and refines the design of neurosurgical experiments. Our technique could also prove beneficial in other areas of neuroscience research that require accurate calculation of stereotaxic coordinates. Furthermore, it could be useful for other nonhuman primate species for which brain atlases are typically unavailable.

KEYWORDS

non-human primates, magnetic resonance imaging, brain, neurosurgery, stereotaxic coordinates

1 Introduction

The refinement of neurosurgery techniques for the manipulation of cortical and subcortical targets is crucial for obtaining reliable and reproducible results. This is fundamental to neurology and neuroscience research. Non-human primates (NHPs) serve as invaluable animal models for predicting accurate preclinical results in biomedical research. Despite representing only a small proportion of vertebrate animals, many species are utilized in neuroscience research. Their value as predictive models are further enhanced due to their sophisticated behavior, and the anatomical and functional similarities of their nervous systems

to humans (Chudasama and Robbins, 2006; Arnason and Clausen, 2016) (see Table 1).

Stereotactic neurosurgery methodologies and neurophysiological microelectrode recordings in neuroscience research typically rely on brain atlases. These atlases are based on the assumption that morphological features are consistent across individuals relative to cranial landmarks such as the bregma, interaural line, and infra-orbital ridges. Using a stereotactic device, the atlas is created from a few subjects' *ex-vivo* brain histology data to map and target specific brain regions by coordinates (Palazzi et al., 2008; Hardman and Ashwell, 2012). This approach is quite successful in rodents due to low intersubject variability, which across species, is reportedly less than 1 mm (Palazzi et al., 2008; Paxinos and Franklin, 2019). However, in NHPs, the variability of brain volumes is approximately 5-fold larger than in laboratory rodents and can be largely attributed to high intersubject variability (Ose et al., 2022). This significant variability in brain morphology and size presents a unique challenge for the use of brain atlases (Pereira-Pedro et al., 2017; Sansalone et al., 2020). Given the considerable variability exhibited within species, quantitative 3D morphometric analysis showed robust results in geometric allometry brain size and shape variation not associated with size in two New World Monkeys genera. Therefore, it may be inappropriate to use mean values to represent an entire species (Marroig, 2007).

Moreover, brain atlases for NHPs are largely available for the species most commonly used in neuroscience research, such as Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), Cynomolgus (*Macaca fascicularis*), and Marmosets (*Callitrix jacchus*). However, there are scarce references for species that are not among these, such as the robust capuchin monkeys (*Sapajus apella*), New World species with prominent characteristics for the study of complex neurological functions (Muniz et al., 2021). Species of the genus *Sapajus* have been successfully used as good models to elucidate cortical and subcortical anatomical connections (Sousa et al., 1991; Rosa et al., 1993; Adams et al., 2000). To the best of our knowledge there is only one atlas available for *Sapajus apella*, published in 1968 (Manocha et al., 1968). At that time, the genus *Cebus* comprised only four species: *Cebus albifrons*, *Cebus olivaceus*, *Cebus capucinus*, and *Cebus apella*. These were later separated into two distinct clades based on evidence from morphological, phylogenetic, and biogeographic studies, giving rise to two genera: the gracile (untufted) capuchins, representing the genus *Cebus*, and the robust (tufted) capuchins, representing the genus *Sapajus* (Alfaro et al., 2012).

Robust capuchin monkeys (*Sapajus apella*) are found in South America and are endemic to the Amazonian region. They represent one of the most widespread primates in the Neotropics. They are not an endangered species and breed well in captivity, easily adapting to human contact (Ryland et al., 1997). Although not traditionally used

TABLE 1 Comparison between different species of non-human primates used in neuroscience research.

| | <i>Callithrix jacchus</i> | <i>Sapajus apella</i> | <i>Macaca Mulatta</i> | <i>Chlorocebus aethiops</i> | <i>Macaca fuscata</i> |
|--|--|--|--|--|--|
| General Biologic Characteristics | Small body size (~400 g) | Larger body size (~4 kg) | Larger body size (~7 kg) | Larger body size (~8 kg) | Larger body size (~11 kg) |
| | Rapid development (~12–15 months to sexual maturity) | Slower development (~5–7 yr. to sexual maturity) | Slower development (~4–7 yr. to sexual maturity) | Slower development (~5 yr. to sexual maturity) | Slower development (~4–7 yr. to sexual maturity) |
| | Old age reached early (~8 yr) | * | * | * | * |
| | Short-lived (~5–7 yr. in captivity, with a maximum of 16–17 years) | Longer-lived (40–50 years in captivity) | Longer-lived (~27 years in captivity) | Longer-lived (13–30 years in captivity) | Longer-lived (~27 years in captivity) |
| | Twin births common | Single births common | Single births common | Single births common | Single births common |
| | Short gestation (~4.5 months) | Longer gestation (6 months) | Longer gestation (6 months) | Longer gestation (6 months) | Longer gestation (6 months) |
| | Short inter-litter interval (~5–7 months) | Longer inter-litter interval (~21–24 months) | Longer inter-litter interval (~12-months) | Longer inter-litter interval (~9-months) | Longer inter-litter interval (~12-months) |
| | Greater phylogenetic distance to humans | Smaller phylogenetic distance to humans | Smaller phylogenetic distance to humans | Smaller phylogenetic distance to humans | Smaller phylogenetic distance to humans |
| Morphofunctional characteristics of the nervous system | Absolutely and relatively small, unconvoluted brains (among the smallest relative to body size) | Absolutely and relatively larger, convoluted brains | Absolutely and relatively larger, convoluted brains | Absolutely and relatively larger, convoluted brains | Absolutely and relatively larger, convoluted brains |
| | Higher-order parietal, temporal and prefrontal areas | Higher-order parietal, temporal and prefrontal areas | Higher-order parietal, temporal and prefrontal areas | Higher-order parietal, temporal and prefrontal areas | Higher-order parietal, temporal and prefrontal areas |
| | Lack of monosynaptic projections of corticospinal neurons onto the motor neurons of the spinal cord ventral horn | Presence of monosynaptic projections of corticospinal neurons onto the motor neurons of the spinal cord ventral horn | Presence of monosynaptic projections of corticospinal neurons onto the motor neurons of the spinal cord ventral horn | Presence of monosynaptic projections of corticospinal neurons onto the motor neurons of the spinal cord ventral horn | Presence of monosynaptic projections of corticospinal neurons onto the motor neurons of the spinal cord ventral horn |

in neuroscience research, they serve as excellent experimental models due to their ease of handling, adaptability, and reproducibility (Table 2). They exhibit intricate neuronal circuitry, a high encephalization rate, a strong tendency toward exploitation and manipulation, complex social behaviors, and cognitive abilities, such as tool usage (Visalberghi, 1993). These characteristics, along with other cost–benefit related factors, make them a very interesting research model for both basic and applied studies of the nervous system (Muniz et al., 2021).

To address the limitations of neurosurgical procedures for NHP species that are not often used in research, we present a low-cost and easily attainable method in this study. This method uses Magnetic Resonance Imaging (MRI) to accurately determine the precise coordinates of brain areas in *Sapajus apella*. The MRI sessions targeted subcortical areas, but this approach can be applied to a range of procedures that require stereotactic localization of both cortical and subcortical structures in different NHP species. The methodologies and technologies we have developed are highly pertinent in regions where resources are more constrained. Our protocol leverages locally available resources and is tailored to the specific ecological and socio-economic context of Brazil.

2 Materials and methods

2.1 Animal handling and ethics

The participants were seven adult male capuchin monkeys (*Sapajus apella*) from a colony at the National Primates Center primate facilities in Ananindeua, Pará, Brazil. The animals were 21.14 ± 5.17 years old and weighed 4.3 ± 0.99 kg (Table 3). They were housed in pairs in standard cages, each measuring $2.5 \times 2.0 \times 2.5$ m. Each cage had a communication window that allowed free movement in a total space of $2.5 \times 4.0 \times 2.5$ m. The cages were regularly enriched with toys and objects to facilitate climbing and were cleaned regularly. The lighting followed a regular day/night cycle provided by natural light (latitude $01^\circ 21' 56''$ S; longitude $48^\circ 22' 20''$). The animals' diet consisted of specific chow for laboratory animals, specifically for non-human primates, and was offered daily. Fruits and natural juice were also part of the diet. Water was available *ad libitum*. All procedures were performed according to the guidelines of Directive 2010/63/EU of the European Union and under the approval of the Ethics Committee for the Use of Animals from the Evandro Chagas Institute (CEUA/IEC), protocol numbers 45/2016 and 37/2018.

2.2 Preparation for imaging procedures

The imaging procedures were performed with the animals anesthetized by using 9 mg/kg of pethidine and 1.2 mg/kg of midazolam, followed by propofol at 2 mg/kg maintained by infusion at the rate of 0.4 mg/kg/min (Galante et al., 2019). The animals were transported to the imaging facilities in portable stainless steel containment cages ($0.80 \text{ m} \times 0.90 \text{ m} \times 0.80 \text{ m}$), with constant anesthetic monitoring by a veterinarian and two handling technicians. For proper positioning of the animals to enter the MRI machine, they were placed in a non-metallic (polylactic acid plastic/PLA) stereotactic apparatus (a 3D printed copy of the original stereotactic apparatus—Narishige®, see Figures 1, 2 for some details). Correct placement of ear bars into the

TABLE 2 The number of articles using *Sapajus apella* as an animal model in neuroscience research per decade.

| Species | Number of articles (2003–2013) | Number of articles (2014–2023) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>Sapajus apella</i> | 21 | 48 |
| <i>Callithrix jacchus</i> | 117 | 422 |
| <i>Macaca mulatta</i> | 1,181 | 2,190 |
| <i>Chlorocebus aethiops</i> | 527 | 509 |
| <i>Macaca fuscata</i> | 11 | 50 |

For details, see [Supplementary material S1](#).

TABLE 3 Characteristics of the experimental subjects.

| Subject | Sex | Age | Weight (Kg) |
|---------|-----|-----|-------------|
| AM-BEM | M | 18 | 4.130 |
| AM-BEG | M | 18 | 3.914 |
| AM-AOR | M | 28 | 4.288 |
| AM-ASA | M | 28 | 4.362 |
| AM-AXD | M | 23 | 4.362 |
| AM-BBH | M | 17 | 3.210 |
| AM-BCL | M | 16 | 3.536 |

acoustic meatus, and placement of the mouth adaptor and orbital bars were performed to guarantee alignment of the orbitomeatal plane. Small fish oil capsules were glued to the head at the locations of the infraorbital foramen, and the tip of each ear bar was coated with cotton embedded in a fish oil solution, to increase signal in these areas and facilitate further localization. The animal in the apparatus was then positioned on an MRI bed-sled that fit into the bore of the MRI machine. An 8-channel receive coil was placed over this stereotactic system (see Figure 3A). To enhance flexibility and ensure animal safety, the orbital bars and the edges of the ear bar were coated with industrial silicone (Figure 3B). After the image acquisition, the anesthetic supply was suspended, and the animal was monitored until it fully recovered.

2.3 Assessment of MRI compatibility

To ensure that the stereotactic device does not cause image loss, an MRI was also acquired using a phantom framed and frameless. Phantom volumes were calculated using rendering and parameters calculations of SLICER 3D® software (see [Supplementary material S3](#)). To define the SNR (Signal-to-Noise Ratio) values of each image, the average signal intensity was calculated and then divided by the standard deviation of noise reference. The average signal intensity was measured using ROI with a 10-point square in the center of each image. The reference noise, ROI with a 10-point square in the top left corner of each image.

2.4 Image acquisition and data processing

MR anatomical images were acquired in a SIGNA™ Creator 1,5 T using a 3D T1 Cube (voxel/pixel ratio = 1). Whole-brain images were

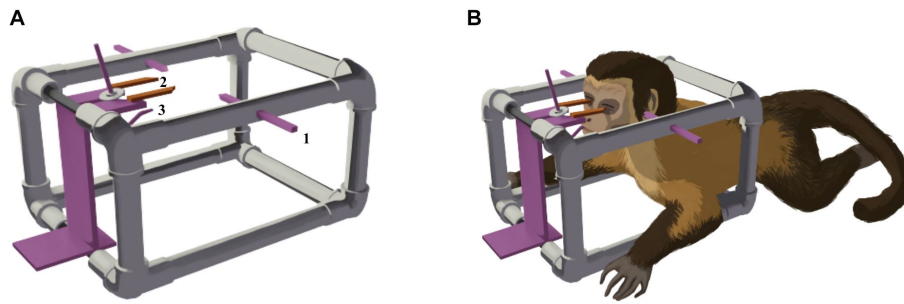


FIGURE 1
(A) Diagram of the 3D-printed, non-metallic stereotactic apparatus. The ear bars (1), orbital bars (2), and mouth adaptor (3) are similar to those used in the surgical apparatus. **(B)** Schematic drawing of the animal positioned in the apparatus for image acquisition. The ear bars are positioned in the right and left external acoustic meatus, the eyepieces are on the right and left inferior orbital margins, and the mouth adaptor is securely fixed to the palatus.

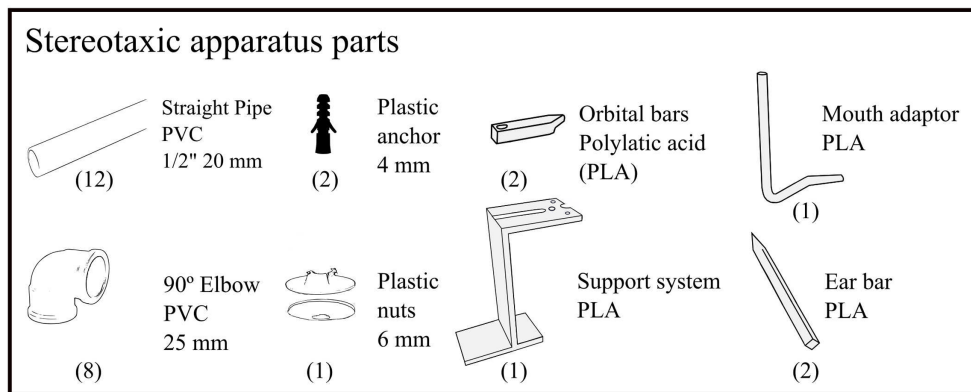
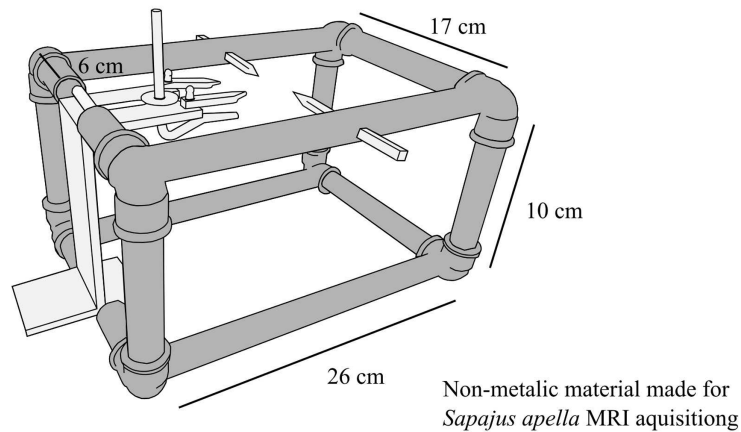
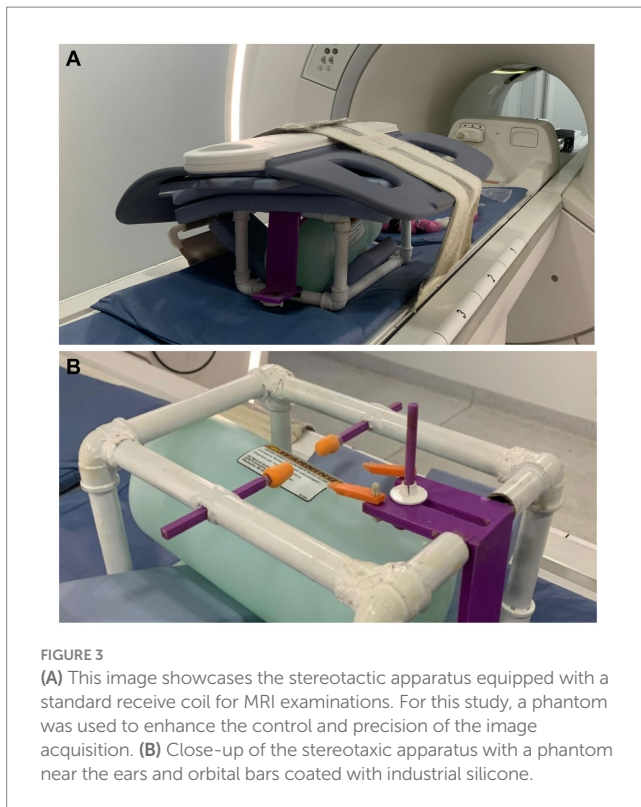


FIGURE 2
 Non-metallic apparatus for MRI acquisition. The frame, depicted in dark gray, was constructed from utility engineering materials, including PVC pipes and elbows. The components in lighter gray were produced using a Sethi3D S3 printer, which employs Fused Deposition Modeling (FDM) technology. Polylactic acid (PLA) was chosen for printing due to its high resolution, structural rigidity, and minimal shrinkage. The 3D models of each component can be accessed in the .STL file (refer to [Supplementary material S2](#)). Assembly was made easy by straightforward hardware fittings. The alignment of the stereotaxic device was executed with precision using a square and level.

acquired in a 3D volume with a 256x256x256mm matrix; a slice thickness of 0.6mm, NEX=1, TR=500 ms, and a minimum echo time. Images were uploaded in DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) format. Post-processing was performed in SLICER 3D® software. This software provides a tridimensional reconstruction of the animal's brain through MRI

sections uploaded in DICOM files. These reconstructions were used for brain volume rendering and calculation, followed by the placement of anatomical (infraorbital foramina, acoustic meatus) and fiducial markers (middle point of the interaural line) that were used as references for aligning the stereotactic planes. For a step-by-step description of the procedures on the software, see



[Supplementary material S3](#). The anteroposterior zero plane (AP-0) was represented by a straight line passing through the width of the brain at the center of the external auditory meatus. The origin (zero point) of the stereotactic coordinates corresponded to the midpoint between the two ear-bars, with the horizontal plane parallel to the orbitomeatal (OM) plane as determined by the two ear-bars and two eye-bars. The axial, coronal, and sagittal planes were then aligned perpendicularly at the zero point ([Figure 4](#)).

2.5 Determination of the stereotaxic coordinates

After the image rendering and placement of the reference planes, 14 potential surgical targets were placed in easily evident and well-defined brain structures: corpus callosum (genus – G, and splenium – S), anterior horn of lateral ventricles (left – A1 and right – A2), posterior horn of the lateral ventricles (left – P1 and right – P2), substantia nigra (four points distributed laterally through the nucleus length – SN1-4) and caudate nucleus (four points distributed anteroposteriorly through the nucleus length – C1-4) ([Figures 5A,B](#)). The coordinates of each target were calculated automatically by the 3D Slicer software. All coordinates calculated by the program were visually confirmed by two experimenters who measured the target points manually using the software's rule ([Figure 5C](#)).

2.6 Statistical analysis

We performed statistical analysis using GraphPad Prism1 8.0 Software. First, we tested the normality (Kolmogorov–Smirnov) and

homogeneity (Levine test) of the data. A parametric statistical analysis using ANOVA (One-way, $\alpha=0.05$, Tukey post-test) was performed for each axis (AP, DV, ML) to detect differences between coordinates. Pearson correlation coefficients were calculated to verify possible correlations between stereotaxic coordinates, brain volumes, and cephalic perimeters. The coefficient of variation was calculated for axis coordinates and brain volumes. The confidence interval was set to 95% ($p<0.05$).

For MRI compatibility comparisons, we tested the normality test (Shapiro–Wilk). A non-parametric statistical analysis using the Mann–Whitney test (U, $\alpha=0.05$) was performed for SNRs values to detect any device susceptibility on MRI acquisition.

3 Results

3.1 Assessment of MRI compatibility

The same MRI acquisition protocol was conducted with a phantom in the stereotactic system and solely phantom to assess MRI compatibility comparisons ([Table 4](#) and [Supplementary material S1](#)). There is no significant difference in SNR values ($p=1$). This confirmed that there was no interference in MRI acquisition, which validates the use of the machined non-metallic stereotactic apparatus. Note there is no difference induced by the device ([Figure 6](#)).

3.2 Normality test

The normality test identified one of the animals (AM-AOR/Velinho) as an outlier. Given that the MRI images taken for this animal showed a significant movement artifact, which made it difficult to place the markers and surgical targets, we excluded this subject from the sample. The results of the normality tests (Kolmogorov–Smirnov) are presented in [Table 5](#).

3.3 Individual calculation of stereotaxic coordinates

The stereotactic coordinate calculations were performed individually according to the procedures described above. The individual coordinates for each of the surgical targets, and for the three anatomical axes are presented in [Table 6](#). ANOVA tests comparing the coordinates for all animals in each target did not show significant differences between the measurements obtained for the subjects. The averages were significantly different enough to reject the null hypothesis of coordinates equality between monkeys at each axis (AP [$p=0.98$]; DV [$p=0.19$]; ML [$p=0.76$]).

3.4 Surgical confirmation of the coordinates

The surgical planning yielded robust results in terms of experimental accuracy. The surgical procedure, aimed at the basal ganglia, was informed by coordinates determined through MRI Slicer 3D processing and demonstrated efficiency. The conventional

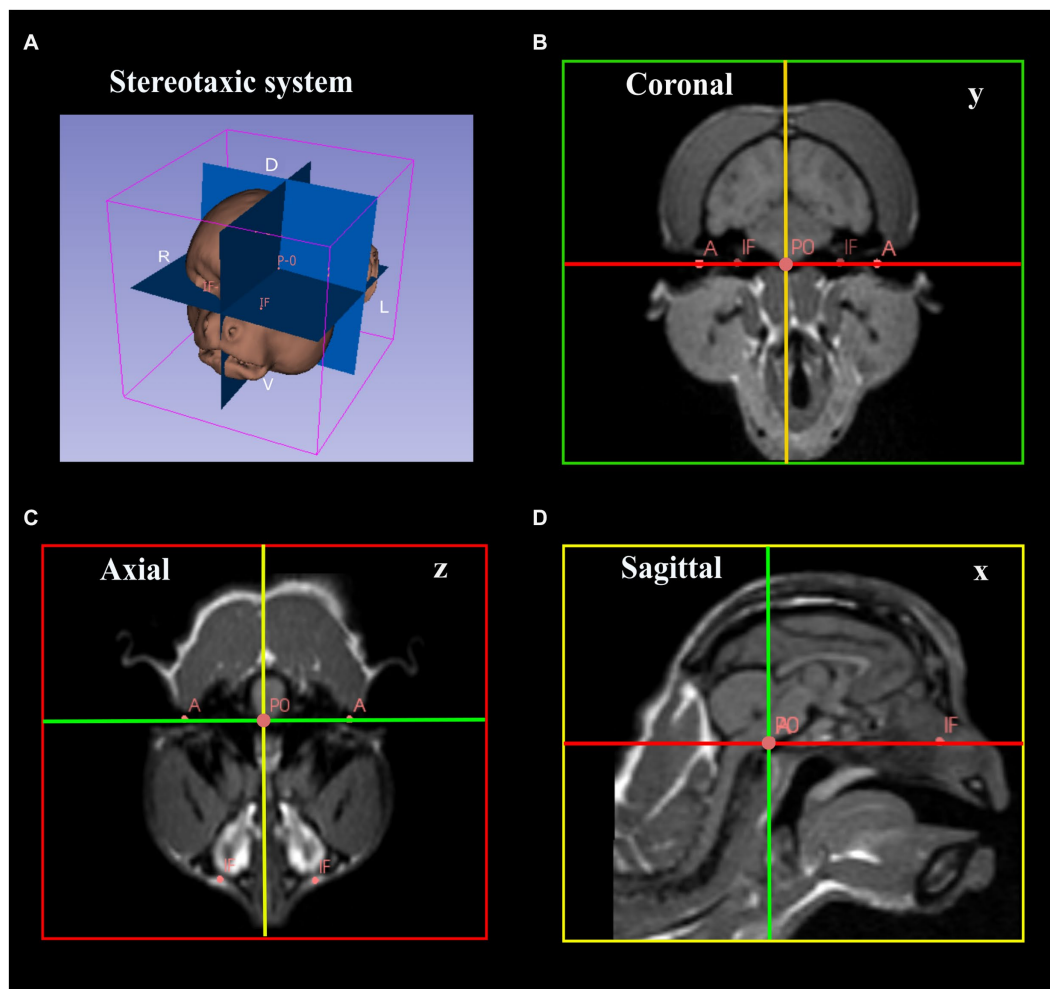


FIGURE 4

Image data processing for determination of stereotactic coordinates. (A) Image rendering and placement of the reference planes. (B–D) Placement of anatomical and fiducial markers and alignment of the coronal, axial, and sagittal planned perpendicularly and aligned with the reference points. (B) Coronal image passing through the intermeatus line (green line, y). (C) Axial image passing through the transverse axis (red line, z). (D) Sagittal image passing through the longitudinal fissure (yellow line, x) (A, Accoustic meatus; IF, infraorbital foramen; PO, the origin).

apparatus Narishige® was used for surgical manipulation. Our surgical protocol involved unilateral injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra and caudate nucleus to induce a reduction in dopaminergic neurons (see Figure 7).

4 Correlation analysis of brain coordinates and volumes

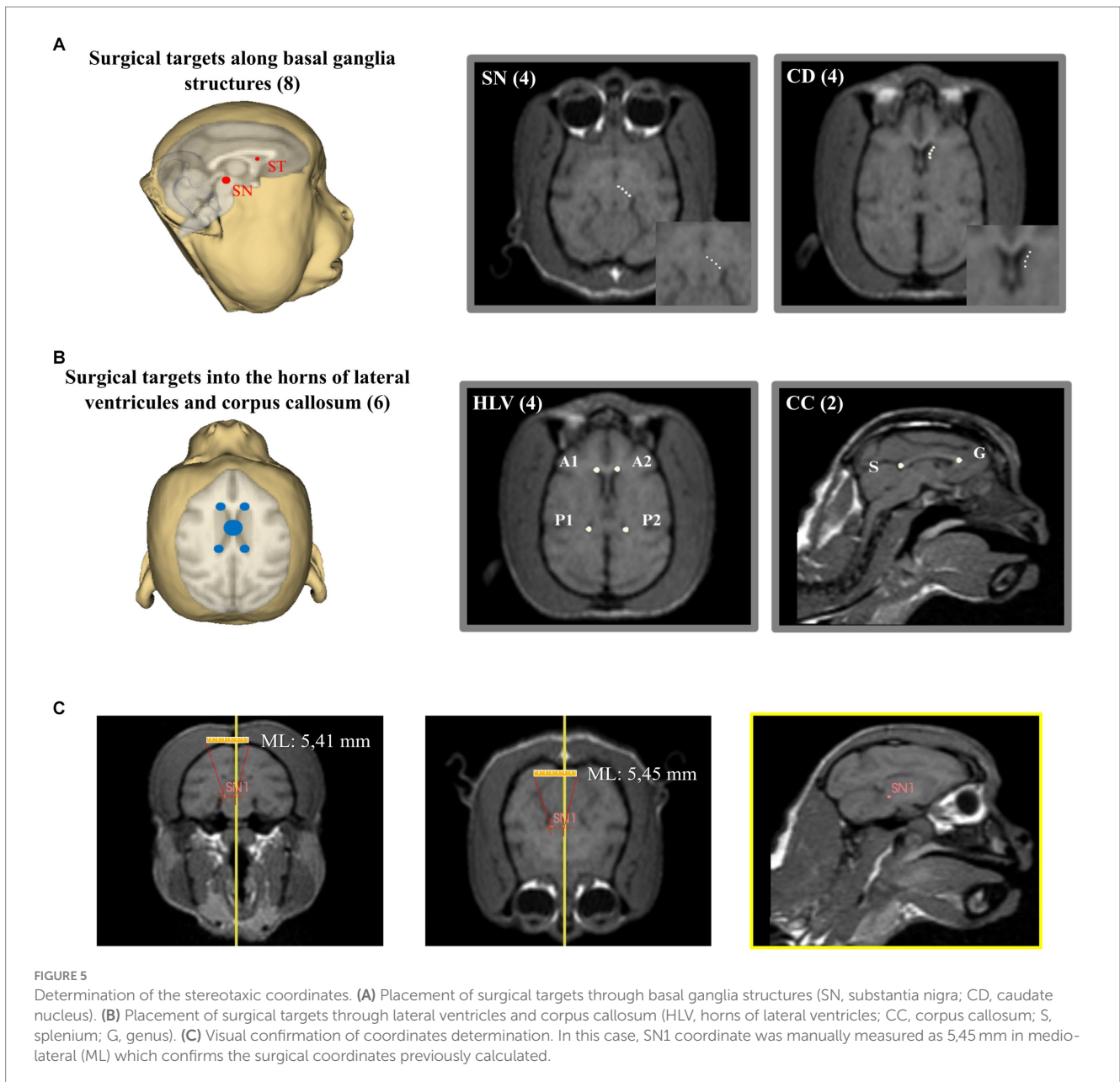
We observed no significant correlation between brain volumes and stereotactic coordinates on either axis. This suggests that the variability in coordinates does not mirror changes in overall brain volume. In other words, variations in brain volume might be indicative of nonlinear differences in skull size and shape. To demonstrate this, we arranged the data on brain volumes and coordinates in descending order and emphasized the coordinates corresponding to each animal's brain volume. For clearer visualization, we assigned different colors to each subject's brain, creating a coordinate matrix for each animal (see Figure 8).

4.1 Coefficient of variation

The CV for brain volumes was 9.4%. The COV for all coordinates in different axes can be seen in Figure 9. This suggests a non-linear variation, with a higher COV value observed for AP coordinates.

5 Discussion

In our study, we described a technique in which MRI imaging was used to obtain stereotactic coordinates for different surgical targets in *Sapajus apella*, a gyrencephalic New World species that is a promising model for many approaches in neuroscience research. The method described here represents an important experimental refinement when compared to conventional methods (see MRI processing guide in Supplementary material S1). In primate experiments, atlas-based stereotaxy is commonly used. Errors in targeting are generally a result of either morphologic differences between the individual macaque brains, or human errors in identifying the brain landmarks (Subramanian et al.,



2005). These errors in targeting and the consequent misplaced targeting are rarely reported but should be included in future publications.

Moreover, the availability of brain atlases for different species of non-human primates is scarce, and the available atlases are either entirely based on a single animal or lack adequate 3D data (Paxinos et al., 2000). As mentioned, the only brain atlas available for capuchin monkeys was published in 1968 (Manocha et al., 1968) for *Cebus apella*. At that time, the genus *Cebus* included Tufted and Untufted Capuchin monkeys, which posteriorly. These were later separated into two different genera after phylogenetic studies have confirmed a huge diversity, justifying the creation of a new taxonomic division, the genus *Sapajus* (Lynch Alfaro et al., 2012). Additionally, the aforementioned publication does not cover the integrity of the brain regions and displays only images of the basal telencephalon in the coronal plane without coverage of more superior or cortical structures.

Therefore, the need for the development of our protocol primarily stems from the lack of available stereotactic atlases for *Sapajus apella*.

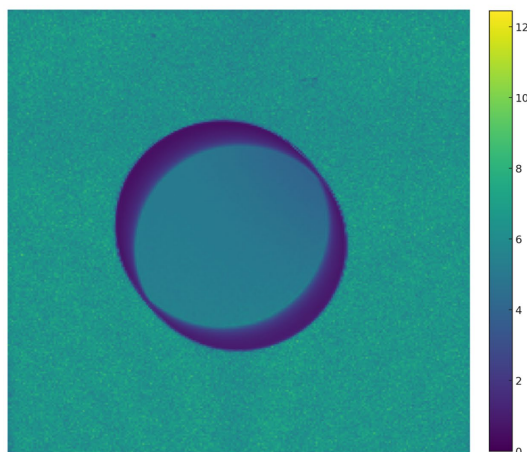
TABLE 4 Volume and average SNRs for the scans using the phantom with and without the stereotactic frame.

| MRI phantom | Volume (cm ³) | Average SNRs |
|-------------------|---------------------------|--------------|
| Phantom frameless | 150.1 | 38 |
| Phantom framed | 150.1 | 38 |

The literature on the use of *Sapajus apella* as an animal model for experimental neurosurgeries is quite scarce. Despite being a promising model for the study of both normal and abnormal nervous systems (Hecht et al., 2021; Muniz et al., 2021; Miss et al., 2022), capuchin monkeys are not among the most frequently used species in non-human primate biomedical research. This is likely due to practical reasons that make other NHP species more suitable for laboratory use (Bert et al., 2012; Lankau et al., 2014).

Unlike rodents, whose brain structures exhibit relatively constant size and location values, the brains of NHPs can be highly variable

tSNR Map: Phantom frameless



tSNR Map: Phantom framed

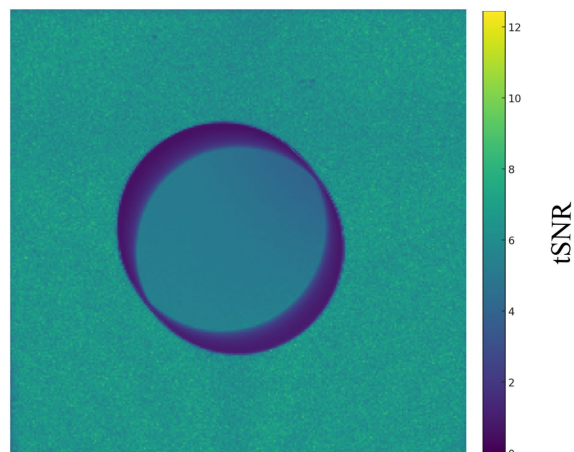


FIGURE 6
Temporal SNR for phantom frameless, and phantom framed. The same protocol was used for both conditions.

(Bentley et al., 2018). Primates are altricial animals, experiencing a significant postnatal brain growth spurt. Therefore, variations in environmental factors such as maternal care, food, and environmental stimuli can induce a wide range of phenotypes, reflecting on the development of the size and shape of the skull (Ikonomidou et al., 2001; De Vareilles et al., 2022) (see Table 6; Figure 8). Thus, the use of MRI for targeting significantly improves surgical accuracy as it addresses the issue of intraspecies variability in brain structure.

Based on the classical Cartesian plane, frame-based systems for neurosurgery have the advantage of proven clinical accuracy and a high degree of mechanical stability, making them the gold standard. However, there are many frameless methods available that appear to offer flexibility (Fukaya et al., 2010; Patil, 2010; Sutherland et al., 2013). Frameless systems demand greater complexity and material expenditure. In addition to requiring precise hand coordination, natural tremors may influence the error margin and surgical results (Bradac et al., 2017).

Convection-enhanced delivery (CED) is a frameless system of drug delivery to the brain through intraparenchymal microcatheters with broader achievement using fewer infusions (Bradac et al., 2017; Yazdan-Shahmorad et al., 2018). In addition to the need for compatible and expensive materials for implantation in the parenchyma, it constitutes an invasive surgical method with the potential for encephalitic states (Khateeb et al., 2019). Surgical methods must be efficient and minimize animal risk. MRI-guided surgeries are preferable to intraoperative plain film roentgenography due to associated radiation exposure issues (Damilakis et al., 2010). Beyond radiation safety, MRI-guided surgeries, as a preoperative refinement, enable virtual fiducial placement on software platforms for virtual surgical planning, which is crucial for minimizing the error rate (Farrell et al., 2014).

Our method, which uses MRI, provides superior soft tissue contrast and allows us to view the structures of the monkey brain *in vivo*. The procedure we followed for stereotactic calculations was both simple and inexpensive. Although we are aware of the existence of complex scripts and software reported in previous studies, they typically employ high-cost computational frameworks and involve several pre-processing steps (Subramanian et al., 2005; Frey et al., 2011), yet they offer similar accuracy to our method. Some protocols involve the use of fiducial

markers attached to the skull or in subcortical regions, which are more invasive and can trigger unintended inflammatory responses (Asahi et al., 2003). Our method was designed to avoid invasive fixation on the stereotaxic frame when positioning the animal for MRI scanning, similar to the protocol used by Saunders (Saunders et al., 1990).

Other studies have previously applied similar protocols using Old World NHPs, primarily Rhesus (*Macaca mulatta*). For New World monkeys, the most commonly used species is the common marmoset (*Callithrix jacchus*), a New World species with a lissencephalic brain (Hikishima et al., 2011). An interesting study by Seidlitz (Seidlitz et al., 2018) provided a population-averaged MRI standard template with anatomical references for NHP brains, taking into account individual asymmetry. This included surface reconstructions and transformations to previously published digital brain atlases for Rhesus. We did not find a similar study for *Sapajus apella*.

6 Error margin

Although we applied a highly developed imaging method, the protocols described here are not without potential errors. We calculated a small error margin in our study by comparing the software-generated coordinates with visually controlled coordinates, which involved confirming the coordinates using the software's manual tool. Based on these comparisons, the error margin for each coordinate in the three axes was calculated by taking the average of the differences between the software-calculated and visually-calculated coordinates, along with their standard deviation. A mean error of 0.02 ± 0.01 in the anterior–posterior, 0.09 ± 0.11 in the dorsoventral, and 0.01 ± 0.03 mm in the mediolateral was observed (see Supplementary material S1). This can occur due to factors such as MRI resolution, potential uncontrolled movement artifacts during image acquisition, and the examiner's performance during visual control. Nonetheless, compared to the size and volume of the targeted anatomical structures, the error margin obtained here is negligible and may not be associated with a surgical error. On the other hand, the intraspecies variation observed here ranged between 4.04 ± 1.03 in the anteroposterior, 3.88 ± 0.58 in the dorsoventral, and 1.42 ± 0.62 mm in the mediolateral

TABLE 5 Normality test results for all coordinates in each of the three axes (mm).

| Coordinate | Min | Max | Mean | S.D. | S.E. | KS dist. | <i>p</i> |
|-------------------------|-------|-------|-------|--------|---------|----------|----------|
| ANTERO-POSTERIOR | | | | | | | |
| A1 | 24.42 | 29.96 | 26.69 | 2.055 | 0.8389 | 0.1645 | >0.10 |
| A2 | 24.76 | 28.19 | 26.36 | 1.379 | 0.5629 | 0.1791 | >0.10 |
| P1 | 0.577 | 6.645 | 3.217 | 2.076 | 0.8475 | 0.1607 | >0.10 |
| P2 | 0.801 | 5.783 | 2.978 | 1.808 | 0.738 | 0.1814 | >0.10 |
| S | 0.477 | 4.598 | 1.959 | 1.45 | 0.5918 | 0.2526 | >0.10 |
| G | 27.42 | 29.1 | 28.3 | 0.728 | 0.2972 | 0.2188 | >0.10 |
| SN1 | 4.779 | 9.098 | 6.653 | 1.553 | 0.6342 | 0.1792 | >0.10 |
| SN2 | 6.238 | 10.25 | 7.839 | 1.478 | 0.6036 | 0.1878 | >0.10 |
| SN3 | 7.537 | 11.55 | 9.047 | 1.521 | 0.621 | 0.2119 | >0.10 |
| SN4 | 8.968 | 12.76 | 10.22 | 1.604 | 0.6547 | 0.2606 | >0.10 |
| CD1 | 18.71 | 22.4 | 20.08 | 1.375 | 0.5613 | 0.2161 | >0.10 |
| CD2 | 20.09 | 23.66 | 21.74 | 1.437 | 0.5866 | 0.1919 | >0.10 |
| CD3 | 21.39 | 24.96 | 23.38 | 1.441 | 0.5883 | 0.1975 | >0.10 |
| CD4 | 22.73 | 26.61 | 24.79 | 1.499 | 0.6118 | 0.1591 | >0.10 |
| DORSAL-VENTRAL | | | | | | | |
| A1 | 20.83 | 24.27 | 22.58 | 1.331 | 0.5436 | 0.2916 | >0.10 |
| A2 | 20.98 | 24.38 | 22.62 | 1.311 | 0.535 | 0.2806 | >0.10 |
| P1 | 20.87 | 24.31 | 22.55 | 1.297 | 0.5293 | 0.2599 | >0.10 |
| P2 | 20.79 | 24.32 | 22.52 | 1.3 | 0.5305 | 0.2505 | >0.10 |
| S | 17.16 | 22.29 | 19.48 | 1.731 | 0.7069 | 0.1945 | >0.10 |
| G | 21.28 | 26 | 22.97 | 1.763 | 0.7196 | 0.2386 | >0.10 |
| SN1 | 12.61 | 16.59 | 13.93 | 1.47 | 0.5999 | 0.2317 | >0.10 |
| SN2 | 12.7 | 16.76 | 13.97 | 1.519 | 0.6199 | 0.2549 | >0.10 |
| SN3 | 12.4 | 16.76 | 13.91 | 1.57 | 0.6411 | 0.259 | >0.10 |
| SN4 | 12.25 | 16.75 | 13.88 | 1.584 | 0.6468 | 0.2661 | >0.10 |
| CD1 | 19.75 | 23.38 | 21.66 | 1.211 | 0.4944 | 0.1915 | >0.10 |
| CD2 | 19.83 | 23.07 | 21.62 | 1.088 | 0.4442 | 0.199 | >0.10 |
| CD3 | 19.84 | 23.32 | 21.66 | 1.165 | 0.4758 | 0.1545 | >0.10 |
| CD4 | 19.77 | 23.23 | 21.71 | 1.179 | 0.4814 | 0.22 | >0.10 |
| MEDIO-LATERAL | | | | | | | |
| A1 | 3.172 | 4.647 | 3.709 | 0.5062 | 0.2066 | 0.2919 | >0.10 |
| A2 | 2.917 | 4.488 | 3.563 | 0.5651 | 0.2307 | 0.2986 | >0.10 |
| P1 | 6.056 | 7.877 | 6.795 | 0.7782 | 0.3177 | 0.2489 | >0.10 |
| P2 | 6.66 | 7.129 | 6.901 | 0.1756 | 0.07168 | 0.1321 | >0.10 |
| S | 1.194 | 2.196 | 1.538 | 0.3893 | 0.1589 | 0.1882 | >0.10 |
| G | 1.185 | 1.771 | 1.315 | 0.2318 | 0.09461 | 0.3565 | 0.0165 |
| SN1 | 5.236 | 6.375 | 5.64 | 0.5164 | 0.2108 | 0.3242 | 0.048 |
| SN2 | 3.576 | 5.072 | 4.252 | 0.6186 | 0.2525 | 0.2369 | >0.10 |
| SN3 | 2.07 | 3.799 | 2.874 | 0.6853 | 0.2798 | 0.2477 | >0.10 |
| SN4 | 0.918 | 2.577 | 1.539 | 0.6629 | 0.2706 | 0.3298 | 0.0402 |
| CD1 | 3.572 | 4.653 | 4.062 | 0.3827 | 0.1562 | 0.1327 | >0.10 |
| CD2 | 3.361 | 4.498 | 3.768 | 0.3882 | 0.1585 | 0.3099 | 0.0738 |
| CD3 | 3.053 | 4.85 | 4.035 | 0.5943 | 0.2426 | 0.2204 | >0.10 |
| CD4 | 3.108 | 6.134 | 4.761 | 1.015 | 0.4145 | 0.1861 | >0.10 |

TABLE 6 Individual coordinate values were calculated for each surgical target in each subject (mm).

| ANIMAL | AMBCL | AMAXD | AMBEN | AMBBH | AMASA | AMBEG |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ANTERO-POSTERIOR | | | | | | |
| A1 | 24.725 | 24.415 | 27.275 | 27.587 | 29.956 | 26.178 |
| A2 | 24.762 | 24.959 | 26.840 | 28.193 | 27.471 | 25.954 |
| P1 | 0.577 | 2.390 | 4.145 | 6.645 | 3.437 | 2.107 |
| P2 | 0.801 | 1.607 | 4.255 | 5.783 | 2.911 | 2.510 |
| S | 1.728 | 0.869 | 1.826 | 4.598 | 2.254 | 0.477 |
| G | 27.429 | 27.418 | 28.719 | 29.102 | 28.842 | 28.274 |
| SN1 | 4.779 | 5.290 | 6.339 | 9.098 | 7.269 | 7.144 |
| SN2 | 6.238 | 6.498 | 7.619 | 10.253 | 8.667 | 7.761 |
| SN3 | 7.537 | 7.874 | 8.874 | 11.550 | 10.106 | 8.341 |
| SN4 | 9.019 | 9.079 | 9.847 | 12.763 | 11.614 | 8.968 |
| CD1 | 19.631 | 19.905 | 22.402 | 18.928 | 20.875 | 18.713 |
| CD2 | 21.632 | 21.914 | 23.659 | 20.199 | 22.963 | 20.088 |
| CD3 | 23.488 | 23.670 | 24.958 | 21.393 | 24.762 | 21.987 |
| CD4 | 24.763 | 25.091 | 26.119 | 22.734 | 26.608 | 23.434 |
| DORSAL-VENTRAL | | | | | | |
| A1 | 24.079 | 22.040 | 20.830 | 22.158 | 24.273 | 22.113 |
| A2 | 24.038 | 22.040 | 20.981 | 22.244 | 24.380 | 22.059 |
| P1 | 23.880 | 22.028 | 20.867 | 22.241 | 24.307 | 21.959 |
| P2 | 23.784 | 22.035 | 20.793 | 22.248 | 24.320 | 21.959 |
| S | 19.857 | 17.155 | 18.595 | 18.877 | 22.294 | 20.094 |
| G | 23.770 | 23.188 | 21.278 | 21.843 | 26.002 | 21.736 |
| SN1 | 14.099 | 13.201 | 12.793 | 12.609 | 16.586 | 14.312 |
| SN2 | 14.113 | 13.238 | 12.763 | 12.696 | 16.763 | 14.275 |
| SN3 | 14.123 | 13.211 | 12.780 | 12.396 | 16.763 | 14.208 |
| SN4 | 14.100 | 13.231 | 12.820 | 12.253 | 16.750 | 14.153 |
| CD1 | 22.200 | 21.030 | 19.753 | 21.738 | 23.379 | 21.876 |
| CD2 | 22.137 | 21.082 | 19.833 | 21.705 | 23.068 | 21.876 |
| CD3 | 22.234 | 21.075 | 19.837 | 21.625 | 23.318 | 21.874 |
| CD4 | 22.298 | 21.071 | 19.770 | 22.048 | 23.225 | 21.872 |
| MEDIO-LATERAL | | | | | | |
| A1 | 3.762 | 3.172 | 3.628 | 3.655 | 4.647 | 3.392 |
| A2 | 2.917 | 3.299 | 3.968 | 4.488 | 3.331 | 3.372 |
| P1 | 6.056 | 6.227 | 6.633 | 6.321 | 7.877 | 7.654 |
| P2 | 6.660 | 6.754 | 6.956 | 7.037 | 6.870 | 7.129 |
| S | 1.518 | 1.772 | 1.355 | 1.194 | 1.195 | 2.196 |
| G | 1.200 | 1.771 | 1.346 | 1.192 | 1.195 | 1.185 |
| SN1 | 5.236 | 5.237 | 5.430 | 5.341 | 6.375 | 6.218 |
| SN2 | 3.819 | 3.947 | 4.142 | 3.576 | 5.072 | 4.953 |
| SN3 | 2.513 | 2.506 | 2.734 | 2.070 | 3.623 | 3.799 |
| SN4 | 1.126 | 1.260 | 1.204 | 0.918 | 2.150 | 2.577 |
| CD1 | 3.960 | 3.791 | 3.572 | 4.095 | 4.653 | 4.303 |
| CD2 | 3.635 | 3.746 | 3.578 | 3.361 | 4.498 | 3.791 |
| CD3 | 4.300 | 3.864 | 4.203 | 3.053 | 4.850 | 3.937 |
| CD4 | 5.381 | 4.734 | 4.830 | 3.108 | 6.134 | 4.377 |

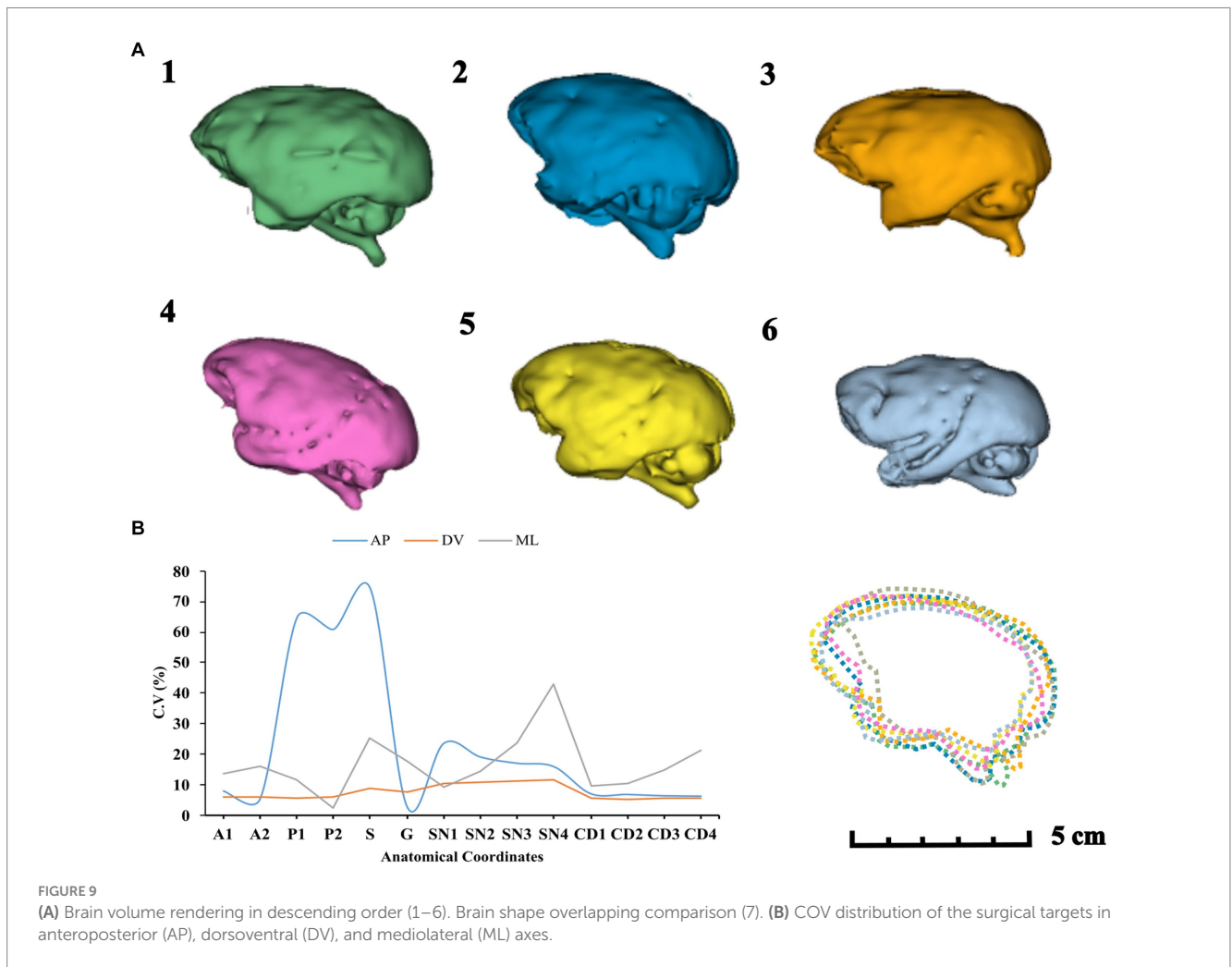


FIGURE 9

(A) Brain volume rendering in descending order (1–6). Brain shape overlapping comparison (7). (B) COV distribution of the surgical targets in anteroposterior (AP), dorsoventral (DV), and mediolateral (ML) axes.

(see Table 4), which represents a significant distance that could lead to a targeting error in neurosurgical approaches.

6.1 Correlation between brain volume and stereotaxic coordinates

It is known that brain growth is accentuated during early life development. After a highly dynamic early postnatal period, brain growth stabilizes in adulthood, when interindividual differences become well established. These differences result from varying and nonlinear growth patterns in different brain structures throughout the lifespan (Coupé et al., 2017; Danielsen et al., 2020), leading to interindividual differences in brain volume, shape, development, and proportion between brain structures.

In our study, we found no correlation between total brain volume and stereotaxic coordinates, which reinforces the fact that differences in brain development are nonlinear within species. It has been shown that the same subcortical structure may exhibit different stereotaxic locations throughout the lifespan, for example, the midsagittal area of the corpus callosum. Watson et al. (2022) observed sustained growth patterns of the corpus callosum in *Sapajus apella* monkeys in the splenium and genu regions. Regional differences are apparent in these growth patterns, with the genu increasing considerably during the first 6 years of life, and the splenium showing a greater increase between seven and 18 years (Vannucci et al., 2017). Considering our sample of

adult monkeys, we observed higher variations for the coordinates P1, P2, and S, the most posterior structures analyzed in this study, which may reflect the patterns reported by Watson et al. (see Figure 9).

Based on the ratio of AC–PC (anterior commissure to posterior commissure) analysis in selected groups of humans and NHPs, there are higher variances in the AP axis. The mean \pm SD for AC–PC distances were 28.3 ± 1.6 mm, 12.3 ± 0.8 mm, and 13.8 ± 0.7 mm for the human, *Cynomolgus*, and Rhesus groups, respectively (Fiandaca et al., 2011). This correlates with our results about the higher CV in AP coordinates and also supports the difficulty of localizing deep brain targets such as striatal brain structures (Yin et al., 2009).

Morphological brain variations can be related to different environmental contexts, which involve capuchins' extractive foraging behaviors, including motor processing and spatial ability for prey capturing, tool usage, etc. (Janson and Boinski, 1992). Furthermore, *Sapajus apella* monkeys exhibit sex differences in behavior, with differences in cortical plasticity in brain organization (Hecht et al., 2021). It has been suggested that the morphology of the corpus callosum in capuchins is influenced by sex and handedness (Phillips et al., 2007), which could be linked to differences in cortical anatomy (Phillips and Sherwood, 2008).

Previous studies have calculated coefficients of variation (COV) of brain volume for different species, having reported a higher COV of brain volume in New World monkey species than that observed in rodents: 2.3% for mice (Ma et al., 2008), 3.2% for rats (Hasegawa et al., 2010), compared to 6.6% in marmosets (Hayashi et al., 2021). The

significant primate's COV correlates with the acceptable limits of the classical stereotactic approach. Our data suggest a volume brain COV of 9.4% for *Sapajus apella* adult population.

6.2 Advantages and limitations

This simple, cost-effective protocol with minimal pre-processing steps for primates' MRI-based stereotactic calculations has the potential to assist experimenters working with different animal species in refining their neurosurgical methods and improving targeting (Figure 7). The most significant advantages of our protocol lie in the ease of determining any potential brain target, both cortical and subcortical, and in considering intraspecies anatomical differences. This method, which involves using a non-metallic replica of the surgical holder during imaging and referencing anatomical landmarks, can overcome potential errors induced by anatomical asymmetries of the subjects' heads. For instance, substantial differences in the diameters of the external auditory meatus between the right and left sides can result in a discrepancy between two coordinate systems, because the midpoint of the ear bars does not correspond to the actual interaural zero. The validation by predicting the error margin met the required safety standards, leading us to believe that our protocol will have promising applications.

We believe that an open-source paradigm is a major trend in the development of medical imaging applications. 3D Slicer has the advantage of having an intuitive work interface, an internal DICOM image convertor, and the possibility of filing results through a scene system that can make changes on previous reconstructions, besides combining different scenes to compare studies.

Despite its simplicity and consistency, there are some limitations to this alternative protocol. First, there are technical limitations such as the quality of the MRI and post-processing software tools. For instance, the manual ruler for visual control depends on the operator, and the positioning of fiducial markers relies on anatomical knowledge (Gonzalo Domínguez et al., 2016). The resolution of the MRI must be considered and can be improved by adjusting the scanning sequence and extending the scanning time. Another significant limitation lies in determining the coordinates of areas where cytoarchitectural criteria are crucial for defining boundaries. For example, many neocortical areas cannot be confidently identified by MRI imaging, which only shows the differences between gray and white matter.

7 Conclusion

This technique addresses the issue of significant intraspecies variability in brain size and shape, a major source of bias in atlas-based studies for stereotactic brain surgery in NHPs. Furthermore, for species that are infrequently used in neuroscience research, the lack of available brain atlases can be overcome. The use of open-source and user-friendly software for image processing makes this method cost-effective and readily accessible for use in various experimental settings. The adoption of anatomical landmarks, along with the pre-placement of the animal in a stereotactic frame for imaging, may help to avoid stereotactic errors induced by the anatomical asymmetry of the animal's head. Additionally, preoperative MRI scanning can be beneficial in identifying preexisting brain abnormalities that meet exclusion criteria for behavioral or neuroanatomic studies. In

summary, our method may be highly beneficial to areas of neuroscience research that depend on accurate stereotaxic apparatus, with minimal procedural complexity.

We hope our protocol serves as a model for similar environments, proving that significant scientific contributions can emerge from regions traditionally underrepresented in global research landscapes. This aligns with the growing recognition of the importance of contextually relevant research in developing countries, which can address local challenges and contribute to the global scientific community.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was approved by Ethics Committee for the Use of Animals from the Evandro Chagas Institute (CEUA/IEC). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

LP: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Software, Writing – original draft, Writing – review & editing. LL: Data curation, Formal analysis, Software, Writing – review & editing. JM: Conceptualization, Project administration, Writing – review & editing. CB: Data curation, Methodology, Software, Writing – review & editing. BG: Data curation, Writing – review & editing. LK: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing, Writing – original draft.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was funded by the Horizon 2020 Research and Innovation Program of the European Union (n° 767092). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. publications costs by PROPESP/UFPA (PAPQ).

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to the staff of the MEDICAL clinic in Castanhal-PA. We extend our thanks to the technicians of the National Center of Primates in Ananindeua-PA for their skillful assistance with MRI imaging acquisition, and collaborators of Eduardo Oswaldo-Cruz Neurophysiology Laboratory of the Federal University of Pará (UFPA). We also thank the M.sc Arthur Gonsales da Silva for the SNRs measurements script.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2024.1324669/full#supplementary-material>

References

- Adams, M. M., Hof, P. R., Gattass, R., Webster, M. J., and Ungerleider, L. G. (2000). Visual cortical projections and chemoarchitecture of macaque monkey pulvinar. *J. Comp. Neurol.* 419, 377–393. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000410)419:3<377::AID-CNE9>3.0.CO;2-E
- Alfaro, J. W. L., Silva Jr, J. D. S. E., and Rylands, A. B. (2012). How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *Am. J. Primatol.* 74, 273–286. doi: 10.1002/ajp.22007
- Arnason, G., and Clausen, J. (2016). On balance: weighing harms and benefits in fundamental neurological research using nonhuman primates. *Med. Health Care Philos.* 19, 229–237. doi: 10.1007/s11019-015-9663-4
- Asahi, T., Tamura, R., Eifuku, S., Hayashi, N., Endo, S., Nishijo, H., et al. (2003). A method for accurate determination of stereotaxic coordinates in single-unit recording studies in monkeys by high-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging. *Neurosci. Res.* 47, 255–260. doi: 10.1016/S0168-0102(03)00202-5
- Bentley, J. N., Khalsa, S. S., Kobylarek, M., Schroeder, K. E., Chen, K., Bergin, I. L., et al. (2018). A simple, inexpensive method for subcortical stereotaxic targeting in nonhuman primates. *J. Neurosci. Methods* 305, 89–97. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.05.007
- Bert, A., Abbott, D. H., Nakamura, K., and Fuchs, E. (2012). The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease. *Drug Discov. Today* 17, 1160–1165. doi: 10.1016/j.drudis.2012.06.009
- Bradac, O., Steklacova, A., Nebrenska, K., Vrana, J., De Lacy, P., and Benes, V. (2017). Accuracy of Vario guide frameless stereotaxic system against frame-based stereotaxy: prospective, randomized, single-center study. *World Neurosurg.* 104, 831–840. doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.104
- Chudasama, Y., and Robbins, T. (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol. Psychol.* 73, 19–38. doi: 10.1016/j.biopsycho.2006.01.005
- Coupé, P., Catheline, G., Lanuza, E., Manjón, J. V., and Initiative, A. S. D. N. (2017). Towards a unified analysis of brain maturation and aging across the entire lifespan: a MRI analysis. *Hum. Brain Mapp.* 38, 5501–5518. doi: 10.1002/hbm.23743
- Damilakis, J., Adams, J. E., Guglielmi, G., and Link, T. M. (2010). Radiation exposure in X-ray-based imaging techniques used in osteoporosis. *Eur. Radiol.* 20, 2707–2714. doi: 10.1007/s00330-010-1845-0
- Danielsen, V. M., Vidal-Piñeiro, D., Mowinckel, A. M., Sederevicius, D., Fjell, A. M., Walhovd, K. B., et al. (2020). Lifespan trajectories of relative corpus callosum thickness: regional differences and cognitive relevance. *Cortex* 130, 127–141. doi: 10.1016/j.cortex.2020.05.020
- De Vareilles, H., Rivière, D., Sun, Z.-Y., Fischer, C., Leroy, F., Neumane, S., et al. (2022). Shape variability of the central sulcus in the developing brain: a longitudinal descriptive and predictive study in preterm infants. *Neuro Image* 251:118837. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.118837
- Farrell, B. B., Franco, P. B., and Tucker, M. R. (2014). Virtual surgical planning in orthognathic surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin* 26, 459–473. doi: 10.1016/j.coms.2014.08.011
- Fiandaca, M. S., Salegio, E. A., Yin, D., Richardson, R. M., Valles, F. E., Larson, P. S., et al. (2011). Human/nonhuman primate AC–PC ratio—considerations for translational brain measurements. *J. Neurosci. Methods* 196, 124–130. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.12.023
- Frey, S., Pandya, D. N., Chakravarty, M. M., Bailey, L., Petrides, M., and Collins, D. L. (2011). An MRI based average macaque monkey stereotaxic atlas and space (MNI monkey space). *NeuroImage* 55, 1435–1442. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.01.040
- Fukaya, C., Sumi, K., Otaka, T., Obuchi, T., Kano, T., Kobayashi, K., et al. (2010). Nexframe frameless stereotaxy with multitrack microrecording: accuracy evaluated by frame-based stereotaxic X-ray. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 88, 163–168. doi: 10.1159/000313868
- Galante, R., Carvalho, E. R., Muniz, J. A., Castro, P. H., Gris, V. N., Amora, D. S., et al. (2019). Comparison between total intravenous anesthesia with propofol and intermittent bolus of tiletamine-zolazepam in capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39, 271–277. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5847
- Gonzalo Domínguez, M., Hernández, C., Ruisoto, P., Juanes, J. A., Prats, A., and Hernández, T. (2016). Morphological and volumetric assessment of cerebral ventricular system with 3D slicer software. *J. Med. Syst.* 40, 1–8. doi: 10.1007/s10916-016-0510-9
- Hardman, C. D., and Ashwell, K. W. (2012). *Stereotaxic and chemoarchitectural atlas of the brain of the common marmoset (Callithrix jacchus)*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hasegawa, M., Kida, I., and Wada, H. (2010). A volumetric analysis of the brain and hippocampus of rats rendered perinatal hypothyroid. *Neurosci. Lett.* 479, 240–244. doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.070
- Hayashi, T., Hou, Y., Glasser, M. F., Autio, J. A., Knoblauch, K., Inoue-Murayama, M., et al. (2021). The nonhuman primate neuroimaging and neuroanatomy project. *NeuroImage* 229:117726. doi: 10.1016/j.neuroimage.2021.117726
- Hecht, E. E., Reilly, O. T., Benítez, M. E., Phillips, K. A., and Brosnan, S. F. (2021). Sex differences in the brains of capuchin monkeys (*Sapajus [Cebus] apella*). *J. Comp. Neurol.* 529, 327–339. doi: 10.1002/cne.24950
- Hikishima, K., Quallo, M., Komaki, Y., Yamada, M., Kawai, K., Momoshima, S., et al. (2011). Population-averaged standard template brain atlas for the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *NeuroImage* 54, 2741–2749. doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.10.061
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff-Mueser, U., et al. (2001). Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem. Pharmacol.* 62, 401–405. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00696-7
- Janson, C. H., and Boinski, S. (1992). Morphological and behavioral adaptations for foraging in generalist primates: the case of the cebines. *Am. J. Phys. Anthropol.* 88, 483–498. doi: 10.1002/ajpa.1330880405
- Khateeb, K., Griggs, D. J., Sabes, P. N., and Yazdan-Shahmorad, A. (2019). Convection enhanced delivery of optogenetic adeno-associated viral vector to the cortex of rhesus macaque under guidance of online MRI images. *JoVE (J. Vis. Exp.)* 147:e59232. doi: 10.3791/59232
- Lankau, E. W., Turner, P. V., Mullan, R. J., and Galland, G. G. (2014). Use of nonhuman primates in research in North America. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 53, 278–282. doi: 10.30802/AALAS-JAALAS-13-000107
- Lynch Alfaro, J. W., Boubli, J. P., Olson, L. E., Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G. A., et al. (2012). Explosive Pleistocene range expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. *J. Biogeogr.* 39, 272–288. doi: 10.1111/j.1365-2699.2011.02609.x
- Ma, Y., Smith, D., Hof, P. R., Foerster, B., Hamilton, S., Blackband, S. J., et al. (2008). *In vivo* 3D digital atlas database of the adult C57BL/6J mouse brain by magnetic resonance microscopy. *Front. Neuroanat.* 2:175. doi: 10.3389/neuro.05.001.2008
- Manocha, S. L., Shantha, T. R., and Bourne, G. H. (1968). *A stereotaxic atlas of the brain of the Cebus monkey (Cebus apella)*. Oxford University, Great Britain Clarendon Press.
- Marroig, G. (2007). When size makes a difference: allometry, life-history and morphological evolution of capuchins (*Cebus*) and squirrels (*Saimiri*) monkeys (*Cebinae*, Platyrrhini). *BMC Evol. Biol.* 7, 20–26. doi: 10.1186/1471-2148-7-20
- Miss, F. M., Meunier, H., and Burkart, J. M. (2022). Primate origins of copresentation and cooperative flexibility: a comparative study with common marmosets (*Callithrix jacchus*), brown capuchins (*Sapajus apella*), and Tonkean macaques (*Macaca tonkeana*). *J. Comp. Psychol.* 136, 199–212. doi: 10.1037/com0000315
- Muniz, J. A. C. P., Leal, L. C. P., Bahia, C. P., and Krejčová, L. V. (2021). *Sapajus apella* as a model for the development of novel therapeutic approaches for Parkinson's disease. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 12:11. doi: 10.5123/S2176-6223202100514
- Ose, T., Autio, J. A., Ohno, M., Frey, S., Uematsu, A., Kawasaki, A., et al. (2022). Anatomical variability, multi-modal coordinate systems, and precision targeting in the marmoset brain. *Neuro Image* 250:118965. doi: 10.1016/j.neuroimage.2022.118965

- Palazzi, X., Bordier, N., Palazzi, X., and Bordier, N. (2008). *The marmoset brain in stereotaxic coordinates* New York, NY: Springer.
- Patil, A. A. (2010). A modified stereotaxic frame as an instrument holder for frameless stereotaxis. *Surg. Neurol. Int.* 1:62. doi: 10.4103/2152-7806.70957
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Cambridge: Cambridge Academic press.
- Paxinos, G., Huang, X.-F., and Toga, A. W. (2000). *The rhesus monkey brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, USA: Academic Press.
- Pereira-Pedro, A. S., Rilling, J. K., Chen, X., Preuss, T. M., and Bruner, E. (2017). Midsagittal brain variation among non-human primates: insights into evolutionary expansion of the human precuneus. *Brain Behav. Evol.* 90, 255–263. doi: 10.1159/000481085
- Phillips, K. A., and Sherwood, C. C. (2008). Cortical development in brown capuchin monkeys: a structural MRI study. *NeuroImage* 43, 657–664. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.08.031
- Phillips, K. A., Sherwood, C. C., and Lilak, A. L. (2007). Corpus callosum morphology in capuchin monkeys is influenced by sex and handedness. *PLoS One* 2:e792. doi: 10.1371/journal.pone.0000792
- Rosa, M. G., Soares, J. G., Fiorani, M., and Gattass, R. (1993). Cortical afferents of visual area MT in the Cebus monkey: possible homologies between new and Old World monkeys. *Vis. Neurosci.* 10, 827–855. doi: 10.1017/S0952523800006064
- Ryland, A. B., Mittermeier, R. A., and Rodriguez-Luna, E. (1997). Conservation of neotropical primates: threatened species and an analysis of primate diversity by country and region. *Folia Primatol.* 68, 134–160. doi: 10.1159/000157243
- Sansalone, G., Allen, K., Ledogar, J., Ledogar, S., Mitchell, D., Profico, A., et al. (2020). Variation in the strength of allometry drives rates of evolution in primate brain shape. *Proc. R. Soc. B* 287:20200807. doi: 10.1098/rspb.2020.0807
- Saunders, R., Aigner, T., and Frank, J. (1990). Magnetic resonance imaging of the rhesus monkey brain: use for stereotaxic neurosurgery. *Exp. Brain Res.* 81, 443–446. doi: 10.1007/BF00228139
- Seidlitz, J., Sponheim, C., Glen, D., Frank, Q. Y., Saleem, K. S., Leopold, D. A., et al. (2018). A population MRI brain template and analysis tools for the macaque. *NeuroImage* 170, 121–131. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.04.063
- Sousa, A. P., Piñon, M. C. G., Gattass, R., and Rosa, M. G. (1991). Topographic organization of cortical input to striate cortex in the Cebus monkey: a fluorescent tracer study. *J. Comp. Neurol.* 308, 665–682. doi: 10.1002/cne.903080411
- Subramanian, T., Deogaonkar, M., Brummer, M., and Bakay, R. (2005). MRI guidance improves accuracy of stereotaxic targeting for cell transplantation in parkinsonian monkeys. *Exp. Neurol.* 193, 172–180. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.11.032
- Sutherland, G. R., Wolfsberger, S., Lama, S., and Zarei-Nia, K. (2013). The evolution of neuro arm. *Neurosurgery* 72, A27–A32. doi: 10.1227/NEU.0b013e318270da19
- Vannucci, R. C., Barron, T. F., and Vannucci, S. J. (2017). Development of the corpus callosum: an MRI study. *Dev. Neurosci.* 39, 97–106. doi: 10.1159/000453031
- Visalberghi, E. (1993). “Capuchin monkeys: a window into tool use in apes and humans” in *Tools, language and cognition in human evolution*, 138–150.
- Watson, C. M., Sherwood, C. C., and Phillips, K. A. (2022). Myelin characteristics of the corpus callosum in capuchin monkeys (*Sapajus [Cebus] apella*) across the lifespan. *Sci. Rep.* 12:8786. doi: 10.1038/s41598-022-12893-z
- Yazdan-Shahmorad, A., Silversmith, D. B., Kharazia, V., and Sabes, P. N. (2018). Targeted cortical reorganization using optogenetics in non-human primates. *elife* 7:e31034. doi: 10.7554/eLife.31034
- Yin, D., Valles, F. E., Fiandaca, M. S., Forsayeth, J., Larson, P., Starr, P., et al. (2009). Striatal volume differences between non-human and human primates. *J. Neurosci. Methods* 176, 200–205. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.027