

MARCELO LUIZ DUTRA VICENTE

PARTICIPAÇÃO DA ONTOGÊNESE CALOSA NO ESTABELECIMENTO DE ESPECIALIZAÇÕES CEREBRAIS. UM ESTUDO DAS CORRELAÇÕES ENTRE ASSIMETRIA MOTORA E SENSÓRIO-MOTORA EM CAMUNDONGOS COM AGENESIA CALOSA POR IRRADIAÇÃO X PRÉ-NATAL

**JUIZ DE FORA
2008**

MARCELO LUIZ DUTRA VICENTE

PARTICIPAÇÃO DA ONTOGÊNESE CALOSA NO ESTABELECIMENTO DE ESPECIALIZAÇÕES CEREBRAIS. UM ESTUDO DAS CORRELAÇÕES ENTRE ASSIMETRIA MOTORA E SENSÓRIO-MOTORA EM CAMUNDONGOS COM AGENESIA CALOSA POR IRRADIAÇÃO X PRÉ-NATAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde Brasileira

Orientador: Prof. Dr. Renan W. Farinazzo Vitral.

**JUIZ DE FORA
2008**

VICENTE, Marcelo Luiz Dutra

Participação da ontogênese calosa no estabelecimento de especializações cerebrais. Uma estudo das correlações entre assimetria motora e sensório-motora em camundongos com agenesia calosa por irradiação X pré-natal/ Marcelo Luiz Dutra Vicente; Orientação Prof. Dr. Renan Wesley Farinazzo Vitral. Juiz de Fora, 2008.

74 f.

Dissertação de Mestrado em Saude, do Programa de Pós-Graduação em Saúde – PPGS/UJFJ, DA Univerdidade Federal de Juiz de Fora.

1. Assimetrias cerebrais
2. Neuroplasticidade funcional
3. Agenesia calosa

MARCELO LUIZ DUTRA VICENTE

PARTICIPAÇÃO DA ONTOGÊNESE CALOSA NO ESTABELECIMENTO DE ESPECIALIZAÇÕES CEREBRAIS. UM ESTUDO DAS CORRELAÇÕES ENTRE ASSIMETRIA MOTORA E SENSÓRIO-MOTORA EM CAMUNDONGOS COM AGENESIA CALOSA POR IRRADIAÇÃO X PRÉ-NATAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado em Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Área de Concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Saúde Brasileira

Aprovada em 07 de Março de 2008.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renan Wesley Farinazzo Vitral

Universidade Federal de Juiz de Fora, Depto. de Fisiologia.

Prof^a. Dr^a Ana Paula Ferreira

Universidade Federal de Juiz de Fora, Depto. de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia.

Dr. Guilherme de Souza Lima Brito

CLC bio A/S Dinamarca, Consultor Científico em Software Bioinformática

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**

Aos meus pais , **JOSÉ LUIZ VICENTE e MARLENE DUTRA VICENTE**, pelo exemplo de trabalho, honestidade, e amor. Sempre me ensinando a valorizar e buscar continuamente o conhecimento.

Aos meus irmãos **MARTA TEREZINHA e MARCOS VINÍCIUS**, companheiros e amigos de aprendizado.

Aos meus filhos, **LUCAS, LUÍZA, JÉSSICA e JOÃO MARCELO**, que através de seus comportamentos alegres, questionadores e sinceros ensinam com muito amor, que a ciência da vida é maravilhosa.

À minha esposa **MARCELLA**, pela paciência, senso crítico e estímulo constante.

Ao meu orientador **RENAN WESLEY FARINAZZO VITRAL**, pela oportunidade de compartilhar de seu conhecimento e experiência. Durante todos esses anos de colaboração tenho, além da gratidão, orgulho de seguir o seu exemplo profissional de pesquisador e de considerá-lo um grande amigo.

À Profª Drª **DARCÍLIA MARIA NAGEN DA COSTA**, pela compreensão e auxílio.

Ao **COLEGIADO e PROFESSORES** do Programa de Pós-Graduação em Saúde.

Ao Prof. Dr. **RAFAEL LINDEN**, por conceder gentilmente o uso do Laboratório de Neurogênese no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

À **FAPEMIG, FINEP, CNPq**, pelo auxílio e suporte ao trabalho.

Ao **INSTITUTO ONCOLÓGICO LTDA**, por conceder gentilmente o uso do espaço físico e aparelho para o procedimento de irradiação.

RESUMO

Estudos prévios têm mostrado que a agenesia calosa causada por irradiação ionizante pré-natal promove alterações na expressão de lateralidade cerebral. Sugere-se que fatores genéticos possam estar envolvidos na expressão de lateralidade cerebral. A intenção deste trabalho foi estudar, em camundongos, as correlações entre expressões de lateralidade cerebral no teste de preferência de patas, que avaliou o comportamento lateralizado motor e no teste de campo aberto, que avaliou o comportamento lateralizado sensório-motor, quando avaliado o comportamento em sua periferia. No teste campo aberto, os animais foram divididos em subgrupos: aqueles que foram expostos a um fator sonoro contínuo estressante de 105 decibéis a 3000 Hz e os que não foram expostos. Foi testado um número total de 49 machos não irradiados e 51 fêmeas não irradiadas, 34 machos irradiados e 39 fêmeas irradiadas. Os instrumentos estatísticos utilizados foram análise de regressão com o coeficiente de Pearson e ANOVA. Os resultados mostraram índice de significância nas correlações lateralidade direcional da preferência de patas x lateralidade direcional do campo aberto e lateralidade direcional da preferência de patas x índice de lateralidade do campo aberto, em machos não irradiados sem som e em fêmeas não irradiadas com som. A modificação nos índices de lateralidade nos animais irradiados dos respectivos grupos sugere a participação da ontogênese calosa no estabelecimento da lateralidade como expressão conjunta. Além disto, a presença de índices de significância nos grupos não irradiados citados sugere a participação de fatores genéticos e/ou epigenéticos no estabelecimento da lateralidade como expressão conjunta.

Palavras-chaves: Agenesia calosa. Irradiação ionizante. Lateralidade motora e sensório-motora.

ABSTRACT

Previous studies showed that callosal agenesis by exposition to prenatal ionizing irradiation leads to changes in the cerebral lateralized behavior. Other studies suggest genetic factors as involved in the establishment of cerebral lateralization. The intention this work was to study, in mice, the correlations between the establishment of the cerebral lateralization on the paw preference test, that objectives the study of motor laterality, and on the open-field test, that objectives the study of sensorimotor lateralization on the periphery. In the open-field test the animals were subdivided in subgroups: that were exposed a stressing continuous sound factor of 105 dB and 3000 Hz and that weren't exposed. It were tested 49 nonirradiated males, 51 nonirradiated females, 34 irradiated males, 39 irradiated females. The statistical tool used were the regression analysis with the Pearson Coefficient and the ANOVA. The results showed significance in correlations of directional laterality of the paw preference x directional laterality of the open-field, and in directional laterality of the paw preference x lateralisation index of the open-field. This was expressed in the nonirradiated males without sound and nonirradiated females with sound. The changes on the laterality index in the irradiated mice on the respective groups suggest the role of the callosal ontogenesis on the establishment of laterality as a dual expression. On the other hand, the presence of significance index on the above cited nonirradiated groups suggest the role of genetic and/or epigenetic factors on the laterality establishment as a dual expression.

Keywords: Callosal agenesis. Ionizing irradiation. Motor and Sensorimotor lateralization.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Visão geral da sala de manutenção dos animais a serem testados. A sala possui um “ <i>timer</i> ” para controle do ciclo claro e escuro. Temperatura ambiente.	27
Figura 2	Aparato em madeira utilizado para avaliação da preferência de patas (acima) e com o camundongo no interior (abaixo), com a porta transparente e o tubo de alimentação.	29
Figura 3	Vista superior do aparato do teste campo aberto sem o animal (acima) e com animal (abaixo).	31
Figura 4	Vista dorsal do encéfalo de animal normal (acima) e irradiado (abaixo). Barra de calibração = 1mm.	34
Figura 5	Corte coronal do encéfalo de animal normal (acima) e irradiado (abaixo) com 40 μm de espessura e corado por Nissl com cresil violeta. Notar, no animal irradiado, a ausência do corpo caloso bem como da comissura dorsal do hipocampo. Calibração = 500 μm .	35
Tabela 1	Índices de significância estatística no teste de correlação de Pearson e ANOVA, de todos os grupos experimentais.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(AxB) - Campo retangular

cGy - Centigray

cm - centímetro

D - Câmara de ionização sem a tampa de acrílico

D1 - Câmara de ionização com a tampa de acrílico

D feto - Dose do feto

D monitor - Dose do monitor

E1 - Primeiro dia gestacional

E16 - Décimo terceiro dia gestacional

FAC - Fator de abertura do colimador

Fb - Fator de bandeja

(FBS)X - *Backscatter* no campo quadrado de lado X, onde X corresponde ao lado do quadrado equivalente ao campo retangular efetivamente utilizado

(FBS) 10x10- *Backscatter* no campo padrão 10x10cm

Fc - Fator de calibração

FICS - Fêmeas irradiadas com som

FISS - Fêmeas irradiadas sem som

FNCS - Fêmeas não irradiadas com som

FNSS - Fêmeas não irradiadas sem som

Fr - Fator de retrodispersão

Gy - Gray

Hz - Hertz

IL OF - índice de lateralidade na periferia do campo aberto

LD OF- lateralidade direcional na periferia do campo aberto

LD PP - lateralidade direcional na preferência de patas

Mev. - Um milhão de elétrons-volt

μm - micrómetro

MICS - Machos irradiados com som

MISS - Machos irradiados sem som

MNCS - Machos não irradiados com som

MNSS - Machos não irradiados sem som

ML OF - magnitude da lateralidade na periferia do campo aberto

ML PP - magnitude da lateralidade na preferência de patas

PDP - Percentual de dose profunda

PDF - Feixe com a profundidade.

%L - percentagem de uso da pata esquerda

% LD - percentagem do tempo de permanência no lado esquerdo

%ML - magnitude da lateralidade através da percentagem do tempo de permanência no lado preferido

%PP - percentagem de uso da pata preferida

P30 - Trigéssimo dia pós natal

Rads - Radiation absorbed dose

X - Lado equivalente

X1 - Dose medida a 10 cm de profundidade, considerando a distância fonte-alvo igual a 100cm

X2 - Dose medida a 20 cm de profundidade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 ASSIMETRIAS CEREBRAIS	14
1.1 Assimetrias Funcionais	14
1.2 Assimetrias Morfológicas	16
1.3 Assimetrias Neuroquímicas	17
2 DESENVOLVIMENTO E FISIOLOGIA DO CORPO CALOSO	18
3 MODELOS EXPERIMENTAIS ENVOLVENDO A AUSÊNCIA PRECOCE DO CORPO CALOSO EM ROEDORES E SUA CORRELAÇÃO COM DESENVOLVIMENTO DE ASSIMETRIAS CEREBRAIS	20
3.1 Irradiação ionizante pré-natal	20
3.2 Transecção cirúrgica do corpo caloso	21
3.3 Mutantes neurológicos	21
4 INFLUÊNCIAS DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DAS ASSIMETRIAS CEREBRAIS.	22
MÉTODOS	24
1 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	24

1.1 Camundongos suíços não irradiados (controles)	24
1.2 Camundongos suíços irradiados	24
1.2.1 <i>Procedimento de irradiação</i>	25
2 CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	27
3 TESTES COMPORTAMENTAIS	28
3.1 Preferência de patas	28
3.2 Campo aberto	30
3.3 Procedimentos histológicos e avaliações morfológicas	32
3.4 Testagens estatísticas	32
RESULTADOS	33
1 ASPECTOS QUALITATIVOS DA MORFOLOGIA DOS ANIMAIS IRRADIADOS	33
2 ESTUDOS DAS CORRELAÇÕES DE LATERALIZAÇÃO MOTORA E SENSÓRIO-MOTORA	33
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	52
APÊNDICE C	53
APÊNDICE D	54
APÊNDICE E	55
APÊNDICE F	56
APÊNDICE G	57
APÊNDICE H	58
APÊNDICE I	59
APÊNDICE J	60
APÊNDICE L	61
APÊNDICE M	62
APÊNDICE N	63
APÊNDICE O	64

APÊNDICE P	65
APÊNDICE Q	66
APÊNDICE R	67
APÊNDICE S	68
APÊNDICE T	69
APÊNDICE U	70
APÊNDICE V	71
APÊNDICE X	72
APÊNDICE Z	73
APÊNDICE AA	74

INTRODUÇÃO

1 ASSIMETRIAS CEREBRAIS

A ocorrência de diferenças cerebrais tanto no nível funcional quanto nos níveis morfológico e neuroquímico tem sido descrita em vários estudos (ROSEN *et al.*, 1984; LENT & SCHMIDT, 1993; BIDDLE & EALES, 2001). Essas características foram denominadas assimetrias cerebrais, e não é uma particularidade do cérebro humano. Vários estudos observam a existência também de assimetrias em animais como ratos, camundongos, gatos, cães e primatas (BISAZZA *et al.*, 1998; QUARANTA *et al.*, 2004).

As assimetrias cerebrais funcionais são assim denominadas porque incluem as diferentes habilidades fisiológicas dos hemisférios cerebrais e também os diversos comportamentos lateralizados. A observação de diferenças morfológicas em determinadas estruturas do sistema nervoso tem sido descrita tanto no nível macroscópico quanto no nível microscópico. As assimetrias neuroquímicas têm sido referidas principalmente quanto às diferenças na concentração de vários neurotransmissores em regiões cerebrais distintas.

1.1 Assimetrias funcionais

Um dos aspectos mais interessantes da organização anatômica das funções cerebrais são as notáveis diferenças encontradas entre os hemisférios e, conseqüentemente, a sua expressão em comportamentos especializados.

As especializações hemisféricas do cérebro humano têm sido descritas desde o século passado. Em 1836, o médico francês Marc Dax propôs que a perda da fala poderia estar relacionada a dano no hemisfério esquerdo (SPRINGER & DEUTSCH, 1993). Em 1861, Pierre Paul Broca descreveu o caso de um paciente que compreendia a linguagem falada, porém era incapaz de falar fluentemente (KANDEL, 2000). Após análise *post mortem* do cérebro deste paciente foi evidenciado uma lesão na região posterior do lobo frontal esquerdo. Em 1864 Broca publicou o trabalho demonstrando uma área específica do hemisfério esquerdo especializada com a função de linguagem (posteriormente chamada Área de Broca) e a síndrome denominada Afasia de Broca ou de Expressão (KANDEL, 2000).

Uma década mais tarde, Carl Wernicke descreveu um tipo de afasia, envolvendo um prejuízo da compreensão da linguagem falada. Ele relacionou esse tipo de afasia com lesões em outra região hemisférica, a porção posterior do lobo temporal esquerdo, demonstrando

assim uma área cerebral funcionalmente especializada para a compreensão da fala (KANDEL, 2000; SUN & WALSH, 2006).

Além da evidência da localização do centro da fala no hemisfério esquerdo na maioria dos seres humanos, outra especialização funcional observada nesse hemisfério é o controle da atividade motora das mãos do lado direito. Mais de 90% da população humana apresenta maior habilidade motora com a mão direita (CORBALLIS, 2003). Cerca de 95% dos direitistas e 70% dos esquerdistas a linguagem falada é controlada pelo hemisfério esquerdo (RASMUSSEN & MILNER, 1977; CORBALLIS, 2003).

Uma importante contribuição para o estudo das especializações cerebrais veio através dos trabalhos de SPERRY (1968; 1974; 1982), avaliando pacientes que foram submetidos à cirurgia de secção sagital do corpo caloso, com o intuito de evitar a propagação de focos epilépticos para o hemisfério contralateral. Foram encontradas inesperadas capacidades de linguagem no hemisfério direito como também funções específicas para tarefas que envolvem faculdades espaciais e não verbais tais como raciocínio geométrico ou situações que exige utilizar habilidades emocionais (GAZZANIGA, 2000). E também foi registrada uma série de deficiências encontradas em pacientes calosotomizados, ao qual ficou conhecido como “Síndrome da desconexão inter-hemisférica” (GESCHWIND & KAPLAN, 1962; GESCHWIND, 1965), contrariando os relatos progressos de AKELAITIS (1941), ao qual sugeriu que humanos com corpo caloso seccionado não comportavam diferentemente dos não seccionados. Assim, considera-se que o nosso cérebro consiste de uma metade esquerda que exerce a função predominantemente de linguagem verbal, controle dos aspectos cognitivo-rationais da fala, pensamento analítico e seqüencial, e outra metade direita que assumiria a participação em atividades espaciais e não verbais, em reatividade emocional e pensamento intuitivo. DENENBERG (1981) relata que lateralização funcional, quando presente, seria similar através das espécies: o hemisfério esquerdo estaria relacionado às funções comunicativas enquanto o hemisfério direito responderia a informações espaciais e afetivas.

Especialização para função semelhante à linguagem humana (speech-like) tem sido descrita em primatas (PETERSEN *et al.*, 1978; HEFFNER & HEFFNER, 1984). Macacos japoneses têm apresentado uma clara vantagem do ouvido direito para a discriminação monoaural de vocalizações espécie-específica (PETERSEN *et al.*, 1978). Esses macacos apresentaram um pronunciado prejuízo para essa habilidade auditiva, seguindo ablação somente do córtex temporal esquerdo (HEFFNER & HEFFNER, 1984).

O conceito de que o hemisfério direito do rato apresentaria algumas características comuns ao hemisfério direito humano, tem sido sugerido por DENENBERG *et al.* (1981; 1986) após realizarem experimentos destinados a estudar especialização hemisférica no rato. Observa-se que processos afetivos e comportamentos espaciais são lateralizados no hemisfério direito do rato, especialmente se os animais fossem manipulados diariamente do nascimento a idade adulta. Evidências adicionais para especialização funcional do hemisfério direito em ratos têm sido fornecidas por outros pesquisadores, por exemplo, ROBINSON (1979), onde através da clipagem cirúrgica da artéria cerebral média de cada lado do cérebro do rato demonstrou que o hemisfério direito é mais fortemente envolvido em atividade exploratória motor do que o esquerdo.

Similar a preferência manual em humanos, a preferência de patas é um bom exemplo de comportamento lateralizado em animais. Dentre os mais estudados incluem gatos (FABRE-THORPE *et al.*, 1993), cães (QUARANTA *et al.*, 2004), ratos (TANG & VERSTYNNEN, 2002), macacos (FAGOT *et al.*, 1991) e camundongos (BIDDLE & EALES, 2001). Principalmente em estudos que envolvem camundongos, tem sido sugerido que esse uso preferencial das patas pode sofrer influência direta de fatores genéticos (BIDDLE *et al.*, 1993; COLLINS, 1991) e epigenéticos (COLLINS, 1975; SCHMIDT *et al.*, 1991; MANHÃES *et al.*, 1993), tanto no nível individual como no populacional.

1.2 Assimetrias morfológicas

Esse tipo de assimetria tem sido observado desde o século passado, quando pesquisadores relataram que os hemisférios apresentavam peso e tamanhos diferenciados (LENT & SCHMIDT, 1993). Porém, somente com a publicação do trabalho de GESCHWIND & LEVITSKY (1968) é que definitivamente comprovaram-se diferenças significativas na morfologia entre os dois hemisférios. Eles mediram as dimensões anatômicas do *planum temporale* (região da superfície superior do lobo temporal) em 100 cérebros humanos. E os resultados claramente demonstraram que o *planum* esquerdo era mais largo em 65% dos cérebros; o *planum* direito foi somente 11% mais largo e em 24% dos cérebros essa área nos lados direito e esquerdo foram aproximadamente iguais em tamanho. O padrão de assimetria do *planum temporale* tem sido associado com diferenças morfológicas da fissura Sylviana (TAN, 1992), em alguns casos associados com circunstâncias patológicas (ECKERT *et al.*, 2006).

Assimetrias ao nível histológico têm sido descritas em cérebros humanos, aos quais algumas foram correlacionadas com assimetrias macroscópicas. GALABURDA *et al* (1978) encontraram relação entre assimetria do *planum temporale* e da área citoarquitetônica denominada Tpt, a qual ocupa uma grande porção do *planum*. Descreveram que a área Tpt é maior no lado esquerdo, naqueles cérebros com um *planum temporale* mais largo. Um outro exemplo é a assimetria na área citoarquitetônica opercular no giro frontal inferior, ao qual foi maior no lado esquerdo (GALABURDA, 1980).

Um importante exemplo de assimetria morfológica tem sido relatado por ORTHNER & SANDLER (1975) e KOOISTRA & HEILMAN (1988). Eles descreveram que o volume do globo pálido é maior no lado esquerdo. Uma vez que os gânglios da base estão envolvidos com o controle motor, tem sido sugerido que essa assimetria volumétrica favorecendo o lado esquerdo esteja correlacionada com o uso preferencial da mão direita.

Várias assimetrias anatômicas têm sido descritas em cérebro de ratos e camundongos. KOLB *et al.* (1982) acharam que o hemisfério direito do rato macho é mais extenso e pesado do que o esquerdo. SCHMIDT & CAPARELLI-DÁQUER (1989) avaliaram a assimetria morfológica da extensão da área dorsal cortical e do peso dos hemisférios em camundongos machos Balb/CCF, aos quais 20% dos animais apresentam corpo caloso ausente ou muito reduzido. Nos camundongos com corpo caloso intacto, eles acharam assimetria favorecendo o hemisfério esquerdo, porém nos animais que apresentam defeito no corpo caloso nenhuma diferença morfológica significativa foi encontrada.

1.3 Assimetrias neuroquímicas

Muitas assimetrias neuroquímicas têm sido descritas para várias regiões cerebrais e relacionadas com os diversos tipos de neurotransmissores. ROSEN *et al.* (1984) observaram em ratos adultos uma concentração assimétrica de dopamina no *striatum* (maior concentração à direita), uma quantidade maior de serotonina no *striatum* esquerdo e no núcleo *accumbens* direito e também um conteúdo maior de ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) no córtex esquerdo, sugerindo uma correlação entre assimetrias neuroquímicas e lateralização comportamental.

Muitos comportamentos lateralizados têm sido conseqüentes a esse tipo de assimetria. NIELSEN *et al.* (1997) têm correlacionado preferência de patas, comportamento rotacional e função dopaminérgica em camundongos HI (*High*) e LO (*Low*), que representam um modelo

genético de lateralização funcional cerebral conforme citado por COLLINS (1991). Os animais denominados HI apresentam um alto grau de lateralização na preferência de patas e os camundongos LO demonstram um baixo grau de lateralização. Nesse trabalho foi avaliado o comportamento rotacional e a ocorrência de assimetria dopaminérgica. Os camundongos HI apresentam uma percentagem de preferência rotacional maior que os animais LO, coincidindo com o grau de lateralização na preferência de patas. E conjuntamente, foram demonstradas diferenças na concentração de dopamina no núcleo *accumbens* e no *striatum* desses animais.

GLICK *et al.* (1982) acharam concentrações diferenciadas de ácido glutâmico descarboxilase (GAD), ácido gama aminobutírico (GABA), acetiltransferase (ChAT) e dopamina, nos gânglios da base. O conteúdo de dopamina no globo pálido foi maior à esquerda. Assimetrias neuroquímicas têm sido constatadas em várias regiões cerebrais de ratos normais, porém muitos trabalhos têm focado principalmente o sistema nigrostriatal. UNGERSTEDT & ARBUTHNOTT (1970) relataram que animais com lesões unilaterais circularam em alta velocidade em direção ao lado ipsilateral à lesão.

2 DESENVOLVIMENTO E FISIOLOGIA DO CORPO CALOSO

O corpo caloso é uma estrutura neuroanatômica presente em todos mamíferos placentados. É composto, em sua maior parte, por fibras mielinizadas que cruzam a linha média conectando áreas corticais e estruturas subcorticais entre os hemisférios direito e esquerdo. Técnicas de microscopia eletrônica têm mostrado tanto o número de axônios inter-hemisféricos quanto o diâmetro e o grau de mielinização das fibras. A contagem total de axônios calosos em humanos é estimada em cerca 200 milhões (ABOITIZ *et al.*, 1992). No macaco *Rhesus* foi determinado um número de 56 milhões de fibras (LAMANTIA & RAKIC, 1990). Em gatos, a quantidade estimada é de 23 milhões de axônios calosos (BERBEL & INNOCENTI, 1988). O corpo caloso do rato é composto por aproximadamente 12 milhões de fibras (GRAVEL *et al.*, 1990). É estimado que uma proporção variável de 50 a 86% desses axônios são mielinizados, dependendo da espécie (GRAVEL *et al.*, 1990). Quanto ao diâmetro das fibras é também variável, entre 0,10 a 2µm, em gatos e macacos (BERBEL & INNOCENTI, 1988; LAMANTIA & RAKIC, 1990).

A formação do corpo caloso parece estar diretamente relacionada aos mecanismos que envolvem a corticogênese (LENT *et al.*, 1990). Conforme tem sido proposto (RAKIC, 1990; ANGEVINE & SIDMAN, 1961), as células precursoras neuronais são oriundas de uma área

embrionária transitória denominada zona ventricular. Após interromper o ciclo mitótico e o processo de divisão, cada uma destas células, que irá compor o córtex cerebral, inicia um movimento migratório em direção à superfície pial movendo-se ao longo das fibras da glia radial, cujos processos prolongam-se radialmente através de toda extensão dos hemisférios, passando por outras zonas embrionárias transitórias. Em certo momento, a célula interrompe a migração e se posiciona em determinados pontos da superfície, onde constituirá as diversas camadas corticais (RAKIC, 1990).

Embora a axogênese seja considerada frequentemente iniciar após cada neurônio alcançar sua posição final no córtex (BERRY & ROGERS, 1965; MOREST, 1970), há exemplos de aparecimento precoce de axônios que projetariam pelo corpo caloso oriundos tanto de células migratórias (SCHWARTZ *et al.*, 1991) como também de neurônios da zona embrionária transitória denominada subplaca (CHUN *et al.*, 1987).

Os fatores que contribuem para o direcionamento das fibras que compõe o corpo caloso não são totalmente conhecidos. SILVER *et al.* (1982) têm relatado que, antes das fibras calosas de embriões de camundongos cruzarem a linha média, agrupamentos de células gliais da linhagem astrocítica formariam uma “ponte” por onde essas fibras em crescimento passariam, direcionando-as para o lado oposto.

Após cruzarem a linha média, a maioria das fibras calosas não alcança a superfície cortical prontamente. Elas, funcionalmente, permanecem durante alguns dias dentro da substância branca e na camada VI (6ª camada do córtex cerebral), antes de arborizarem por todo córtex. Esse processo é denominado *período de espera* (LENT *et al.*, 1990; OLAVARRIA & VAN SLUTYTERS, 1985; LENT & JHAVERI, 1992). Em seguida, após esse período, as fibras que alcançam o córtex cerebral iniciam o processo de arborização, formando padrões descontínuos de terminações em cada área cortical. Porém, não são todas as células que realizam essa etapa, devido à ocorrência do fenômeno de eliminação seletiva de alguns neurônios, durante o desenvolvimento cerebral. LAMANTIA & RAKIC (1990) têm relatado que o cérebro de macacos neonatos contém cerca de 200 milhões de axônios calosos comparados com os 56 milhões de fibras encontradas no cérebro de macaco adulto. O significado funcional deste processo ainda não é claramente compreendido.

A mielinização da maioria dos neurônios que compõem o corpo caloso é uma das últimas etapas do desenvolvimento do sistema nervoso. Estende-se durante um longo período da vida

pós-natal em muitos mamíferos, apesar de ter sido registrado a presença de oligodendrócitos (células responsáveis pela expressão de mielina) dentro do corpo caloso antes de suas conexões estarem totalmente estabelecidos (LENT & JHAVERI, 1992).

Uma grande variação regional de composição de fibras é também encontrada ao longo do trato caloso, provavelmente refletindo projeções de diferentes áreas corticais. Tem sido descrito, em diferentes espécies, que fibras originárias de porções rostrais dos hemisférios cerebrais cursam através do joelho e parte rostral do corpo da estrutura calosa, enquanto axônios oriundos de áreas mais caudais do córtex cerebral cursam através de regiões caudais e do esplênio do corpo caloso (LENT & SCHMIDT, 1993).

As projeções calosas, na maioria das vezes, atingem áreas corticais recíprocas. Isso tem sido evidenciado por SEGRAVES & ROSENQUIST (1982) no córtex visual de gatos e por outros autores no córtex somatossensorial de gatos (CAMINITI *et al.*, 1979) e macacos (PANDYA & VIGNOLO, 1968). A distribuição laminar de células e terminais calosos é altamente variável, dependendo da área cortical e da espécie animal estudada. Contudo, há uma tendência para as conexões calosas predominarem nas camadas supragranulares em muitos mamíferos (JOUANDET *et al.*, 1985; LENT & SCHMIDT, 1993).

Além da conhecida função de possibilitar transferência de informações entre os hemisférios cerebrais, ao corpo caloso tem sido atribuído também o papel de direcionamento das assimetrias cerebrais, tanto em humanos (ABOITIZ *et al.*, 1992) como em animais (DENENBERG, 1981; DENENBERG *et al.*, 1991; MANHÃES *et al.*, 2003).

3 MODELOS EXPERIMENTAIS ENVOLVENDO A AUSÊNCIA PRECOCE DO CORPO CALOSO EM ROEDORES E SUA CORRELAÇÃO COM DESENVOLVIMENTO DE ASSIMETRIAS CEREBRAIS

3.1 Irradiação ionizante pré-natal

Imediatamente após sua última mitose e antes da diferenciação, neurônios jovens têm demonstrado serem exatamente radiosensíveis, mais do que a neuroectoderme do qual foram originados (HICKS, 1954; HICKS, 1958; D'AMATO, 1982). GOBBEL *et al.* (1998) têm descrito a atuação da radiação X em neurônios pós mitóticos, com ocorrência de apoptose neuronal possivelmente induzida por dano no DNA.

SCHMIDT & LENT (1987) descreveram que a irradiação ionizante pré-natal altera o desenvolvimento embrionário do córtex cerebral e corpo caloso em camundongos, de acordo com a dose e idade de irradiação. Todos os camundongos irradiados com 3Gy no 16º dia gestacional (E16) foram completamente acalosos. Em animais irradiados com a mesma dose em E17, foi evidenciado o corpo caloso, porém fortemente reduzido em largura e extensão, principalmente em sua metade posterior. Animais que receberam dose de 2Gy em E17 apresentaram uma redução menos pronunciada, assim demonstrando que essa diminuição da área calosa era dependente da dose total aplicada e da idade gestacional em que o animal era irradiado. Além dessas alterações morfológicas, foi também observado a ocorrência de neurônios ectópicos na camada I do neocórtex e no hipocampo e, também, redução do número de neurônios e da espessura das camadas corticais supragranulares (II e III) e V.

Com relação às alterações da morfologia calosa nesse modelo irradiado, SCHMIDT & LENT (1987) têm atribuído a uma série de fatores, dentre eles: 1º - Essas alterações estariam diretamente ligadas à grande redução do número de neurônios das camadas corticais II, III e V, no qual muitas células calosas estão incluídas. 2º - Dano às células da ponte de glia, as quais supostamente orientariam o cruzamento das fibras calosas na linha média.

3.2 Transecção cirúrgica do corpo caloso

Esse procedimento experimental de transecção cirúrgica na linha média tem sido usado com frequência em camundongos neonatos para relacionar a plasticidade cerebral com a ausência precoce do corpo caloso (MANHÃES *et al.*, 2003). Os animais neonatos são submetidos, nas primeiras 24 horas pós-natal, a uma cirurgia que consiste em um pequeno corte longitudinal ao nível do corpo caloso. Nenhuma alteração significativa da mieloarquitetura e nem da citoarquitetura do córtex cerebral tem sido demonstrada em camundongos adultos calosotomizados (SILVER *et al.*, 1982; LENT & SCHMIDT, 1987).

3.3 Mutantes neurológicos

Animais com alterações congênitas do corpo caloso, principalmente camundongos, têm sido utilizados para correlacionar a gênese do corpo caloso com o desenvolvimento de assimetrias morfológicas cerebrais (SCHMIDT & CAPARELLI-DÁQUER, 1989).

WAHLSTEN (1974; 1982) tem descrito a ocorrência de agenesia parcial e total do corpo caloso em 30% dos camundongos Balb/CCF. Esses animais apresentam um feixe de fibras

longitudinais aberrantes, disposto medialmente, abaixo da substância branca de ambos os hemisférios, denominadas feixe de *Probst*. Os mecanismos genéticos que envolvem a ocorrência de agenesia calosa não foram completamente estabelecidos.

4 INFLUÊNCIAS DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DAS ASSIMETRIAS CEREBRAIS.

Os fatores genéticos, bem como as influências epigenéticas que participam da expressão das assimetrias cerebrais ainda não foram completamente definidas. Tem sido sugerido que o desenvolvimento das assimetrias cerebrais inicia-se a partir de uma estrutura cerebral simétrica, sendo que, principalmente após o nascimento, fatores epigenéticos e mecanismos genéticos alterariam essa forma inicial (LENT & SCHMIDT, 1993). Porém esse conceito não tem sido totalmente aceito, principalmente devido ao registro de assimetrias em períodos recentes do desenvolvimento do sistema nervoso. LEMAY & CULEBRAS (1972) têm observado em humanos, que já na 16ª semana de gestação a região Silviana é mais elevada no hemisfério direito. Um *planum temporale* esquerdo mais largo tem sido encontrado em fetos e neonatos (WADA & DAVIES, 1977), em alguns casos antes da 31ª semana de gestação (CHI *et al.*, 1977). Assimetrias neuroquímicas e funcionais têm sido observadas em humanos em desenvolvimento. BRACCO *et al.* (1984) têm registrado uma maior concentração de acetilcolina transferase no hemisfério direito em fetos entre o 29ª e a 39ª semana de gestação. Avaliações eletrofisiológicas de potenciais evocados e eletroencefalograma em crianças têm indicado que assimetrias funcionais apresentam-se precocemente após o nascimento, e que sua direção muda alternativamente durante o desenvolvimento pós-natal (THATCHER *et al.*, 1987). Essas evidências precoces de assimetrias têm sido descritas em animais como ratos (KOLB *et al.*, 1982; DOWLING *et al.*, 1982) e gatos (BIANKI, 1988).

Partindo da hipótese que as assimetrias hemisféricas existem desde estágios muito precoces do desenvolvimento neural de cada indivíduo, de maneira instável, sugere-se que a estabilização delas viria através da atuação casual ou não de mecanismos específicos, orientando para o lado esquerdo e/ou direito (LENT & SCHMIDT, 1993). Dentre os fatores que podem contribuir para o direcionamento das assimetrias, o desenvolvimento do corpo caloso é citado (DENENBERG, 1981; LENT & SCHMIDT, 1993). SCHMIDT & CAPARELLI-DÁQUER (1989) avaliaram essa possível participação do corpo caloso no estabelecimento das assimetrias morfológicas utilizando camundongos Balb/CCF, que são modelos animais genéticos com agenesia parcial ou total do corpo caloso, e camundongos

Suíços cujo corpo caloso apresenta-se íntegro. Os resultados obtidos em animais com alteração genética do corpo caloso demonstram ausência de assimetria direcional significativa, quando o peso e a área cortical dorsal dos hemisférios foram avaliados. Em contraste, camundongos normais apresentaram significativas diferenças morfológicas no peso hemisférico e na área cortical dorsal, direcionadas para o lado esquerdo. Assim sugerem que a ontogênese do corpo caloso pratica um trabalho no direcionamento de assimetrias cerebrais. Com o mesmo modelo animal, MANHÃES *et al.*, (1991) investigaram a relação entre defeitos calosos com o uso preferencial de patas. O estudo da magnitude da lateralidade em camundongos Balb/CCF demonstrou que esses foram mais lateralizados do que os animais com o corpo caloso intacto, sendo também, que a análise da lateralidade direcional indicou uma tendência populacional para o uso da pata esquerda em animais com alterações calosas quando comparados com os camundongos Suíços. Isso reforça também a conclusão que alterações no desenvolvimento do corpo caloso estão diretamente relacionadas com o direcionamento das assimetrias.

Fatores externos que atuam no desenvolvimento do corpo caloso, como a irradiação ionizante, também têm sido utilizados com a finalidade de esclarecer o papel desta estrutura na orientação das assimetrias hemisféricas (MANHÃES *et al.*, 1993; CAPARELLI-DÁQUER & SCHMIDT, 1991).

A participação de outros fatores epigenéticos no desenvolvimento de estruturas cerebrais tem sido estudada tanto durante o período pré-natal como após o nascimento (DENENBERG, 1981; LENT & SCHMIDT, 1993). FROST e MOY (1989) estudaram o efeito da ausência de estímulo luminoso no desenvolvimento de projeções calosas visuais em gatos. Observaram que animais criados em total escuridão apresentaram um aumento da eliminação parcial de projeções calosas imaturas, ocasionando uma significativa redução no número total de neurônios das camadas supragranular e infragranular (as quais enviam axônios através do corpo caloso) e um abrandamento na distribuição desses neurônios nas áreas 17 e 18. Outros estudos também têm demonstrado que estimulação visual normal é necessária para a estabilização do complemento normal das projeções do corpo caloso (FROST *et al.*, 1990; INNOCENTI *et al.*, 1985).

O objetivo do presente trabalho é estudar a expressão da neuroplasticidade funcional com ênfase na correlação entre assimetria motora e sensório-motora em camundongos com agenesia calosa por irradiação ionizante pré-natal.

MÉTODOS

1 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Os animais utilizados foram camundongos suíços criados na sala de manutenção de animais do Laboratório de Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, no qual permaneciam localizados em caixas individualizadas com água e alimento *ad libitum*. Os progenitores foram acasalados durante um período total de 20 horas, com início às 14 horas de um dia e separados às 10 horas do dia seguinte. Após o acasalamento cada fêmea foi individualizada em caixa, coberta com serragem em seu fundo e limpas diariamente. O primeiro dia gestacional (E1) foi a partir da zero hora do dia da separação. Cada fêmea grávida foi aleatoriamente determinada em gerar animais que constituiriam o grupo não irradiado ou o grupo irradiado.

1.1 Camundongos suíços não irradiados (controles)

As progenitoras dos camundongos que constituíam esse grupo não foram expostas à radiação. A prole foi mantida junta a cada progenitora nos primeiros 30 dias após o nascimento (P30). Em seguida, cada animal de prole distinta foi individualizado em caixa, codificado, e mantido com água e alimento *ad libitum*. No 60º dia iniciaram os testes comportamentais. Foi avaliado nos testes um número total de 49 machos não irradiados e 51 fêmeas não irradiadas. Os experimentadores não tinham acesso ao significado da codificação dos animais. O procedimento de testagem dos animais foi realizado em Agosto/1997.

1.2 Camundongos suíços irradiados

Cada progenitora dos animais que formaram esse grupo foi conduzida ao Instituto Oncológico Ltda. (Juiz de Fora) para ser irradiada, no 16º dia gestacional (E16). Cada fêmea era exposta a uma fonte de raio x para receber uma dose corporal total de 3 Gy (300 rads). Após o procedimento de irradiação, a fêmea grávida retornava individualmente para sua caixa, no qual era mantida com água e alimento *ad libitum*. A prole era mantida junto a progenitora até o 30º dia pós-natal. Após esse período, cada animal irradiado era individualizado em caixa, codificado e 60 dias após o nascimento foram submetidos aos testes comportamentais. Os experimentadores não tinham acesso ao significado da codificação dos animais. Esse grupo foi composto de 34 machos e 39 fêmeas. O procedimento de testagem dos animais foi realizado em Agosto/1997.

1.2.1 Procedimento de irradiação

As irradiações foram realizadas utilizando-se um acelerador linear de partículas (Mevatron VI Siemens), com energia de 6 Mev. A fonte, constituída por um tubo emissor de raios x, localizava-se a 100 cm do recipiente que continha o animal. As fêmeas grávidas eram colocadas em um caixa de plástico. Os animais recebiam dose de corpo inteiro, considerada homogênea, dentro do campo retangular de 10 x 05 cm e calculada para a profundidade de 02 cm. A taxa de dose era constante e igual a 2Gy/minuto.

Considerando a importância da dosimetria neste trabalho, as etapas serão descritas passo a passo. Estas foram seguidas de acordo com as normas da Agência Internacional de Energia Atômica.

A escolha de dose do monitor em cGy (D_{monitor}) era feita com base na equação:

$$D_{\text{monitor}} = 100 \times D_{\text{feto}} / \text{PDP} \times F_b \times F_c \times 1 / F_r$$

Onde:

PDP = Percentual de dose profunda

F_b = Fator de bandeja

F_c = Fator de calibração

F_r = Fator de retrodispersão

Para o acelerador linear de 6 Mev e para a distância fonte de 100 cm, a dose máxima ocorre a 1,5 cm de profundidade. A dose no feto foi considerada como aplicada a 2 cm, havendo, assim, atenuação do feixe com a profundidade (PDF).

O fator de bandeja (F_b) foi experimentalmente determinado a partir da relação entre as medidas de dose na água (phantom), realizadas com a câmara de ionização sem a tampa de acrílico (D) e com a tampa (D_1). No nosso caso, as medidas indicaram:

$$F_b = D / D_1 = 1,02$$

O fator de calibração (F_c) era sempre verificado devido ao desgaste do aparelho. O rendimento era ajustado eletronicamente para 1 cGy/impulso, de forma que o fator de calibração fosse considerado unitário para todas irradiações ($F_c = 1$).

O fator de retrodispersão (Fr) foi calculado pela seguinte equação:

$$Fr = (FBS)X / (FBS) 10 \times 10 \times FAC$$

Onde:

(FBS)X = Backscatter no campo quadrado de lado X, onde X corresponde ao lado do quadrado equivalente ao campo retangular efetivamente utilizado.

(FBS) 10x10 = Backscatter no campo padrão 10x10cm

FAC = Fator de abertura do colimador.

O fator Fr foi calculado para campos quadrados. O campo retangular (Ax B) relaciona-se com o quadrado através do lado equivalente (X):

$$X = (A \times B \times 4) / (2 \times A + 2 \times B)$$

Para testarmos a estabilidade do acelerador linear, foram realizadas medidas mensais de energia fotônica, com a utilização de câmaras de ionização (FARMER – modelo 2571) calibradas a cada dois anos no laboratório de dosimetria da Comissão Nacional de Energia Nuclear (padrão secundário). A relação era testada:

$$X2 / X1 = 0,56 \text{ (para acelerador Mevatron 6 Mev)}$$

Onde:

X1 = Dose medida a 10 cm de profundidade, com a distância fonte-alvo igual a 100 cm.

X2 = Dose medida a 20 cm de profundidade.

O aparelho manteve-se estável ao longo de nosso experimento. A homogeneidade do campo era assegurada pelas curvas de isodose. Assim, a dose foi considerada homogeneamente distribuída ao longo de toda a superfície do animal, sem efeito de “penumbra” nas extremidades do animal. O procedimento de irradiação das fêmeas grávidas foi realizado em Maio/1997.

2 – CONDIÇÕES AMBIENTAIS DE MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

A sala de manutenção dos animais possuía um ciclo claro-escuro (12 horas/ciclo) controlado por um “timer”, de modo que o ciclo claro iniciava-se às 03 horas e o ciclo escuro às 15 horas. Os testes comportamentais foram realizados a partir do início do ciclo escuro. O controle do odor local era feito através de dois exaustores. A limpeza da sala de manutenção era feita semanalmente, sendo que a limpeza da caixa de cada animal foi diária (Fig. 1). Aos camundongos foi fornecido água e alimento *ad libitum*, exceto no dia anterior à realização do teste de preferência de patas.



Figura 1: Visão geral da sala de manutenção dos animais a serem testados. A sala possui um “timer” para controle do ciclo claro e escuro. Temperatura ambiente.

3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.1 Preferência de patas

Este teste teve por objetivo avaliar o grau (magnitude) e a direção da lateralidade no uso preferencial de uma das patas. O camundongo era privado de alimento (água *ad libitum*) em todas as sessões do teste por um período de 24 horas. Após esse período o animal era colocado em aparato de madeira cúbico (7,5 x 7,5 x 14 cm), cuja parede que era voltada ao experimentador era transparente, contendo um tubo cilíndrico de alimentação projetado à altura do tórax do animal quando este estivesse apoiado sobre as suas patas posteriores conforme demonstrado na figura 2. O tubo ficava em uma posição equidistante das suas paredes laterais. Fragmentos de ração eram colocados no tubo onde o animal alcançava e capturava com a pata. Foi considerada válida somente a captura no qual o animal retirava todo o alimento de dentro do tubo e somente uma das patas podia estar presente dentro do tubo durante toda a tentativa. Esse comportamento era observado até que 25 capturas do alimento fossem realizadas numa sessão diária, em 02 dias intervalados, somando total de 50 capturas. Após a realização de cada sessão o animal retornava para a sua gaiola onde recebia alimentação *ad libitum*. O intervalo entre as sessões era de 48 horas. Os animais eram testados com 60 dias de vida.

Classificou-se o uso da pata como sendo direito ou esquerdo. Para cada animal, a percentagem de uso da pata esquerda ($\%L = \text{número de captura com a pata esquerda} \times 100 / \text{número total de captura}$) fora usado para avaliar a lateralização direcional, e a percentagem de uso da pata preferida ($\%PP = \text{número de captura com a pata preferida} \times 100 / \text{número total de captura}$) fora usado para avaliar a magnitude da lateralidade (SCHMIDT *et al.*,1991).



Figura 2: Aparato em madeira utilizado para avaliação da preferência de patas (acima) e com o camundongo no interior (abaixo), com a porta transparente e o tubo de alimentação.

3.2 Campo aberto

O objetivo deste teste foi avaliar a lateralidade sensório-motora durante deambulação pela periferia. Consistiu em um aparato quadrado, sem bordas, de 24 x 24 cm, com 64 subdivisões quadrangulares, dispostos no centro de um compartimento cilíndrico negro de 90 cm de diâmetro onde permaneceu elevado. O campo aberto foi dividido em centro e periferia, esta última definida como as duas fileiras mais externas (Fig. 3).

Um estímulo sonoro estressante com frequência de 3000 Hz e de intensidade de 105 decibéis foi utilizado em metade dos animais testados. Todos os camundongos testados foram subdivididos em 8 grupos: 1° - Machos controles sem estímulo sonoro; 2° - Machos controles com estímulo sonoro; 3° - Fêmeas controles sem estímulo sonoro; 4° - Fêmeas controles com estímulo sonoro; 5° - Machos irradiados sem estímulo sonoro; 6° - Machos irradiados com estímulo sonoro; 7° - Fêmeas irradiadas sem estímulo sonoro e 8° - Fêmeas irradiadas com estímulo sonoro. Cada animal era colocado no centro do aparato onde era observado por um período de 10 minutos. O comportamento foi considerado lateralizado quando o camundongo apresentava em uma angulação de 45 graus ou mais em relação à periferia do campo aberto, independente de estar em movimento, sendo computado o tempo gasto nesta situação. Todas as tentativas foram filmadas para análise posterior.

A lateralidade foi estudada através de um índice de lateralidade obtido pela subtração dos tempos, dividido pelo tempo total. A lateralidade direcional foi avaliada através da porcentagem do tempo de permanência no lado esquerdo ($\% LD = \text{tempo de permanência no lado esquerdo} \times 100 / \text{tempo total}$) e a magnitude da lateralidade através da porcentagem do tempo de permanência no lado preferido ($\% ML = \text{tempo de permanência no lado preferido} \times 100 / \text{tempo total}$).

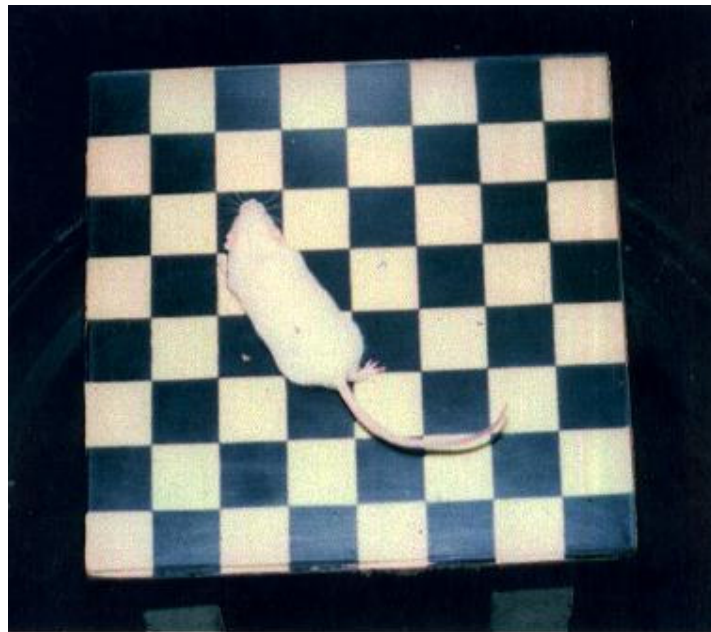
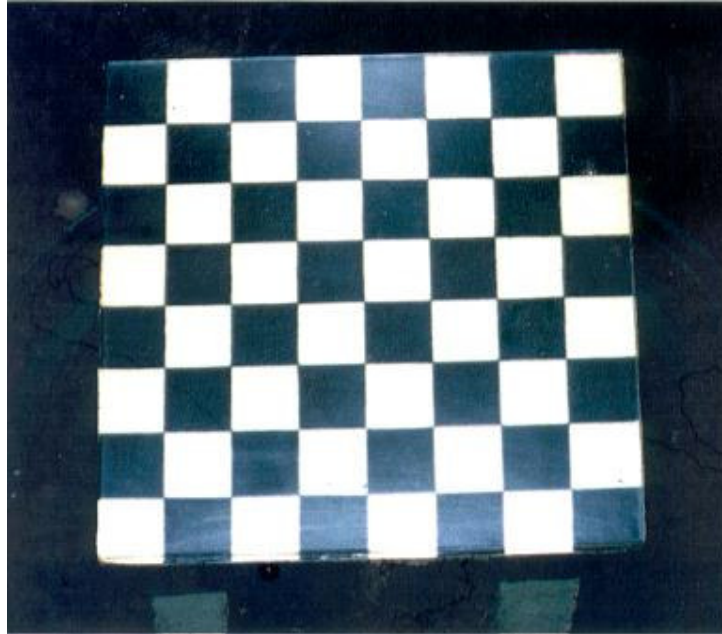


Figura 3: Vista superior do aparato do teste campo aberto sem o animal (acima) e com animal (abaixo).

3.3 Procedimentos histológicos e avaliações morfológicas

Após completa realização dos testes comportamentais, cada animal foi anestesiado profundamente com clornembutal. Em seguida perfundido intracardiacamente com cloreto de sódio a 0,9% por cinco minutos, seguido de paraformaldeído a 4% por trinta minutos e finalizado com formalsucrose 30% por quinze minutos. Após a perfusão, os cérebros foram retirados dos crânios com o auxílio de uma lupa de dissecação e colocados em solução fixadora (formalina 10%). Os cérebros dos animais controles e irradiados foram incluídos em albumina. Em seguida realizou os cortes histológicos coronais, em gelo seco, com criostato, sendo a espessura do corte de 40 µm. O material para análise histológica foi selecionado pelo critério de utilizar um corte e desprezar dois. Os cortes foram corados com cresil violeta pelo método de Nissl e fotografados para posterior análise qualitativa macroscópica. Os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Neurogênese (Prof. Dr. Rafael Linden) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.4 – Testagens estatísticas

As avaliações consistiram do teste de correlação de Pearson (one-tailed) e de ANOVA. Foi escolhido o teste de correlação por que assumimos que o fator “preferência de patas” é invariável a nível populacional em animais com agenesia calosa (MANHÃES *et al.*, 1993). Desta forma podemos utilizar o fator “preferência de patas” como independente e utilizar um nível de significância como sujeito ao fator “one-tailed”.

RESULTADOS

1 ASPECTOS QUALITATIVOS DA MORFOLOGIA DOS ANIMAIS IRRADIADOS

As irradiações tiveram um consistente efeito de degeneração cortical, essencialmente sobre as camadas supragranulares e sobre regiões posteriores (Fig. 4). Todos os animais irradiados apresentaram-se com agenesia do corpo caloso e da comissura dorsal do hipocampo (Fig. 5).

2 ESTUDOS DAS CORRELAÇÕES DE LATERALIZAÇÃO MOTORA E SENSÓRIO-MOTORA

Foram estudadas correlações entre lateralidade direcional na preferência de patas e lateralidade direcional na periferia do campo aberto (*Open-field*) (LD PP x LD OF), lateralidade direcional na preferência de patas e índice de lateralidade na periferia do campo aberto (LD PP x IL OF), magnitude da lateralidade na preferência de patas e magnitude da lateralidade na periferia do campo aberto (ML PP x ML OF), em machos e fêmeas, irradiados e não irradiados.

As análises estatísticas estão representadas na tabela 1. Foram encontrados índices de significância nos grupos machos não irradiados sem som e fêmeas não irradiadas com som, quanto às correlações de lateralidade direcional da preferência de patas x lateralidade direcional do campo aberto e lateralidade direcional da preferência de patas x índice de lateralidade do campo aberto.

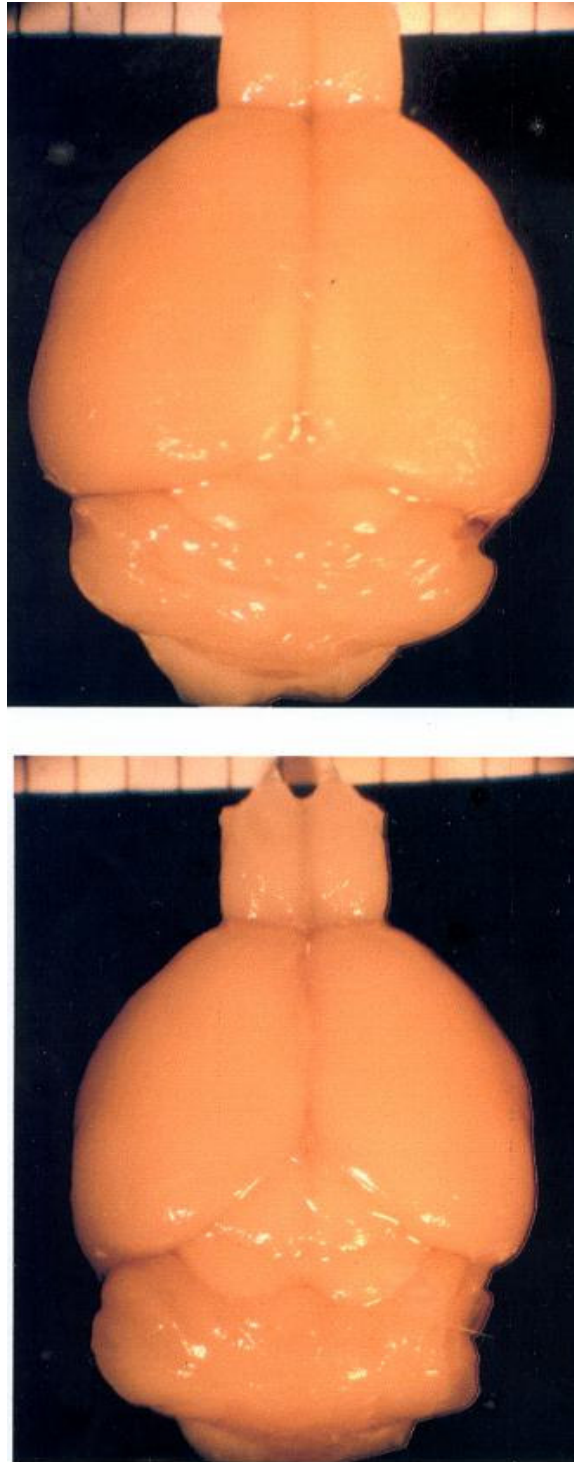


Figura 4: Vista dorsal do encéfalo de animal normal (acima) e irradiado (abaixo). Barra de calibração = 1mm.

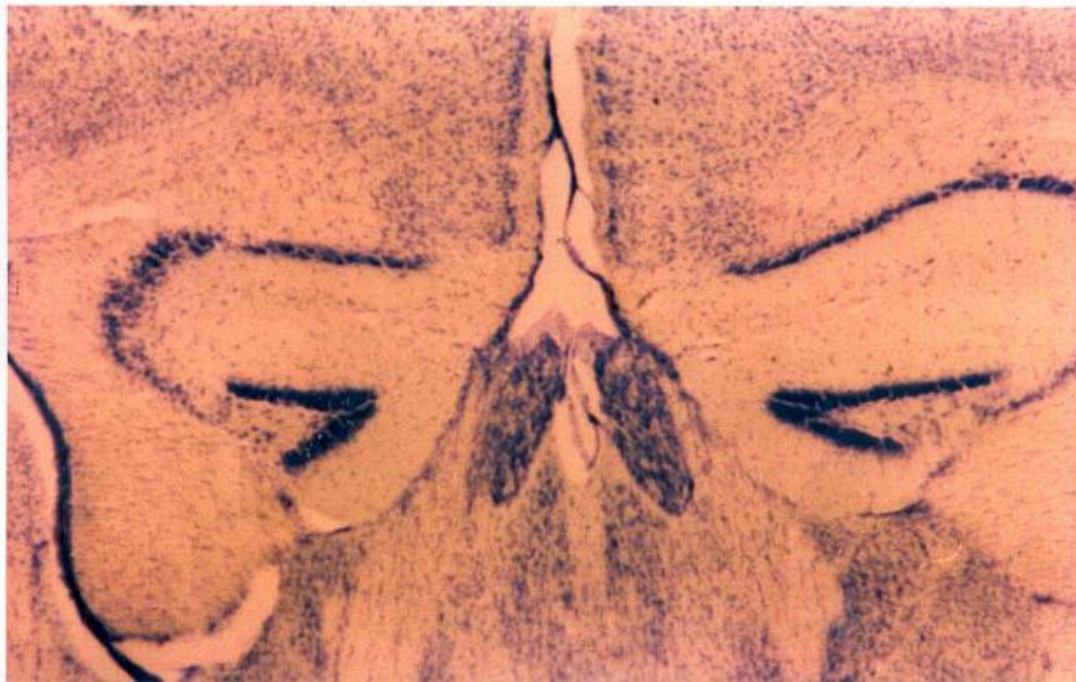
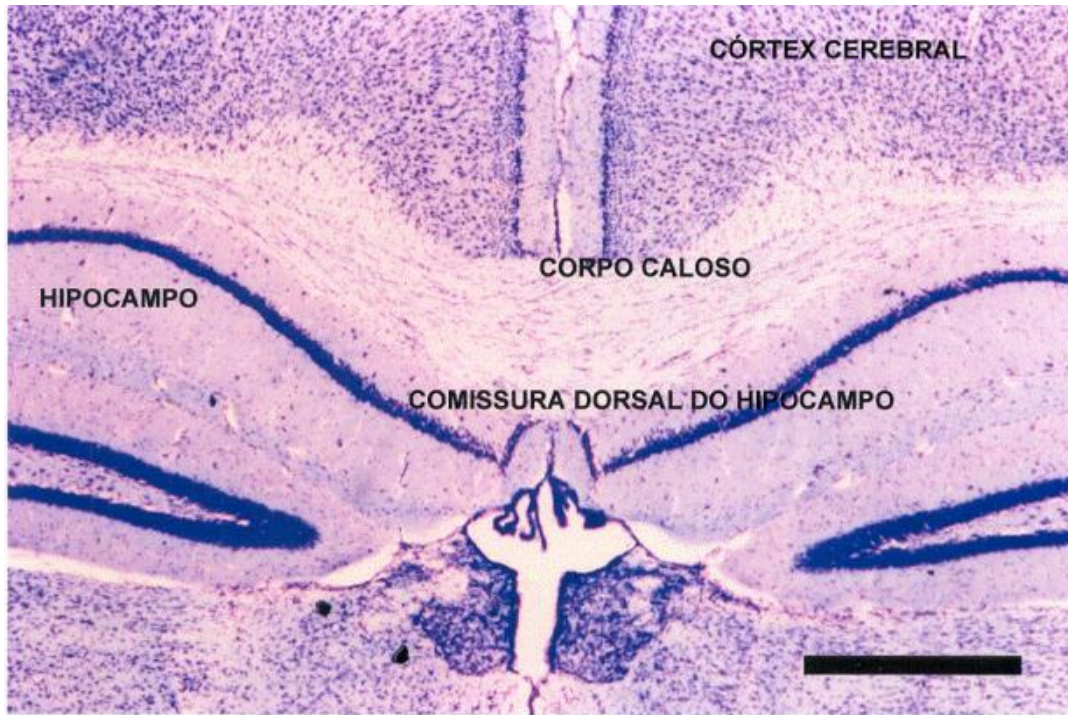


Figura 5: Corte coronal do encéfalo de animal normal (acima) e irradiado (abaixo) com 40 μm de espessura e corado por Nissl com cresil violeta. Notar, no animal irradiado, a ausência do corpo caloso bem como da comissura dorsal do hipocampo. Calibração = 500 μm .

Tabela 1: Índices de significância estatística no teste de correlação de Pearson e ANOVA, de todos os grupos experimentais.

Grupo Experimental	Correlação de Pearson (sig.)	ANOVA (sig.)	F ratio
MACHOS			
LD PP x LD OF			
MICS	0.242	0.483	0.523
MISS	0.418	0.835	0.045
MNCS	0.458	0.916	0.011
MNSS	0.008**	0.01**	6.807
IL OF x LD PP			
MICS	0.249	0.498	0.488
MISS	0.096	0.192	1.837
MNCS	0.460	0.92	0.01
MNSS	0.01**	0.02*	6.356
ML PP x ML OF			
MNCS	0.244	0.489	0.495
MNSS	0.468	0.937	0.006
MICS	0.331	0.662	0.201
MISS	0.331	0.662	0.201
FÊMEAS			
LD PP x LD OF			
FICS	0.183	0.366	0.879
FISS	0.319	0.639	0.227
FNCS	0.026*	0.05*	4.278
FNSS	0.345	0.689	0.163
IL OF x LD PP			
FISS	0.298	0.596	0.289
FICS	0.192	0.385	0.809
FNCS	0.027*	0.05*	4.175
FNSS	0.338	0.676	0.178
ML PP x ML OF			
FICS	0.4	0.799	0.067
FISS	0.153	0.305	1.101
FNCS	0.289	0.578	0.321
FNSS	0.153	0.305	1.101

DISCUSSÃO

A expressão comportamental das alterações morfológicas conseqüentes à irradiação ionizante tem sido um tópico interessante a ser avaliado. Camundongos irradiados apresentam além da agenesia parcial ou total do corpo caloso outras alterações estruturais como ectopias na camada molecular cortical e no *stratum oriens* do hipocampo, hipotrofia neocortical, ausência do córtex visual primário (Área 17) conforme a definição citoarquitetônica de CAVINESS (1975), perda seletiva de células amácrinas deslocadas na camada ganglionar da retina (SCHMIDT *et al.*, 2001). As alterações morfológicas variam de acordo com a idade gestacional e a dose corporal total utilizada (SCHMIDT & LENT, 1987). Avaliando o comportamento de uso preferencial de patas nesses animais, MANHÃES *et al.* (1993) têm observado uma diferença significativa na lateralidade direcional, entre roedores normais e os que receberam doses diferenciadas de radiação, sugerindo que a ausência precoce do corpo caloso rompe o padrão normal da assimetria direcional.

A ocorrência de recuperação funcional distinta após irradiação ionizante tem sido descrita. VITRAL *et al.* (2006) estudaram o funcionamento da memória e aprendizado visuo-espacial relacionado ao sistema de memória de referência e laborativa em camundongos com ausência do córtex visual primário, alteração do padrão de laminação neuronal do neocórtex e do hipocampo induzidos pela irradiação pré-natal. Animais receberam dose corporal total de 3 Gy (1 Gy = 100 rad) em E16 (décimo sexto dia gestacional), e na vida adulta foram submetidos aos testes que avaliaram aprendizado discriminativo e visuo-espacial com o uso do sistema de memória laborativa e de referência. Apresentaram déficits em navegação espacial e memória laborativa em contraste com a recuperação da memória de referência. O restabelecimento funcional após dano pré-natal foi sugerido estar relacionada a fatores específicos da organização de circuito cortical local.

No presente trabalho foi encontrado índices de significância nos grupos machos não irradiados sem som e fêmeas não irradiadas com som, quanto às correlações da lateralidade motora e sensorio-motora.

A atuação de variados fatores estressantes ambientais podem ser observados em determinadas etapas do desenvolvimento cerebral, repercutindo no comportamento lateralizado na idade adulta. Eventos estressantes ocorridos no período pré-natal podem alterar o comportamento através da modificação do funcionamento de determinados sistemas

de neurotransmissores como a dopamina (ALONSO *et al.*, 1994) ou como consequência a atuação direta de fatores externos como etanol (ZIMMERBERG & REUTER, 1989) e a irradiação ionizante (VITRAL *et al.*, 1995) sobre a morfologia cerebral. A ocorrência de situações estressantes durante o nascimento tem sido relacionada às alterações na lateralidade (COREN & PORAC, 1980; SEARLEMAN *et al.*, 1989). Muitos fatores estressantes agem nos animais após o nascimento, podendo interferir de maneira significativa no desenvolvimento normal do comportamento lateralizado. DENENBERG (1981) tem descrito diferenças comportamentais entre ratos neonatos que sofreram manipulações precoces e animais não-manipulados.

O fato de ter sido encontrado um comportamento lateralizado diferenciado entre machos e fêmeas, sob as mesmas condições estressantes, levanta a possibilidade interessante de que a lateralidade funcional seja influenciada por vários fatores ontogenéticos e não apenas genéticos, tais como a variação de taxas hormonais entre machos e fêmeas durante a gestação.

A capacidade dos hemisférios cerebrais de expressar sua funcionalidade de modo distinto é um dos pontos de interesse na neurociência, principalmente no intuito de compreender os mecanismos subjacentes. As características funcionais de cada hemisfério cerebral são intrigantes, principalmente se ponderar sobre como ocorre à distinção funcional entre os hemisférios e de que modo seu desenvolvimento pode ser influenciado por fatores genéticos e/ou epigenéticos. O neocórtex de mamíferos está relacionado com as habilidades sensoriais, motoras e cognitivas (KANDEL, 2000). A compreensão de como se desenvolve e modifica é crucial para que possamos entender melhor o funcionamento cerebral. O processo que resulta no desenvolvimento do córtex cerebral apresenta fases amplamente distintas que envolvem desde a gênese e migração neuronal (BYSTRON *et al.*, 2006; RAKIC, 2006) à formação das áreas funcionais corticais (RAKIC, 1978; O'LEARY, 1989; SUR & LEAMEY, 2001), com significativa participação de genes (O'LEARY & NAKAGAWA, 2002; CHAMBERS & FISHELL, 2006; MALLAMACI & STOYKOVA, 2006)

Áreas corticais individuais são caracterizadas por agrupamentos específicos de vias aferentes (input), por conexões de processamento intrínseco e por vias eferentes específicas (output). Em adição, há diferenças pequenas, mas potencialmente significantes na laminação entre áreas corticais. Especificação cortical refere a definição de vias no qual essas características são estabelecidas durante o desenvolvimento; sendo que cada característica envolve uma combinação de fatores intrínsecos e eventos extrínsecos (SUR & LEAMEY,

2001). Fatores intrínsecos no desenvolvimento cortical referem aos genes e moléculas expressadas dentro do tecido. A natureza dos fatores extrínsecos difere dependendo do tempo e estágio do desenvolvimento. Contudo, é difícil separar claramente a ação diferenciada desses aspectos intrínsecos e extrínsecos durante o processo de desenvolvimento cortical (SUR & LEAMEY, 2001). São propostos modelos para explicar a formação de regiões funcionais do cortex. O modelo protomapa proposto por PASKO RAKIC (1978) sugere que a regionalização funcional do córtex é principalmente controlada por determinantes genéticos e moleculares que são intrínsecos da região proliferativa da zona ventricular. As 'unidades proliferativas' na zona ventricular forma um protomapa de regiões corticais prospectivas. Neurônios migrantes pós-mitóticos da zona ventricular mantém as propriedades regionais das unidades proliferativas (RAKIC, 1978; RAKIC, 1988). O outro modelo é proposto por Dennis O'Leary, o modelo protocortex no qual argumenta a importância da influência dos fatores extrínsecos sobre a regionalização cortical, sobretudo dos inputs talamocorticais (O'LEARY, 1989) e regulação genética (O'LEARY & NAKAGAWA, 2002). As evidências acumuladas em determinados estudos têm indicados que ambos modelos são aplicáveis para justificar a regulação do padrão cortical e o estabelecimento de regionalização.

Os fatores genéticos responsáveis pela diferenciação das áreas corticais têm sido questionados. É sugerido que a regulação gênica associada ao controle direto das identidades de áreas corticais implicaria no envolvimento de vários genes de fatores de transcrição expressos por progenitores neurais dentro das camadas proliferativas periventriculares como, por exemplo, *Emx1*, *Emx2*, *Pax6*, *Foxg1* e *Coup-tf1* (MALLAMACI & STOYKOVA, 2006) e também a participação de moléculas sinalizantes, incluindo fator de crescimento fibroblasto 3,7,8,17,18 (FGF3, FGF7, FGF8, FGF17, FGF18), Wnts, proteínas morfogenéticas ósseas (Bmps) (O'LEARY & NAKAGAWA, 2002, GAREL *et al.*, 2003; MALLAMACI & STOYKOVA, 2006).

Os animais irradiados, de ambos os sexos, não apresentaram nível de significância quanto a correlação da lateralidade motora e sensório-motora. Os camundongos irradiados apresentam agenesia do corpo caloso e da comissura dorsal do hipocampo, degeneração cortical, essencialmente sobre as camadas supragranulares e regiões corticais posteriores.

A possibilidade interferência da radiação nos mecanismos moleculares e genéticos, de modo individualizado ou conjunto, em períodos críticos do desenvolvimento cortical abre um precedente interessante para compreender a possível ocorrência de modificações

neuroplásticas funcional e morfológica, com conseqüentes repercussões na expressão da lateralidade funcional bem como na gênese das áreas corticais.

CONCLUSÕES

O trabalho evidenciou a existência de uma relação significativa entre comportamento lateralizado motor e sensório-motor com agenesia calosa ocasionada pela irradiação ionizante pré-natal. Sugere-se a possibilidade de atuação de fatores epigenéticos na expressão lateralidade motora e sensório-motora.

Outro aspecto conclusivo foi a evidência de resposta diferenciada quanto atuação do estímulo sonoro estressante sobre a expressão do comportamento lateralizado, com diferença distinta entre gêneros, sugerindo uma possível participação de fatores endócrinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOITIZ, F. SCHEIBEL, A.B.; FISHER, R.S.; ZAIDEL, E. Individual differences in brain asymmetries and fiber composition in the human corpus callosum. **Brain Res.**, v.598, p.154-161, 1992.

AKELAITIS, A.J. Studies on the corpus callosum: Higher visual functions in each homonymous visual field following complete section of corpus callosum. **Arch. Neurol. Psychiatry**, v.45, p.788, 1941.

ALONSO, S.J.; NAVARRO, E.; RODRIGUEZ, M. Permanent dopaminergic alterations in the nucleus accumbens after prenatal stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.49, n.2, p.353-358, 1994.

ANGEVINE, J.B.Jr.; SIDMAN, R.L. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. **Nature**, v.192, p.766-768, 1961.

BAYER, S.A.; ALTMAN, J. Experimental studies of neocortical development using X-irradiation. In: BAYER, S.A., ALTMAN, J. **Neocortical Development**, New York, Raven Press, p.128-149, 1991.

BERBEL, P.; INNOCENTI, G.M. The development of the corpus callosum in cats: a light and electron-microscopic study. **J. Comp. Neurol.**, v.276, p.132-156, 1988.

BERRY, M.; ROGERS, A.W. The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. **J. Anat.**, v.99, p.691-709, 1965.

BIANKI, V.L.; BOZHKO, G.T., SLEPCHENKO, A.F. Interhemispheric asymmetry of homotopic transcallosal responses of the auditory cortex in the cat. **Neurosci. Behav. Physiol.**, v.18, n.4, p.315-323, 1988.

BIDDLE, F.G.; COFFARO, C.M.; ZIEHR, J.E.; EALES, B.A. Genetic variation in paw preference (handedness) in the mouse. **Genome**, 36: 935-943, 1993.

BIDDLE, F.G.; EALES, B.A. Lateral asymmetry of paw usage: phenotypic survey of constitutive and experience-conditioned paw-usage behaviours among common strains of the mouse. **Genome**, v.44, p. 539-548, 2001

BISAZZA, A., ROGERS, L.J., VALLORTIGARA, G. The Origins of Cerebral Asymmetry: A review of evidence of behavioural and brain lateralization in fishes, reptiles and amphibians. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.22, n.3, p.411-426, 1998.

BRACCO, L.; TIEZZI, A.; GINANNESCHI, A. Lateralization of choline acetyltransferase (ChAT) activity in fetus and adult human brain. **Neurosc. Letter**, v.50, p.301-305, 1984.
BYSTRON, I.; RAKIC, P.; MOLNÁR, Z.; BLACKMORE, C. The first neurons of the human cerebral cortex. **Nat. Neurosci.**, v.9, n.7, p.880-886, 2006.

CAMINITI, R.; INNOCENTI, G.M.; MANZONI, T. The anatomical substrate of callosal messages from SI and SII in the cat. **Expl. Brain Res.**, v.35, p.295-314, 1979.

CAPARELLI-DÁQUER, E.M.A.; SCHMIDT, S.L. Absence of population cerebral asymmetries in mice with callosal defects induced by prenatal gamma irradiation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.24, p.1233-1238, 1991.

CAVINESS, V.S. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. **J. Comp. Neurol.**, v.164, p.247-264, 1975.

CHAMBERS, D.; FISHELL, G. Functional genomics of early cortex patterning. **Gen. Biol.**, v.7, n.202, p.1-4, 2006.

CHI, J.G.; DOOLING, E.C.; GILLES, F.H. Left-right asymmetries of the temporal speech areas of the human fetus. **Arch. Neurol.**, v.34, p.346-348, 1977.

CHUN, J.J.; NAKAMURA, M.J.; SHATZ, C.J. Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide immunoreactive neurons, **Nature**, v.325, p.617-620, 1987.

COLLINS, R.L. When left-handed mice live in right-handed worlds. **Science**, v.187, p.181-184, 1975.

COLLINS, R.L. Reimpressed selective breeding for lateralization of handedness in mice. **Brain Res.**, v.564, p.194-202, 1991.

CORBALLIS, M.C. From mouth to hand: gesture, speech, and the evolution of right-handedness. **Behav. Brain. Sci.**, v.26, p.199-208, 2003

COREN, S.; PORAC, C.; Birth factors and laterality: effects of birth order, parental age and birth stress on four indices of lateral preference. **Behav. Genet.**, v.10, n.2, p.123-138, 1980.

CROW, T.J. Nature of the genetic contribution to psychotic illness – a continuum viewpoint. **Acta Psychiatr. Scand.**, v.81, n.5, p.401-408, 1990a.

CROW, T.J. Temporal lobe asymmetries as the key to the etiology of schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v.16, n.3, p.433-443, 1990b.

D'AMATO, C.J. Regeneration and recovery in the fetal nervous system after radiation injury. **Exp. Neurol.**, v.76, n.3, p.457-467, 1982.

DENENBERG, V.H. Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience. **Behav. Brain Sci.**, v.4, p.1-49, 1981.

DENENBERG, V.H.; GALL, J.; BERREBI, A.; YUTZEY, D.A. Callosal mediation of cortical inhibition in the lateralized rat brain. **Brain Res.**, v.397, p.327-332, 1986.

DENENBERG, V.H.; SHERMAN, G.F.; SCHROTT, L.M.; ROSEN, G.D.; GALABURDA, A.M. Spatial learning, discrimination learning, paw preference and neocortical ectopias in two autoimmune strains of mice. **Brain Res.**, v.562, p.98-104, 1991.

DOWLING, D.A.; DIAMOND, M.C.; MURPHY, G.M.; JOHNSON, R.E. A morphological study of male rat cerebral asymmetry. **Expl. Neurol.**, v.75, p.51-68, 1982.

ECKERT, M.A.; GALABURDA, A.M.; KARCHEMSKIY, A.; LIANG, A.; THOMPSON, P.; DUTTON, R.A.; LEE, A.D.; BELLUGI, U.; KORENBERG, J.R.; MILLS, D.; ROSE, F.E.; REISS, A.L. Anomalous sylvian fissure morphology in Williams syndrome. **Neuroimage**, v.33, p.39-45, 2006.

FABRE-THORPE, M.; FAGOT, J.; LORINCZ, E.; LEVESQUE, F.; VAUCLAIR, J. Laterality in cats: paw preference and performance in a visuomotor activity. **Cortex**, v.29, n.1, p.15-24, 1993.

FAGOT, J.; VAUCLAIR, J. Manual laterality in nonhuman primates: a distinction between handedness and manual specialization. **Psychol. Bull.**, v.109, p.76-89, 1991.

FROST, D.O.; MOY, Y.P. Effects of dark rearing on the development of visual callosal connections. **Expl. Brain Res.**, v.78, p.203-213, 1989.

FROST, D.O.; MOY, Y.P.; SMITH, D.C. Effects of alternating monocular occlusion on the development of visual callosal connections. **Exp. Brain Res.**, v.83, n.1, p.200-209, 1990.

GALABURDA, A.M.; SANIDES, F.; GESCHWIND, N. Human brain: Cytoarchitectonic left-right asymmetries in the temporal speech region. **Arch. Neurol.**, v.35, p.812-817, 1978.

GALABURDA, A.; SANIDES, F. Cytoarchitectonic organization of the human auditory cortex. **J. Comp. Neurol.**, v.193, n.3, p.597-610, 1980.

GAREL, S.; HUFFMAN, K.J.; RUBENSTEIN, J.L.R. Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in *Fgf8* hypomorphic mutants. **Develop.**, v.130, p.1903-1914, 2003.

GAZZANIGA, M.S. Cerebral specialization and interhemispheric communication: Does the corpus callosum enable the human condition? **Brain**, v.123, p.1293-1326, 2000.

GESCHWIND, N.; KAPLAN, E. A human cerebral disconnection syndrome. **Neurol.**, v.12, p.675-685, 1962.

GESCHWIND, N. Disconnection syndromes in animals and man Part II. **Brain**, v.88, p.585-644, 1965.

GESCHWIND, N.; LEVITSKY, W. Human Brain: left-right asymmetries in temporal speech region. **Science**, v.16, p.186-189, 1968.

GLICK, S.D.; ROSS, D.A.; HOUGH, L.B. Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. **Brain Res.**, v.234, p.53-63, 1982.

GOBBEL, G.T.; BELLINZONA, M.; VOGT, A.R.; GUPTA, N.; FIKE, J.R.; CHAN, P.H. Response of postmitotic neurons to X-Irradiation: Implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. **J. Neurosci.**, v.18, n.1, p.147-155, 1998.

GRAVEL, C.; SASSEVILLE, R.; HAWKES, R. Maturation of the corpus callosum of the rat. II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. **J. Comp. Neurol.**, v.291, p.147-161, 1990.

HEFFNER, H.E.; HEFFNER, R.S. Temporal lobe lesions and perception of species-specific vocalizations by macaques. **Science**, v.226, p.75-76, 1984.

HICKS, S.P. Mechanism of radiation anencephaly, anophthalmia, and pituitary anomalies; repair in the mammalian embryo. **AMA Arch. Pathol.**, v.57, n.5, p.363-378, 1954.

HICKS, S.P. Radiation as an experimental tool in mammalian developmental neurology. **Physiol. Rev.**, v.38, n.3, p.337-356, 1958.

INNOCENTI, G.M.; FROST, D.O.; ILLES, J. Maturation of visual callosal connections in visually deprived kittens: a challenging critical period. **J. Neurosci.**, v.5, n.2, p.255-267, 1985.

JOUANDET, M.L.; LACHAT, J.J.; GAREY, L.J. Distribution of the neurons of origin of the great cerebral commissures in the cat. **Anat. Embr.**, v.171, p.105-120, 1985.

KANDEL, E. R. The brain and behavior. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principles of neural science.**, 4^a edition, USA, McGraw-Hill Companies, 2000, p.5-18.

KOLB, B.; SUTHERLAND, P.J.; NONNEMAN, A.J.; WHISHAW, I.Q. Asymmetry in the cerebral hemispheres of the rat, mouse, rabbit and cat: right hemisphere is larger. **Exp. Neurol.**, v.78, p.348-359, 1982.

KOOISTRA, C.A.; HEILMAN, K.M. Motor dominance and lateral asymmetry of globus pallidus. **Neurol.**, v.38, p.388-390, 1988.

LAMANTIA, A.S.; RAKIC, P. Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the Rhesus monkey. **J. Comp. Neurol.**, v.291, p.520-537, 1990.

LEMAY, M.; CULEBRAS, A. Human brains – morphologic differences in the hemispheres demonstrable by carotid arteriography. **New Engl. J. Med.**, v.7, p.168-170, 1972.

LENT, R.; SCHMIDT, S.L. Early disconnected brains: Developmental plasticity of the cerebral cortex in absence of the corpus callosum. In: CHAGAS, C.; LINDEN, R. **Developmental Neurobiology of Mammals**, Pontifical Academy of Sciences: The Vatican, p.319-346, 1987.

LENT, R.; HEDIN-PEREIRA, C.; MENEZES, J.R.L.; JHAVERI, S. Neurogenesis and development of callosal and intracortical connections in the hamster. **Neurosci.**, v.28, p.21-37, 1990.

LENT, R.; JHAVERI, S. Myelination of the cerebral commissures of the hamster, as revealed by a monoclonal antibody specific for oligodendrocytes. **Devl. Brain Res.**, v.66, p.193-201, 1992.

LENT, R.; SCHMIDT, S.L. The ontogenesis of the forebrain commissures and the determination of brain asymmetries. **Progr. Neurob.**, v.40, p.249-276, 1993.

MALLAMACI, A.; STOYKOVA, A. Gene networks controlling early cerebral cortex arealization, **Eur. J. Neurosc.**, v.23, p.847-856, 2006.

MANHÃES, A.C.; SCHMIDT, S.L.; CAPARELLI-DÁQUER, E.M. Paw preference in mice with callosal defects induced by prenatal gamma irradiation. **Braz. J. Med. Res.**, v.26, p.1213-1218, 1993.

MANHÃES, A.C.; KHARE, T.E.; CAPARELLI-DÁQUER, E.M.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; SCHMIDT, S.L.; FILGUEIRAS, C.C. Neonatal transection of the corpus callosum affects paw preference lateralization of adult Swiss mice. **Neurosci. Lett.**, v.348, n.2, p.69-72, 2003.

MOREST, D.K. A study of neurogenesis in the forebrain of the opossum pouch young. **Anat. Embr.**, v.130, n.4, p.265-305, 1970.

NIELSEN, D.M.; VISKER, K.E.; CUNNINGHAM, M.J.; KELLER, R.W. Jr.; GLICK, S.D.; CARLSON, J.N. Paw preference, rotation and dopamine function in Collins HI and LO mouse strains. **Physiol. Behav.**, v.61, n.4, p.525-535, 1997.

OLAVARRIA, J.; VAN SLUYTERS, R.C. Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.239, p.1-26, 1985.

O'LEARY, D.D. Do cortical areas emerge from a protocortex? **Trends Neurosci.**, v.12, p.400-406, 1989.

O'LEARY, D.D.; NAKAGAWA, Y. Patterning centers, regulatory genes and extrinsic mechanisms controlling arealization of the neocortex. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.12, p.14-25, 2002.

ORTHNER, H.; SELER, W. Planimetric volumetry of human brains. **Fortschr. Neurol. Psychiatr. Grenzgeb.**, v.43, n.4, p.191-209, 1975.

PANDYA, D.N.; VIGNOLO, L.A. Interhemispheric neocortical projections of somatosensory areas I and II in the Rhesus monkey. **Brain Res.**, V.15, P.49-65, 1968.

PETERSEN, M.R.; BECCHER, M.D.; ZOLOTH, S.R.; MOODY, D.B.; STEBBINS, W.C. Neural lateralization of species-specific vocalizations by Japanese macaques. **Science**, v.202, p.324-327, 1978.

QUARANTA, A., SINISCALCHI, M., FRATE, A., VALLORTIGARA, G. Paw preference in dogs: relations between lateralised behaviour and immunity. **Behav. Brain Res.**, v.153, p.521-525, 2004.

RAKIC, P. Neuronal migration and contact guidance in primate telencephalon. **Postgrad. Med. J.**, v.54, p.25-40, 1978.

RAKIC, P. Specification of cerebral cortical areas. **Science**, v.241, p.170-176, 1988.

RAKIC, P. Critical cellular events during cortical evolution: radial unit hypothesis. In: **The Neocortex**. FINLAY, B.L.; INNOCENTI, G.M.; SCHEICH, H., New York, Plenum Press, 1990, p.21-32.

RAKIC, P. A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. **Cerebral cortex**, v.16, p.i3-i17, 2006.

RASMUSSEN, T.; MILNER, B. The role of early left-brain injury in determining lateralization of cerebral speech functions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.299, p.355-369, 1977.

- ROBINSON, R.G. Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat. **Science**, v.205, p.707-710, 1979.
- ROSEN, G.D.; FINKLESTEIN, S.; STOLL, A.L.; YUTZEY, D.A.; DENENBERG, V.H. Neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum and nucleus accumbens. **Life Sci.**, v.34, n.12, p.1143-1148, 1984.
- SCHMIDT, S.L.; LENT, R. Effects of prenatal irradiation on the development of cerebral cortex and corpus callosum of the mouse. **J. Comp. Neurol.**, v.264, p.193-204, 1987.
- SCHMIDT, S.L.; CAPARELLI-DÁQUER, E.M. The effects of total and partial callosal agenesis on the development of morphological brain asymmetries in the BALB/cCF mouse. **Exp. Neurol.**, v.104, p.172-180, 1989.
- SCHMIDT, S.L.; MANHÃES, A.C., DE MORAES, V.Z. The effects of total and partial callosal agenesis on the development of paw preference performance in the BALB/cCF mouse. **Brain Res.**, v.545, p.123-130, 1991.
- SCHMIDT, S.L.; VITRAL, R.W.F.; LINDEN, R. Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.19, p.469-473, 2001.
- SCHWARTZ, M.L.; RAKIC, P.; GOLDMAN-RAKIC, P.; Early phenotype expression of cortical neurons: Evidence that a subclass of migrating neurons have callosal axons. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.88, p.1354-1358, 1991.
- SEARLEMAN, A.; PORAC, C; COREN, S. Relationship between birth order, birth stress and lateral preference: a critical review. **Psychol. Bull.**, v.105, n.3, p.397-408, 1989.
- SEGRAVES, M.A.; ROSENQUIST, A. The afferent and efferent callosal connections of retinotopically defined areas in cat cortex. **J. Neurosci.**, v.2, p. 1090-1107, 1982.
- SILVER, J.; LORENZ, S.E.; WHALSTEN, D.; COUGHLIN, J. Axonal guidance during development of the great commissures descriptive and experimental studies *in vivo*, on the role preformed glial pathways. **J. Comp. Neurol.**, v.210, p.10-29, 1982.
- SPERRY, R.W. Hemisphere disconnection and unity in conscious awareness. **Am. Psychol.**, v.27, p.723-733, 1968.
- SPERRY, R.W. Lateral specialization in the surgically separated hemispheres. In: Schmitt, F.O.; Worden, F.C. **The Neurosciences: Third Study Program**, Cambridge, MIT Press, 1974.

SPERRY, R.W. Some effects of disconnecting the cerebral hemispheres. **Science**, v.217, p.1223-1226, 1982.

SPRINGER, S. P.; DEUTSCH, G.. Primeiras evidências clínicas: A descoberta da assimetria. In: SPRINGER, S. P.; DEUTSCH, G. **Cérebro esquerdo, cérebro direito**. São Paulo: Summus editorial, 1998. p. 17-24.

SUN, T.; WALSH, C.A. Molecular approaches to brain asymmetry and handedness. **Nature Rev. Neurosci.**, v.7, p.655-662, 2006.

SUR, M.; LEAMEY, C.A. Development and plasticity of cortical areas and networks. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, p.251-262, 2001.

TAN, U. Similarities between sylvian fissure asymmetries in cat brain and planum temporale asymmetries in human brain. **Int.J.Neurosci.**, v.66, p.163-175, 1992.

TANG, A.C.; VERSTYNEN, T. Early life environment modulates 'handedness' in rats. **Behav. Brain Res.**, v.131, p. 1-7, 2002.

THATCHER, R.W.; WALKER, R.A., GUIDICE, S. Human cerebral hemispheres develop at different rates and ages. **Science**, v.236, p.1110-1113, 1987.

UNGERSTEDT, V.; ARBUTHNOTT, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in the rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res.**, v.24, p.485-493, 1970.

VITRAL, R.W., MOREIRA, C., DUTRA, M.L.V.; LINDEN, R.; SCHMIDT, S.L. Visuo-spatial learning in mice exposed to prenatal gamma radiation. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v.21, p.1941, 1995.

VITRAL, R.W., VITRAL, C.M., DUTRA, M.L. Callosal agenesis and absence of primary visual cortex induced by prenatal X rays impair navigation's strategy and learning in tasks involving visuo-spatial working but not reference memory in mice. **Neurosci. Lett.**, v.395, p.230-234, 2006.

WADA, J.A.; DAVIES, A.E. Fundamental nature of human infant's brain asymmetry. **Can. J. Neurol. Sci.**, v.4, p.203-207, 1977.

WAHLSTEN, D. Heritable aspects of anomalous myelinated fibre tracts in the forebrain of the laboratory mouse. **Brain Res.**, v.68, p.1-18, 1974.

WAHLSTEN, D. Deficiency of corpus callosum varies with strain and supplier of the mice. **Brain Res.**, v.239, p.329-348, 1982.

ZAIDEL, E.; SPERRY, R.W. Disconnection syndrome as a model for laterality effects in the normal brain. **Brain**, v.97, p.263-272, 1974.

ZIMMERBERG, B.; REUTER, J.M. Sexually dimorphic behavioral and brain asymmetries in neonatal rats: effects of prenatal alcohol exposure. **Devl. Brain Res.**, v.46, n.2, p.281-290, 1989.

APÊNDICE A

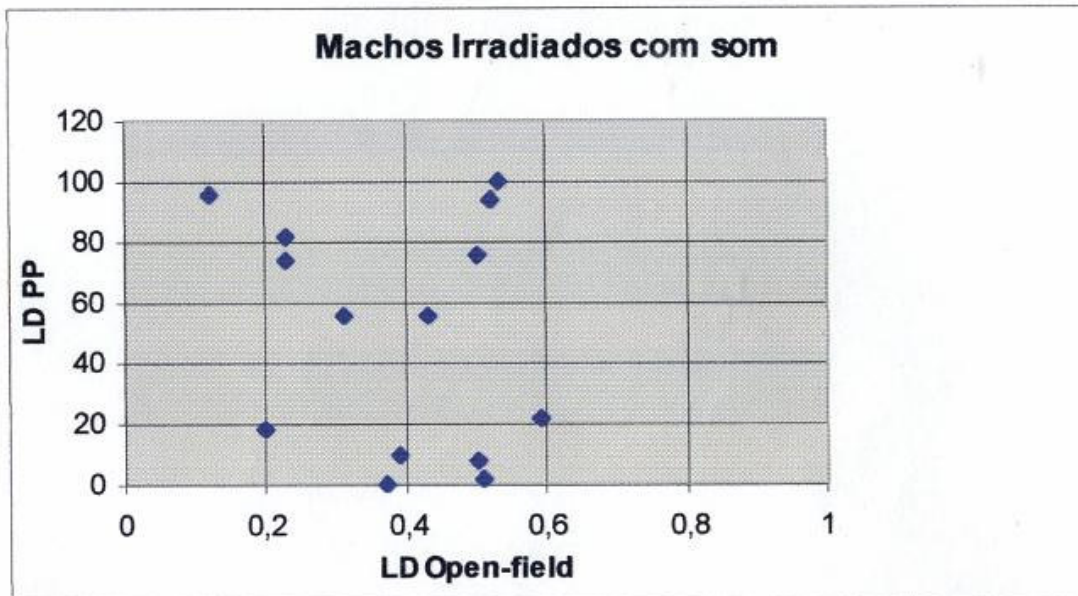


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos irradiados com som.

APÊNDICE B

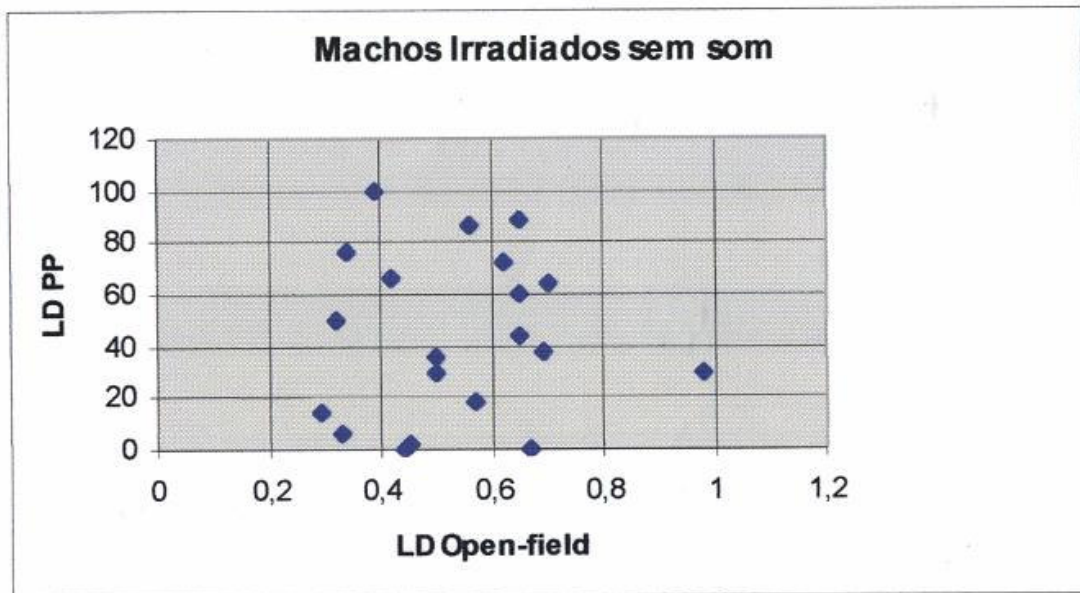


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos irradiados sem som.

APÊNDICE C

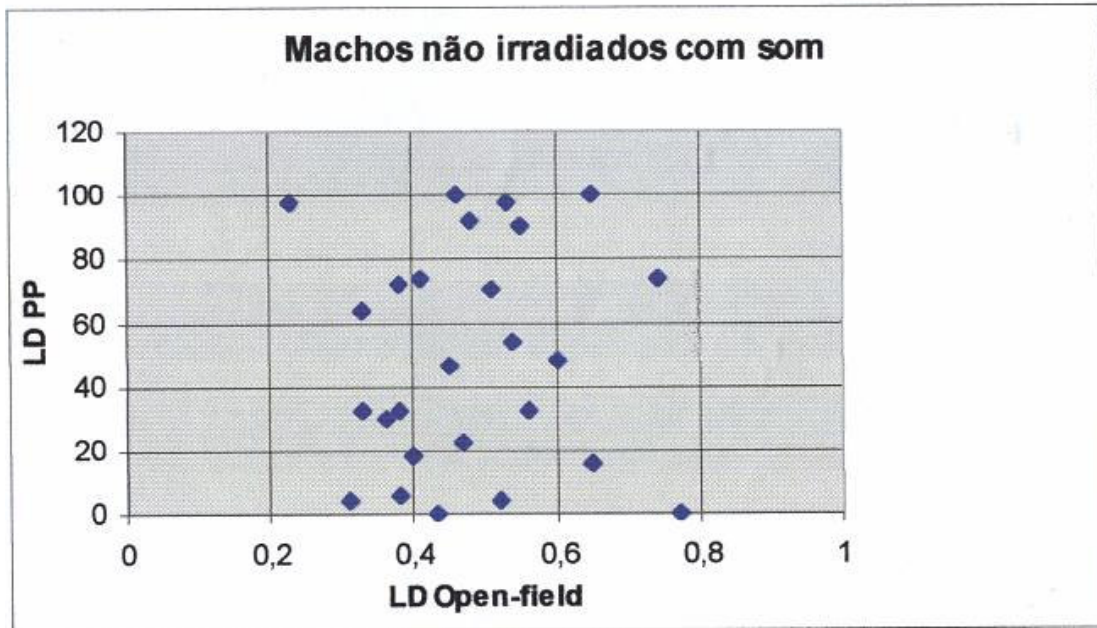


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos não irradiados com som.

APÊNDICE D

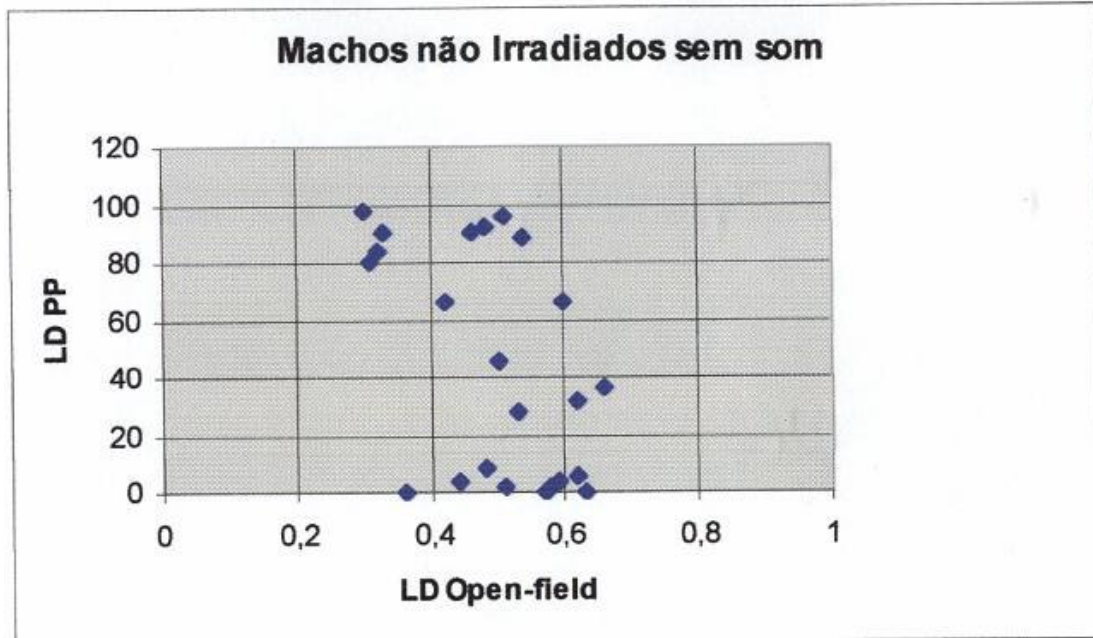


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos não irradiados sem som.

APÊNDICE E

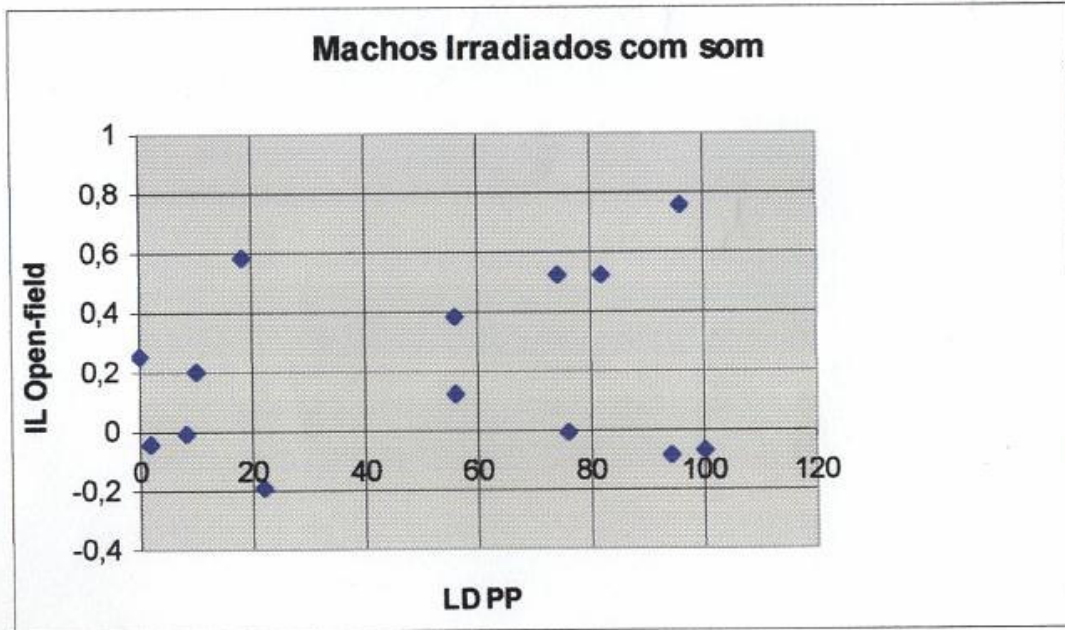


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de machos irradiados com som.

APÊNDICE F

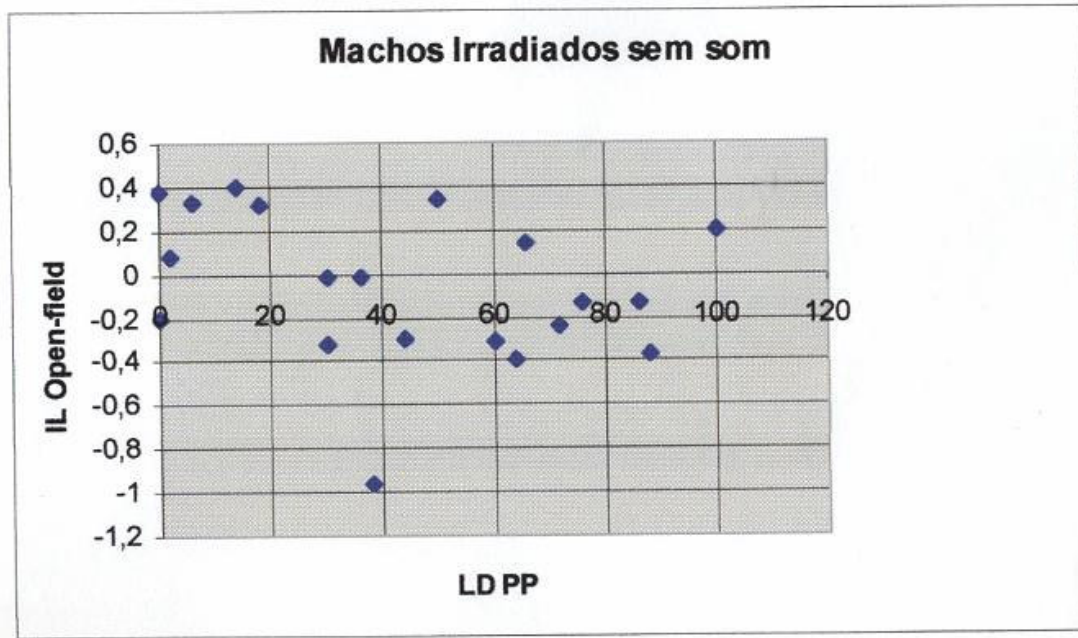


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de machos irradiados sem som.

APÊNDICE G

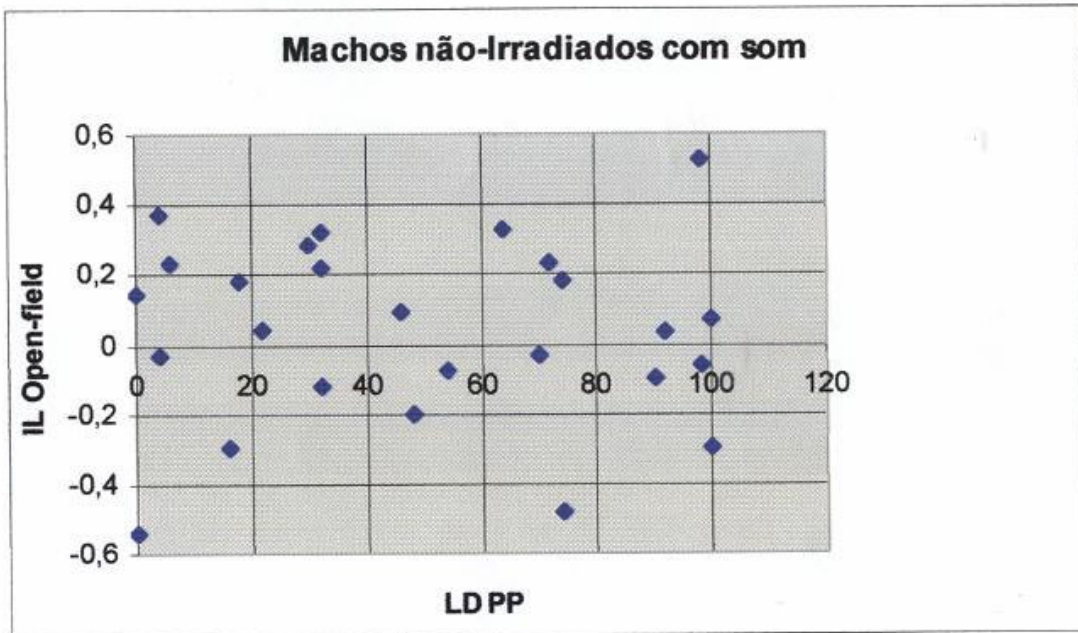


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de machos não irradiados com som.

APÊNDICE H



Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de machos não irradiados sem som.

APÊNDICE I

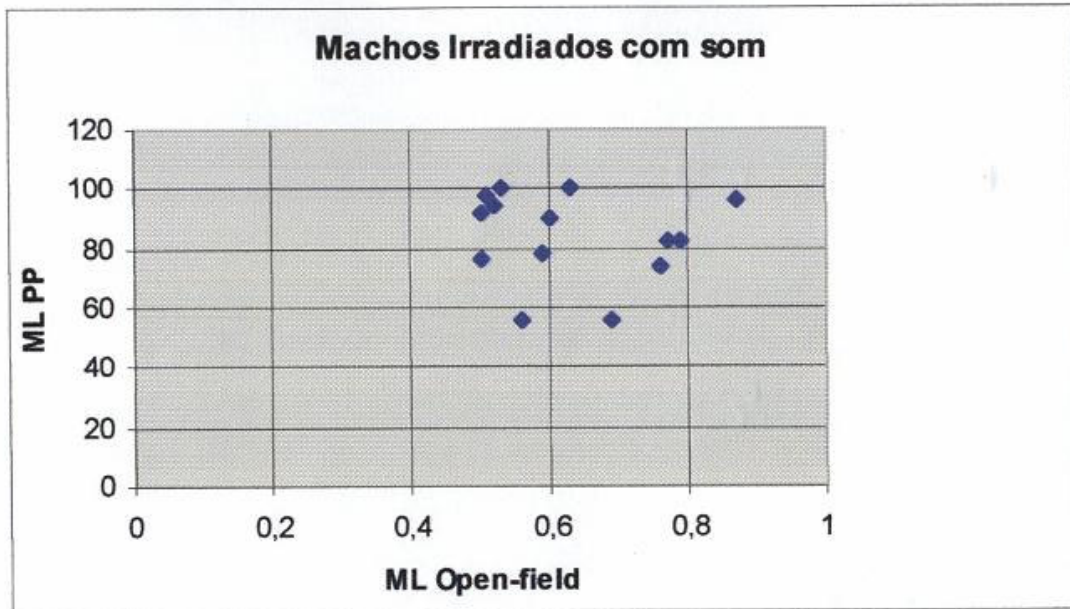


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos irradiados com som.

APÊNDICE J

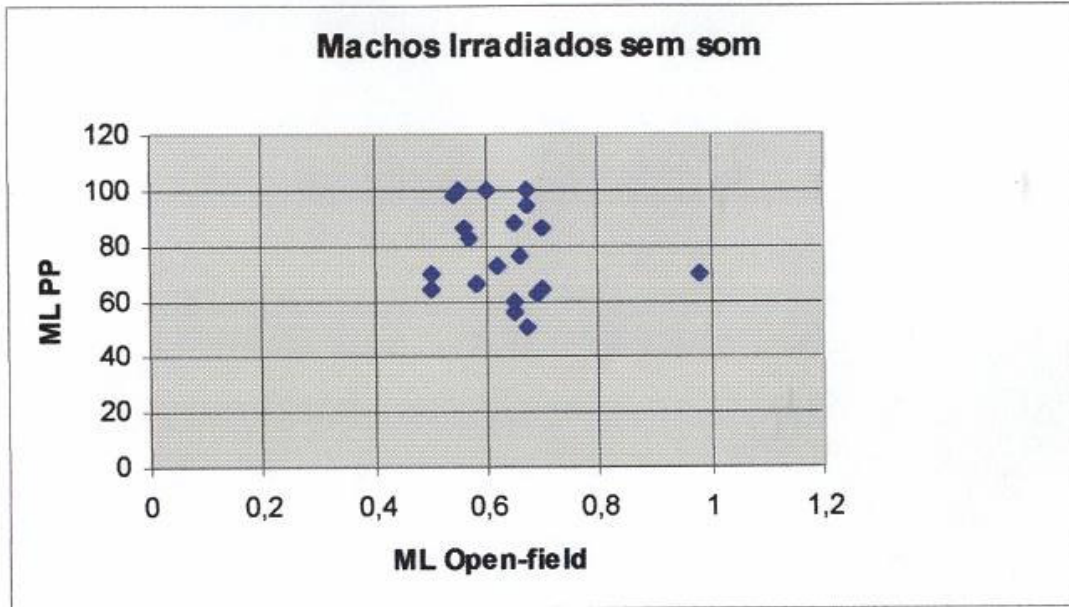


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos irradiados sem som.

APÊNDICE L

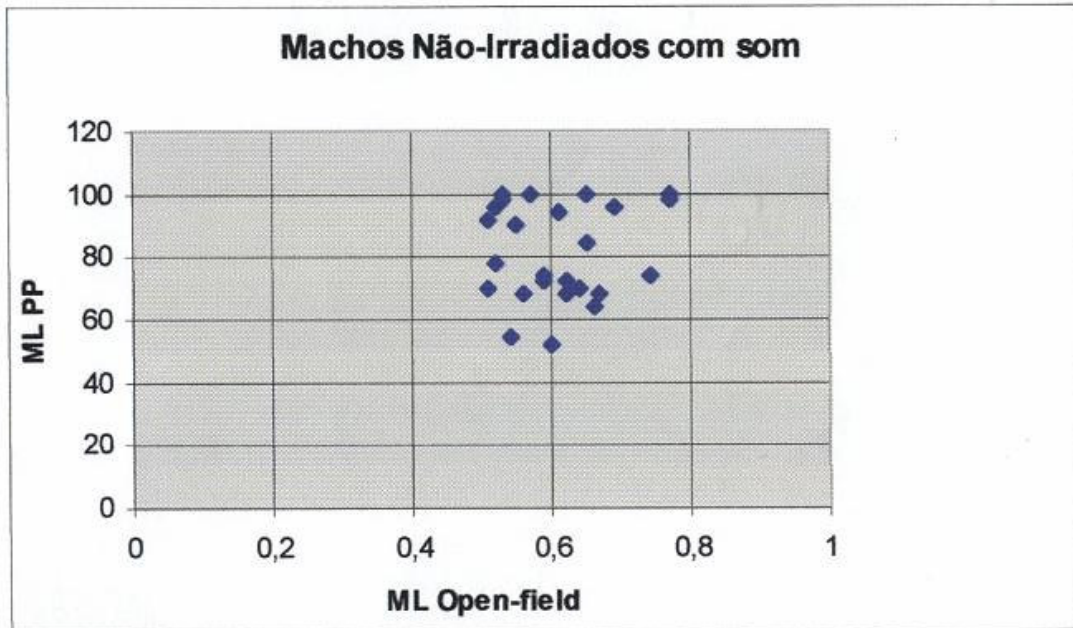


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos não irradiados com som.

APÊNDICE M

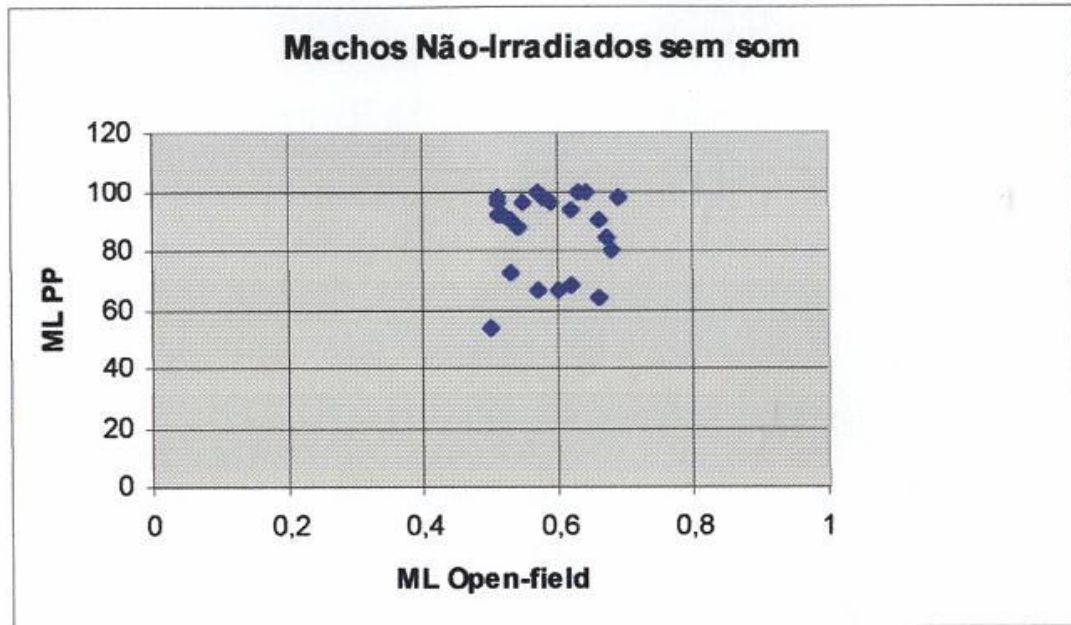


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de machos não irradiados sem som.

APÊNDICE N

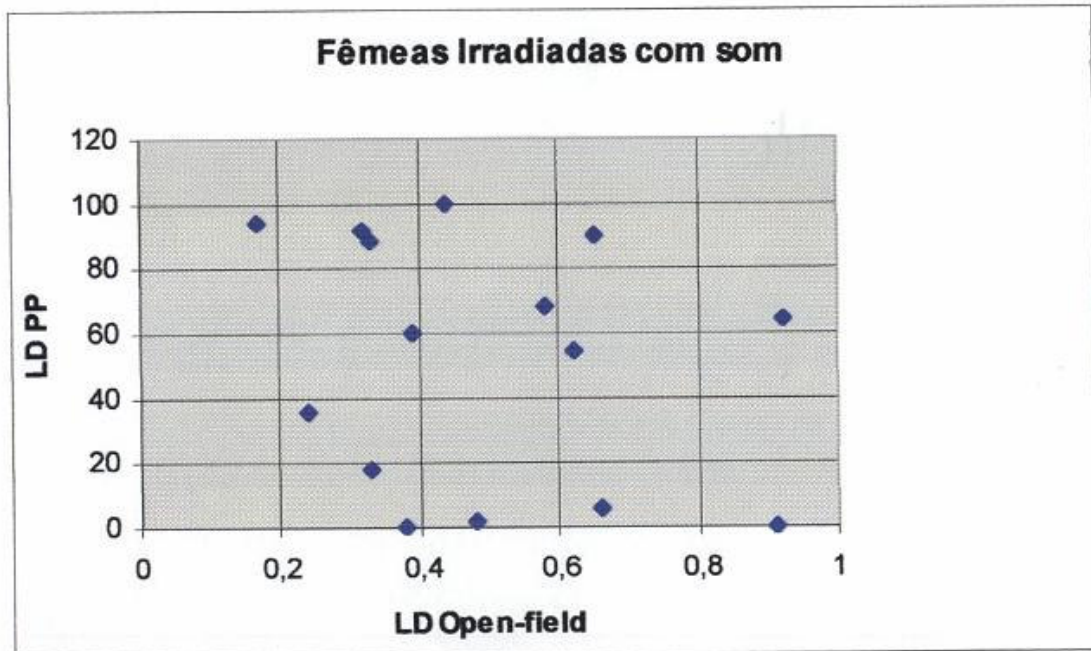


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas com som.

APÊNDICE O

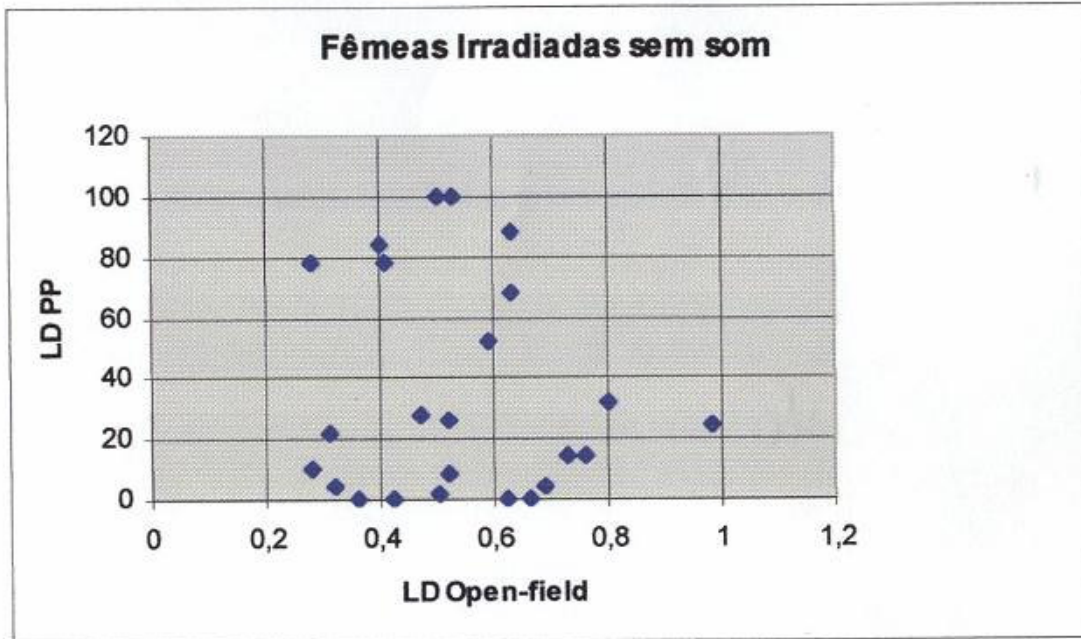


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas sem som.

APÊNDICE P

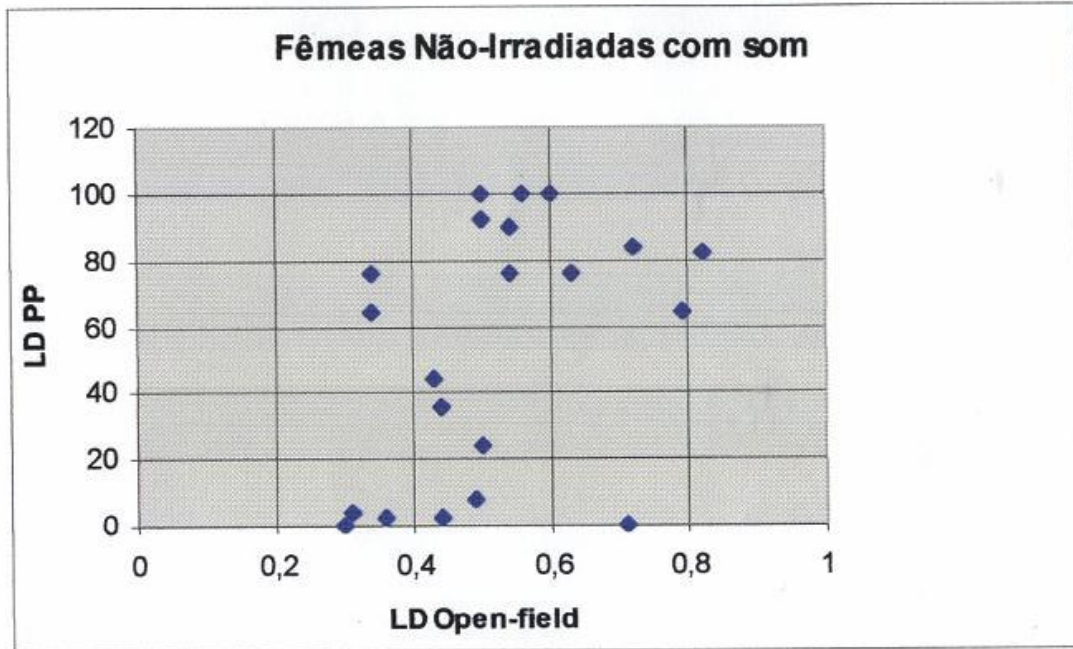


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas com som.

APÊNDICE Q

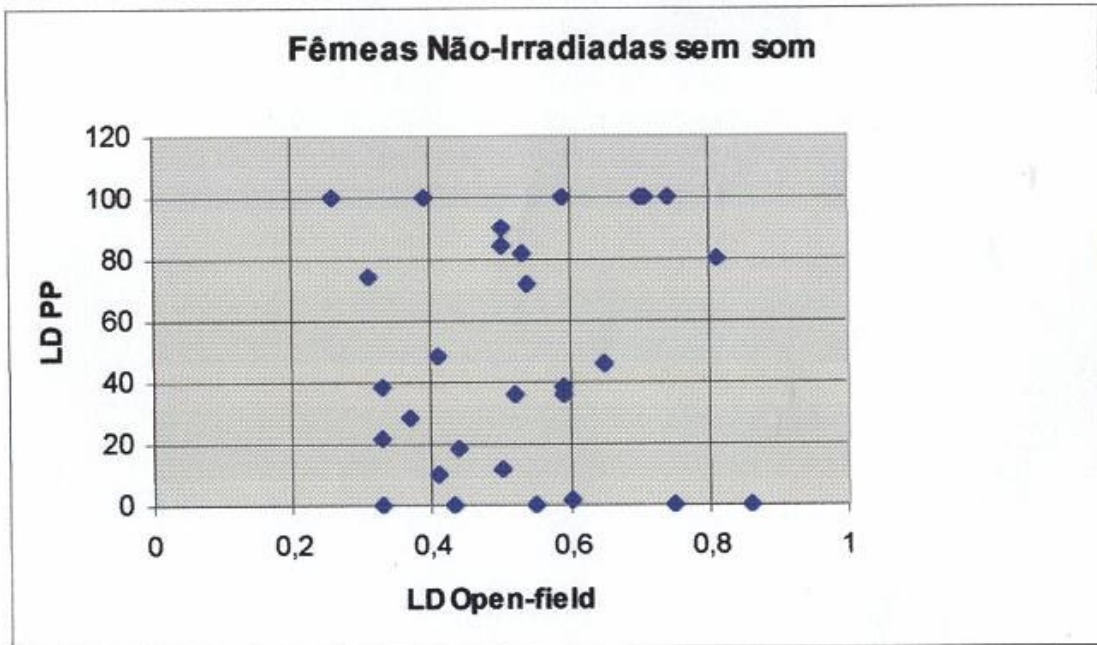


Gráfico demonstrativo das relações entre lateralidade direcional de preferências de patas (ordenada) e lateralidade direcional do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas sem som.

APÊNDICE R

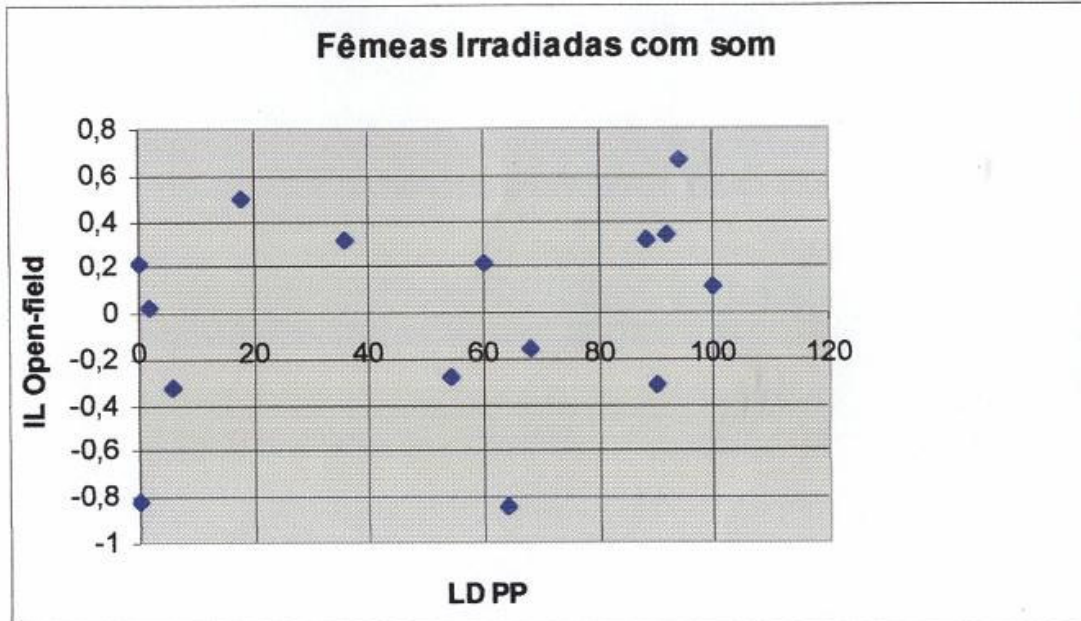


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas com som.

APÊNDICE S

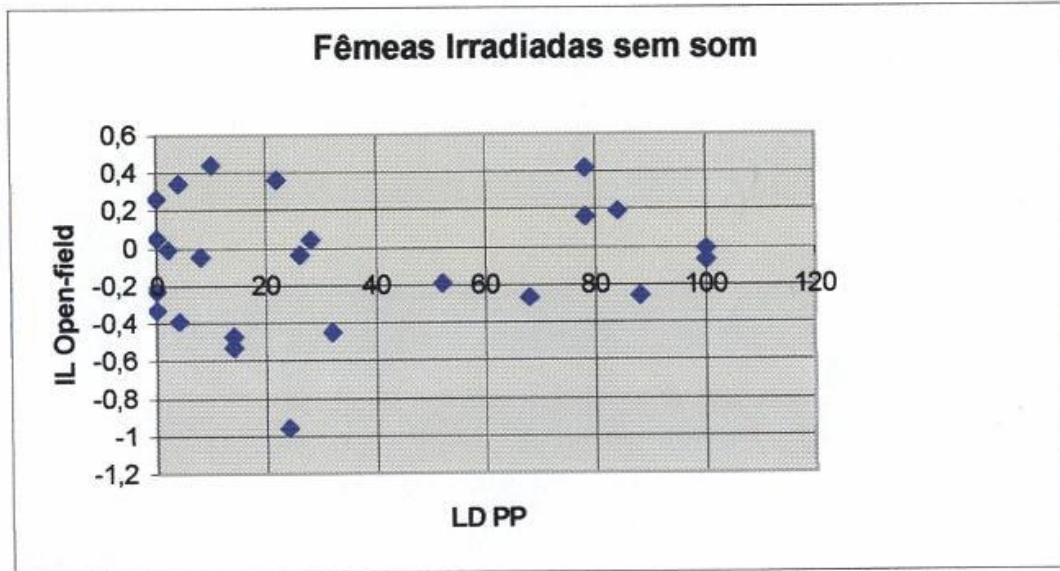


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas sem som.

APÊNDICE T

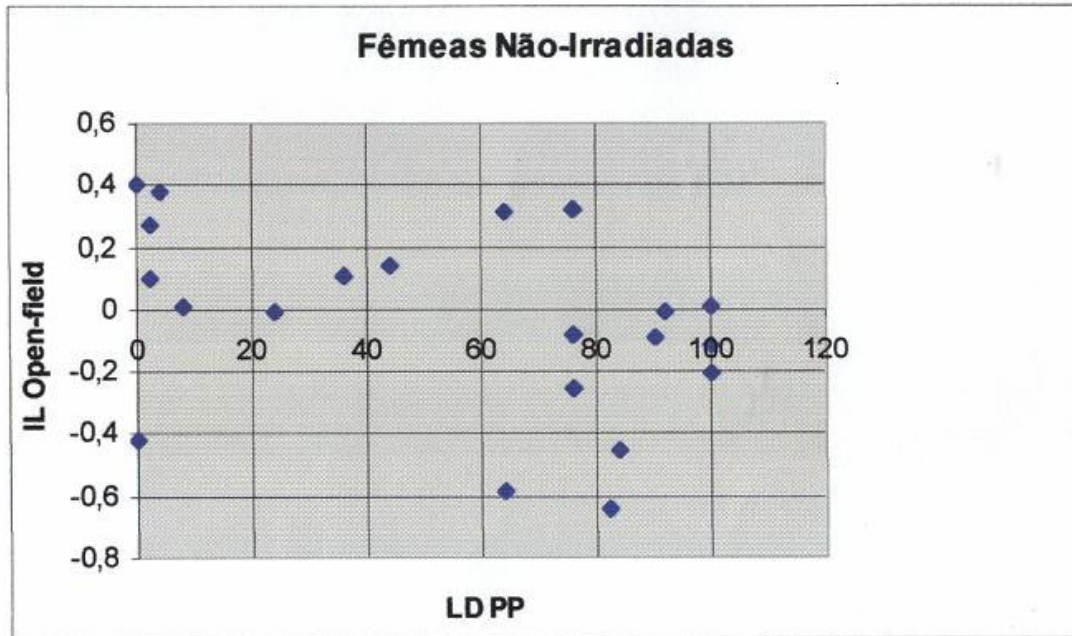


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas com som.

APÊNDICE U

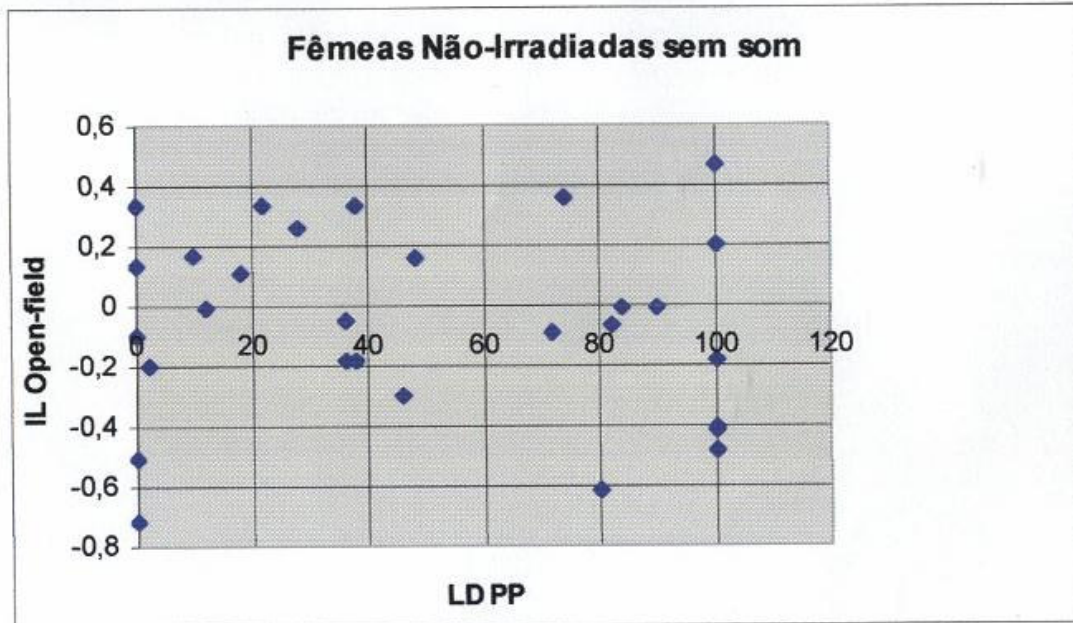


Gráfico demonstrativo das relações entre índice de lateralidade do campo aberto (*open-field*) (ordenada) e lateralidade direcional de preferências de patas (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas sem som.

APÊNDICE V

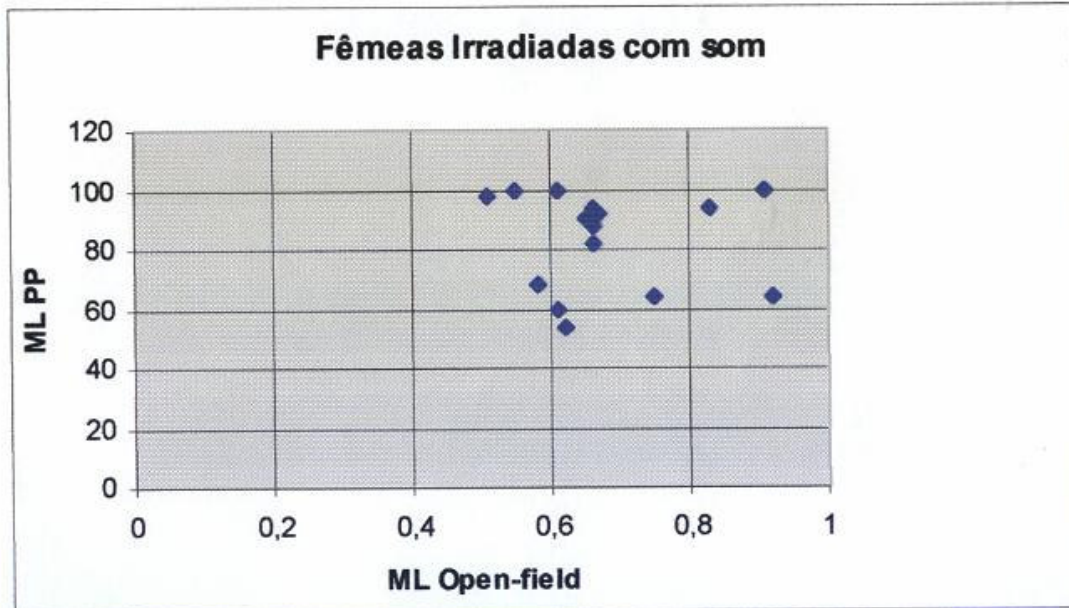


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas com som.

APÊNDICE X

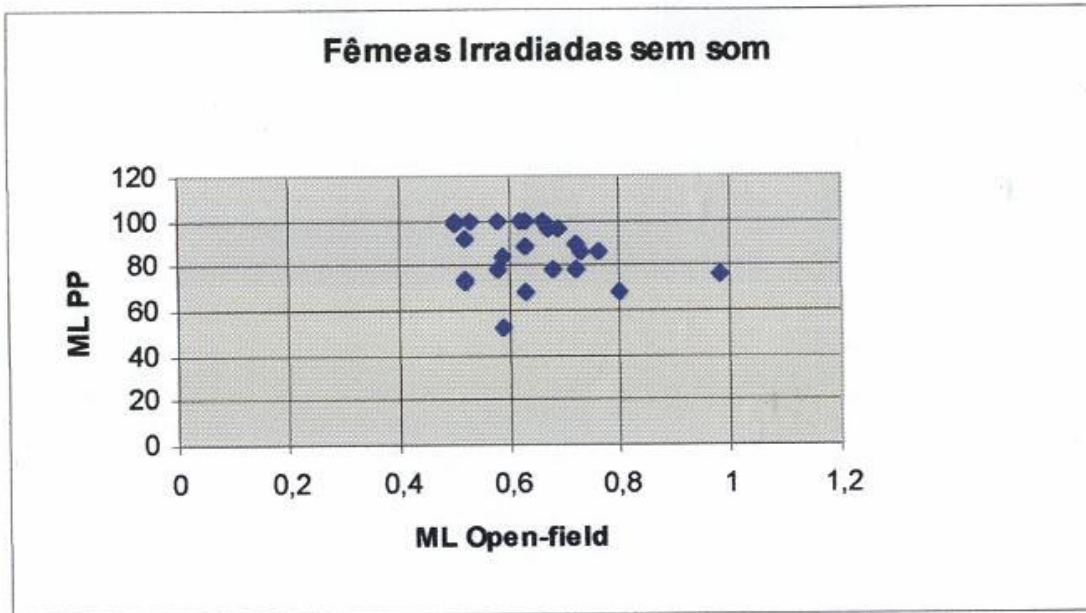


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas irradiadas sem som.

APÊNDICE Z

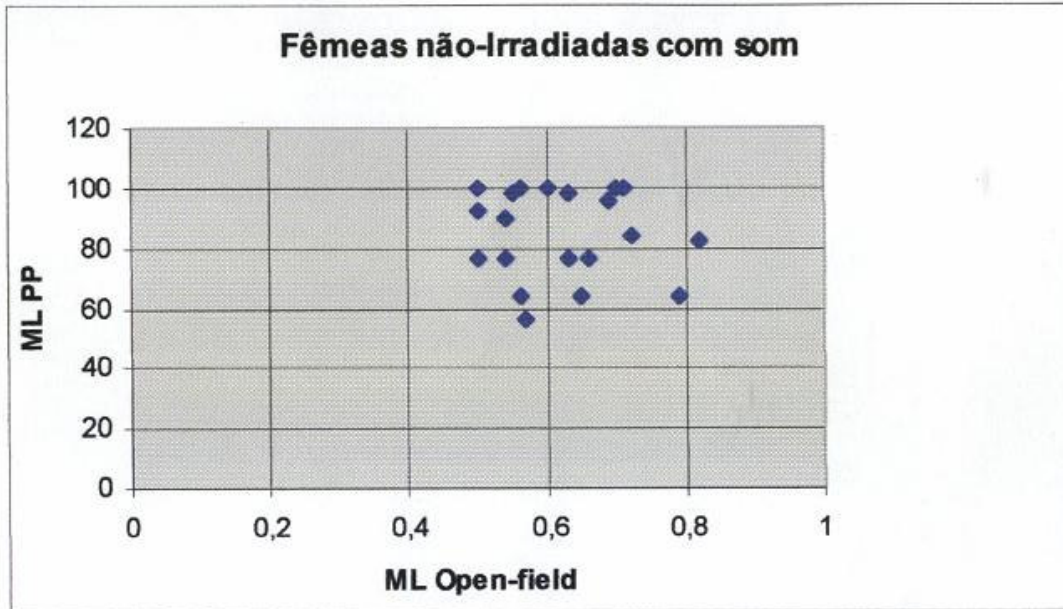


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas com som.

APÊNDICE AA

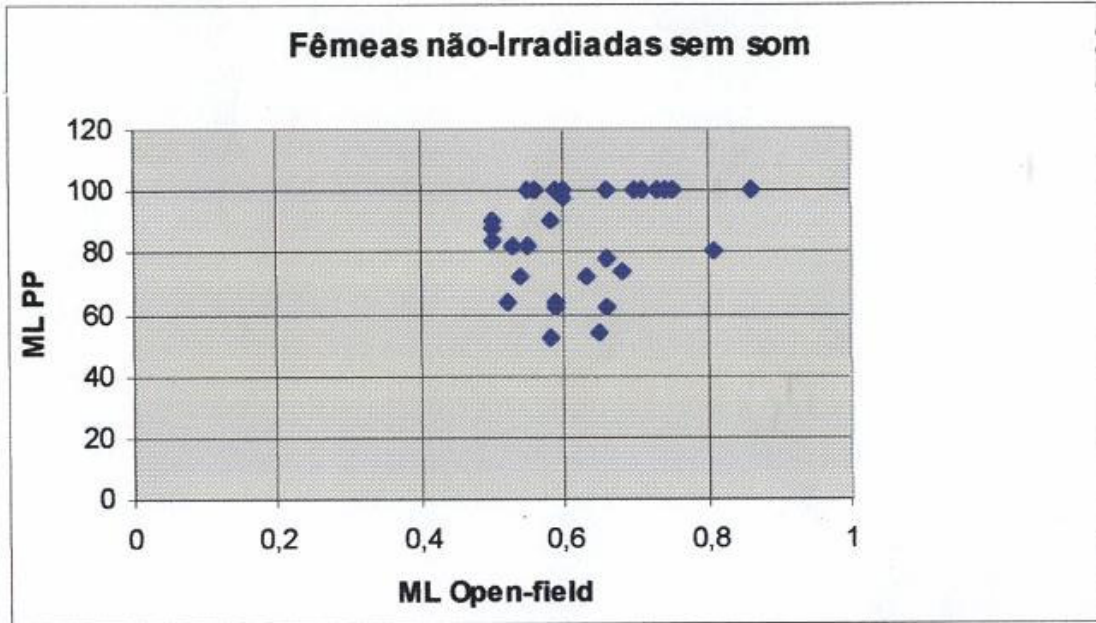


Gráfico demonstrativo das relações entre magnitude da lateralidade de preferências de patas (ordenada) e magnitude da lateralidade do campo aberto (*open-field*) (abscissa) no grupo de fêmeas não irradiadas sem som.