



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR

LEON CLAUDIO PINHEIRO LEAL

MODELO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE
HEMIPARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM PRIMATAS
***Sapajus apella* E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOTORAS**

BELÉM – PA

2019

LEON CLAUDIO PINHEIRO LEAL

**MODELO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE
HEMIPARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM PRIMATAS
Sapajus apella E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOTORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Co-Orientação: Prof. Dra. Lane Viana Krejčová

BELÉM – PA

2019

**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)**

L433m Leal, Leon Claudio Pinheiro
Modelo experimental para indução de hemiparkinsonismo por
6-hidroxidopamina em primatas *Sapajus apella* e avaliação das
alterações motoras / Leon Claudio Pinheiro Leal. — 2019.
70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Doença de Parkinson. 2. Primatas. 3. Refinamento. 4.
6-OHDA. 5. Dominância Manual. I. Título.

CDD 574.0724

LEON CLAUDIO PINHEIRO LEAL

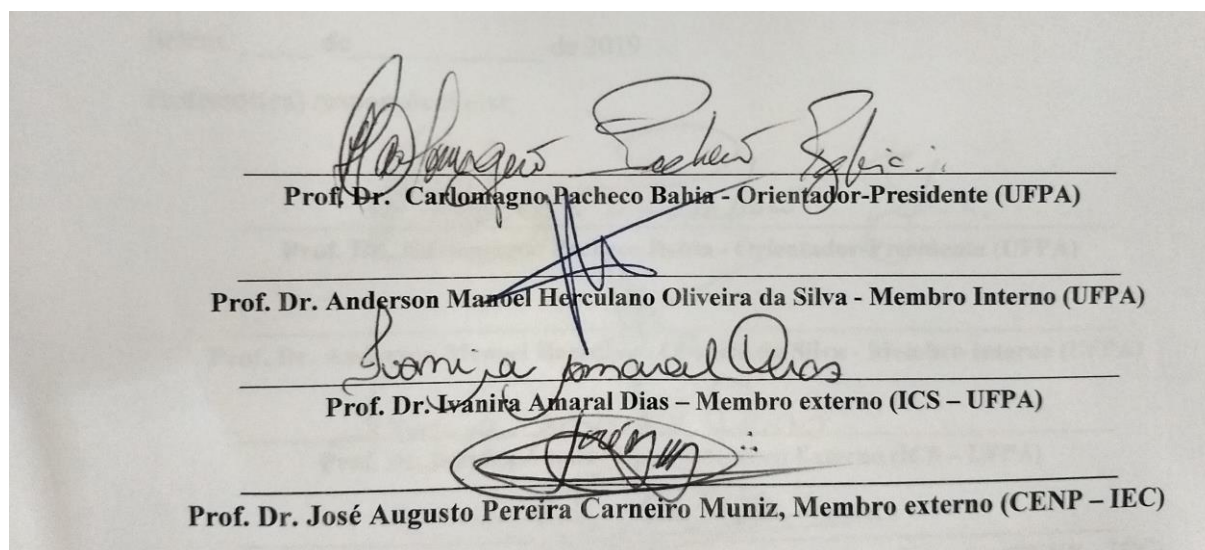
MODELO EXPERIMENTAL PARA INDUÇÃO DE HEMIPARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM PRIMATAS *Sapajus apella* E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOTORAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Co-Orientação: Prof. Dra. Lane Viana Krejčová

Dissertação apresentada em: 09/07/2019



Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia - Orientador-Presidente (UFPA)

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva - Membro Interno (UFPA)

Prof. Dr. Ivanira Amaral Dias - Membro externo (ICS - UFPA)

Prof. Dr. José Augusto Pereira Carneiro Muniz, Membro externo (CENP - IEC)

BELÉM – PA

2019

Agradeço a minha família que sempre
me apoiou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmãos, madrasta e a minha tia Katia que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida.

Á Rafaela Reis pela ajuda no trabalho, compartilhando alegrias, risadas e momentos de desesperos, as distrações nos momentos difíceis me ajudaram a continuar.

Á professora Dr. Lane Viana Krejčová, por toda a paciência, confiança e ensinamentos tanto na vida profissional quanto pessoal.

Agradeço ao Centro Nacional de Primatas pela oportunidade e o auxílio na realização desse trabalho.

Á técnica Camila Nunes pelos ensinamentos no início do processo de habituação e dando uma dose de coragem no primeiro momento com os primatas.

Aos técnicos Obadias Reis Silva, Sheila Tetsume Makiana e Lorena dos Santos Maniva pela disposição em ajudar, auxílio no manejo e treinamento dos animais, sem essa disposição em ajudar o trabalho seria ainda mais difícil.

Ao chefe do SEEMP, Rafael Furtado dos Santos sempre preocupado com o andamento do projeto e disposto a ajudar.

Ao professor Dr. Jose Augusto Pereira Carneiro Muniz por todo ensinamento, as palavras de conforto e o apoio, sem esses momentos o trabalho seria ainda mais difícil.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Carlomagno Pacheco Bahia que teve paciência, com suas palavras de sabedoria me guiando e me ajudando bastante a concluir este trabalho.

“Aquele que trabalha duro supera um gênio...”

(Rock Lee – Naruto)

RESUMO

A doença de Parkinson é atualmente a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, possuindo uma alta incidência nas Américas do Norte e do Sul e na Europa, há mais de 50 anos não vislumbramos nenhum tratamento revolucionário para a doença e ainda a diversos aspectos da sua neuropatologia que ainda permanecem sem um esclarecimento concreto, nesse sentido o modelo experimental em primatas se aproxima da realidade humana apresentam valor inestimável para o desenvolvimento de novas terapias e elucidação sobre mecanismos relacionados à doença. O modelo de 6-hidroxi dopamina em primatas figura um modelo que mimetiza alguns sintomas motores característicos da DP. O presente estudo objetivou desenvolver um protocolo de indução de HemiParkinsonismo em primatas *Sapajus apella*. Foram utilizados três macacos *Sapajus apella*, todos machos adultos, foram submetidos a sessões de condicionamento diário utilizando a técnica do “clicker” de reforçamento positivo para posicionamento em cadeira para primatas. Concomitantemente, os testes motores *staircase test* e tabuleiro de Brinkman foram realizados para determinação da lateralidade pelos atributos de preferência e dominância manuais. Após esse período foram realizados dois protocolos de indução por 6-OHDA, o primeiro protocolo foi injetado em 10 sítios no núcleo estriado e o segundo protocolo foi injetado em 10 sítios nas vias nigro estriatais, uma semana após as injeções foram realizadas doze semanas de análises clínicas. Todos os animais aprenderam os comportamentos de entrada e posicionamento na cadeira em um período mínimo de 30 sessões utilizando reforçamento positivo puro. Os resultados do *staircase test* demonstraram que os animais apresentaram lateralidade consistentes com nas atribuições de preferência e dominância manuais. O teste do tabuleiro de *Brinkman*, especificamente apresentou menor sensibilidade para determinação dos mesmos atributos, apesar de ser o teste mais comumente utilizado. As análises clínicas revelaram que o segundo protocolo de indução apresentou mais sintomas motores característicos da DP. A indução por 6-OHDA nas vias nigroestriatais demonstraram ser um bom método de indução para estudos de tratamentos e para um melhor entendimento da doença.

Palavras-chave: Refinamento, Primatas, Doença de Parkinson, 6-OHDA, Dominância Manual.

ABSTRACT

Parkinson's disease is currently the second most common neurodegenerative disease in the world, with a high incidence in North and South America and Europe, for more than 50 years we have not seen any revolutionary treatment for the disease and many aspects of its neuropathology that still remain without a concrete enlightenment, in this feeling the experimental model in primates approaches the human reality are invaluable value for the development of new therapies and elucidation on mechanisms related to the disease. The 6-hydroxydopamine model in primates is a model that mimics some motor symptoms characteristic of PD. The present study aimed to develop a protocol for the induction of HemiParkinsonism in *Sapajus apella* primates. Three *Sapajus Apella* monkeys, all adult males, were submitted to daily conditioning sessions using the positive reinforcement clicker technique for primate chair positioning. Concurrently, the staircase and Brinkman tray motor tests were performed to determine laterality by the manual preference and dominance attributes. After this period, two 6-OHDA induction protocols were performed, the first protocol was injected into 10 sites in the nucleus striatum and the second protocol was injected into 10 sites in the nigrostriatal pathways, one week after the injections were performed twelve weeks of clinical analysis . All animals learned the input and positioning behaviors in the chair in a minimum of 30 sessions using pure positive reinforcement. The results of the staircase test demonstrated that the animals presented laterality consistent with the assignments of manual preference and dominance. The Brinkman test, specifically, presented lower sensitivity for determination of the same attributes, despite being the most commonly used test. Clinical analysis revealed that the second induction protocol had more motor symptoms characteristic of PD. Induction by 6-OHDA in the nigrostriatal pathways has been shown to be a good induction method for treatment studies and for a better understanding of the disease.

Keywords: Refining; Primates, Parkinson's Disease, 6-OHDA, Hand Dominance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Representação esquemática do circuito neuronal nos núcleos da base no cérebro normal; B) A degeneração da SNc prejudica o circuito cortico-estriatal no cérebro de pacientes com DP. Setas verdes representam atividade neuronal excitatória, com espessura maior representam a hiperexcitação da atividade neuronal e com menor espessura representam uma diminuição da atividade neuronal excitatória normal e setas vermelhas representam atividade neuronal inibitória, com espessura maior representam a hiperinibição da atividade neuronal e com menor espessura representam uma diminuição da atividade neuronal inibitória normal.

Figura 2. Molécula de 6-Hidroxi-dopamina

Figura 3. A) Modelo em *sketchup* da cadeira para primatas adaptada utilizada no presente estudo; B) Animal em posicionamento durante a fase de treinamento, apresentando os comportamentos desejados de permissividade ao toque, cabeça e membros superiores devidamente inseridos e posicionados nos orifícios do aparato.

Figura 4. A) modalidade *valley*, com escadas descendentes à porção medial e orifício de acesso localizado na porção medial do aparato, e B) modalidade *hill*, com escadas ascendentes à porção medial e orifícios de acesso nas porções laterais direita e esquerda do aparato

Figura 5. A) modelo e dimensões do tabuleiro de Brinkman. B) posicionamento do tabuleiro na primeira fase do teste. C) posicionamento do tabuleiro na segunda fase do teste.

Figura 6. Sequência padrão de análise para o cálculo do índice de sistematização da sequência temporal de retirada das recompensas no tabuleiro de Brinkman.

Figura 7. Curvas de aprendizado estimadas por médias móveis do grupo de animais durante o período de treinamento. Os períodos P1-P5 estão evidenciados ao longo da curva.

Figura 8. A,B,C,D,E,F,G,H: Representação gráfica das médias individuais obtidas nos parâmetros comportamentais analisados durante o período de treinamento. ANOVA *two-way*, teste *a priori* de Bonferroni. *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

Figura 9. A, B, C, D: Representação gráfica das médias dos parâmetros comportamentais para as mãos direita e esquerda para os primatas M1, M2 e M3. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. E: Representação gráfica das médias para o número total de recompensas recuperadas bilateralmente para cada animal. ANOVA *two way*, teste *a priori* de Bonferroni, * $p < 0,05$.

Figura 10 A, B, C, D: Representação gráfica das médias obtidas pelos animais nas versões valley e hill do teste staircase. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Figura 11. A, B, C, D: Gráficos representativos das médias dos escores obtidos para as mãos direita e esquerda para cada animal no tabuleiro de Brinkman, nos parâmetros latência de 1ª recompensa, uso de mão trocada, recuperação de todas as recompensas e perda de recompensa. *** teste t, $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Figura 12. A, B, C: Gráficos representativos das médias dos escores obtidos para as mãos direita e esquerda para cada animal no tabuleiro de Brinkman, nos parâmetros latência de 1ª recompensa, recuperação de todas as recompensas e perda de recompensa. D: Comparações bilaterais entre o número total de recompensas recuperadas dos slots horizontais e verticais do tabuleiro. *** teste t, $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Figura 13. A: Gráficos representativos das médias do uso de pegadas do tipo pinça (polegar-indicador) e uso do indicador somente no período de testes. teste t bicaudal para amostras pareadas, *** $p < 0,001$. B: Índices de sequência temporal obtidas nas sessões da segunda fase para cada animal. C: Escores obtidos para cada animal no período de testes. D, E, F: Trajetórias executadas pelos animais para recuperação das recompensas nos slots distribuídos ao longo do tabuleiro de Brinkman, para cada uma das sessões na segunda fase de experimentos.

Figura 14. A: Progressão dos escores obtidos no período pós intervenção para os sujeitos experimentais submetidos ao protocolo 1 (M3) e protocolo 2 (M2). B: Representação gráfica das médias dos escores totais da avaliação clínica para os primatas M2 e M3. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados comportamentais observados durante o período de treinamento.

Tabela 2: Dados comportamentais obtidos no teste staircase.

Tabela 3: Dados comportamentais obtidos no tabuleiro de Brinkman.

Tabela 4: Lateralidade individual demonstrada pelos animais para parâmetros de preferência e dominância manuais.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença de Parkinson
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
SNe	Substância negra <i>pars compacta</i>
GPI	Globo pálido interno
SNr	Substância negra reticulada
GABA	γ -aminobutírico
UPDRS	Escala unificada de avaliação para Doença de Parkinson
3Rs <i>(replacement)</i>	Refinamento, Redução e Substituição <i>reduction, refinement, replacement)</i>
CENP	Centro Nacional de Primatas
GPe	Globo pálido externo
STN	Núcleo Subtalâmico
AP	Antero-Posterior
DV	Dorso-Ventral
ML	Médio-Lateral

SÚMARIO

1. Introdução	16
1.1 Circuitaria dos Núcleos da Base na DP.....	17
1.2 Modelos experimentais de indução DP em primatas	18
1.2.1 A 6-OHDA.....	18
1.2.2 Modelo experimental.....	19
1.3 A determinação da lateralidade para a indução de HemiParkinsonismo em modelo experimental em primata não humano	20
1.4 Aspectos Éticos	21
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. Materiais e Métodos	23
4.1 Animais	23
4.2 Procedimentos Experimentais.....	24
4.2.1 Habituação ao experimentador.....	24
4.2.2 Treino para posicionamento em cadeiras de primatas por reforçamento positivo puro	24
4.3 Testes Motores	26
4.3.1 <i>Staircase test</i>	27
4.3.2 Teste Modificado do Tabuleiro de <i>Brinkmann</i>	28
4.4 Indução do HemiParkinsonismo por 6-OHDA	29
4.5 Avaliação Clínica	30
4.6 Análises Estatísticas	31
5. Resultados	33
5.1 Treinamento por reforçamento positivo para posicionamento na cadeira para primatas	33
5.2 Determinação de lateralidade pelo <i>staircase test</i>	35
5.3 Determinação da lateralidade pelo tabuleiro de <i>Brinkmann</i>	37
5.3.1 Primeira fase	37
5.3.2 Segunda fase.....	38
5.3.3 Padrão Motor antes da injeção de 6-OHDA	39

5.4 Avaliação Clínica	41
6. Discussão	42
6.1 O reforçamento positivo induz respostas comportamentais em primatas <i>Sapajus apella</i>	42
6.2 O <i>staircase test</i> e o teste do tabuleiro de <i>Brinkman</i> são eficazes na determinação da lateralidade em <i>Sapajus apella</i>	46
6.3 A injeção intracerebral de 6-OHDA pode ser utilizada para indução de Hemiparkinsonismo em <i>Sapajus apella</i>	52
6.4 Implicações	54
7. Conclusão	57
8. Referências	59
9. Anexos	68

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda causa de doenças neurodegenerativas mais frequente no mundo, possuindo alta incidência na Europa (von Campenhausen, Bornschein et al. 2005), na América do Norte (Marras, Beck et al. 2018) e na América do Sul (Bauso, Tartari et al. 2012). Atualmente, a incidência mundial de pessoas com DP é de 10-20 por 100 000 pessoas por ano (Tysnes and Storstein 2017), com prevalência maior em pessoas entre 40 – 50 anos de idade e a incidência aumenta de 5 a 10 vezes em pessoas entre 60-90 anos de idade. É estimado ainda que em 2030 a incidência mundial de pessoas com DP seja duplicada (Tysnes and Storstein 2017).

A DP possui altos custos de tratamento e para a manutenção da qualidade de vida do paciente. Por exemplo, na Europa foi considerada a sexta doença mais cara quando comparada com as 19 mais prevalentes desordem neurológicas (Gustavsson, Svensson et al. 2011). Já no Brasil, estima-se gasto médio de 18 mil Reais por ano por paciente (Bovolenta, de Azevedo Silva et al. 2017), sendo que os custos variam dependendo da idade do paciente e do grau de apresentação dos sintomas motores e não motores. Nos gastos estão incluídos aquisição de medicamentos, consultas, custos com cuidador, adaptações nas residências e equipamentos que auxiliam a vida cotidiana.

A DP é causada pela morte dos neurônios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo e há mais de 50 anos não vislumbramos nenhum tratamento revolucionário para a doença. Diversos aspectos de sua neuropatologia ainda permanecem obscuros, e, nesse sentido, modelos experimentais que se aproximem da realidade humana apresentam valor inestimável para o desenvolvimento de novas terapias e elucidação sobre mecanismos relacionados à doença. Dentre estes, o modelo experimental mais próximo da realidade dos seres humanos para estudos de DP é o modelo experimental que usando primata não humanos (p. ex. macacos do novo mundo), que apresenta similaridades neuroanatômicas, imunológicas, fisiológicas e genômicas com os humanos, superando assim àquelas apresentadas por outros modelos experimentais com outros animais como os pequenos roedores (Arnason and Clausen 2016). Os modelos para indução da DP em animais experimentais baseiam-se em indução pelo uso de neurotoxinas, lesões (químicas e/ou físicas) e vetores virais que mimetizam os sintomas da doença. Uma das neurotoxinas mais usadas para a indução da DP é a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) que figura hoje como o modelo mais comumente utilizado em estudos com pequenos roedores

(Deumens, Blokland et al. 2002), tendo sido utilizado também modelos primatas (principalmente em saguis - *Callitrix jacchus*) (Yun, Ahn et al. 2015) e mimetiza diversos sintomas motores e aspectos neuropatológicos da doença.

1.1 Circuitaria dos Núcleos da Base e a DP

A DP é um distúrbio neurológico que afeta a circuitaria dos núcleos da base, ocasionando a perda de neurônios dopaminérgicos que acarreta os sintomas motores característicos da doença (Braak and Del Tredici 2008). A degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNc), que tem projeções para o núcleo estriado, resulta no desbalanço das funções da circuitaria dos núcleos da base (Blandini, Nappi et al. 2000). Geralmente, os pacientes com DP tendem a apresentar os sintomas motores somente quando perdem cerca de 50-80% dos neurônios dopaminérgicos da SNc, sugerindo a presença de um mecanismo de compensação nos estágios iniciais da doença (McGregor and Nelson 2019). No núcleo estriado existem dois tipos de receptores de dopamina: o receptor D1 (que é excitatório) e o receptor D2 (que é inibitório), que influenciam na atividade motora do sistema extrapiramidal. Os componentes deste sistema incluem os núcleos da base, envolvendo o globo pálido interno (GPi) e a porção reticulada da substância negra (SNr). A 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) que, 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 de indivíduos com DP (Kalia and Lang 2015). A perda dopaminérgica também pode levar ao aumento da atividade colinérgica, devido a perda da influência inibitória normal da dopamina na circuitaria dos núcleos da base (Galvan and Wichmann 2007, Redgrave, Rodriguez et al. 2010). Ver Figura 1.

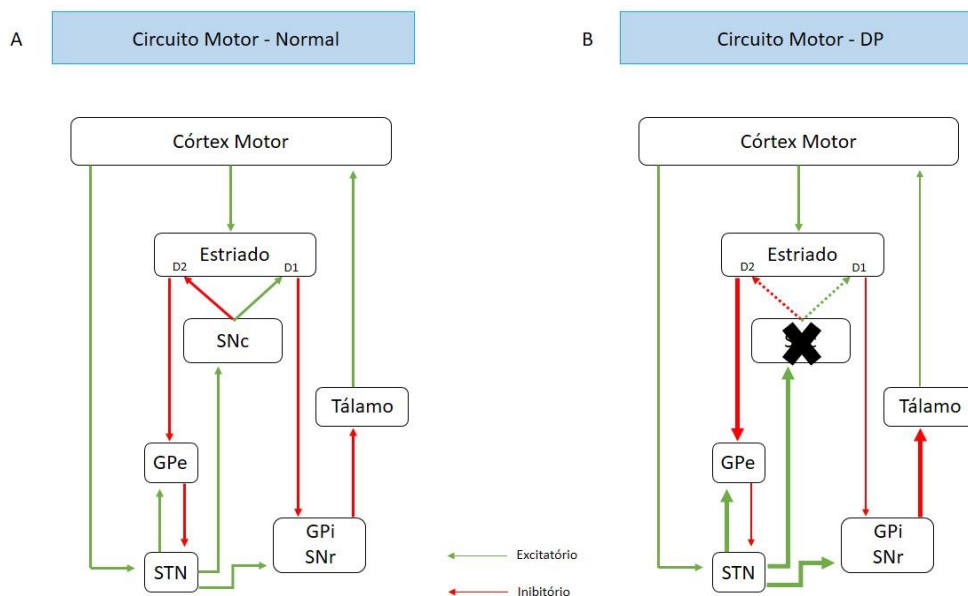


Figura 1. A) Representação esquemática do circuito neuronal nos núcleos da base no cérebro normal; B) A degeneração da SNc prejudica o circuito cortico-estriatal no cérebro de pacientes com DP. Setas verdes representam atividade neuronal excitatória, com espessura maior representam a hiperexcitação da atividade neuronal e com menor espessura representam uma diminuição da atividade neuronal excitatória normal e setas vermelhas representam atividade neuronal inibitória, com espessura maior representam a hiperinibição da atividade neuronal e com menor espessura representam uma diminuição da atividade neuronal inibitória normal. Ver lista de abreviaturas.

Os sintomas motores e não motores da DP podem ser detectados clinicamente e a patologia do tecido nervoso em humanos só pode ser confirmada *post-mortem*. Assim, existe uma grande necessidade de estudos em modelos experimentais para aprofundar nossa compreensão acerca dos mecanismos fisiopatológicos da doença, sua etiologia, marcadores genéticos, bem como ampliar as formas de tratamento. Estudos utilizando primatas não humanos como modelo experimental historicamente tem fornecido informações valiosas sobre a DP e seus possíveis tratamentos, devido a similaridades funcionais as estruturais do sistema motor com os seres humanos.

1.2 Modelos experimentais de indução DP em primatas.

1.2.1 A 6-OHDA

A 6-OHDA (Figura 2) representa atualmente a neurotoxina mais frequentemente utilizada para neurodegeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos, *in vitro* e *in vivo*, e é um modelo comum para indução de parkinsonismo em modelos roedores, com pouco uso relatado em primatas (Beal 2001). Os mecanismos subjacentes

à toxicidade da 6-OHDA envolvem a participação do estresse oxidativo relacionado à formação de radicais livres produzidos durante sua autoxidação à topaminaquinona (Villa, Muñoz et al. 2013) e a inibição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, mais especificamente os complexos I e IV (Blum, Torch et al. 2001). Ambos os mecanismos parecem agir sinergicamente para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo (Blum, Torch et al. 2001).

A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, sendo necessário administrá-la através de cirurgia estereotáxica, injetando a neurotoxina diretamente na região de interesse (Tieu 2011). Os principais alvos de injeção de 6-OHDA são a substância negra, vias nigroestriatais e núcleo estriado (Bové, Prou et al. 2005, Jagmag, Tripathi et al. 2016). Tipicamente, o local da injeção é unilateral (modelo hemiparkinsoniano), que permite que o lado não lesionado seja utilizado como controle interno e pode fornecer um ponto interessante para a avaliação dos sintomas comportamentais, especialmente em modelos primatas (Yun, Ahn et al. 2015). A administração de injeções bilaterais induz uma alta taxa de mortalidade, com grande enfraquecimento do animal, acentuada afagia, adiposia e convulsões, e requer atenção mais cuidadosa durante o período pós-operatório (Stoker and Greenland 2018).

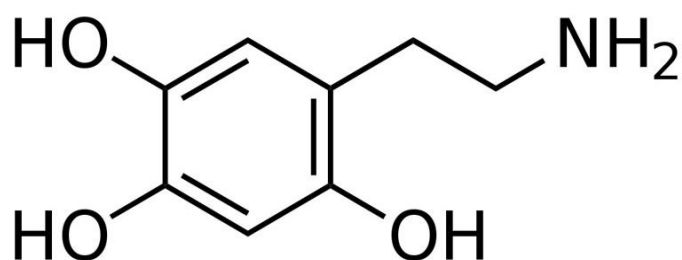


Figura 2. Molécula de 6-Hidroxiopmina.

1.2.1 Modelo Experimental

Em primatas não humanos, o modelo mais frequentemente utilizado é a da espécie *Callitrix jacchus*, conhecida como sagui comum, e as áreas de injeção da neurotoxina para a indução do parkinsonismo são as vias nigroestriatais (Annett, Martel et al. 1994, Annett, Torres et al. 1997, Eslamboli, Baker et al. 2003, Ridley, Garea-Rodríguez,

Schlumbohm et al. 2012) e a combinação de substância nigra e núcleo estriado (Eslamboli, Cummings et al. 2003, Milton, Marshall et al. 2004, Eslamboli, Georgievska et al. 2005, Garea-Rodríguez, Eesmaa et al. 2016, Ando, Nishime et al. 2017). A dosagem mais utilizada entre os estudos é de 4mg/ml de 6-OHDA dissolvido em 0,01% ascorbato/salina. As lesões causadas pela neurotoxina 6-OHDA, de acordo com a dosagem aplicada, podem mimetizar os estágios mais severos da DP, bem como protocolos de lesões mais leves do sistema dopaminérgico já foram desenvolvidos em macacos do novo mundo da espécie sagui (Garea-Rodríguez, Eesmaa et al. 2016). Nessa espécie de primata não humano do novo mundo, os sintomas de DP relatados pela indução de 6-OHDA em saguis incluem a negligência do membro afetado, distonia, rigidez, redução da atividade espontânea do animal, marcha descoordenada, comprometimento do equilíbrio, mudanças na postura, bradicinesia, congelamento, hipocinesia, marcha prejudicada, habilidades motoras grosseiras e finas e vocalizações, hipocinesia, dificuldade em escalar e déficits de percepção e memória (Eslamboli, Baker et al. 2003, Milton, Marshall et al. 2004, Eslamboli, Georgievska et al. 2005, Garea-Rodríguez, Schlumbohm et al. 2012, Santana, Halje et al. 2014, Santana, Palmér et al. 2015).

1.3 A determinação da lateralidade para a indução de HemiParkinsonismo em modelo experimental de primata não humano

A investigação da lateralidade em primatas não humanos consiste em passo importante no desenvolvimento de desenhos experimentais envolvendo a escolha do hemisfério cerebral para lesão experimental com a finalidade de indução de hemiparkinsonismo, facilitando a interpretação dos dados e funcionando como ferramenta para tomada de decisões experimentais.

Os termos ‘dominância manual’ e ‘preferência manual’, apesar de serem termos comumente utilizados como sinônimos, apresentam diferenças essenciais entre os seus atributos, bem como de sua apresentação em primatas humanos e não humanos (Chatagny, Badoud et al. 2013). A preferência manual pode ser definida como a mão escolhida prioritariamente para a realização de uma determinada tarefa, independentemente do fato de esta ser ou não a mais eficiente para a tarefa (Serrien, Ivry et al. 2006). A dominância manual, por sua vez, reflete o melhor desempenho e eficiência motora de uma mão em relação a outra em testes que requeiram habilidade manual (Serrien, Ivry et al. 2006).

Diversos estudos analisaram aspectos comportamentais e fisiológicos envolvidos na determinação da lateralização e habilidade manual em primatas (Alstermark, Pettersson et al. 2011, Kinoshita, Matsui et al. 2012, Zhao, Hopkins et al. 2012), com hipóteses sendo levantadas acerca da possível relação com a dominância hemisférica e lateralização em humanos. Todavia, apesar da preferência manual já haver sido demonstrada em diversas espécies de primatas, incluindo prossímios e grandes macacos africanos (Masataka 1989, Ward, Milliken et al. 1990, Fagot and Vauclair 1991, Spinozzi, Castorina et al. 1998), não existem evidências inquestionáveis acerca da apresentação do fenômeno de dominância manual entre primatas, sendo questionável a possível homologia do fenômeno de lateralidade entre primatas não humanos e humanos (Warren 1980), apesar de argumentos acerca da influência da complexidade dos testes utilizados sobre os resultados (Spinozzi, Castorina et al. 1998, Spinozzi, Lagana et al. 2007, Chatagny, Badoud et al. 2013).

1.4 Aspectos éticos

A utilização de primatas não humanos, do velho e do novo mundo, em pesquisas científicas apresenta desafios éticos e práticos que superam expressivamente àqueles observados para qualquer outro animal usado como modelo experimental, fazendo com que cuidados especiais e essenciais quando do planejamento de desenhos experimentais devam ser rigorosamente observados (Prescott 2010).

No desenvolvimento de modelos experimentais de parkinsonismo, os animais passam a mimetizar os sintomas de pacientes com DP, o que leva a prejuízos no bem-estar do animal. Partindo dessa premissa, estratégias de refinamento ganham destaque, diferente da redução e substituição dos 3Rs de Russel e Burch (Kirk 2018), as primeiras fazem parte apenas do planejamento experimental, o refinamento perpassa não somente pelas justificativas éticas, mas como elementos cientificamente relevantes e inovadores, uma vez que prejuízos ao bem-estar do animal podem afetar diretamente sua validade enquanto modelo experimental (Mendl, Burman et al. 2009). O refinamento é, muitas vezes, mal compreendido porque as interpretações focam apenas em estratégias clínicas, ambulatoriais e farmacológicas associadas somente aos procedimentos invasivos dos processos experimentais. Todavia, o refinamento compreende todas as abordagens que visam evitar ou minimizar potenciais estímulos nocivos, nociceptivos, estresse ou qualquer outro efeito adverso, físico ou psicológico, experimentado em qualquer período

da vida dos animais envolvidos, e que visem aumentar o bem-estar dos mesmos (Howard, Nevalainen et al. 2016, Junaid 2016).

Primeiramente, uma análise cuidadosa das características específicas da espécie de primata envolvida no modelo experimental é essencial, uma vez que fatores fisiológicos relacionados aos animais, ambiente físico, complexidade social e taxonomia podem afetar a validade do resultados do estudo (Örlink and Rehbinde 2000). A seguir, a implementação de técnicas de habituação e treinamento incluem benefícios valiosos nos cuidados efetivos para com primatas, que incluem facilitação do manejo, bem-estar animal, na qualidade dos dados e no relacionamento primata-pesquisador, com redução dos riscos dessa interação para ambos uma vez que os primatas tendem a cooperar em sua própria rotina de cuidados e experimentos, além de funcionar como uma espécie de enriquecimento ambiental (Westlund 2015). Técnicas de condicionamento operante, como o treinamento por reforçamento positivo que ensinam os animais a apresentarem os comportamentos desejados de forma voluntária, podem ser aplicados para melhorar a reatividade às rotinas experimentais e de cuidados.

O presente trabalho visa criar um protocolo de indução de hemiparkinsonismo em modelo primata *Sapajus apella*. No melhor do nosso conhecimento, não existem relatos da indução de hemiparkinsonismo nessa espécie, e a mesma apresenta elementos que podem configurar um excelente modelo experimental para o estudo da DP, por possuir uma elevada taxa de encefalização, associado a repertório motor e comportamental complexo (Bortoff and Strick 1993).

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 com nível 1 ou 2 de biossegurança, e configura-se como um excelente 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. 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, visto que esta espécie de primata não humano, de um ponto de vista evolutivo, é um macaco do novo mundo mais próximo dos humanos, com características morfológicas e comportamentais complexas

que se assemelham com os humanos. 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.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

- Desenvolver protocolo de indução de hemiparkinsonismo em primatas *Sapajus apella*.

3.2. Objetivos específicos:

- Estabelecer protocolos de habituação e treino para testes motores com posicionamento em cadeira para primatas não humanos;
- Determinar a lateralidade em macacos da espécie *Sapajus apella* através dos testes motores *staircase* e tabuleiro de Brinkman para escolha de lado preferencial de lesão na substância negra do mesencéfalo.
- Analisar os sintomas clínicos alcançados pelas injeções de 6-OHDA na substância negra mesencefálica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 03 macacos-prego (*Sapajus apella*) machos, normonutridos, com idade média de 14 anos, peso médio de $4,300 \pm 0,99$ kg, provenientes de reprodução no criadouro e mantidos nas facilidades do Centro Nacional de Primatas (CENP). Os animais foram submetidos a uma dieta constituída por ração própria para animais de laboratório ofertada diariamente, associada à oferta de frutas e sucos intercalados quatro vezes por semana e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretivas da União Europeia (2010/63/EC) e sob aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA/IEC) certificados nº 45/2016 e nº 37/2018.

4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Habituação ao experimentador

Antes do período da realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à dois meses de sessões diárias de condicionamento por reforçamento 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*”. Uma vez tornado evidente que o animal compreendeu a associação entre o som e a apresentação da recompensa, o reforçador condicionante deverá ser utilizado para sinalizar ao animal quando o mesmo apresentar um comportamento desejado. Durante as sessões para habituação dos animais experimentais ao experimentador, a interação será ativa, incluindo oralização e gestos. Quando houver os comportamentos desejados, o experimentador emitirá o som com o “*clicker*” seguido da oferta de uma pequena recompensa comestível para o animal. Cada sessão terá duração máxima de duas horas e as recompensas comestíveis serão variadas. Quando o animal demonstra rejeição a uma determinada recompensa a mesma era descartada. As recompensas que os animais demonstrarem preferência serão utilizadas nos períodos posteriores para a realização dos testes comportamentais.

4.2.2. Treino para posicionamento em cadeira de primatas por reforçamento positivo puro

Após o período de habituação, foram realizadas as sessões de treinamento para posicionamento na cadeira de primatas. Cada animal foi treinado, individualmente, três vezes por semana, de maneira alternada por um período de 120 dias, totalizando 50 sessões, com duração de 20 minutos cada. Durante essas sessões, a cadeira para primatas foi posicionada anexa à gaiola do animal, de forma a permitir a entrada do animal no aparato experimental de forma espontânea.

A cadeira para primatas (Figura 3A), utilizada no presente trabalho, foi desenvolvida a partir de modelo já existente utilizados em outros estudos e adaptada (Nassi, Lomber et al. 2013), às especificidades do projeto experimental em questão, assegurando o conforto dos animais durante a restrição parcial para testes comportamentais. O aparato experimental consiste em uma caixa de acrílico (45cm x

35cm x 28cm), reforçada com barras de aço inoxidável, com aberturas frontais para os membros superiores esquerdo e direito e superior para a cabeça do animal, com dispositivo ajustável para posicionamento da cabeça com restrição parcial e assento regulável na altura, de acordo com o tamanho do animal. A cadeira era fixada na porta da gaiola garantindo o fácil acesso do animal como uma extensão desta durante a sessão de treinamento, sendo retirada ao término de cada sessão.

A técnica do “clicker” foi utilizada durante as sessões de treinamento na cadeira, onde o experimentador, utilizando as mesmas oralizações e gesticulações da fase de habituação. O posicionamento desejado está ilustrado na Figura 3B. Para facilitação da inserção e permanência da cabeça do animal no orifício determinado era oferecido ao mesmo uma recompensa líquida em mamadeira ou congelada, posicionada na parte superior da cadeira, acima do orifício, de forma que o animal necessitasse passar a cabeça posicionando-a para fora do aparato a fim de alcançar o mesmo com a boca para o consumo (Figura 3B).

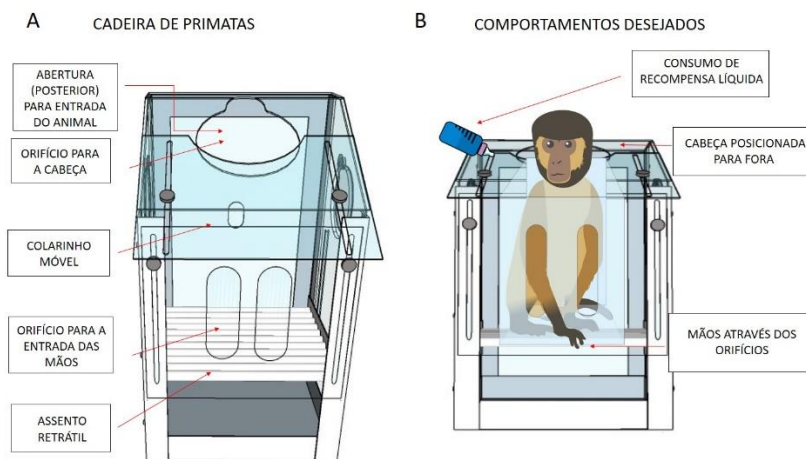


Figura 3. A) Modelo em *sketchup* da cadeira para primatas adaptada utilizada no presente estudo. B) Animal em posicionamento durante a fase de treinamento, apresentando os comportamentos desejados de permissividade ao toque, cabeça e membros superiores devidamente inseridos e posicionados nos orifícios do aparato.

Todas as sessões foram gravadas e posteriormente analisadas para obtenção e registro dos seguintes parâmetros experimentais:

- Tempo de toque na cabeça (tempo total da sessão que o animal permitia o experimentador tocar em sua cabeça);
- Tempo com a cabeça para a fora (tempo total da sessão que o animal permanece com a cabeça posicionada para fora do aparato no local destinado);

- Toque na cabeça (número de vezes que o animal permitia ser tocado na cabeça);
- Número de vezes que o animal colocava a cabeça para fora;
- Tempo de toque no tronco (tempo total da sessão que o animal permitia o experimentador tocar em seu tronco);
- Número de vezes que o animal permitia ser tocado no tronco;
- Latência de entrada (tempo que o animal leva para realizar a primeira entrada no aparato, a partir da abertura da porta da gaiola);
- Número de entradas espontâneas (número de vezes que o animal entra no aparato sem qualquer tipo de estímulo por parte do experimentador);
- Tempo de permanência espontânea (tempo total da sessão que o animal permanecia no aparato sem qualquer estímulo por parte do experimentador);
- Tempo do consumo da recompensa líquida (tempo total que o animal levava para consumir a recompensa líquida);
- Número de pegadas pela frente (número de vezes que o animal pegava a recompensa pelas aberturas frontais do aparato posicionando nestes os membros superiores);
- Número de pegadas com a boca (número de vezes em que o animal pegava a recompensa da mão do experimentador com a boca);
- Tempo de permanência na cadeira (tempo total da sessão que o animal permanece dentro do aparato).

4.3 Testes motores

Após o período de habituação ao experimentador e concomitantemente ao treino para posicionamento na cadeira para primatas, os animais foram submetidos a testes motores que envolvem o uso de coordenação motora fina e global. Todos os testes utilizaram exclusivamente os membros superiores e foram testados bilateralmente. Os testes utilizados estão descritos a seguir.

4.3.1. *Staircase Test*

O *staircase test* consiste em um aparato de acrílico transparente com duas aberturas permitindo acesso a pequenos degraus laterais contendo recompensas comestíveis, organizados de forma ascendente ou descendente (Figura 4). As aberturas são dispostas de modo que cada conjunto de degraus seja alcançado pelo membro superior de apenas um lado do animal com facilidade, mas dificilmente sejam alcançados em sua totalidade com o membro contralateral. Os diferentes níveis/altura dos degraus garantem a dificuldade necessária para a avaliação da coordenação dos movimentos de pegada e pinça juntamente com a coordenação de grandes grupamentos musculares proximais adutores, abdutores, flexores e extensores no membro superior durante os diferentes níveis dos degraus. Para permitir esta avaliação em diferentes graus de extensão, para primatas são adaptadas duas versões do teste: *valley* e *hill*, que se diferenciam de acordo com o sentido dos degraus da escada lateral em relação ao membro superior que está executando a tarefa. Na versão *valley* (Figura 4A), 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. Na versão *hill* (Figura 4B) as escadas sobem em direção ao centro do aparato e os orifícios de acesso são posicionados lateralmente, de modo que o animal deve alcançar com o membro superior esquerdo os degraus do lado esquerdo e com o membro superior direito os degraus do lado direito. Para o presente trabalho, foram desenvolvidas adaptações dos aparatos experimentais *staircase* para dimensões adequadas à espécie *Sapajus apella* (Marshall and Ridley 2003) a partir das medidas usadas para a espécie *Callithrix jacchus*.

Em cada sessão foram realizadas três tentativas para cada versão do teste, com o tempo de até 3 minutos para a recuperação de todas as recompensas, sempre começando pelas tentativas na versão *hill* seguidas pelas tentativas da versão *valley*. Todas as 50 sessões de teste foram gravadas para posterior análise das seguintes variáveis:

- Número de recompensas recuperadas (número total de recompensas que o animal pegava sem deixar cair do aparato);
- Latência de primeira recompensa (tempo que o animal leva para pegar a primeira recompensa, registrado separadamente para a mão direita ou a esquerda);

- 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);
- Uso de mão trocada (número de vezes que o animal utiliza a mão contrária ao lado correto referido pelo aparato, registrando cada lado individualmente);
- Perda de recompensa (número de recompensas em que o animal deixa cair no trajeto de retirada do aparato, registrando cada lado individualmente).

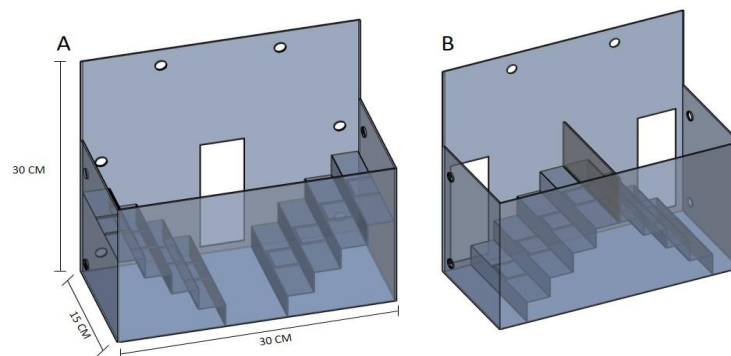


Figura 4. A) modalidade *valley*, com escadas descendentes à porção medial e orifício de acesso localizado na porção medial do aparato, e B) modalidade *hill*, com escadas ascendentes à porção medial e orifícios de acesso nas porções laterais direita e esquerda do aparato.

4.3.2 Teste modificado do Tabuleiro de *Brinkman*

O teste modificado do tabuleiro de *Brinkman* é um teste de habilidade manual que requer movimento independente e preciso dos dedos, utilizado para verificação da coordenação motora fina do animal (Schmidlin, Kaeser et al. 2011). Consiste em um tabuleiro (22cm x 12cm) com 50 aberturas retangulares com cantos arredondados, sendo 25 deles dispostos em posição vertical e os 25 restantes em posição horizontal. As aberturas retangulares são de diâmetro com 3 mm de profundidade, 12 mm de comprimento e 5 mm de largura, o suficiente para permitir somente a inserção de um dedo para retirada da recompensa, de modo que as mesmas somente possam ser retiradas com o uso de pegada em pinça (uso do polegar em oposição ao indicador), o movimento manual de maior precisão entre primatas (Schmidlin, Kaeser et al. 2011). Os testes foram divididos em duas fases, a fim de facilitar a discriminação entre preferência e dominância manuais. As primeiras 25 sessões do teste foram realizadas com o animal posicionado na cadeira para primatas em tentativas unilaterais (direita ou esquerda), garantidas pela

obstrução da passagem de acesso de um dos membros na cadeira e pelo posicionamento em 45° do tabuleiro em posição de oposição ao membro requerido para a realização dos testes (Figura 5). Cada sessão foi iniciada com o membro superior contrário ao da sessão anterior. Na segunda fase dos testes foram realizadas outras 25 sessões sem restrição unilateral, com o tabuleiro fixado em frente ao animal, sendo permitida uma única tentativa, dando ao animal a liberdade para retirar as recompensas com qualquer um dos membros.

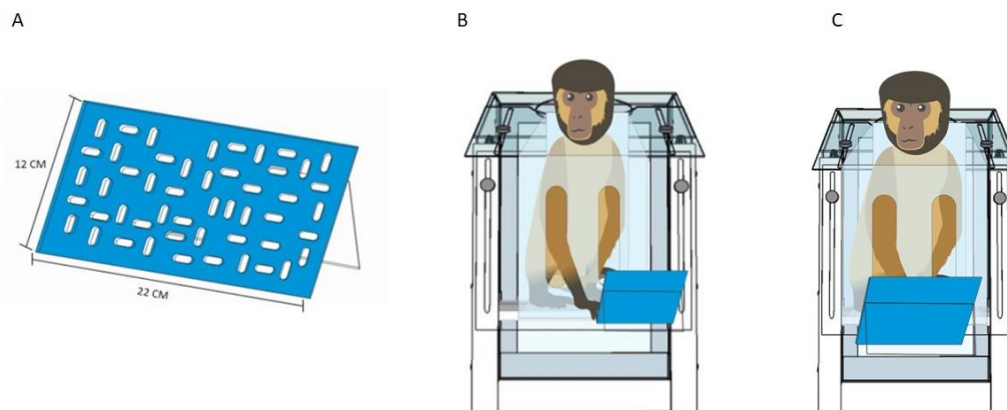


Figura 5.A) modelo e dimensões do tabuleiro de Brinkman. B) posicionamento do tabuleiro na primeira fase do teste. C) posicionamento do tabuleiro na segunda fase do teste.

4.4 Indução do HemiParkinsonismo por 6-OHDA

Os animais foram submetidos ao protocolo de administração intracerebral unilateral de 6-OHDA hidrocloreídrica (4 mg/ml base de peso livre dissolvido em 0,01% ascorbato/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 no 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.

Foram utilizados dois protocolos: O primeiro protocolo de indução foi formado por 10 sítios no núcleo estriado a partir das seguintes coordenadas: 1) Antero-Posterior (AP):19.5 mm, Dorso-Ventral (DV):13 mm, Medio-Lateral (ML) :3 mm; 2) AP:19.5 mm, DV:12 mm, ML:3 mm; 3) AP:19.5 mm, DV: 11 mm, ML: 3mm; 4) AP:17 mm, DV:14

mm, ML: 4mm; 5) AP:17 mm, DV:13 mm, ML:4 mm; 6) AP:14.5 mm, DV:15 mm, ML: 4 mm; 7) AP:14.5 mm, DV:14 mm, ML: 4 mm; 8)AP:14.5 mm, DV:13 mm, ML:4 mm, 9) AP:12.5 mm, DV:15 mm, ML:5.3 mm;10) AP:12.5 mm, DV:14 mm, ML:5.3 mm. Foram injetados 2µl/sítio em uma taxa de 0,5 µl/min. Após cada descida da seringa a mesma permaneceu por 2 minutos no local, antes de ser retirada.

O segundo protocolo de indução de hemiparkinsonismo foi composto por 10 sítios de injeções nas vias nigro estriatais com as seguintes coordenadas: SN: 1) AP:8.5 mm, DV:+0.5 mm, ML:4 mm; 2) AP:8.5 mm, DV:+1.5 mm, ML:4 mm; 3) AP:7.5 mm, DV: 0 mm, ML: 4.3mm; 4) AP:7.5 mm, DV:2 mm, ML: 6.2mm, as vias nigroestriatais 1) AP:11.5 mm, DV:+2.8 mm, ML:7.8 mm; 2) AP:12 mm, DV:+3.5 mm, ML:7.3 mm; 3) AP:12 mm, DV:+2.5 mm, ML: 7.3 mm; 4) AP:11 mm, DV:+3.0 mm, ML:9 mm e na SNC: 1) AP:9.5 mm, DV:+1 mm, ML:2.5 mm; 2) AP:9.5 mm, DV:2 mm, ML:2.5 mm. Foi injetado 2µl/sítio em uma taxa de 0,5 µl/min. Da mesma forma, após cada descida da seringa a mesma permaneceu por 2 minutos no local, antes de ser retirada. Após os procedimentos cirúrgicos os animais foram medicados com tramadol (7mg/kg) e dexametasona (3mg/kg), retornando a suas gaiolas após todos os procedimentos, os animais eram monitorados diariamente, duas vezes ao dia. O primeiro protocolo foi aplicado no M3 e o segundo protocolo foi aplicado no M2.

4.5 Avaliação Clínica

A escala de avaliação clínica dos sintomas motores de primatas não humanos parkinsonianos desenvolvida por (Santana, Palmér et al. 2015), adaptada da escala unificada de avaliação para DP (UPDRS), possui 16 categorias pontuadas de 0 até 3 pontos em todos os parâmetros avaliados, onde zero consiste na ausência de sintomas e o três o estado mais severo dos sintomas. Os parâmetros avaliados são: tremor em repouso, tremor em movimento, congelamento, marcha e locomoção, coordenação motora fina, bradicinesia, hipocinesia, rigidez, balanço corporal, balanço corporal induzido, postura, iniciação de movimento, escalada, coordenação motora grossa, expressão facial e vocalização. O escore máximo do teste é de 48 pontos. As análises foram realizadas uma semana após a cirurgia de injeção de 6-OHDA, sempre no turno da manhã, três vezes por semana por até dois avaliadores que entram no recinto de manutenção do animal. Os mesmos observaram e interagiram com os animais para verificar os sintomas

apresentados, pontuando para cada um dos parâmetros que estão disponíveis no anexo 1. Foram realizadas 15 semanas de análises.

4.6 Análise dos dados

Os dados quantitativos obtidos através das análises dos vídeos e quantificações temporais e/ou de quantidade de vezes na qual um determinado comportamento fora apresentado para o treinamento de posicionamento na cadeira bem como para os testes motores no staircase e tabuleiro de Brinkman foram organizados em planilhas no Excel e analisados através de estatística paramétrica, utilizando os Softwares BioEstat 5.0 e GraphPad Prism. Foram realizados testes de normalidade para detecção de extremos seguido de testes estatísticos para verificação de diferenças significativas. Atendidos os critérios de normalidade, para a determinação de preferência e/ou dominância manual aplicamos teste t bicaudal para amostras pareadas estabelecendo comparações bilaterais. Para verificação do fator aprendizado nos testes utilizamos o método de médias móveis, uma vez que este permite a estimativa de uma curva de aprendizado, e verificamos as diferenças entre os valores obtidos em cinco janelas temporais ao longo da curva obtida durante o período de treinamento, denominados períodos 1, 2, 3, 4 e 5 (P1, P2, P3, P4, P5) correspondentes a intervalos de 10 sessões cada. Aplicamos teste de normalidade para exclusão de dados amostrais extremos, seguido de teste ANOVA sendo adotado o intervalo de confiança mínimo de 95% ($p < 0,05$).

Para análise das alterações nos padrões motores durante os períodos de teste no tabuleiro de Brinkman, estabelecemos uma avaliação quantitativa da sequência temporal utilizada por cada animal para a retirada das recompensas comestíveis no tabuleiro. Para tal, utilizamos um índice de sistematização da sequência motora, conforme anteriormente proposto (Kaeser, Chatagny et al. 2014). Utilizamos como parâmetro uma sequência sistemática iniciando da extremidade esquerda do tabuleiro e finalizando na extremidade direita, conforme ilustrado na figura 4. Para o cálculo do índice utilizamos os valores numéricos correspondentes à sequência padrão e subtraímos dos valores numéricos resultantes da ordem crescente na sequência de retirada dos slots realizada pelos animais. A sequência espectral, por exemplo, determinará valores elevados dos índices. A partir desses cálculos, analisamos a variabilidade dos dados ao longo dos períodos de treinamento a fim de detectar a presença de estabelecimento de hábito motor no teste por parte dos animais, que pode ser observada quando da apresentação de baixa variabilidade entre as sessões consecutivas.

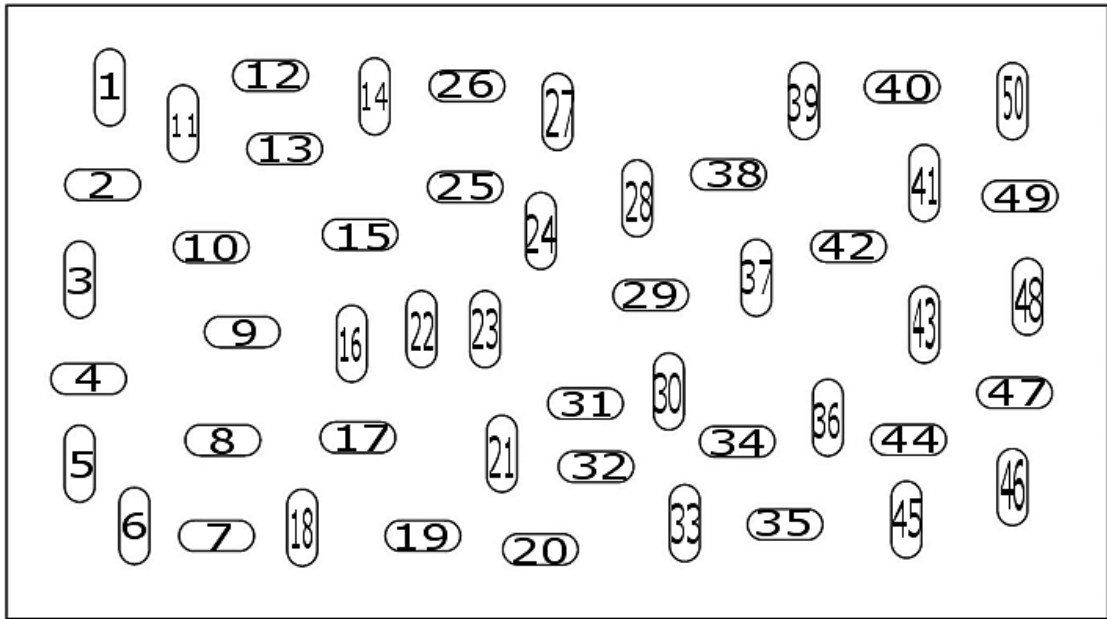


Figura 6. Sequência padrão de análise para o cálculo do índice de sistematização da sequência temporal de retirada das recompensas no tabuleiro de Brinkman.

5. RESULTADOS

5.1 Treinamento por reforçamento positivo para posicionamento na cadeira para primatas

Os animais experimentais aprenderam o comportamento voluntário de entrar e se posicionar na cadeira para primatas em média de 30 sessões durante período de 8 semanas. O treinamento utilizado foi exclusivamente por reforçamento positivo. Houve uma única exceção para o primata M1 que não atendeu ao critério para o posicionamento correto da cabeça no tempo necessário para a permanência na cadeira para primatas. Todavia, o animal experimental aprendeu a entrar espontaneamente na cadeira para primatas e usar as aberturas frontais para manipulação de objetos e coleta de recompensas comestíveis que, por sua vez, estavam posicionadas fora do aparato experimental. Observamos diferenças estatisticamente significativas para a maioria dos parâmetros comportamentais quando comparamos as médias do grupo nos períodos subseqüentes (P1 a P5) de observação. Dos 13 parâmetros observados, 12 apresentaram diferenças significativas entre os 5 períodos com aumentos nos escores positivos, com exceção para o parâmetro permissividade ao toque no corpo (tabela 1).

Tabela 1. Dados comportamentais durante os períodos de treinamento para posicionamento na cadeira.

		P1	P2	P3	P4	P5
1	Toque na cabeça	4.2±0.6	4.2±0.9	2.9±0.4*	5.2±0.6	5.6±0.7
2	Toque no tronco	14.2±1.3***	6.3±2.1**	1.5±0.3	0.7±0.3	00±0.0
3	Tempo de toque na cabeça	32.8±6.2***	36.3±9.1***	72.4±17.4***	394.5±32.2***	725.6±55.5***
4	Tempo de toque no tronco	161.9±0.9***	32.7±11.3	48.4±7.7**	0.3±0.3	0.0±0.0
5	Latência de entrada	38.5±3***	24±4.9***	8.8±1.2	5.9±0.6	2.6±0.4
6	Tempo de permanência na cadeira	715.7±56.1*	799.6±34.3*	636.8±35.7	722.8±14.1	879.1±36.6***
7	Número de entradas espontâneas	6.5±0.6	4.8±0.5***	8.1±0.6	7.5±0.5	7.3±0.5
8	Tempo de recompensa líquida	95.2±13.4***	85±16.4***	288.4±17.6***	404.4±17.5***	428.9±29.2***
9	Tempo com a cabeça para fora	37±10***	129.4±34.4***	393.5±26.3***	545.7±18.7***	635.4±11***
10	Número de vezes com a cabeça para fora	1.7±0.3***	7.8±1.3	11±1.2**	6.9±0.5	6.9±0.4
11	Número de pegadas pela frente	16.7±1.7***	18.7±1.6***	13.8±1.8**	7.7±0.8	6.2±0.6
12	Número de pegadas com a boca	3.5±0.6	6±1.1	6.5±1.1	6.5±0.6	9.4±1.6**
13	Tempo de permanência espontânea	152.3±13.3	207.1±24.5	148.8±17.4	167.2±9.5	163.3±10.3

As médias foram obtidas para cada período de 10 sessões comportamentais denominados P1-P5. ANOVA two way, ** p<0,01; *** p<0,001.

As curvas de aprendizado expressas pelas médias móveis demonstram a obtenção dos melhores escores, ou o início de um platô, em torno da 30ª sessão para a maior parte dos parâmetros comportamentais analisados (Fig 7).

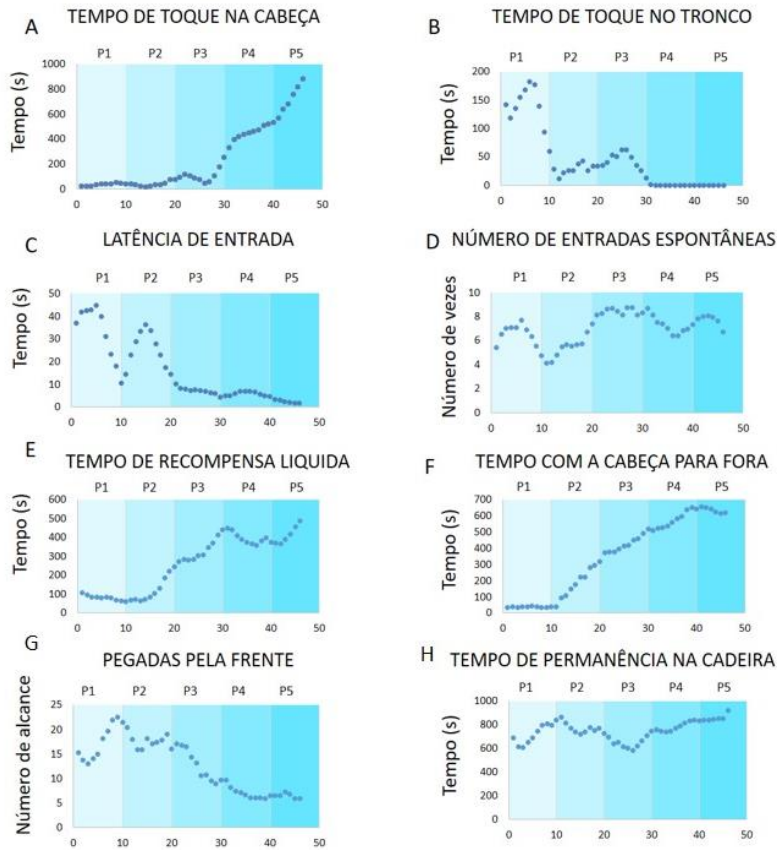


Figura 7. Curvas de aprendizado estimadas por médias móveis do grupo de animais durante o período de treinamento. Os períodos P1-P5 estão evidenciados ao longo da curva.

Análises interindividuais dos parâmetros comportamentais durante o treinamento na cadeira para primatas demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os sujeitos (toques na cabeça: M1:0.3±0.1, M2:4.7±0.6, M3:7.4±0.5; toque no tronco: M1:19.3±8.2, M2:70±12.9, M3:65.4±14.4; latência de entrada: M1:10±2.8, M2:34.4±5.8, M3:4.5±0.3; tempo de permanência espontânea: M1:111.3±9.7, M2:251.7±13.2, M3:10.4±0.7; entradas espontâneas: M1:10.4±0.8, M2:4.7±0.3, M3:5.7±0.5; consumo de recompensa líquida: M1:0.0±0.0, M2:502.3±47.5, M3:237.8±4; posicionamento da cabeça: M1:0.0±0.0, M2:534.8±58.1, M3:509.8±47.8; posicionamento das mãos: M1:23.9±1.7, M2:5.7±1.0, M3:8.3±1.2). Inicialmente, o estabelecimento do platô das curvas de aprendizado foi diferente entre M1, M2 e M3 (o platô foi considerado como

estabelecido quando o maior valor para um dado parâmetro não foi superado nas próximas 3 sessões), com o sujeito mais rápido dominando o comportamento básico em aproximadamente 20 sessões, e o sujeito mais lento fazendo-o em cerca de 37 sessões para atender ao mesmo critério. Alguns dos parâmetros comportamentais analisados não apresentaram estabelecimento de platô (tempo de toque na cabeça, tempo de recompensa líquida e tempo de permanência na cadeira). As comparações das médias individuais das sessões apresentaram diferenças com relação à permissividade do toque da cabeça, posicionamento da cabeça no aparato, latência para entrada e permanência no aparelho, tempo para consumo da recompensa líquida e correto posicionamento e interação pelas aberturas frontais do aparelho (Figura 8). O animal M1 mostrou clara evitação para o posicionamento da cabeça, todavia apresentou melhor desempenho no número de entradas espontâneas no aparato experimental, enquanto M2 apresentou maiores escores no tempo de permanência espontânea, mas aumento na latência de entrada.

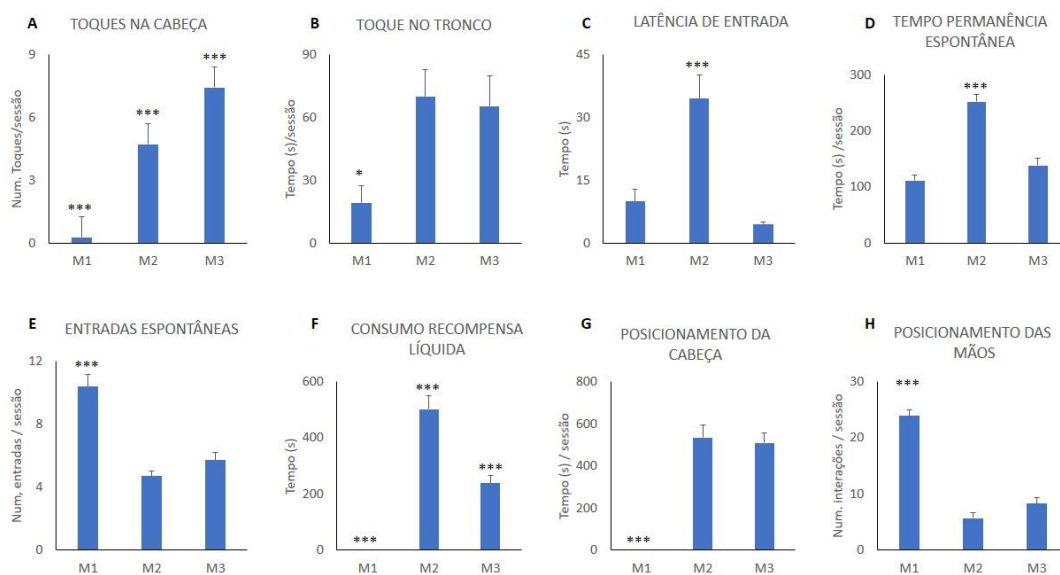


Figura 8. A,B,C,D,E,F,G,H: Representação gráfica das médias individuais obtidas nos parâmetros comportamentais analisados durante o período de treinamento. ANOVA *two-way*, teste *a priori* de Bonferroni. *** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

5.2 Determinação de lateralidade pelo *staircase test*

O teste *staircase* demonstrou diferenças significativas em diversos parâmetros entre os desempenhos dos lados direito e esquerdo para todos os sujeitos experimentais. Observamos diferenças nas comparações bilaterais na latência de pegada da primeira

recompensa, tempo total de conclusão do teste, tentativas de uso de mão contrária ao lado observado no aparato e perda de recompensas (Tabela 2).

Tabela 2. Dados comportamentais obtidos no teste staircase.

	M1		M2		M3	
	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda
Latência de primeira recompensa	3.9±0.1***	2.7 ± 0.2	3.7±0.3	4.4±0.3	3.1±0.4***	5.9 ± 0.8
Tempo total do teste	11±0.8***	8.9 ± 0.8	12.8±1.1***	15.6 ± 1.2	12.1±0.8***	15.3 ± 0.9
Uso de mãos trocadas	0.2±0.03***	0.4±0.04	0.5±0.04***	0.02±0.01	0.5±0.04***	0.0±0.0
Perda de recompensas	0.05±0.02*	0.01±0.001	0.2±0.01	0.003 ± 0.003	0.01±0.01	0.01±0.01

Teste t bicaudal para amostras pareadas. * p<0,05; *** p<0,001.

As comparações interindividuais entre o total de recompensas recuperadas bilateralmente por cada animal demonstraram um desempenho significativamente menor de M1 em relação a M2 e M3 (Figura 9).

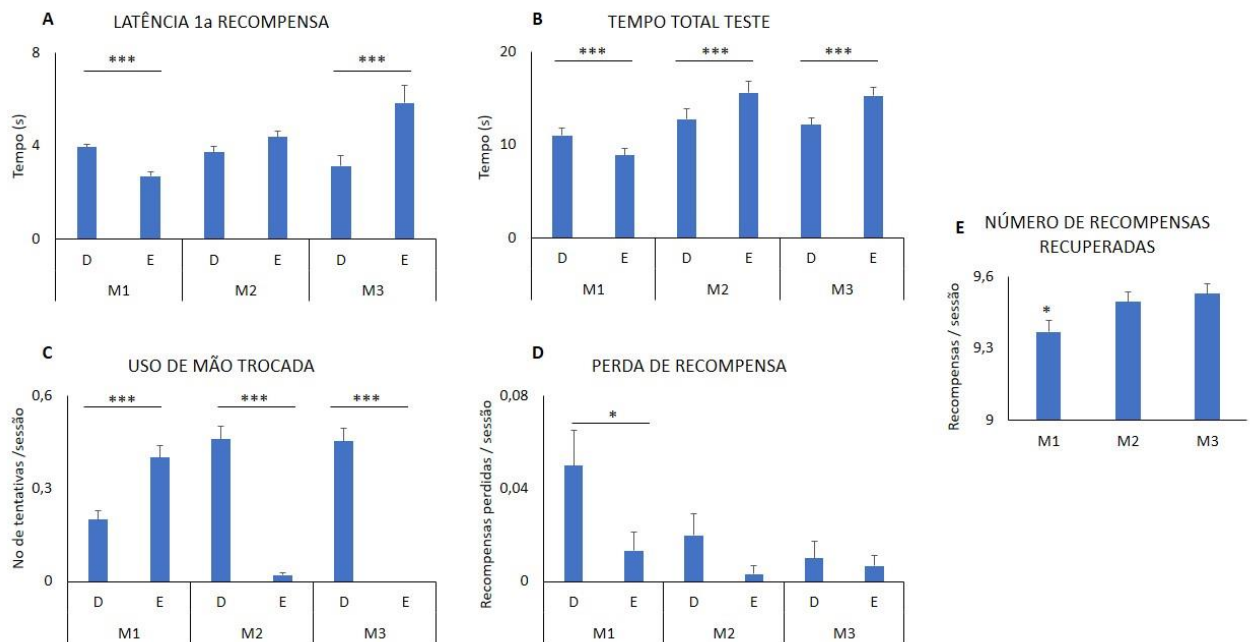


Figura 9. A, B, C, D: Representação gráfica das médias dos parâmetros comportamentais para as mãos direita e esquerda para os primatas M1, M2 e M3. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * p < 0,05; *** p < 0,0001. E: Representação gráfica das médias para o número total de recompensas recuperadas bilateralmente para cada animal. ANOVA two way, teste *a priori* de Bonferroni, * p<0,05.

Comparações entre os resultados obtidos nas versões *hill* e *valley* do teste *staircase* para cada animal, bilateralmente, demonstram diferenças significativas. Todos os animais obtiveram um número maior de recompensas recuperadas na versão *hill* do teste, porém o tempo necessário para a conclusão do teste foi maior nessa versão para os animais M1 e M2. A versão *valley* apresentou um aumento no número de tentativas de

uso de mão trocada e menor latência de pegada da primeira recompensa para os animais M1 e M2 (Figura 10).

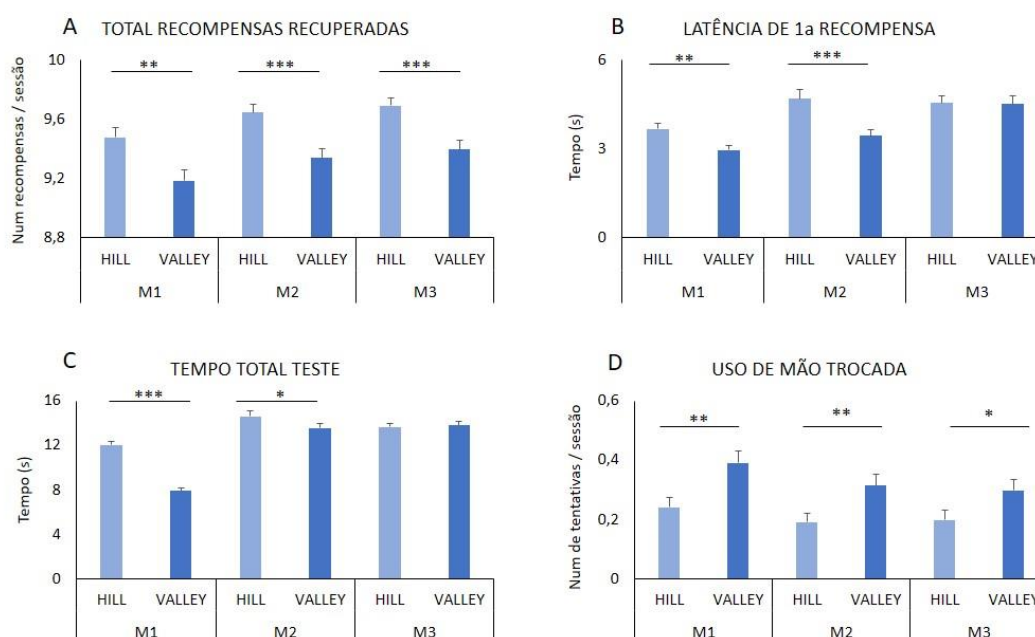


Figura 10 A, B, C, D: Representação gráfica das médias obtidas pelos animais nas versões valley e hill do teste staircase. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

5.3 Determinação da lateralidade pelo tabuleiro de Brinkman

5.3.1 Primeira fase

Na primeira fase do tabuleiro de *Brinkman*, os dados foram obtidos isoladamente para as mãos direita e esquerda. Observamos diferenças significativas nos parâmetros de latência de primeira recompensa, tempo total de conclusão do teste, tentativas de uso de mão trocada e perda de recompensas (tabela 3, figura 11).

Tabela 3. Dados comportamentais obtidos no tabuleiro de Brinkman.

	M1		M2		M3	
	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda	Direita	Esquerda
Latência de primeira recompensa	1.7±0.2	2.1± 0.2	2± 0.2*	2.9± 0.3	1.2± 0.1	1.5± 0.2
Tempo total de conclusão do teste	76.9±2.3***	153.8± 7.8	181.5± 11.1	171.6± 5.3	114.3±3.1*	103.1± 4.7
Tentativa de uso de mãos trocadas	0.4±0.1**	0.0± 0.0	0.2±0.1***	10.7± 0.7	1.4± 0.4	1.3± 0.4
Perda de recompensa	10.5±0.6***	6.2± 0.5	17±0.9**	12.5± 1.4	2.6±0.4***	4.3± 0.4

Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

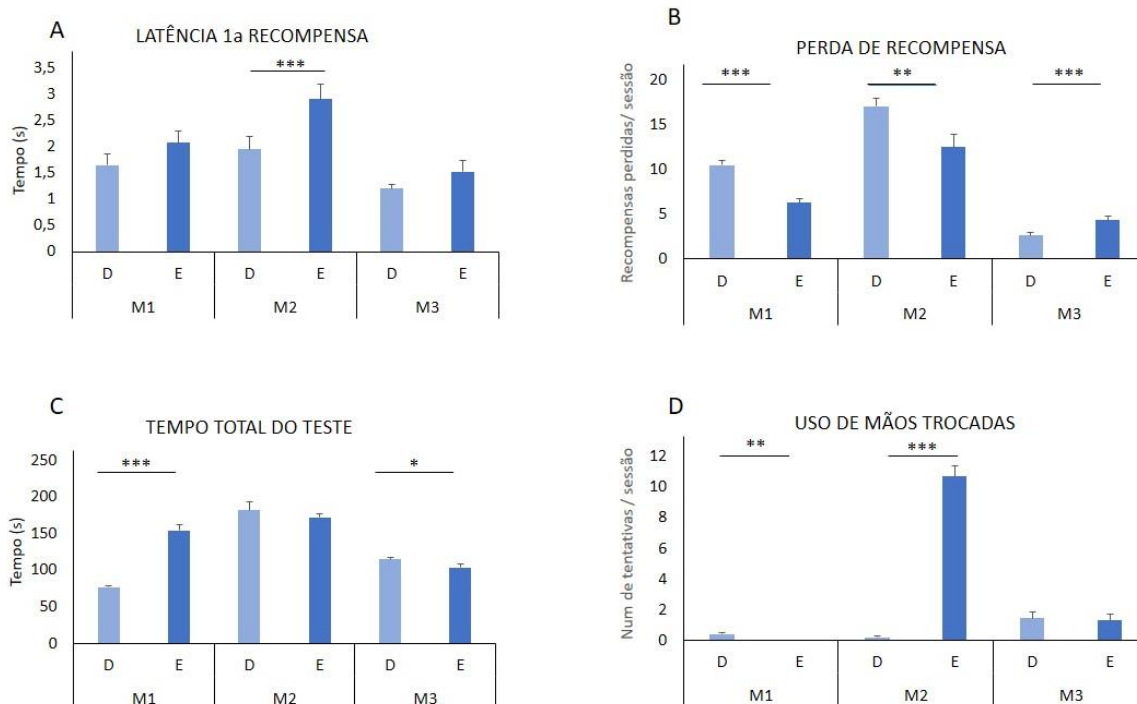


Figura 11. A, B, C, D: Gráficos representativos das médias dos escores obtidos para as mãos direita e esquerda para cada animal no tabuleiro de Brinkman, nos parâmetros latência de 1ª recompensa, uso de mão trocada, recuperação de todas as recompensas e perda de recompensa. *** teste t, $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5.3.2 Segunda fase

Na segunda fase do tabuleiro de *Brinkman*, na qual os animais tinham acesso bilateral irrestrito ao aparato colocado em posição centralizada à frente do animal, observamos diferenças significativas nas latências de alcance da primeira recompensa quando comparamos os lados direito e esquerdo para todos os animais. Os resultados também apresentaram diferenças individuais no desempenho, com M2 apresentando tempo maior para recuperação de todas as recompensas em relação aos demais animais. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o número de recompensas recuperadas, ou perda de recompensa, para os slots verticais e horizontais do tabuleiro para nenhum dos lados. Os dados estão na figura 12.

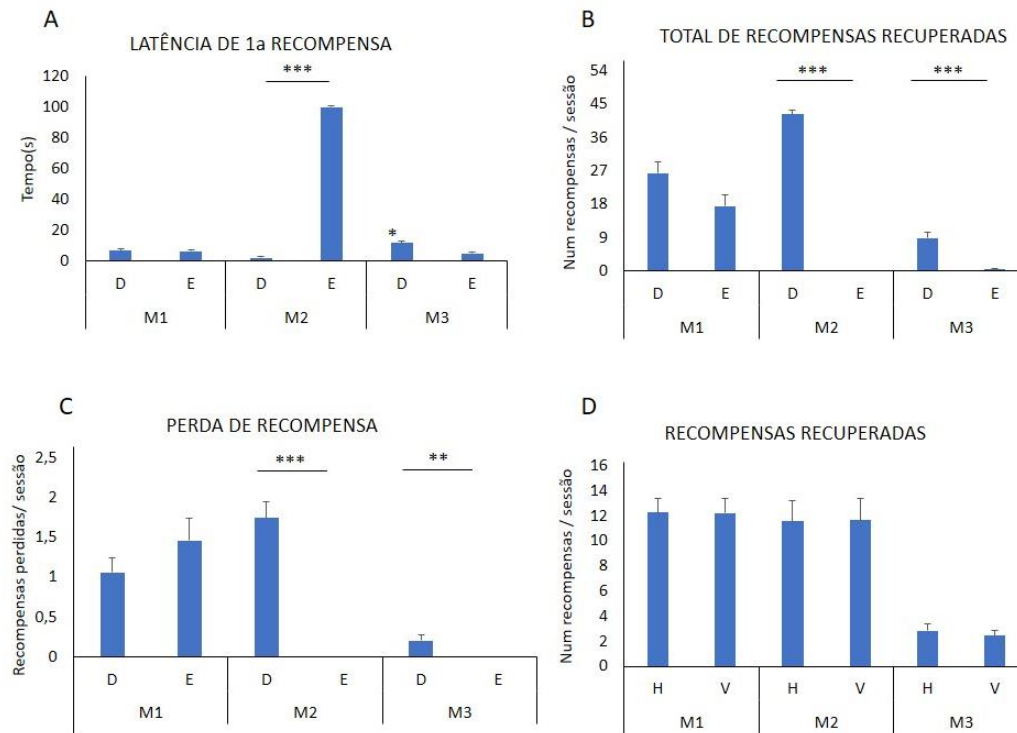


Figura 12. A, B, C: Gráficos representativos das médias dos escores obtidos para as mãos direita e esquerda para cada animal no tabuleiro de Brinkman, nos parâmetros latência de 1ª recompensa, recuperação de todas as recompensas e perda de recompensa. D: Comparações bilaterais entre o número total de recompensas recuperadas dos slots horizontais e verticais do tabuleiro. *** teste t, $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5.3.3 Padrão motor antes da injeção de 6-OHDA

Observamos o tipo de pegada dos animais para recuperação das recompensas, os animais demonstraram clara prevalência de pegada em pinça, que envolve o polegar e o indicador. Para ambas as fases de teste comportamental, o número de recompensas recuperadas pelos animais nos primeiros 30 segundos de teste, denominado escore, foi registrado. A análise dos escores bilaterais na segunda fase não demonstram diferenças significativas entre os períodos analisados. As análises da sequência temporal utilizada pelos animais para recuperar as recompensas dos slots demonstram redução da variabilidade nas sequências temporais realizadas pelos animais nas visitas dos slots na segunda fase, especialmente para os animais M1 e M2. Os dados estão ilustrados na Figura 13.

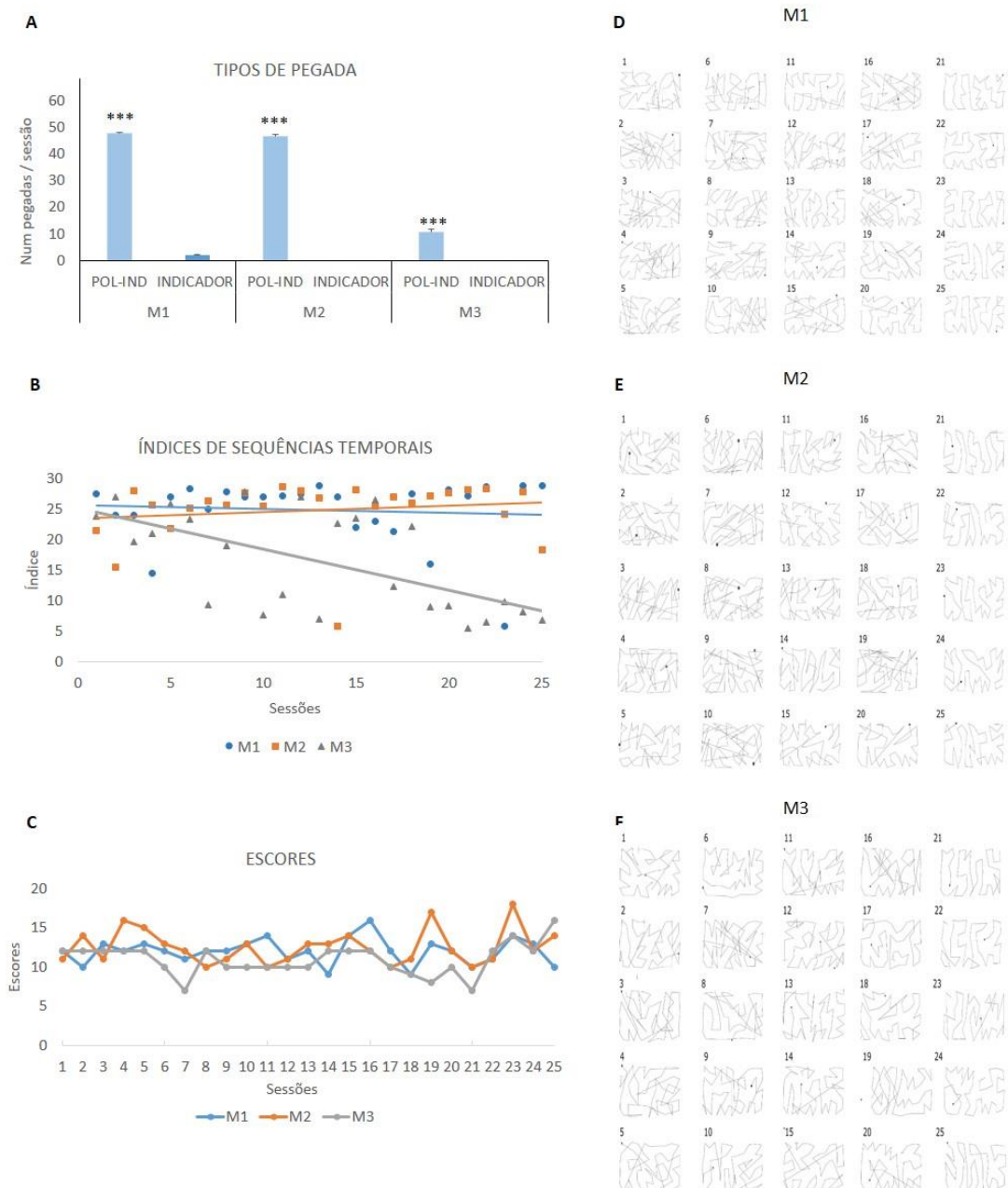


Figura 13. A: Gráficos representativos das médias do uso de pegadas do tipo pinça (polegar-indicador) e uso do indicador somente no período de testes. teste t bicaudal para amostras pareadas, *** $p < 0,001$. B: Índices de sequência temporal obtidas nas sessões da segunda fase para cada animal. C: Escores obtidos para cada animal no período de testes. D, E, F: Trajetórias executadas pelos animais para recuperação das recompensas nos slots distribuídos ao longo do tabuleiro de Brinkman, para cada uma das sessões na segunda fase de experimentos.

5.4 Avaliação Clínica

As análises do protocolo clínico UPDRS para primatas demonstra diferença significativa entre as médias dos escores totais obtidos para os dois protocolos de indução de hemiparkinsonismo aplicados neste estudo. Para o primeiro protocolo aplicado, os sintomas foram observados a partir da primeira semana pós-cirúrgica, com redução gradativa da apresentação da rigidez, iniciação motora, escalada voluntária e coordenação motora, alcançando níveis basais por volta de 6 semanas após a cirurgia. Para o segundo protocolo, observamos padrão similar de apresentação sintomática, seguido de remissão porém com reaparecimento crescente dos sintomas de parkinsonismo a partir da 12^a semana após a intervenção (Figura 14).

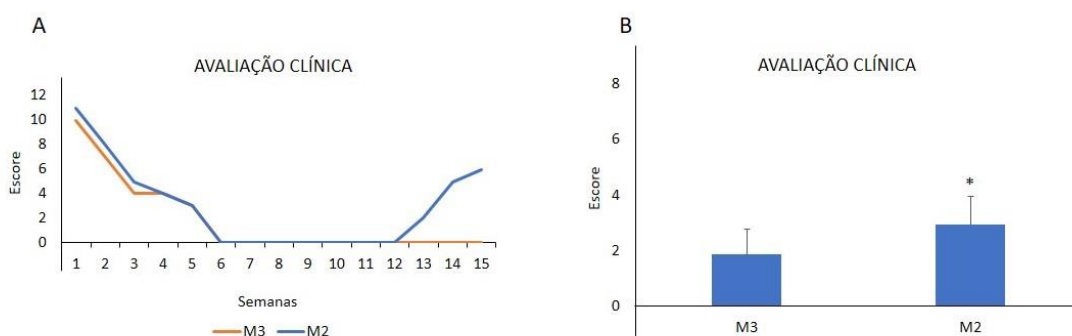


Figura 14: A. Progressão dos escores obtidos no período pós intervenção para os sujeitos experimentais submetidos ao protocolo 1 (M3) e protocolo 2 (M2). B. Representação gráfica das médias dos escores totais da avaliação clínica para os primatas M2 e M3. Teste t bicaudal para amostras pareadas. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo visa o desenvolvimento de um protocolo de indução de hemiparkinsonismo por 6-OHDA em primatas da espécie *Sapajus apella* e também visa avaliar se o uso de técnicas de reforçamento positivo podem ser implementadas de forma eficiente para o treinamento desses primatas para posicionamento e execução de testes comportamentais em aparato de contenção parcial denominado cadeira de primatas. Analisou, ainda, o uso de adaptações dos testes *staircase* e tabuleiro de Brinkman para determinação de lateralidade de primatas da espécie *Sapajus apella*, relevante para planejamento experimental e análises de resultados em ensaios envolvendo distúrbios das vias motoras.

6.1 O reforçamento positivo induz respostas comportamentais em primatas *Sapajus apella*

Nossos resultados demonstram que o uso isolado da técnica do *clicker*, sem qualquer adição de punição positiva ou reforçamento negativo pode ser suficiente para eliciar respostas desejáveis por macacos *Sapajus apella*. Durante o período de treinamento, percebemos que os animais foram capazes de rapidamente relacionar o *clicker* às recompensas e desenvolveram os comportamentos para receber as recompensas oferecidas, comportamento este que não observamos durante nenhuma das fases de apresentação de comportamentos estereotipados ou aberrantes. Todos os sujeitos apresentaram comportamento de entrada espontânea no aparato no decorrer das 50 sessões de treinamento. Em média, o tempo necessário para estabelecer uma conexão entre o reforçador positivo e o *clicker* e aplicá-lo às necessidades requeridas pelos protocolos experimentais e de cuidado parece ser por volta dos 3 meses para a espécie.

É razoável presumir que quanto maior a distância entre os comportamentos naturais da espécie e a tarefa a ser estabelecida, maior a necessidade de tempo e intensidade de rotinas de treinamento para alcançá-los; diferenças entre comportamentos possivelmente alcançáveis e rotinas de treinamento necessárias certamente apresentarão variações significativas em relação às espécies consideradas. Macacos capuchinhos apresentam cérebros relativamente grandes em relação à massa corporal (Perry, Manson et al. 2009), comportamento altricial e assim como primatas superiores denotam grande desenvolvimento cerebral pós-natal, que depende particularmente das experiências no início da infância (Portmann 1990, Fragaszy, Visalberghi et al. 2004). Sob essa

perspectiva, podemos assumir que apresentam semelhanças no aspecto de diversificação dos comportamentos individuais com os humanos, uma vez que o desenvolvimento neurológico extensivo na fase pós-natal tende a intensificar tais diferenças (Elman, Bates et al. 1998).

No presente estudo observamos variações significativas nos parâmetros comportamentais (toques na cabeça, toque no tronco, latência de entrada, tempo de permanência espontânea, entradas espontâneas, consumo de recompensa líquida, posicionamento da cabeça e posicionamento das mãos) entre os animais durante o processo de aprendizagem, com especificidades de preferências de comportamentos sendo observados para cada animal. O primata M1, por exemplo, apresenta clara evasão de posicionamento da cabeça, apesar de melhores desempenhos de posicionamento de membros superiores e entrada espontânea no aparato, M2 apresentou melhor desempenho no posicionamento da cabeça e consumo de recompensa líquida e M3 apresentou melhor permissividade ao toque e menor latência de entrada na cadeira para primatas. O posicionamento em aparato de contenção parcial claramente estabelece comportamento bastante complexo para primatas, uma vez que qualquer restrição de movimentos tende a ser naturalmente percebida como um fator estressor, mesmo quando da habituação comportamental (Ruys, Mendoza et al. 2004). As diferenças apresentadas nos padrões de aprendizagem dos comportamentos necessários à tarefa dos animais experimentais podem ser atribuídas à diferentes processamentos cognitivos em relação ao estímulo que, por sua vez, são atribuídos à variabilidade biológica com bases genéticas, epigenéticas e são fatores esperados nas amostras.

As curvas de aprendizado exibiram platô para a maior parte dos parâmetros analisados (tempo de toque no tronco, latência de entrada, tempo de consumo de recompensa líquida e pegadas pela frente), apesar da apresentação de trajetória ascendente constante para alguns comportamentos, p. e.g. tempo de toque na cabeça, que podem ser indicativos de continuidade de processo de aprendizagem, ergo, o estabelecimento do aprendizado de posicionamento na cadeira foi alcançado durante o período, em conformidade com critérios aplicados em estudos prévios que consideram a consolidação quando do alcance de um valor não excedido pelas próximas 3 ou 5 sessões subsequentes (Chatagny, Badoud et al. 2013, Kaeser, Chatagny et al. 2014).

As diferenças estatísticas significativas entre os períodos analisados denotaram o claro efeito de modulação comportamental no aprendizado da tarefa. Alguns parâmetros,

todavia, como os relacionados à permissividade para o toque no tronco do animal experimental, apresentaram redução de sua apresentação, evidenciando que, mesmo quando habituados ao posicionamento, os animais permanecem em constante estado de alerta. Foi descrito que todas as vezes que o experimentador tocava no tronco do animal experimental, quando este estava posicionado com a cabeça para fora da cadeira para primatas, o mesmo tendia à retirada imediata da cabeça do orifício do aparato a fim de manter controle visual das interações físicas com o experimentador. Esse dado corrobora os estudos desenvolvidos por (Ruys, Mendoza et al. 2004) que analisaram as respostas comportamentais e fisiológicas de *Macaca mulatta* à contenção constante em cadeiras para primatas, demonstraram que mesmo quando alcançada a habituação comportamental, os níveis de cortisol permaneceram elevados quando os animais experimentais são submetidos à restrição de movimento na cadeira para primatas. A fim de evitar aumento desnecessário dos níveis de estresse, a partir da 30ª sessão as tentativas de toque no tronco dos animais posicionados foram eliminadas do protocolo experimental.

O aumento na permissividade dos animais para toques na cabeça, tempo com a cabeça posicionada corretamente no aparato (para fora), aumento significativo do tempo para consumo da recompensa líquida e redução progressiva na latência de entrada espontânea do animal no aparato observados no presente estudo, em conjunto, esses resultados sugerem redução da ansiedade dos animais quando da restrição dos movimentos da cabeça durante o posicionamento do pescoço no orifício do cadeira de primatas, o que nos leva a presumir que houve redução gradativa do estresse relacionado à tarefa por parte dos animais. Todavia, não é possível afirmar categoricamente a redução dos níveis de estresse sem termos realizado dosagem de cortisol nesses animais. Estudos anteriores, em diferentes espécies de primatas, apresentam dados contraditórios acerca das relações entre apresentações comportamentais e elevação dos níveis de cortisol (Kelly, Stonemetz et al. 2009, Novak, Hamel et al. 2013). Não obstante, é importante notar que estes estudos são focados em manifestações comportamentais específicas utilizadas como indicativos de estresse e que incluem a apresentação de comportamentos estereotipados e de autoflagelamento. No presente estudo não detectamos a apresentação de tais comportamentos em nenhuma das fases experimentais e como a taxa de aprendizado dos animais apresentou-se satisfatória, assumimos que os níveis de estresse foram mantidos em padrões não significativos para induzir respostas fisiológicas que pudessem alterar o funcionamento neurológico. Efeitos importantes da elevação dos

níveis de cortisol sobre o desempenho cognitivo no aprendizado em primatas foram demonstrados (Lyons, Lopez et al. 2000) e medidas dos níveis de cortisol em primatas durante o período de treinamento para rotinas experimentais demonstraram aumento dos níveis sistêmicos desse hormônio durante a fase inicial de treinamento, seguido de redução gradual e retorno aos níveis basais com pelo menos três semanas de treinamento em *Macaca mulatta* (Lee, Shin et al. 2013).

Estudos aplicando treino por reforçamento positivo para aprendizagem de testes motores em *Macaca fascicularis* observaram o alcance do platô de aprendizagem após 3 meses de treinamento diário (3 a 5 vezes por semana), com o mínimo de 70 sessões para alcance de resultados significativos nos animais experimentais com melhor taxa de aprendizado (Kaeser, Chatagny et al. 2014). Outros trabalhos demonstraram resultados mais rápidos na aquisição dos comportamentos desejados, utilizando combinação de reforçamento positivo e reforçamento negativo em *Macaca mulatta* (McMillan, Perlman et al. 2014). É importante ressaltar que o uso de reforçamento negativo em primatas é bastante questionável do ponto de vista ético e pode atuar como fator estressor, comprometendo a validade de resultados dependentes de outras variáveis fisiológicas e comportamentais em questão (Wergård et al. 2015). Um treino realizado com reforçamento puramente positivo envolve a não coerção do animal, de modo que o progresso acontece de acordo com o curso natural do mesmo e, caso o animal não exiba um determinado comportamento, sem consequências negativas, o que de certa forma reduz a praticidade da abordagem por conta do tempo para aprendizado mais prolongado quando comparado com outras técnicas (Prescott, 2010).

Ensaio aplicando reforçamento positivo em *Callithrix jacchus* demonstraram que os animais treinados apresentam redução das respostas comportamentais à fatores estressores quando comparados a animais que não receberam o treinamento (Bassett, Buchanan-Smith et al. 2003) em estudos com amostras sanguíneas de animais cativos demonstraram que variáveis fisiológicas relacionadas ao estresse podem ser afetadas positivamente ou até mesmo prevenidas pelo treinamento com reforçamento positivo (Lambeth, Hau et al. 2006).

Primatas apresentam repertório comportamental variado decorrente de processamentos psicológicos complexos e o conhecimento do repertório comportamental característico da espécie em questão é relevante na interpretação dos resultados. Por exemplo, em espécies que estabelecem hierarquia social é sabido que os machos alfa são

mais susceptíveis à apresentação de respostas comportamentais a fatores estressores (Sapolsky 2005). Sabemos que os macacos do gênero *Sapajus* exibem típica hierarquia social, com ocorrência de indivíduos dominantes: machos e fêmeas alfa (Morton, Lee et al. 2013). No presente ensaio, o indivíduo M1 apresenta constituição corpórea mais robusta quando comparado a M2 e M3, bem como exibe claramente padrões de comportamento sugestivos de dominância (e.g. vocalizações mais elevadas, movimentos mais bruscos, postura mais elevada). Se estes fatores são responsáveis pelas diferenças nos padrões de aprendizagem aqui observados, é uma questão que demanda investigações mais detalhadas.

Primatas também tendem a ser sensíveis ao número de pessoas no ambiente, sendo ideal o treinamento ser realizado com somente um ou dois pesquisadores, medida adotada no presente estudo. A interação constante dos animais com a mesma equipe permite o reconhecimento de características comportamentais individuais dos animais que podem influenciar o aprendizado devido a preferências, seja por recompensas seja por pesquisadores, uma vez que os primatas também são capazes de reconhecer os humanos, o que pode afetar os resultados dos testes de acordo com o pesquisador que está aplicando (Waite, Buchanan-Smith et al. 2002). A ocorrência de uma melhor relação entre pesquisador-primata por sua vez tende a reduzir a apresentação de comportamentos anormais, dada a redução do estresse associado à manipulação e interação com o humano, e deve ser buscada no sentido de reduzir a variabilidade dos dados induzida por estresse, além de aumentar a segurança da equipe de trabalho reduzindo a probabilidade de lesões por comportamento agressivo dos animais (Rennie and Buchanan-Smith 2006) bem como proporcionar maior conforto e bem-estar para o animal.

6.2. O *staircase test* e tabuleiro de Brinkmann são eficazes na determinação da lateralidade em *Sapajus apella*

No presente estudo, investigamos a hipótese de que os parâmetros observados nos *staircase test* e tabuleiro de Brinkmann podem ser instrumentos para prever a preferência e/ou dominância manual em primatas da espécie *Sapajus apella*. Os dois testes que aplicamos revelaram resultados consistentes, porém não necessariamente complementares relacionados às conclusões do presente estudo, o que reforça a distinção proposta anteriormente por Chatagny et al (Chatagny, Badoud et al. 2013) acerca da distinção dos atributos de preferência e dominância manual em primatas. Diferenças significativas de desempenho intermanual foram observadas em ambos os testes para

todos os animais, sendo que os parâmetros analisados apresentam maior sensibilidade à detecção de preferência ou dominância manual, sendo desta forma utilizados para a análise dos resultados de cada teste.

O *staircase test* analisa a coordenação motora geral do membro superior, havendo a necessidade de regulações de contrações musculares dos grupamentos flexores, extensores, adutores e abdutores dos membros superiores (direito e esquerdo) para o movimento de alcance de objetos em diversas alturas, em posição aduzida ou abduzida do braço, dependendo do degrau no qual a recompensa está sendo recuperada e da versão do aparato utilizada (adução para a versão *valley* e abdução para a versão *hill*), juntamente com os movimentos precisos de pegada proporcionados pela fina coordenação da musculatura distal.

O tabuleiro de Brinkman, por sua vez, analisa de forma mais direta o desempenho de coordenação motora fina do ato motor complexo de pegada em pinça, em posições vertical e horizontal. Dada a liberdade de movimentação do braço proporcionada pelo teste, que o diferencia do *staircase test*, os movimentos de pegada em pinça podem ser realizados na postura de braço que se fizer mais confortável para o animal, e.g. havendo variações interindividuais claramente observáveis especialmente quando da recuperação de recompensas dos slots horizontais, que podem ser feitos tanto em posição de desvio radial quanto em posição de desvio ulnar (Kaeser, Chatagny et al. 2014).

Ambos os testes são altamente intuitivos e aproveitam as habilidades motoras e o comportamento natural dos primatas. O *staircase test* apresenta pequena necessidade de habituação, na qual o animal percebe após algumas tentativas a impossibilidade de recuperação de todas as recompensas de um determinado pela utilização do membro contrário. O tabuleiro de *Brinkman*, por sua vez, pode ser utilizado com macacos não treinados, que podem facilmente realizá-lo e imediatamente iniciam a retirada das recompensas comestíveis dos compartimentos do tabuleiro quando colocados de frente a este. A análise em duas fases distintas do tabuleiro de *Brinkman* foi realizada neste estudo a fim de proporcionar clareza entre as análises de preferência e dominância manuais.

Dos parâmetros comportamentais analisados, alguns são claros indicativos da preferência enquanto outros tendem a indicar de forma mais categórica o fenômeno de dominância manual (Tabela 4). Conforme anteriormente mencionado, a preferência manual indica o lado primeiramente escolhido pelo animal para a realização de uma

determinada tarefa, enquanto a dominância reflete o lado com o qual o animal apresenta melhor desempenho motor. (Kaeser, Chatagny et al. 2014).

Os resultados obtidos revelaram diferentes sensibilidades dos testes empregados para detecção dos atributos de preferência e dominância manuais. Os resultados dos parâmetros apresentaram concordância na determinação dos fenômenos de preferência e dominância em todos os parâmetros analisados para todos os animais, enquanto os dados do tabuleiro de Brinkman revelaram padrões mistos de determinação de lateralidade tanto para os parâmetros indicativos de preferência como para os parâmetros indicativos de dominância manual (Tabela 4).

Tabela 4. Lateralidade individual demonstrada pelos animais para parâmetros de preferência e dominância manuais.

Teste	Atributo	Parâmetro Comportamental Observado	Lateralidade			
			M1	M2	M3	
Staircase	Preferência	Latência de primeira Recompensa	E	NS	D	
		Uso de mão trocada	E	D	D	
	Dominância	Tempo total de teste	E	D	D	
		Perda de recompensa	E	NS	NS	
Tabuleiro de Brinkman	1 Fase	Preferência	NS	D	NS	
		Uso de mão trocada	D	E	NS	
	Dominância	Tempo total de teste	D	NS	E	
		Perda de recompensa	E	E	D	
	2 Fase	Preferência	Latência de primeira Recompensa	NS	D	E
		Dominância	Recompensas recuperadas	NS	D	D
			Perda de recompensa	NS	D	E

Aparentemente, o *staircase test*, por necessariamente forçar o posicionamento e o estabelecimento de uma trajetória motora mais complexa, exigindo maior coordenação visuomanual por parte do animal (o aparato é confeccionado em acrílico transparente para tal), apresentou uma maior sensibilidade na determinação da lateralidade em primatas. Apesar de sua execução não representar ato motor tão distante do *ethos* do animal, sua maior complexidade exige posicionamento correto dos membros superiores para o sucesso no movimento de recuperação das recompensas, podendo assim servir como fator de normalização de condições permitindo uma análise mais acurada e eliminando ruídos provenientes de estratégias e adaptações motoras tanto posturais como de membros superiores. Por sua vez, o tabuleiro de Brinkman, por permitir maior liberdade de movimentação e uso de estratégias motoras diferentes para recuperação das recompensas,

pode adicionar ruído na determinação dos fenômenos de preferência e dominância manuais. Todavia, analisando os dados em conjunto, podemos determinar a lateralidade dos sujeitos experimentais que podem vir a servir como informações importantes na tomada de decisões experimentais para experimentos com lesões motoras unilaterais.

Dados de variabilidade interindividual demonstram melhor desempenho de M1 na segunda fase do tabuleiro de *Brinkman*. Nessa fase, a apresentação do tabuleiro em posição mediana em relação ao corpo do animal, bem como a não restrição para o uso de um dos membros deixando o animal livre para a escolha pode ter influenciado nos resultados experimentais. Os dados obtidos no *staircase test* para o mesmo sujeito demonstram clara preferência e dominância do MMSS do lado esquerdo para todos os parâmetros analisados, enquanto que na segunda tabuleiro de *Brinkman* os resultados são não significativos para qualquer dos parâmetros analisados, o que sugere um ruído provocado pela avidez do animal na recuperação das recompensas que, nesse desenho experimental, favorece o uso bilateral simultâneo para garantir agilidade e dada a baixa complexidade do teste motor, podem ser responsáveis pela redução de sensibilidade do teste aplicado nessas condições.

Ainda, para a primeira fase do teste de *Brinkman*, a latência de primeira recompensa parece não ser um elemento sensível para detecção de lateralidade pelo mesmo motivo, não tendo revelado significância para dois dos três sujeitos analisados. Dada a clara restrição do membro contralateral para a execução da tarefa, a latência neste caso será mais um indicativo da avidez do animal pela recompensa do que por uma preferência de iniciação do teste com um determinado membro, diferentemente do observado no *staircase test*, que apesar de garantir o não sucesso de retirada de todas as recompensas de um determinado lado utilizando a mão contralateral à sua execução, permite ao animal a livre escolha do lado para iniciação do teste.

No contexto da especificidade motora e dominância manual, forte influência é exercida pelo tamanho do objeto e pelo tipo de pegada sobre o desempenho no teste de *Brinkman*. Em humanos, por exemplo, um estudo focado em pegadas de precisão identificou pelo menos sete tipos de pegada envolvendo o pólex e diversas combinações e posturas assumidas em relação aos outros dígitos (Wong and Whishaw 2004). Como não analisamos detalhadamente estes padrões de forma altamente detalhada no presente estudo, tendo somente observado a predominância de pegada em pinça envolvendo o pólex e o segundo quíroráctilo e relação aos outros tipos de pegada que em sua maioria

foram representadas por pegadas envolvendo o segundo quirodáctilo e combinações variadas de outros dedos da mesma mão ou mesmo a mão oposta, não podemos afirmar em que extensão as diferenças individuais de padrão de pegada entre os macacos podem ter influenciado a variabilidade dos dados aqui descritos.

Não obstante, não podemos sugerir a presença de padrões inconclusivos ou discrepantes entre preferência e dominância ou mesmo ambidestria para os sujeitos experimentais, dadas as observações anteriores e o fato de tais discrepâncias terem sido apresentadas somente nos resultados do teste de Brinkman. Dessa forma, é razoável presumir que a utilização do *staircase test* apresenta maior sensibilidade para determinação de lateralidade por preferência e dominância manuais em primatas. Apesar disso, o tabuleiro de *Brinkman* ainda constitui o método mais utilizado na literatura para análise de lateralidade em estudos com primatas (Brinkman 1984, Chatagny, Badoud et al. 2013, Kaeser, Chatagny et al. 2014).

De um modo geral, testes que envolvem tarefas de grande habilidade são mais sensíveis à detecção da dominância manual, enquanto testes de baixa complexidade motora tendem a revelar mais claramente a preferência manual. O tabuleiro de *Brinkman* é largamente utilizado para estudos da determinação de lateralidade em primatas (Liu and Rouiller 1999, Freund, Schmidlin et al. 2009, Kaeser, Wyss et al. 2010), enquanto o *staircase test* é menos frequentemente descrito (Santisakultarm, Kersbergen et al. 2016). Enquanto o *staircase* permite uma avaliação da coordenação motora de forma global incluindo coordenação combinada de diversos músculos da mão e braço, o tabuleiro de *Brinkman* analisa de forma mais direta a pegada em pinça, que pode ser associada a estratégias motoras variadas envolvendo mão e braço. Não obstante, as análises aqui aplicadas em ambos os testes não apresentam alto grau de sensibilidade a diferenças sutis de desempenho provocados por diferentes graus de desenvolvimento motor ou diferenças individuais na coordenação motora fina (Kaeser, Chatagny et al. 2014). Análises anteriores do desempenho de macacos no tabuleiro de *Brinkman* demonstraram a existência de diferenças interindividuais consideráveis em estratégias e hábitos motores, que influenciam a precisão e os padrões de realização do teste em primatas (Kaeser, Chatagny et al. 2014), semelhantes às diferenças de padrões motores individuais observadas em humanos desde a infância (Kakebeeke, Caflisch et al. 2013).

No presente estudo optamos pela aplicação de um protocolo de curta duração para a determinação da lateralidade dos animais, de modo observar o padrão motor natural dos

animais não influenciado pelo aprendizado motor e consequente aumento de performance de coordenação motora induzida pelos testes (Kaeser, Chatagny et al. 2014). É sugerido que macacos aprendem ou refinam a preferência manual pela experiência motora, sem diferenças observáveis no aprendizado pelos hemisférios ipsi- e contralateral à mão de preferência (Chatagny, Badoud et al. 2013, Kaeser, Chatagny et al. 2014), diferentemente dos humanos onde a dominância manual é uma característica congênita (Warren 1980).

A análise dos padrões motores nas sequências temporais de retirada das recompensas revelou a redução gradativa na variabilidade das sequências, demonstrando que, mesmo havendo curta duração nas análises, especialmente nas últimas cinco sessões observa-se uma clara indicação do estabelecimento de hábito motor para a realização do teste (Chatagny, Badoud et al. 2013, Kaeser, Chatagny et al. 2014), refletido na redução dos valores de variabilidade e na clara redução dos pontos de intersecção nas trajetórias motoras realizadas (Figura 13), um fator que deve ser considerado quando da análise de resultados experimentais envolvendo desordens motoras incluindo abordagens terapêuticas para os mesmos. A criação de hábitos motores certamente será refletida no tempo de execução dos testes, revelando melhoria de desempenho, e não necessariamente reflete melhora de capacidade de coordenação ou desempenho motor diretamente relacionado aos substratos neurais do aparelho locomotor, envolvendo todavia em seu estabelecimento estratégias cognitivas associadas (Haith and Krakauer 2018).

O fenômeno de preferência manual tem sido demonstrado em diversas espécies de primatas. Porém, de forma distinta ao caso humano, onde 90% da população é destra (Raymond and Pontier 2004), as porcentagens e a direção da lateralização variam grandemente entre primatas (Papademetriou, Sheu et al. 2005) de acordo com a espécie e população (Murata, Higo et al. 2008), sendo acentuada com a idade ou pelo treinamento de tarefas motoras (Zhao, Hopkins et al. 2012). Investigações anteriores demonstraram que resultados discrepantes com relação à preferência manual em primatas podem ser resultados da especificidade dos testes e parâmetros para sua determinação. De um modo geral, a complexidade do teste empregado parece desempenhar um papel importante (Spinozzi, Lagana et al. 2007, Uomini 2009). Um fator importante a considerar concerne ao fato de a maior parte dos estudos não fazer distinção entre os atributos de preferência e dominância manual, caracterizando apenas como preferência manual a apresentação de um desempenho superior de uma mão em relação a outra. Assim, tais discrepâncias podem apenas refletir diferenças na documentação dos fenômenos de preferência e

dominância, que já foram demonstrados não serem necessariamente correspondentes entre primatas, mesmo humanos (Chatagny, Badoud et al. 2013).

Ainda, fatores ambientais, culturais e de aprendizagem podem estar envolvidos na apresentação dos atributos de lateralização, *e.g.* o aprendizado pela repetição de um teste motor pode afetar os resultados de testes de lateralidade em primatas (Fagot and Vauclair 1991, Chatagny, Badoud et al. 2013). Humanos, por exemplo, possuem um amplo repertório motor aprendido, especialmente considerando habilidades bimanuais, nas quais a mão de preferência executa o componente mais complexo da tarefa, enquanto a outra mão desempenha papel de estabilização. Hábitos complexos (*e.g.* enfiar a linha no buraco de uma agulha) tendem a favorecer a mão com melhor performance motora (dominante), o que induz a coerência entre preferência e dominância em humanos. Em primatas não humanos, as tarefas bimanuais naturais consistem em tarefas motoras simples (*e.g.* descascar uma fruta ou quebrar uma noz), que não representam grandes desafios à coordenação motora fina e podem justificar a maior discrepância entre preferência e dominância manuais observadas nessas espécies. Existem teorias discordantes acerca da homologia ou não da lateralização cerebral entre humanos e primatas bem como da influência de fatores ambientais, organização cortical e influências genéticas sobre tal fenômeno (Hepper, Shahidullah et al. 1991, Papademetriou, Sheu et al. 2005, Hopkins, Phillips et al. 2011, Kinoshita, Matsui et al. 2012, Gotts, Jo et al. 2013, Kakebeeke, Cafilisch et al. 2013, Kaeser, Chatagny et al. 2014), havendo portanto a necessidade de investigações mais profundas nesse cenário.

6.3 A injeção intracerebral de 6-OHDA pode ser utilizada para indução de HemiParkinsonismo em *Sapajus apella*.

Até o presente momento, a indução de parkinsonismo unilateral por 6-OHDA em *Sapajus apella* não foi relatado na literatura, sendo o presente estudo esforço inédito nesse modelo experimental. Para avaliar as diferenças em termos de apresentação sintomática da doença de Parkinson, utilizamos dois protocolos de indução, focados em diferentes modelos de degeneração da substância negra do mesencéfalo: 1) degeneração dos terminais dopaminérgicos para indução de neurodegeneração retrógrada nas vias nigroestriatais (Rodrigues, Gomide et al. 2003, Perlberg, Lambert et al. 2018) e 2) degeneração da substância negra e vias nigroestriatais (Jeon, Jackson-Lewis et al. 1995). Ambos os protocolos induziram déficits motores nos animais a partir da primeira semana pós-cirurgia de injeção de 6-OHDA, com escores de UPDRS maiores observados no

segundo protocolo de indução. A partir da primeira semana de observação, ambos os animais demonstraram dificuldade de iniciação do movimento, alterações na coordenação motora grossa e fina, dificuldade de escalada na gaiola, hipocinesia, alterações posturais, bradicinesia e rigidez. O animal submetido a intervenção pelo segundo protocolo demonstrou ainda alterações na marcha e locomoção dentro da gaiola. Em nenhum dos protocolos foram observados tremores, seja de repouso ou de intenção. Esses dados corroboram observações anteriores analisando diversos protocolos para indução de parkinsonismo em primatas que demonstram que, tanto em modelos utilizando 6-OHDA como modelos utilizando outras toxinas são capazes de induzir sintomas motores em primatas, com exceção do tremor (Emborg 2007). Até o presente momento não existem relatos da observação de tremores em modelos primatas de parkinsonismo.

Após a primeira semana de análise clínica, observamos que nos dois protocolos de indução, os sintomas motores observados começaram a ser não mais aparentes, diminuindo os escores totais bruscamente nas semanas duas semanas seguintes, e continuaram diminuindo até a sexta semana de avaliação. Essa remissão dos sintomas motores já havia sido demonstrada em protocolos de indução unilateral por 6-OHDA em outras espécies de primatas, com redução dos sintomas motores em saguinos após cerca de 10 semanas pós intervenção (Eslamboli, Baker et al. 2003), em protocolo semelhante ao primeiro protocolo utilizado no presente estudo, com injeções intraestriatais induzindo o quadro degenerativo. Apesar da remissão sintomática, os autores observaram clara redução da reatividade à tirosina hidroxilase na substância negra dos animais injetados. Podemos sugerir, com base nos sintomas apresentados, recuperação e especialmente reaparecimento gradativo dos sintomas após a 12ª semana no segundo animal, que o protocolo que aplicamos foi suficiente para indução de parkinsonismo em fases iniciais, com progressão insidiosa, característica das fases iniciais observadas em humanos.

A partir da 12ª semana, M2 apresentou novamente déficits na coordenação motora fina, bradicinesia em determinados movimentos, rigidez, balanço corporal, dificuldade na escalada e na resposta de iniciação de movimento. M1 não apresentou os mesmos déficits posteriores. Existem dois fatores importantes que podem estar relacionados diretamente a essas diferenças. Primeiramente, é importante considerarmos a anatomia das projeções dopaminérgicas. No segundo protocolo as injeções da neurotoxina foram realizadas no núcleo de neurônios dopaminérgicos e em pontos de suas projeções para o estriado. Dado o volume e distribuição de células neurais na substância negra e no estriado, é razoável

assumir que as injeções diretamente no núcleo, dadas as projeções em padrão semi radial, deverão induzir degeneração em maior escala quando comparados com os padrões degenerativos observados pela degeneração retrógrada induzida pelas injeções diretas no núcleo estriado (Zuch, Nordstroem et al. 2000, Nass, Hall et al. 2002, Kaindlstorfer, Stefanova et al. 2019).

Ainda, a sobreposição de eventos plásticos e degenerativos deve ser considerada quando da avaliação de tais protocolos, uma vez que a 6-OHDA induz degeneração progressiva por alterações oxidativas que podem ser contrabalanceadas por diversos mecanismos fisiológicos envolvendo células gliais imunocompetentes, fatores neurotróficos e elementos indutores de plasticidade cortical que podem estar relacionados ao próprio ethos do animal (Cicchetti, Brownell et al. 2002, Eslamboli, Cummings et al. 2003, Udupa and Chen 2013). Se ou quais desses fatores podem estar implicados na remissão e rerepresentação sintomática desses animais é uma questão que demanda futuras investigações. De um modo geral, as lesões unilaterais por 6-OHDA nas vias nigroestriatais no presente estudo parecem mimetizar os graus dois e três da escala de Hoehn e Yahr em humanos.

6.4 Implicações

Os aprimoramentos de estratégias para ampla implementação dos 3Rs em pesquisas científicas incluem amplos esforços no sentido da substituição (*replacement*), redução e refinamento experimentais. Primatas consistem, ainda, nos modelos experimentais de maior relevância clínica e translacional para o desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de novas abordagens terapêuticas para diversas desordens.

Existe um espaço considerável para o refinamento de procedimentos científicos, veterinários e de criação comuns através do uso de treinamento de reforço positivo, que pode ainda servir como estratégia de enriquecimento ambiental. Primatas são animais altamente treináveis para tarefas, passando por um período de habituação para a realização da tarefa e melhorando seu desempenho de forma crescente ao longo do treinamento, que tem o efeito de além de melhorar o desempenho na atividade proposta generalizar o aprendizado para a realização de tarefas similares (Hikosaka, Rand et al. 1995).

Apesar do amplo uso de cadeiras para primatas para contenção e transporte, existem ainda poucas informações publicadas acerca dos métodos de treinamento e habituação de primatas para sua utilização, que potencialmente age como fator de indução de estresse nos animais, podendo induzir alterações comportamentais e fisiológicas que comprometem a confiabilidade dos dados. A otimização de procedimentos, identificação de possíveis variações necessárias à espécie, a avaliação do tempo necessário para aquisição das respostas comportamentais e redução do estresse relacionado ao estímulo constituem elementos essenciais no planejamento experimental garantindo que o processo de restrição/contenção do animal seja o mais refinado possível reduzindo o estresse e desconforto do animal ao mínimo alcançável facilitando um bom desempenho por parte do animal e na aquisição de dados (McMillan, Bloomsmith et al. 2017).

O envolvimento da equipe de cuidado dos animais é um dos fatores importantes que influenciam todo o processo e validade científica dos dados (Westlund 2015). Interações positivas pesquisador-primata podem melhorar o bem-estar dos animais e aumentar a habilidade dos mesmos em lidar com possíveis fatores estressores (Baker 2004). Quando da implementação de qualquer protocolo de treinamento para primatas em ambiente experimental, é importante considerar as diferenças biológicas, fisiológicas e etologia da espécie a ser utilizada, que afetam todos os aspectos da vida do animal no ambiente de laboratório (Wolfensohn and Honess 2008), e devem influenciar diretamente decisões acerca do tipo de alimento que deve ser oferecido, variáveis ambientais e procedimentos experimentais.

Como a técnica de treinamento por reforçamento positivo requer um maior tempo para aquisição de estabilização da curva de aprendizagem, em alguns cenários experimentais sua implementação pode representar um desafio devido a limites temporais de execução de projetos de pesquisa. Obviamente, o tempo e a duração do processo de habituação devem variar de acordo com a complexidade do procedimento aprendido e de sua proximidade com o *ethos* do animal, bem como da frequência de treinamento (Fernström, Fredlund et al. 2009).

O estudo dos atributos de dominância e preferência manual em primatas, para além de sua importância na observação das similaridades comportamentais e fisiológicas das espécies com os humanos, são essenciais em estudos de efeitos de lesões unilaterais em modelos experimentais de desordens motoras. Além da determinação de hemisfério preferencial para lesão, a determinação de uma linha de base permite a avaliação da

extensão funcional dos danos com base no desempenho individual do animal. É importante considerar ainda o efeito que o próprio treino motor para determinação de lateralidade exerce sobre a recuperação funcional em ensaios aplicando lesões, favorecendo a recuperação dos padrões motores originais do animal, comparados a animais não treinados que tendem gerar estratégias motoras compensatórias (Murata, Higo et al. 2008, Hoogewoud, Hamadjida et al. 2013).

A aplicação de treino motor para detecção de lateralidade e sua descrição detalhada em tais estudos adiciona relevância aos dados no cenário pré-clínico. Diferentemente dos roedores, primatas possuem sistema motor e organização cortical semelhante aos humanos, sendo possíveis análises de destreza manual somente nestes, tornando os resultados desses estudos mais proximamente aplicáveis ao caso humano. Ainda, estes testes permitem testar e quantificar o desempenho motor antes e após a lesão, fornecendo uma análise realista do dano, o que não é possível no caso humano. O impacto considerável da possibilidade de avaliação do impacto pré- e pós-lesão individualmente foi demonstrado em estudos anteriores (Kaeser, Wyss et al. 2010) e pode permitir, por exemplo, o estudo das correlações entre parâmetros anatômicos, extensão do prejuízo funcional, curvas e percentuais de recuperação fornecidos por diferentes abordagens terapêuticas.

A cuidadosa sistematização e descrição de protocolos de indução de parkinsonismo, especialmente em modelos primatas é de indiscutível relevância para o desenvolvimento de estudos em cenário pré-clínico. Uma das principais diferenças em relação a modelos roedores nessa indução trata-se da possibilidade de mimetizar diferentes fases da doença, uma vez que diferentes estudos têm observado alterações e sintomas característicos de fases distintas da progressão da DP humana (Annett, Martel et al. 1994, Eslamboli, Baker et al. 2003, Emborg 2007, Garea-Rodríguez, Eesmaa et al. 2016, Ando, Nishime et al. 2017). Em roedores, a indução de hemiparkinsonismo, apesar de poder ser realizada em sítios diferenciados de injeção conforme realizado no presente estudo, em geral leva a quadros severos da doença, que incluem alta taxa de mortalidade do modelo especialmente em roedores de pequeno porte (Thiele, Warre et al. 2012). As alterações observadas no presente estudo, sugestivas de fases iniciais de parkinsonismo, indicam que futuras adequações de dose/sítio podem ser suficientes para modular a fase de desenvolvimento do parkinsonismo que se deseja mimetizar para os propósitos experimentais em questão.

7. CONCLUSÕES

A implementação de treinamento por reforçamento positivo é eficaz na indução de comportamentos desejáveis assim como o aprendizado de testes comportamentais em macacos *Sapajus apella*. O tempo necessário para aquisição de platô de aprendizado é superior ao observado na aplicação de técnicas combinando reforçamento positivo e negativo. Todavia, o reforçamento positivo afeta positivamente a natureza das relações humano-primata no ambiente do laboratório, influenciando o bem-estar dos animais e reduzindo a probabilidade de apresentação de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, constituindo, assim, importante técnica de refinamento experimental, sendo necessária a implementação de diretrizes para ampla adoção de tais medidas nos protocolos experimentais. Contudo, tais medidas devem considerar as características espécie-específicas bem como a necessidade de esforços experimentais para a determinação das técnicas mais adequadas, duração das sessões, e discussão acerca do impacto do treinamento no ambiente e resultados experimentais em estudos com primatas.

A determinação da lateralidade é fator essencial para estudos aplicando lesões motoras unilaterais, e deve ser adotada como elemento-guia para decisões experimentais em investigações acerca dos efeitos de lesões e tratamentos sobre os danos funcionais à coordenação motora fina e/ou global, configurando rica fonte de dados para a determinação precisa dessas variáveis, porém ainda com limitada descrição na literatura. As relações observadas nesse estudo adicionam evidências a favor dos conceitos e da separação entre os fenômenos de preferência e dominância manual anteriormente propostos (Fagot and Vauclair 1991, Chatagny, Badoud et al. 2013) que podem impactar estudos acerca de lesões e tratamentos em diversas condições motoras, bem como avaliações da recuperação funcional em primatas.

A indução de unilateral de hemiparkinsonismo por 6-OHDA nas vias nigroestriatais é capaz de induzir sintomas motores característicos das fases iniciais da DP, com persistência de progressão sintomática de forma mimética à progressão humana. O desenvolvimento de modelo de hemiparkinsonismo em primatas permite a observação do princípio da redução, bem como a melhor interpretação dos resultados experimentais pela redução da influência de coeficientes de variabilidade biológica. O protocolo de indução por injeção intraestriatal apresentou-se menos eficaz na indução do perfil sintomático, demonstrando que os núcleos e vias de projeção dopaminérgicas configuram

alvos preferenciais para tais protocolos. A possibilidade de regulação dose/sítio de lesão para mimetizar diferentes fases da progressão da doença configura fator importante para o desenho de estudos experimentais para avaliação de abordagens terapêuticas ou elucidação de características fisiopatológicas em diferentes fases da doença com elevado potencial translacional.

8. Referências

Alstermark, B., et al. (2011). "Motor command for precision grip in the macaque monkey can be mediated by spinal interneurons." Journal of neurophysiology **106**(1): 122-126.

Ando, K., et al. (2017). "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 **28**(8): 670.

Annett, L., et al. (1994). "Behavioral assessment of the effects of embryonic nigral grafts in marmosets with unilateral 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway." Experimental neurology **125**(2): 228-246.

Annett, L., et al. (1997). "Survival of nigral grafts within the striatum of marmosets with 6-OHDA lesions depends critically on donor embryo age." Cell Transplantation **6**(6): 557-569.

Arnason, G. and J. Clausen (2016). "On balance: weighing harms and benefits in fundamental neurological research using nonhuman primates." Medicine, Health Care and Philosophy **19**(2): 229-237.

Baker, K. C. (2004). "Benefits of positive human interaction for socially-housed chimpanzees." Animal welfare (South Mimms, England) **13**(2): 239.

Bassett, L., et al. (2003). "Effects of training on stress-related behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in relation to coping with routine husbandry procedures." Journal of Applied Animal Welfare Science **6**(3): 221-233.

Bauso, D., et al. (2012). "Incidence and prevalence of Parkinson's disease in Buenos Aires City, Argentina." European journal of neurology **19**(8): 1108-1113.

Beal, M. F. (2001). "Experimental models of Parkinson's disease." Nature reviews neuroscience **2**(5): 325.

Blandini, F., et al. (2000). "Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease." Progress in neurobiology **62**(1): 63-88.

Blum, D., et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Progress in neurobiology **65**(2): 135-172.

Bortoff, G. A. and P. L. Strick (1993). "Corticospinal terminations in two new-world primates: further evidence that corticomotoneuronal connections provide part of the neural substrate for manual dexterity." Journal of Neuroscience **13**(12): 5105-5118.

Bové, J., et al. (2005). "Toxin-induced models of Parkinson's disease." NeuroRx **2**(3): 484-494.

Bovolenta, T. M., et al. (2017). "Average annual cost of Parkinson's disease in São Paulo, Brazil, with a focus on disease-related motor symptoms." Clinical interventions in aging **12**: 2095.

Braak, H. and K. Del Tredici (2008). "Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered." Experimental neurology **212**(1): 226-229.

Brinkman, C. (1984). "Supplementary motor area of the monkey's cerebral cortex: short- and long-term deficits after unilateral ablation and the effects of subsequent callosal section." Journal of Neuroscience **4**(4): 918-929.

Chatagny, P., et al. (2013). "Distinction between hand dominance and hand preference in primates: a behavioral investigation of manual dexterity in nonhuman primates (macaques) and human subjects." Brain and behavior **3**(5): 575-595.

Cicchetti, F., et al. (2002). "Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging." European Journal of Neuroscience **15**(6): 991-998.

Deumens, R., et al. (2002). "Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA 1

Elman, J. L., et al. (1998). Rethinking innateness: A connectionist perspective on development, MIT press.

Emborg, M. E. (2007). "Nonhuman primate models of Parkinson's disease." ILAR journal **48**(4): 339-355.

Eslamboli, A., et al. (2003). "Sensorimotor deficits in a unilateral intrastriatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys." Experimental neurology **183**(2): 418-429.

Eslamboli, A., et al. (2003). "Recombinant adeno-associated viral vector (rAAV) delivery of GDNF provides protection against 6-OHDA lesion in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*)." Experimental neurology **184**(1): 536-548.

Eslamboli, A., et al. (2005). "Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease." Journal of Neuroscience **25**(4): 769-777.

Fagot, J. and J. Vauclair (1991). "Manual laterality in nonhuman primates: a distinction between handedness and manual specialization." Psychological bulletin **109**(1): 76.

Fernström, A. L., et al. (2009). "Positive reinforcement training in rhesus macaques—training progress as a result of training frequency." American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists **71**(5): 373-379.

Fragaszy, D. M., et al. (2004). The complete capuchin: the biology of the genus Cebus, Cambridge University Press.

Freund, P., et al. (2009). "Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates—re-examination and extension of behavioral data." European Journal of Neuroscience **29**(5): 983-996.

Galvan, A. and T. Wichmann (2007). "GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders." Progress in brain research **160**: 287-312.

Garea-Rodríguez, E., et al. (2016). "Comparative analysis of the effects of neurotrophic factors CDNF and GDNF in a nonhuman primate model of Parkinson's disease." PLoS one **11**(2): e0149776.

Garea-Rodríguez, E., et al. (2012). "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 **210**(2): 195-201.

Gotts, S. J., et al. (2013). "Two distinct forms of functional lateralization in the human brain." Proceedings of the National Academy of Sciences: 201302581.

Gustavsson, A., et al. (2011). "Cost of disorders of the brain in Europe 2010." European Neuropsychopharmacology **21**(10): 718-779.

Haith, A. M. and J. W. Krakauer (2018). "The multiple effects of practice: skill, habit and reduced cognitive load." Current opinion in behavioral sciences **20**: 196-201.

Hepper, P. G., et al. (1991). "Handedness in the human fetus." Neuropsychologia **29**(11): 1107-1111.

Hikosaka, O., et al. (1995). "Learning of sequential movements in the monkey: process of learning and retention of memory." Journal of neurophysiology **74**(4): 1652-1661.

Hoogewoud, F., et al. (2013). "Comparison of functional recovery of manual dexterity after unilateral spinal cord lesion or motor cortex lesion in adult macaque monkeys." Frontiers in neurology **4**: 101.

Hopkins, W. D., et al. (2011). "Hand preferences for coordinated bimanual actions in 777 great apes: implications for the evolution of handedness in hominins." Journal of human evolution **60**(5): 605-611.

Howard, B., et al. (2016). The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use: Refinement, Reduction, and Research, CRC Press.

Jagmag, S. A., et al. (2016). "Evaluation of models of Parkinson's disease." Frontiers in neuroscience **9**: 503.

Jeon, B. S., et al. (1995). "6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death." Neurodegeneration **4**(2): 131-137.

Junaid, J. (2016). "The Welfare of Animals Used in Research, Practice and Ethics." The Canadian Veterinary Journal **57**(2): 175.

Kaesler, M., et al. (2014). "Variability of manual dexterity performance in non-human primates (*Macaca fascicularis*)." International Journal of Comparative Psychology **27**(2).

Kaesler, M., et al. (2010). "Effects of unilateral motor cortex lesion on ipsilesional hand's reach and grasp performance in monkeys: relationship with recovery in the contralesional hand." Journal of neurophysiology **103**(3): 1630-1645.

Kaindlstorfer, C., et al. (2019). "L-dopa response pattern in a rat model of mild striatonigral degeneration." PloS one **14**(6): e0218130.

Takebeke, T. H., et al. (2013). "Neuromotor development in children. Part 3: motor performance in 3-to 5-year-olds." Developmental Medicine & Child Neurology **55**(3): 248-256.

Kalia, L. V. and A. E. Lang (2015). "Parkinson's disease." Lancet **386**(9996): 896-912.

Kelly, B., et al. (2009). Relationships between hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis activity, gene polymorphisms, and abnormal behavior in a large colony cohort of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). American journal of primatology, WILEY-LISS DIV JOHN WILEY & SONS INC, 111 RIVER ST, HOBOKEN, NJ 07030 USA.

Kinoshita, M., et al. (2012). "Genetic dissection of the circuit for hand dexterity in primates." Nature **487**(7406): 235.

Kirk, R. G. W. (2018). "Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research." Sci Technol Human Values **43**(4): 622-648.

Lambeth, S. P., et al. (2006). "Positive reinforcement training affects hematologic and serum chemistry values in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*)." American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists **68**(3): 245-256.

Lee, J. I., et al. (2013). "Changes of N/L ratio and cortisol levels associated with experimental training in untrained rhesus macaques." Journal of medical primatology **42**(1): 10-14.

Liu, Y. and E. M. Rouiller (1999). "Mechanisms of recovery of dexterity following unilateral lesion of the sensorimotor cortex in adult monkeys." Experimental brain research **128**(1-2): 149-159.

Lyons, D. M., et al. (2000). "Stress-level cortisol treatment impairs inhibitory control of behavior in monkeys." Journal of Neuroscience **20**(20): 7816-7821.

Marras, C., et al. (2018). "Prevalence of Parkinson's disease across North America." NPJ Parkinson's disease **4**(1): 21.

Marshall, J. W. and R. M. Ridley (2003). "Assessment of cognitive and motor deficits in a marmoset model of stroke." ILAR journal **44**(2): 153-160.

Masataka, N. (1989). "Population-level asymmetry of hand preference in lemurs." Behaviour: 244-247.

McGregor, M. M. and A. B. Nelson (2019). "Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease." Neuron **101**(6): 1042-1056.

McMillan, J. L., et al. (2017). "An international survey of approaches to chair restraint of nonhuman primates." Comparative medicine **67**(5): 442-451.

McMillan, J. L., et al. (2014). "Refining the pole-and-collar method of restraint: emphasizing the use of positive training techniques with rhesus macaques (*Macaca mulatta*)." Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **53**(1): 61-68.

Mendl, M., et al. (2009). "Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms." Applied Animal Behaviour Science **118**(3-4): 161-181.

Milton, A., et al. (2004). "Dissociation of hemi-spatial and hemi-motor impairments in a unilateral primate model of Parkinson's disease." Behavioural brain research **150**(1-2): 55-63.

Morton, F. B., et al. (2013). "Personality structure in brown capuchin monkeys (*Sapajus apella*): Comparisons with chimpanzees (*Pan troglodytes*), orangutans (*Pongo spp.*), and rhesus macaques (*Macaca mulatta*)." Journal of Comparative Psychology **127**(3): 282.

Murata, Y., et al. (2008). "Effects of motor training on the recovery of manual dexterity after primary motor cortex lesion in macaque monkeys." Journal of neurophysiology **99**(2): 773-786.

Nass, R., et al. (2002). "Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(5): 3264-3269.

Nassi, J. J., et al. (2013). "Corticocortical feedback contributes to surround suppression in V1 of the alert primate." Journal of Neuroscience **33**(19): 8504-8517.

Novak, M. A., et al. (2013). "Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: a review." Applied Animal Behaviour Science **143**(2-4): 135-149.

Örlink, K. and C. Reh binder (2000). "Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments?" Laboratory animals **34**(2): 121-130.

Papademetriou, E., et al. (2005). "A meta-analysis of primate hand preferences, particularly for reaching." Journal of Comparative Psychology **119**(1): 33.

Perlberg, V., et al. (2018). "Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI." PloS one **13**(9): e0202597.

Perry, S., et al. (2009). Manipulative monkeys, Harvard University Press.

Portmann, A. (1990). *A Zoologist Looks at Humankind*. Schaffer J, trans. New York: Columbia 8, University Press.

Prescott, M. J. (2010). "Ethics of primate use." Advances in Science and Research **5**(1): 11-22.

Raymond, M. and D. Pontier (2004). "Is there geographical variation in human handedness?" Laterality: Asymmetries of Body, Brain and Cognition **9**(1): 35-51.

Redgrave, P., et al. (2010). "Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease." Nature reviews neuroscience **11**(11): 760.

Rennie, A. and H. Buchanan-Smith (2006). "Refinement of the use of non-human primates in scientific research. Part I: the influence of humans." ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD- **15**(3): 203.

Ridley, R. M., et al. (2006). "Neglect of memory after dopaminergic lesions in monkeys." Behavioural brain research **166**(2): 253-262.

Rodrigues, R. W. P., et al. (2003). "Striatal injection of 6-hydroxydopamine induces retrograde degeneration and glial activation in the nigrostriatal pathway." Acta cirúrgica brasileira **18**(4): 272-282.

Ruys, J., et al. (2004). "Behavioral and physiological adaptation to repeated chair restraint in rhesus macaques." Physiology & behavior **82**(2-3): 205-213.

Santana, M., et al. (2015). "Characterization of long-term motor deficits in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in the common marmoset." Behavioural brain research **290**: 90-101.

Santana, M. B., et al. (2014). "Spinal cord stimulation alleviates motor deficits in a primate model of Parkinson disease." Neuron **84**(4): 716-722.

Santisakultarm, T. P., et al. (2016). "Two-photon imaging of cerebral hemodynamics and neural activity in awake and anesthetized marmosets." Journal of neuroscience methods **271**: 55-64.

Sapolsky, R. M. (2005). "The influence of social hierarchy on primate health." Science **308**(5722): 648-652.

Schmidlin, E., et al. (2011). "Behavioral assessment of manual dexterity in non-human primates." Journal of visualized experiments: JoVE(57).

Serrien, D. J., et al. (2006). "Dynamics of hemispheric specialization and integration in the context of motor control." Nature reviews neuroscience **7**(2): 160.

Spinozzi, G., et al. (1998). "Hand preferences in unimanual and coordinated-bimanual tasks by tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*)." Journal of Comparative Psychology **112**(2): 183.

Spinozzi, G., et al. (2007). "Hand use by tufted capuchins (*Cebus apella*) to extract a small food item from a tube: digit movements, hand preference, and performance." American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists **69**(3): 336-352.

Stoker, T. and J. Greenland (2018). "Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects."

Thiele, S. L., et al. (2012). "Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease." JoVE (Journal of Visualized Experiments)(60): e3234.

Tieu, K. (2011). "A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **1**(1): a009316.

Tysnes, O.-B. and A. Storstein (2017). "Epidemiology of Parkinson's disease." Journal of Neural Transmission **124**(8): 901-905.

Udupa, K. and R. Chen (2013). "Motor cortical plasticity in Parkinson's disease." Frontiers in neurology **4**: 128.

Uomini, N. T. (2009). "The prehistory of handedness: archaeological data and comparative ethology." Journal of human evolution **57**(4): 411-419.

Villa, M., et al. (2013). "One-electron reduction of 6-hydroxydopamine quinone is essential in 6-hydroxydopamine neurotoxicity." Neurotoxicity research **24**(1): 94-101.

von Campenhausen, S., et al. (2005). "Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe." European Neuropsychopharmacology **15**(4): 473-490.

Waite, C., et al. (2002). "The effects of caretaker-primate relationships on primates in the laboratory." Journal of Applied Animal Welfare Science **5**(4): 309-319.

Ward, J. P., et al. (1990). "Handedness as a function of sex and age in a large population of Lemur." Journal of Comparative Psychology **104**(2): 167.

Warren, J. M. (1980). "Handedness and laterality in humans and other animals." Physiological psychology **8**(3): 351-359.

Wergård, E.-M., et al. (2015). "Training pair-housed Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) using a combination of negative and positive reinforcement." Behavioural processes **113**: 51-59.

Westlund, K. (2015). "Training laboratory primates—benefits and techniques." Primate Biology **2**(1): 119-132.

Wolfensohn, S. and P. Honess (2008). Handbook of primate husbandry and welfare, John Wiley & Sons.

Wong, Y. J. and I. Q. Whishaw (2004). "Precision grasps of children and young and old adults: individual differences in digit contact strategy, purchase pattern, and digit posture." Behavioural brain research **154**(1): 113-123.

Yun, J.-W., et al. (2015). "Modeling Parkinson's disease in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): overview of models, methods, and animal care." Laboratory animal research **31**(4): 155-165.

Zhao, D., et al. (2012). "Handedness in nature: first evidence on manual laterality on bimanual coordinated tube task in wild primates." American Journal of Physical Anthropology **148**(1): 36-44.

Zuch, C. L., et al. (2000). "Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion." Journal of Comparative Neurology **427**(3): 440-454.

9. Anexo

Escala de Avaliação Clínica

Categorias	Pontuação
	[0]:Ausente
Tremor em	[1]:Ocasional ou detectado raramente
Repouso	[2]:Frequente ou facilmente detectável
	[3]:Contínuo e intenso
	[0]: Ausente
Tremor em	[1]: Raramente detectado, presente durante a ação
movimento	[2]: Amplitude moderada, presente durante a ação
	[3]: Moderada amplitude, pode interferir na alimentação
	[0]: Desimpedido para mover o corpo e mostrar o uso normal dos membros
Congelament	[1]: Dificuldades em começar a andar ou no início de movimentos específicos.
o	[2]: O mesmo que em [1], mas os episódios de congelamento têm uma duração maior entre 5 e 10
	[3]: O mesmo que em [1], mas os episódios de congelamento duram mais de 10 s
	[0]: caminha normalmente
Marcha e	[1]: mostra atividade reduzida de caminhada e caminhadas com leve assimetria
locomoção	[2]: Anda devagar, com assimetria e ocasionalmente arrasta um membro
	[3]: não é possível andar
	[0]: Capacidade normal de agarrar marshmallows
Coordenação	[1]: Agarra com dificuldade
motora fina	[2]: Agarra com dificuldade e requer um braço para apoiar opostura ao usar o outro para pegar o marshmallow
	[3]: totalmente incapaz de captar marshmallows
	[0]: Sem dificuldade em iniciar ou executar de forma rápida e precisa movimentos.
	[1]: Dificuldades em iniciar movimentos e exibições mais suaves e movimentos mais lentos ao alcançar marshmallows ou movendo-se espontaneamente
Bradycinesia	[2]: Retarda o atraso ao iniciar movimentos e mostra um desaceleração dos movimentos no alcance e no motor espontâneo atividade
	[3]: totalmente imóvel
	[0]: Move-se livremente e está alerta e responsivo
Hipocinesia	[1]: atividade reduzida, se move com menos velocidade
	[2]: Baixa atividade espontânea, se move quando provocada
	[3]: totalmente imóvel
	[0]: move-se livremente; ações coordenadas, ausência de rigidez
Rigidez	[1]: rigidez leve ou rigidez aparente apenas quando outras partes do corpo estão movendo
	[2]: rigidez impressionante, mas alguns movimentos completos são realizados facilmente
	[3]: rigidez severa, nenhum movimento ou movimento aparecem incompletos
	[0]: postura e coordenação normais
Balanço	[1]: coordenação comprometida, mas é capaz de mudar de quadrupedalismo ao bipedismo sem cair
corporal	[2]: coordenação comprometida, locomoção instável com ocasionais quedas
espontâneo	[3]: De bruços ou deitado em posição supina, incapaz de manter qualquer tipo de postura
	[0]: postura e coordenação normais
Balanço	[1]: coordenação comprometida, mas mudanças do quadrupedalismo ao bipedalismo, sem cair
Corporal	[2]: coordenação comprometida, locomoção instável com ocasionais quedas
Induzido	[3]: De bruços ou deitado em posição supina, incapaz de manter qualquer tipo de postura
	[0]: postura normal
Postura	[1]: postura alterada quando em pé,

	[2]: postura encurvada, posição anormal do tronco; cabeça anormal postura (pescoço flexionado ou inclinado para um lado)
	[3]: Incapaz de manter a postura, deitado em posição supina ou lateral
	[0]: resposta de ameaça imediata e robusta
Iniciação de	[1]: Resposta ligeiramente diminuída ou atrasada, ameaças com abertura boca
Mocimento	[2]: Resposta mínima ou muito atrasada, sem ameaça de boca aberta
	[3]: Nenhuma resposta à provocação
	[0]: normal
Escalada	[1]: sobe com dificuldade. Lenta nos galhos e gaiola em casa malha. Sem cair
	[2]: muito comprometido. Sobe galhos e malha de gaiola com grande esforço. Queda pode ocorrer
	[3]: não é capaz de subir
Coordenação	[0]: Uso normal do membro ao segurar objetos maiores
Motora	[1]: Capacidade reduzida para agarrar objetos maiores para suportar o peso corporal
Grossa	[2]: Raramente consegue captar objetos maiores para suportar o peso corporal
	[3]: não é possível segurar e segurar objetos / estruturas grandes
	[0]: normal
Vocalização	[1]: Diminuição levemente aparente da expressão facial (hipomímia)
	[2]: Hipomímia moderada com lábios separados durante breves momentos
	[3]: Face fixa, perda grave ou total da expressão facial, lábios separados em 6 mm ou mais
	[0]: quantidade normal
Expressão	[1]: vocalização espontânea reduzida
Facial	[2]: vocalização induzida reduzida
	[3]: ausente

Certificado nº 37/2018

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Iuminando parkinson com optogenética: abordagens para o restabelecimento das funções dos núcleos da base em modelo primata**”, registrada com o nº 44/2016, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) Lana Viana Krejcová, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC, observando que ocorreu a inclusão de 03 (três) exemplares adultos machos da espécie *Sapajus apella*, totalizando 06 (seis) animais.

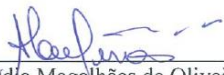
Obs.: O Certificado nº 44/2017 de 16/11/2017, perde sua validade a partir desta data.


Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 31 de outubro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Macaco-prego – <i>Sapajus apella</i>
Nº de animais	6
Peso/Idade	700g a 1 Kg / adultos
Sexo	Macho
Origem	Centro Nacional de Primatas-CENP

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, 10 de dezembro de 2018.


 Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
 CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


 Liliane Almeida Carneiro
 Membro titular da CEUA/IEC/SVS/MS