**Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia**

**“EFEITOS DA ANEMIA FERROPRIVA E DA ESTIMULAÇÃO TÁTIL
SOBRE A MORFOLOGIA DO NERVO ÓPTICO EM RATOS.”**

Jefferson Mallmann Homem
Orientador: Prof. Dr. João-José Lachat

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Ciências,
Área de Psicobiologia

Ribeirão Preto – SP
Janeiro - 2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Homem, Jefferson Mallmann

Efeitos da Anemia ferropriva e da Estimulação tátil sobre a Morfologia do Nervo Óptico
Ribeirão Preto, 2004

74 p. il. 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP – Área de Concentração: Psicobiologia.

Orientador: Lachat, João-José

Anemia, “handling”, Nervo Óptico

Banca Examinadora de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. João-José Lachat

Membros

Prof. Dr. João-José Lachat

Prof. Dr. José Antonio Thomazini

Prof. Dr. Luis Marcellino de Oliveira

Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto

Prof. Dr. Marcos Lania de Araújo

*A meus pais,
meu irmão,
minha esposa*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. João-José Lachat, pela confiança em mim depositada e sua incansável disposição de ajudar a quem precisa.

Ao meu irmão, que de tantas dificuldades tem me tirado para que eu pudesse concluir os objetivos deste e de outros cursos.

Ao meu colega de laboratório, companheiro de jornada, Jesiel, com seu bom humor, sempre pronto a ajudar...

Ao professor Dr João Kagiwara pela valiosa ajuda no programa de estatística.

Às técnicas e técnico de laboratório, Tereza, Izilda, Vani, Tuca e José, pela sempre boa disposição em servir e ajudar a resolver problemas.

Às duas Renatas, secretárias (Psicobiologia e Anatomia e Cirurgia)

Aos anônimos de boa vontade,

Muito Obrigado!

Índice

Resumo	8
Summary	10
Introdução	12
Materiais e Métodos	19
Animais	19
Manutenção dos animais	19
Estimulação dos animais	20
Formação dos grupos experimentais	20
Manutenção e limpeza dos materiais	21
Avaliação hematológica	21
Morfologia e Morfometria	21
Densidade glial do nervo óptico	23
Contagem de vasos	23
Área, Perímetro e Diâmetro mínimo	23
Análise estatística	24
Peso Corporal	24
Peso Corporal das Ratas-Mães	24
Peso Corporal dos Filhotes	24
Hematologia das Ratas-Mães e Filhotes	25
Morfometria	25
Resultados	27
Avaliação do Peso Corporal	27
Avaliação do Peso Corporal das Ratas-Mães	27
Avaliação do Peso Corporal dos Filhotes	27
Avaliação hematológica das Ratas-Mães e Filhotes	30
Avaliação da Hemoglobina e Hematócrito das Ratas-Mães	31
Avaliação da Hemoglobina e Hematócrito dos Filhotes	31
Avaliação Morfológica e Morfométrica	33
Avaliação Morfológica	33
Avaliação Morfométrica	40
Discussão	51
Conclusões	56
Bibliografia	58

Resumo

Vários trabalhos têm mostrado que a ingestão deficiente de ferro pode causar alterações nos parâmetros morfológicos e bioquímicos do Sistema Nervoso Central (SNC) do rato assim como em seu comportamento. Também, os animais deficientes em ferro mostram redução no número de lamelas de mielina e déficits de aprendizado. Por outro lado, a estimulação tátil pode reduzir e/ou evitar os danos causados pela má nutrição sobre o SNC e comportamento. Entretanto, os danos no processo de mielinização têm também sido vistos na anemia ferro-deficiente e, uma vez que o nervo óptico é em grande parte formado pelos axônios mielinizados, o objetivo deste estudo é verificar os efeitos da anemia ferropriva e estimulação tátil sobre a morfologia do nervo óptico de ratos Wistar machos aos 18, 22 e 32 dias de idade. Os animais foram divididos em 2 grupos: Controles (C) (35 mg Fe / Kg de dieta), Anêmicos (A) (4 mg Fe / Kg de dieta). Cada grupo foi subdividido em Estimulado (E) e Não Estimulado (N). O peso corporal, hemoglobina, hematócrito, área, perímetro, diâmetro mínimo, densidade de células gliais e número de vasos no nervo óptico foram avaliados. Os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e sacrificados por perfusão cardíaca com PBS 0,05 M em pH 7,3, seguido por paraformaldeído 2% mais glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). O nervo óptico foi dissecado e imerso em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas a 4°C, desidratado em acetona com graus de diluição crescentes e incluído em araldite. As amostras de nervo óptico foram orientadas para permitir cortes transversos de suas fibras. Secções de 0,5 µm foram obtidas e coradas com azul de toluidina 1% antes de serem examinadas na microscopia de luz. Os estudos morfométricos foram feitos com um sistema analisador de imagens semi-automático (MiniMop). Os resultados mostram que a anemia levou a deficiências no peso corporal, hematócrito, hemoglobina, área, perímetro, diâmetro mínimo, número de células gliais e número de vasos do nervo óptico entre os anêmicos, e que a estimulação melhorou significativamente estes itens tanto em anêmicos quanto em controles (à exceção de hematócrito e hemoglobina) porém não recuperando totalmente os estes prejuízos provocados pela anemia.

Summary

Several works have been shown that the deficient ingestion of iron can cause alterations in the morphologic and biochemical parameters of the Central Nervous System (CNS) of the rat as well as in its behavior. Also, the iron deficient animals show reduction in the number of myelin lamellae and learning deficits. On the other hand, the tactile stimulation can reduce and/or to avoid the damages caused by the bad nutrition about CNS and behavior. However, the damages in the myelinization process have been seen also in the iron-deficient anemia and, at once that the optical nerve is formed largely by the myelinated axons, the objective of this study is to verify the effects of the anemia and tactile stimulation on the morphology of the optical nerve of Wistar males rats at the 18th, 22nd and 32nd days of age. The animals were divided in 2 groups: Controls © (35 mg Fe / diet Kg), Anemic (A) (4 mg Fe / diet Kg). Each group was subdivided in Stimulated (S) and No Stimulated (N). The corporal weight, haemoglobin, haematocrit, area, perimeter, minimum diameter, density of glial cells and number of vases were evaluated. The animals were anesthetized and sacrificed by heart perfusion with PBS 0,05 M in pH 7,3, following for paraformaldheyde 2% plus glutaraldheyde 1% in a phosphate buffer 0,1 M (pH 7,3). The optic nerve was dissected and submerged in solution of osmium tetroxide 1% for two hours at 4⁰C, dehydrated in acetone with decreasing dilution degrees and included in araldite. The samples of optic nerve were guided to allow transverse cuts of their fibers. Sections sized 0,5 µm were obtained and stained with toluidin blue 1% prior examinations in the light microscopy. The morphometric studies were made with a semiautomatic analyzing system of images (MiniMop). The results show that the anaemia caused differences in the corporal weight, haematocrit, haemoglobin, area, perimeter, minimum diameter, number of glial cells and vassels of the optical nerve among controls and anaemic, and that the stimulation influenced significantly on these items taking to the conclusion that it improves the damaged structures due to anaemia, but it doesn't recover them totally.

Introdução

O que se classifica, como nervo óptico é o segmento de fibras retinianas reunidas num cilindro entre o bulbo ocular e o quiasma óptico. Estas fibras provenientes da retina e aglomeradas em feixe de forma cilíndrica, triangular ou achatadas, penetram na cavidade craniana pelo canal óptico no osso esfenóide e unem-se às fibras correspondentes do lado oposto formando o quiasma óptico onde essas fibras cruzam-se parcialmente (Kiernan, 1985).

Embriologicamente o nervo óptico e a retina originam-se do diencéfalo e portanto suas fibras relacionam-se com células gliais centrais e não com células de Schwann.

Em todos os vertebrados o nervo possui o mesmo aspecto microscópico, apenas com pequenas variações, sendo formado pelas fibras nervosas classificadas como aferentes somáticas especiais que vêm da retina e são envoltas pelas três meninges, dura-máter, aracnóide e pia-máter, e que se cruzam parcialmente no quiasma óptico. A camada meníngea mais interna deriva da pia-máter, sendo vascular e bem aderida ao nervo (Godlewsky, 1991).

No homem, o nervo óptico é irrigado por vasos do plexo pial e por ramos intraneurais diretos. O plexo pial recebe ramos das artérias hipofisária superior e oftálmica, intracranialmente, e ramos recorrentes da artéria oftálmica no canal óptico e das artérias ciliares posteriores, além da parte extraneural da artéria central da retina, na órbita. Os ramos intracranianos para o nervo óptico originam-se da artéria central da retina, responsável pela irrigação arterial do nervo sendo que a veia central da retina contribui para a drenagem venosa do nervo (Kern e Riis, 1981; Godlewsky, 1991).

No cão, o nervo óptico também é composto pelos axônios das células ganglionares retinianas, que convergem ao disco óptico e passam através das camadas escleral e coróideia, lateroventralmente ao pólo caudal do globo ocular. O nervo óptico é circundado pelas três meninges durante seu curso sinuoso desde o globo ocular até o canal óptico, quando entra para a cavidade craniana e fica dentro de um funil formado pelos músculos retratores do bulbo ocular. Relaciona-se com a gordura orbital, nervos ciliares e vasos na porção rostral durante seu trajeto. Os gânglios ciliares são envoltos ventrolateralmente pelo músculo reto lateral e lateralmente pela porção ventral do músculo retrator do bulbo ocular ficando o nervo óptico medialmente. Dorsalmente, as artérias oftálmicas e os nervos nasociliares ficam adjacentes às meninges que cobrem a porção caudal da órbita. Os dois nervos juntam-se no quiasma logo após entrar na cavidade craniana, onde as fibras das porções mediais dos dois nervos cruzam o trato óptico do lado oposto (Dangata e Kaufman, 1997).

No rato o nervo óptico tem aproximadamente 11 mm de comprimento desde o quiasma até sua fusão com a parte posterior do bulbo ocular sendo que nos primeiros 5mm o nervo caminha reto no sentido quiasma-bulbo ocular, passando depois por uma deflexão lateral onde se encontra mergulhado entre os músculos motores do bulbo ocular e pálpebras (elevador da pálpebra, reto superior, reto lateral, reto medial, oblíquo superior e oblíquo inferior (Greene, 1955)

A ultra-estrutura das meninges do nervo óptico é semelhante àquela de qualquer meninge de outros mamíferos, mas a pia-máter e a aracnóide que o envolvem possuem maior quantidade de colágeno que as meninges cerebrais. Neste caso o espaço subaracnóideo possui células epiteliais de pia-aracnóide que parecem fibroblastos achatados, formando membranas superficiais de mesotélio ou meningotélio (Godlewski, 1991).

De modo geral, os axônios do nervo óptico dos mamíferos estão organizados dentro de uma rede de fascículos, sendo que tal padrão é evidente e muda entre o globo ocular e o

quiasma óptico. Um corte transversal do nervo óptico mostra suas divisões em fascículos poligonais de fibras (Godlewski, 1991)

Tanto ratos albinos como pigmentados, aos 7 dias de idade, possuem 220 000 fibras em média no nervo óptico. Aos 15 dias de idade há uma redução de 30 000 fibras, continuando tal perda após os 15 dias e se acelerando nos ratos pigmentados. Aos 25 dias os ratos pigmentados mostram 72 371 fibras e os albinos 102 681 em média. Mais de 99,5% dos axônios nas duas linhagens apresentam-se sem mielina aos 7 dias de idade. Aos 25 dias de idade cerca de 90% das fibras remanescentes estão mielinizadas nas duas linhagens. O diâmetro médio dos axônios mielinizados foi estimado entre 0,59 e 0,65 micrômetros nas duas linhagens não havendo diferenças entre idade ou linhagem. Ao contrário, o diâmetro médio dos axônios não mielinizados aumenta significativamente com a idade. Este aumento é maior para os ratos albinos que para os pigmentados, de modo que aos 25 dias de idade os valores respectivos são de 0,49 e 0,42 micrômetros. (Hunter e Bedi, 1986)

Comparando-se o número de axônios do nervo óptico de ratos Wistar recém-nascidos com o de adultos, os nervos formados ao nascimento mostram em torno de 242 000 fibras. No sexto dia pós-natal, o número de axônios cai para valores mais estáveis até atingir valores em torno de 99 000 fibras em adultos. Assim o desenvolvimento do sistema visual do rato durante os primeiros 5 dias de vida, está associado à perda de 60% dos axônios presentes no nervo óptico ao nascimento. (Lam e cols., 1982).

No rato, a distribuição dos axônios no nervo óptico não é uniforme e nem possui uma região de preferência para os vários diâmetros ao contrário de sua distribuição no trato óptico onde os maiores axônios, com 2 micrômetros de diâmetro, ficam dorsalmente e do lado mais profundo do trato óptico, ficando ausentes ventralmente e próximos à pia-máter. Há uma diminuição do diâmetro das fibras que ocupam posições mais ventrais no nervo (Reese, 1987).

Por outro lado, ratos com idades entre 3 e 30 meses mostram fibras com diâmetro menor que 1 micrômetro aos 20 meses, caindo entre 18 e 12% em relação aos ratos de 3 e 12 meses respectivamente. Ao contrário, para fibras maiores que 1 micrômetro não parece haver influência da idade. Conclui-se que a mesma perda já observada para a retina e o córtex visual, com o avanço da idade, também acontece com o nervo óptico (Ricci e cols, 1988).

Estudos morfométricos do nervo óptico de ratos entre 2 e 2,5 anos de idade mostram que com o avanço da idade, aumenta a espessura da bainha de mielina devido ao aumento do número de suas lamelas assim como a distância entre elas. No processo de envelhecimento as alterações mais pronunciadas são notadas nos axônios mais finos enquanto os axônios mais grossos tornam-se mais numerosos e com maior número de lamelas de mielina (Godlewski, 1991).

É comum acreditar-se que os axônios do bulbo ocular mantenham dentro do nervo a mesma organização retinotópica, mas estudos no gato mostram pouca evidência disto e a ordem dentro do nervo não parece ser necessariamente aquela equivalente da retina (Horton e cols, 1979). Suspeita-se que no gato haja um sinal tempo-dependente, que enfraquece com a idade, responsável pelo direcionamento não cruzado dos axônios da retina temporal (Horsburgh e Sefton, 1986). Mesmo assim apesar de cruzarem o quiasma, os axônios se reorganizam no segmento caudal do nervo (Jeffery, 1990).

Assim as fibras mais novas situam-se mais no centro do nervo entre os axônios mais velhos e os fascículos emitem axônios que interpenetram o fascículo vizinho (Kretschmer e cols, 1996). O trajeto de axônios ópticos que tomam diferentes caminhos no quiasma foi

traçado através de cortes longitudinais do nervo óptico de gato, onde quase todos axônios que não cruzam no quiasma, mantêm posição retinotópica (Jeffery, 1990).

A mielina no nervo óptico difere daquela dos nervos periféricos, já que não é formada pelas células de Schwann como nos nervos periféricos e sim pelos oligodendrócitos (Jeffery, 1990), e à medida que avança a mielinização, há modificações também nos oligodendrócitos que exibem menos processos que crescem simétrica e uniformemente ao longo dos axônios, resultando numa forma madura (estável) de oligodendrócito altamente estereotipada. A análise do crescimento destas células sugere que estas não mielinizam axônios ao acaso e que os axônios podem influenciar a mielinização realizada pelos oligodendrócitos mais próximos (Butt e Ransom, 1993).

As várias classes de diâmetros dos axônios não mielinizados mudam pouco durante o desenvolvimento. O embainhamento mielínico dos grandes axônios, começa 6 dias após o nascimento. A formação subsequente de bainhas de mielina compactas, é acompanhada por um aumento do diâmetro axonal. As bainhas mielínicas jovens têm poucos micrômetros de comprimento e são separadas do axônio por um longo espaço vazio. Os nodos de Ranvier diferenciados aparecem aos 14 e 16 dias após o nascimento e a maturação do nodo envolve o aparecimento de uma geometria nodal regular, aumentando a diferença da cobertura do axolema e formação dos processos astrocíticos perinodais (Hildebrand e Waxman, 1984). A mielina por outro lado aumenta muito no período pós-natal, principalmente entre os 18 e 70 dias de idade no rato (Matheson, 1970)

Sobre o nervo óptico muitos trabalhos têm sido feitos com a privação protética, sendo que os resultados mais comuns são a piora na transmissão de impulsos pelos axônios, diminuição do número de axônios em até 5% após o nascimento, em ratos, e o atraso no desenvolvimento das fibras em até 4 dias (Conradi e cols, 1989).

O diâmetro do nervo óptico pode reduzir-se em até 15% assim como o número de axônios por área da superfície de corte transversal pode cair a 17% em relação a animais normais. O diâmetro médio do axônio também diminui de 0,49 μ m para 0,45 μ m, reduzindo inclusive o número dos axônios de maiores diâmetros em até 35%. O número de fibras por unidade de área (densidade) fica aumentado não só pela diminuição do diâmetro dos axônios mas também pela diminuição da proteína da mielina, levando a uma hipomielinização (Conradi e cols, 1985).

A desnutrição de modo geral tem sido obtida dando-se às ratas mães gestantes apenas metade da ração recebida *ad libitum*, mantendo porém a proporção entre os nutrientes. Os resultados têm mostrado que a desnutrição até 25 dias de idade pode levar a uma diminuição no número de fibras em até 35 %, aumentando a proporção de fibras menores nos mais jovens e caindo o diâmetro médio de fibras nesta idade. É provável que os déficits vistos aos 25 dias de idade possam ser mais devido a um atraso temporário no crescimento e desenvolvimento das fibras. Entre 25 e 100 dias há um aumento do número total de axônios aproximando-se dos valores normais do rato adulto, sugerindo o aparecimento de novas células ganglionares ou diferenciação de outras células já existentes na retina (Bedi e Warren, 1983).

Quanto ao cálcio, sabe-se que tende a aumentar no nervo óptico com o avanço da idade (Tohno e cols, 2000), assim como tem importante papel na excitabilidade da célula nervosa (Ren e cols, 2000). Tem importância também para os receptores e canais de cálcio da substância branca na transferência de informações entre axônios e células gliais (Matute e cols, 1994)

Em humanos, um importante caso clínico foi relatado (Ayuka e cols, 2001) onde o paciente apresentou visão turva escura, perda de campo visual, perda de acuidade e

perturbações na percepção de cores, com paralela hipocalciúria, onde os sintomas foram notavelmente revertidos após tratamento com reposição de cálcio.

A deficiência de zinco associa-se a problemas no nervo óptico e plexo coróideo (Kasarskis, 1984) e à diminuição de axônios mielinizados, ficando as bainhas de mielina bem mais finas. (Gong e Amemya, 2001)

Mesmo assim suas funções não são muito bem conhecidas principalmente quando o zinco está associado ao cobre. Acredita-se que seu papel mais importante esteja no funcionamento das metaloenzimas que usam estes minerais em sua composição (Hirayama, 1990).

Há evidências de que o zinco é importante na manutenção funcional dos sentidos especiais tais como visão, paladar, olfato e audição. A função dos cones retinais é piorada na deficiência de zinco devido suas interações com a vitamina A. Mas a função do nervo óptico também pode ser afetada. (Russell e cols, 1983)

A deficiência de magnésio em ratos também leva a hipomielinização axonal, adelgaçamento das bainhas de mielina e axônios desmielinizados. O nervo óptico apresenta áreas multifocais de destruição e necrose (Gong e cols, 2003)

Quanto à deficiência de manganês, distúrbios parecidos aos anteriores já foram relatados, tais como diminuição do diâmetro das lamelas de mielina e anormalidades mitocondriais (Gong e Amemiya, 1999)

Vários estudos têm relatado os efeitos prejudiciais da deficiência de ferro em aspectos morfológicos, bioquímicos e comportamentais em animais de laboratório, demonstrando que o cérebro é um dos últimos órgãos a sofrer prejuízos em relação a outros órgãos do corpo, tais como músculo esquelético por exemplo (Tanaka e cols, 1995). Há sinais de que o cérebro tem uma alta tolerância à deficiência de ferro em relação aos músculos esqueléticos em termos metabólicos, apesar da diminuição de atividade neural nos indivíduos deficientes.

Uma das provas da importância do ferro para o nervo óptico e auditivo é o aparecimento de sintomas neurais acarretados por dosagens de deferroxamina, usada para evitar sobrecarga de ferro em transfusões sanguíneas, aparecendo como sintomas a perda visual e auditiva que pode reverter-se com a descontinuidade da droga (Orton, 1985)

O ferro é um componente essencial em uma dieta balanceada. A deficiência deste microelemento causa uma das desordens nutricionais mais comuns no mundo e atinge aproximadamente 15% da população (Kretchmer e cols, 1996), estando envolvido em numerosos processos bioquímicos importantes para o desenvolvimento e manutenção da função neurológica normal, como síntese de dopamina, serotonina e GABA (Beard e cols, 1993). A deficiência de ferro altera irreversivelmente o comportamento em crianças devido sua relação com os neurotransmissores (dopamina) e organização da rede neuronal e mielinização (Beard, 2003)

Apesar de ter sido mostrado que o ferro é encontrado em todo o encéfalo do rato, sabe-se, que ele é encontrado principalmente no globo pálido lateral e medial, substância negra, núcleo dentado, bem como no putamem, núcleo rubro, tálamo, núcleo caudato (Morris e cols, 1992) e em menor extensão no núcleo estriado (Francois e cols, 1981). Este microelemento está localizado principalmente em oligodendrócitos e micróglia (Connor e Benkovic, 1992) e pode também estar presente nos espaços intersticiais e associado com processos de células nervosas (Hill e Switzer, 1984).

Cerca de 80% do ferro no cérebro de ratos (Rajan e cols, 1976) está na fração de mielina e o restante dividido igualmente entre as frações mitocondriais e sinaptossomais. É interessante comentar que o ferro é acumulado no encéfalo do rato desde o nascimento até

a fase adulta, sendo que sua captação máxima ocorre durante o período pós-desmame e coincide com o pico da síntese de mielina (Connor e Benkovic, 1992). Alguns estudos demonstraram que um período curto de deficiência severa em ferro em animais jovens, resulta em alterações cerebrais que não foram corrigidos após suplementação com ferro, mesmo quando outros sinais da deficiência tenham sido revertidos (Findlay e cols 1981, Felt e Lozoff, 1996).

O ferro cerebral pode ser rapidamente reduzido quando ratos são tratados com dieta pobre em ferro durante 14 dias no período pós-desmame precoce (Chen e cols, 1995). Além deste efeito, a dieta deficiente causa nestes animais redução do peso corporal, da concentração de hemoglobina e da concentração de ferro não heme no fígado. Apesar de não terem sido observadas diferenças no peso encefálico em relação aos animais controle, alguns estudos tem mostrado que o ferro tem um papel essencial no crescimento, na síntese de mielina, no metabolismo de neurotransmissores e em outras funções cerebrais (Beard e cols, 1993), mostrando que análises mais específicas podem revelar alterações encefálicas.

O ferro entra na composição dos sistemas enzimáticos do DNA, cadeia respiratória, neurotransmissores e metabolismo lipídico. Setenta por cento do ferro cerebral está associado com a mielina e sua deficiência causa portanto danos à sua formação. Mas havendo apenas deficiência em ferro não há grandes prejuízos para o crescimento ou o peso corporal, apesar da taxa de ferro no corpo influenciar profundamente o desenvolvimento da mielinização, levando a um atraso neste processo (De los Monteros e cols, 2000), bem como atrasos também na condução de impulsos no nervo óptico (Algarin e cols, 2003).

A importância do ferro cerebral se reflete na presença de receptores de transferrina (proteína transportadora) nas células endoteliais dos capilares cerebrais, de onde o ferro se desloca para o interstício cerebral e é tomado pelas células gliais. Além da transferrina o ferro também é transportado via retrógrada pelos axônios cujo processo aumenta de importância com a idade, e sua difusão se dá principalmente pelos fluidos extracelulares, líquido, plexo coróideo e oligodendrócitos.

O excesso na ingestão de ferro não modifica a distribuição de receptores de transferrina ou ferritina (proteína fixadora) no cérebro, mas ao contrário, a deficiência de ferro altera o conteúdo celular destas proteínas de modo que os receptores de transferrina aumentam e o de ferritina diminuem. A circulação de transferrina no líquido é muito alta, e o metabolismo de ferro nos cérebros em desenvolvimento é marcadamente mais intenso que aquele do cérebro adulto. (Moos, 2002; Connor e Benkovic, 1992)

Mas o papel do plexo coróideo não diminui de importância já que quando ratos deficientes em ferro voltam a receber o elemento nota-se intensa atividade deste órgão na captação do metal, sugerindo que o plexo coróideo agiria como um tampão para evitar a assimilação muito rápida do metal pelo sistema nervoso (Dwork, 1995), mas tal mecanismo homeostático do ferro parece funcionar melhor frente ao excesso do que à deficiência do metal (Sobotka e cols, 1996)

Diversos investigadores têm mostrado que a deficiência em ferro tem efeito prejudicial no comportamento de crianças, em testes de desenvolvimento mental e motor (Escala Bayley), apresentando alterações na atenção e percepção com decréscimo na função cognitiva (Sheard 1994; Lozoff 1988; e Lozoff, 1989)

Em ratos, a anemia ferropriva prejudica o desempenho em exercício forçado e na atividade voluntária (Edgerton e cols, 1972), reduz o número de respostas de esquiva em uma tarefa de esquiva passiva, e prejudica ainda o desempenho cognitivo (Massaro e Widmayer, 1981). Adicionalmente, a deficiência em ferro em níveis não anêmicos prejudica a memória em teste de aversão ao sabor (Wiggins e cols 1984).

Outros estudos mostram que a ingestão de dieta com menores níveis de ferro durante a fase de desenvolvimento cerebral resulta em baixos níveis de ferro cerebral, os quais não se corrigem após o desmame mesmo com tratamento, geralmente levando a alterações em medidas morfológicas, bioquímicas e comportamentais além de alterações funcionais, levando a atrasos no desenvolvimento de animais deficientes neste microelemento (Felt e Lozof, 1996)

Prejuízos no processo de mielinização tem sido amplamente observados na deficiência de ferro, e uma vez que o nervo óptico é uma estrutura constituída, em sua maioria, por axônios mielinizados, seria interessante investigar se existem alterações morfológicas, no nervo óptico de animais com anemia ferropriva, já que em fibras severamente deficientes em mielina, a condução do potencial de ação pode ser bloqueado (Rasminsky, 1985).

Existem evidências de que a estimulação ambiental tem a capacidade de promover alterações plásticas no SNC em aspectos morfológicos (Lima, 1992; Rasminsky, 1985), bioquímicos (Pascual e cols, 1996), eletrofisiológicos (Crnic, 1983) e comportamentais (Crnic, 1983) em ratos.

O estudo da literatura tem mostrado que a estimulação tátil (“handling”) e o ambiente enriquecido podem reduzir e/ou evitar os efeitos prejudiciais ocasionados pela desnutrição protéica sobre o SNC (Lima, 1992) e sobre o comportamento em animais de laboratório (Crnic, 1983). A estimulação ambiental também é capaz de provocar alguma reversão nos danos causados por desnutrição protéica, o que se observou ao se estudar o período de latência de estímulos auditivos que diminuiu em animais desnutridos estimulados quando comparado a animais não estimulados (Rocinholi e cols, 2001).

Apesar de diversos autores mostrarem que a estimulação tátil pode promover mudanças plásticas no SNC, nenhum desses estudos tem avaliado os efeitos da deficiência em ferro durante a lactação e/ou até 32 dias de idade (período de mielinização) e de uma possível interação com a estimulação tátil, em estudos morfológicos do nervo óptico.

Portanto, o objetivo deste trabalho é o de avaliar os possíveis efeitos da anemia ferropriva durante a lactação (18 dias), pós-lactação (22 dias) e recuperação nutricional na pós-lactação até 32 dias de idade, associadas ou não à estimulação tátil (handling) de ratos, de modo a investigar as possíveis correlações entre os parâmetros nutricional e morfológicos no nervo óptico desses animais.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizadas 33 ninhadas de ratos machos Wistar, sendo que cada uma era composta de 1 rata-mãe e 6 filhotes machos, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto. As ninhadas foram transportadas para o Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, no dia do nascimento dos filhotes.

Durante todo o desenvolvimento dos trabalhos seguiu-se os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Manutenção dos animais

Durante a lactação (0 a 21 dias), as ninhadas (rata mãe e 6 filhotes) foram alojadas em gaiolas de polietileno (41 x 40 x 17 cm) com tampa de aço inoxidável e receberam dieta *ad libitum* em comedouro de aço inoxidável e água deionizada em bebedouro de vidro.

Neste período todos os animais receberam dietas isocalóricas formuladas segundo a AOAC-95 (Cunnif, 1995). O grupo Controle © foi mantido com dieta contendo 35 mg de Ferro/Kg, enquanto os animais Anêmicos (A) receberam dieta com 4 mg de Ferro/Kg. A composição das dietas, mistura de vitaminas e misturas de sais podem ser observadas nas **Tabelas 1, 2 e 3**, respectivamente para os dois grupos.

Tabela 1 - Composição da dieta basal utilizada para os grupos Controle[∞] e Anêmico durante os períodos de lactação e pós-lactação segundo AOAC. (Cunnif, 1995)

Componentes	%
Caseína	20
Colina	0,15
Mistura Salina**	0,27
Mistura Vitamínica	0,10
Maizena	20
Óleo de Milho	5
DL-Metionina	0,10
Glicose H ₂ O	49,38

** Mistura Mineral deficiente em Ferro

∞ Grupo controle recebeu dieta basal acrescida de 35 mgFe/Kg de dieta.

Tabela 2 - Composição da Mistura de Vitaminas de acordo com AOAC-95.

Componentes	Quantidade (g/ 100g)
Ácido Fólico	0,10
α- Tocoferol Acetato	5,00
Menadiona	0,04
Niacina	0,10
Pantotenato de Cálcio	1,00
Piridoxina HCL	1,00
Riboflavina	0,30
Sucrose	85,51
Tiamina HCL	0,30
Vitamina A 500.000 UI/g	1,0
Vitamina B12 0.1%	2,0 em gelatina
Vitamina D ₃ 200.000 UI/g	0,75

Tabela 3 - Composição da Mistura de Sais Minerais de acordo com AOAC-95 *.

Componentes	Quantidade (g/ 100g)
MgSO ₄ , anidroso	73,816
ZnSO ₄ 7H ₂ O	19,657
MnSO ₄ H ₂ O	5,733
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,7315
KIO ₃	0,0625

- Mistura de Sais deficiente em Ferro.

Os pesos corporais da rata-mãe e dos filhotes foram registrados durante a lactação aos 0, 7, 14, 21 dias de idade dos filhotes (lactação) e na pós-lactação, somente o peso individual dos filhotes aos 28 dias de idade para investigar o ganho de peso semanal desses animais. Os filhotes também foram pesados individualmente, nos dias das avaliações hematológica e morfológica (18°, 22° e 32° dias de idade), para a realização dos cálculos da quantidade de fármacos a serem administradas para anestesia e perfusão dos mesmos.

Estimulação dos animais

A estimulação tátil começou no dia zero do nascimento dos filhotes e foi realizada 5 dias por semana, consistindo em segurar cada filhote em uma das mãos e deslizar o polegar da outra mão por toda a região dorsal do animal no sentido crânio-caudal, durante 3 minutos.

Para a realização da estimulação tátil no período de lactação, a rata-mãe foi retirada da gaiola de lactação durante 18 minutos e colocada em uma gaiola de polietileno similar. Os animais estimulados foram cobertos com algodão para evitar alteração acentuada da temperatura corporal durante o processo de estimulação. As ratas mães de ninhadas não estimuladas também foram separadas de seus filhotes pelo mesmo período que os animais estimulados e estes filhotes, também foram cobertos com algodão, tomando-se o cuidado de não manipulá-los.

Na fase de pós-lactação os animais estimulados foram retirados de suas gaiolas de alojamento individual e submetidos ao procedimento de estimulação tátil, retornando 3 minutos depois, enquanto os filhotes não estimulados foram manipulados somente para a pesagem semanal comum a todos os grupos.

Formação dos grupos experimentais

Foram retirados, aleatoriamente, no máximo, 2 animais de cada ninhada para a composição de cada grupo experimental com o intuito de reduzir possíveis interferências genéticas nas avaliações utilizadas. No período de lactação foram formados os seguintes grupos experimentais, considerando as variáveis dieta e estimulação tátil tanto aos 18 como aos 22 dias de idade: Controle Não Estimulado (CN), Controle Estimulado (CE), Anêmico Não Estimulado (AN), Anêmico Estimulado (AE). Durante o período de pós-lactação, além dos grupos já citados, foram formados também os grupos Recuperados Não Estimulados (RN) e Recuperado Estimulado (RE) com idades entre 22 e 32 dias de idade. (**tabela 4**)

Foram realizadas as seguintes avaliações: ponderal (peso corporal), hematológica (Hemoglobina e Hematócrito), morfológica (estrutura do nervo óptico) e morfométrica

(densidade glial, área, perímetro e diâmetro mínimo do nervo óptico, assim como também a contagem de vasos em cada corte transversal.

Tabela 4 - Delineamento Experimental

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado,
AN= anêmico não estimulado, AE= anêmico estimulado,
RN= recuperado não estimulado RE= recuperado estimulado

Períodos	Dietas	Condição de Estimulação	Grupos (N = 8)
Lactação	Controle 35 mg de ferro	Não Estimulado	CN18 CN22
		Estimulado	CE18 CE22
	Anêmico 4 mg de Ferro	Não Estimulado	AN18 AN22
		Estimulado	AE18 AE22
Pós-lactação	Controle 35 mg de ferro	Não Estimulado	CN32
		Estimulado	
	Anêmico 4 mg de Ferro	Não Estimulado	AN32
		Estimulado	
	Recuperado 35 mg de Ferro	Não Estimulado	RN32
		Estimulado	

Manutenção e limpeza do material

Todo material utilizado no alojamento e cuidado com os animais, incluindo vidrarias, materiais de aço inoxidável e material plástico foi lavado previamente com uma solução de ácido nítrico a 30% (v/v) e enxaguado em água deionizada, evitando assim, a contaminação com ferro existente no meio ambiente.

Avaliação hematológica

Foi coletada uma amostra de 1 mililitro (ml) de sangue de cada filhote através de punção cardíaca, aos 18, 22 e 32 dias de idade, sendo este volume anticoagulado com uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato de potássio a 10% (EDTA).

O material coletado destinou-se às determinações hematológicas realizadas sempre no mesmo dia da coleta e foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina e hematócrito pelo método do microematócrito.

As avaliações foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, sob orientação e supervisão da Prof. Dra. Ana Maria de Souza.

Morfologia e Morfometria

Os animais de cada grupo experimental (controles e anêmicos) foram profundamente anestesiados pela inalação de éter sulfúrico e perfundidos por via intracardíaca com uma solução de salina tamponada (PBS) 0,05M, pH 7,3 seguida por uma mistura fixadora de paraformaldeído 2% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Foi estabelecida uma relação de 1 ml/g de peso corporal para determinar as quantidades de soluções empregadas na perfusão de cada animal. Isto foi feito aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Após a perfusão, os animais foram decapitados e suas cabeças colocadas imediatamente na mesma solução fixadora por 24 horas a 4 ° C. Em seguida os nervos ópticos foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Stemi DRC, Carl Zeiss) e extremo cuidado foi tomado para evitar o ressecamento do nervo. Usando instrumentos de microcirurgia, a dissecação foi feita removendo-se toda a parte óssea periférica do pálato e expondo-se o local de inserção do nervo no encéfalo e todo seu percurso até a parte posterior do globo ocular. Não foi usada toda a extensão do nervo, mas somente a porção entre o quiasma óptico e a deflexão para o globo ocular, conforme mostrado na **figura 1**.

Figura 1 – Crânio de rato adulto em vista ventral mostrando encéfalo *in situ* com a base do encéfalo dissecada, onde os ossos do assoalho craniano foram removidos. O retângulo indica a região do nervo colhida para análise. (2 X)

Após sua retirada, o nervo foi colocado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, lavado repetidas vezes e refixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3, por um período de 2 a 3 horas a 4° C e então processados para inclusão em araldite, tomando-se o cuidado em orientá-lo para que suas fibras pudessem ser cortadas transversalmente.

Posteriormente, com um ultramicrotomo (Dupont Sorval modelo Porter Blum MT-2B) foram obtidos cortes de 0,5 µm de espessura, montados em lâminas histológicas, corados com azul de toluidina a 1% e então cobertos com lamínulas, colocados em estufa a 37°C para secagem e armazenados para observação em nível de microscopia de luz e então fotografados em um fotomicroscópio (Axiophot Carl Zeiss), usando filme T-Max ISO 100 (Kodak). Após o processamento fotográfico dos filmes, fotomicrografias obtidas com aumentos finais entre 150 e 300 vezes, foram utilizadas para as avaliações morfométricas dos nervos ópticos dos animais dos diversos grupos experimentais.

Densidade glial do nervo óptico.

Para esta avaliação feita aos 18, 22 e 32 dias de idade, foram utilizadas as fotomicrografias com aumento final de 300x. A contagem das células gliais, não diferenciada foi feita utilizando uma grátícula transparente de 7 x 11 cm, a qual era fixada sobre a fotomicrografia, como mostra a **figura 2**.

Figura 2 – Fotomicrografia ilustrativa da região central do nervo óptico mostrando a disposição da grátícula usada para contagem de vasos e células gliais. (aumento de 300 X).

Cada quadrado da grátícula cobria uma área de 1 cm², totalizando 77 cm² em toda a fotomicrografia. A densidade glial (nº de células / mm²) foi calculada a partir da média das contagens obtidas de todos os animais sacrificados para cada uma das condições experimentais.

Contagem de vasos

O número de vasos foi avaliado através de fotomicrografias com aumento final de 300x, onde foi sobreposta uma grátícula transparente de 7 x 11 cm, como se mostra na **figura 2**.

Área, perímetro e diâmetro mínimo

A avaliação destes parâmetros foi realizada utilizando as fotomicrografias com aumento final de 150x, mostrando todo o nervo (**figura 3**). Todos os parâmetros acima citados, foram medidos com auxílio de um sistema analisador de imagens semi-automático da Kontron Bildanalyse (MiniMop)

O diâmetro máximo não foi utilizado devido à facilidade deste parâmetro em modificar-se, conforme a angulação do corte, isto é, para serem confiáveis todos os cortes deveriam ser feitos com noventa graus de angulação entre a navalha e o eixo do nervo, o que se revelou quase impossível controlar durante a realização dos cortes no micrótomo, já

que durante o processo de inclusão muitos segmentos de nervo apresentaram ligeiras mudanças desse ângulo durante a polimerização da resina.

Figura 3 – Fotomicrografia ilustrativa de corte transversal do nervo óptico, utilizada para as medidas de área, perímetro e diâmetro mínimo.

Análise estatística

1. Peso Corporal

Os dados obtidos das avaliações hematológicas, ponderais e morfométricas foram processados em microcomputadores IBM PC Pentium I e II compatíveis, com “software” apropriado, utilizado para a confecção de gráficos e tabelas e também submetidos a análises estatísticas apropriadas, considerando as situações específicas de cada um deles.

1.1. Peso Corporal das ratas-mães.

O peso corporal das ratas mães foi analisado através da análise de variância (ANOVA) para 3 fatores: dieta, com 2 níveis (controle e anêmico), estimulação, com 2 níveis (não estimulado e estimulado) e idade, com 4 níveis (0, 7, 14 e 21 dias, quando as mães foram sacrificadas no 22º dia ou 0, 7, 14 e 18, separadamente, quando as mães foram sacrificadas no 18º dia do período de lactação), com medida repetida no fator dia. As respectivas mães foram sacrificadas junto com os filhotes de 18 e 22 dias de idade.

1.2. Peso Corporal dos Filhotes

As análises dos pesos corporais dos filhotes foram divididas em partes:

De 0 a 28 dias a análise de variância foi conduzida para 3 fatores: dieta com 2 níveis (controle e anêmico), estimulação com 2 níveis (não estimulado e estimulado) e idade com 5 níveis (0, 7, 14, 21, 28 dias), com medida repetida no fator idade.

Aos 28 e 32 dias a ANOVA foi conduzida utilizando as variáveis: dieta com 3 níveis (controle, anêmico e recuperado), estimulação com 2 níveis (não estimulado e estimulado) e idade com 2 níveis (28 e 32 dias), com medida repetida no fator idade.

Quando apropriada, após a ANOVA, a análise *post-hoc* foi conduzida pelo teste de Newman Keuls ($p < 0.05$). A divisão das análises em períodos foi necessária devido a inclusão do grupo recuperado no período de pós-lactação (após 21 dias) e também porque os pesos dos animais de 0 a 28 dias requereram uma análise de medida repetida, enquanto aos 18, 22 e 32 dias foi realizada análise com fatores independentes.

2. Hematologia das Ratas-Mães e Filhotes

A quantidade de Hemoglobina (Hb) e a porcentagem de Hematócrito (Ht) das ratas mães foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) para 2 fatores independentes: dieta, com 2 níveis (controle e anêmica), e idade, com 2 níveis (18 e 21 dias). Quando apropriada, após a ANOVA, a análise de *post-hoc* foi conduzida pelo teste de Newman Keuls ($p < 0.05$).

A análise da quantidade de Hb e a porcentagem de Ht dos filhotes foi dividida em duas partes e realizada através da análise de variância (ANOVA). Inicialmente, a ANOVA foi conduzida para 3 fatores independentes: dieta, com 2 níveis (controles e anêmicos), estimulação, com 2 níveis (não estimulado e estimulado) e idade, com 3 níveis (18, 22 e 32 dias). Posteriormente, a ANOVA foi conduzida também para 3 fatores independentes: dieta, com 3 níveis (controles, anêmicos e recuperados), estimulação, com 2 níveis (não estimulado e estimulado) somente aos 32 dias de idade. A divisão da análise foi necessária devido a inclusão do grupo recuperado aos 32 dias de idade. Quando apropriada, após a ANOVA, a análise de *post-hoc* foi conduzida pelo teste de Newman Keuls ($p < 0.05$).

3. Morfometria

A densidade glial, de vasos e os parâmetros morfométricos dos nervos ópticos (área, perímetro e diâmetro mínimo) foram tratados com uma análise de variância fatorial e, para os efeitos das interações entre as variáveis, foi utilizada a análise de variância ANOVA para 3 fatores: dieta, com 2 níveis (controle e desnutrido), estimulação, com 2 níveis (não estimulado e estimulado) e idade, além do teste estatístico de Bonferroni como pós-teste.

Resultados

Avaliação do Peso Corporal das Ratas-Mães

O **Gráfico 1** mostra o peso corporal das ratas-mães dos grupos CN, CE, AN, AE nos dias 0, 7, 14, 18 e 21 do período de lactação. A ANOVA apontou efeito da variável dia nos pesos corporais tanto de mães sacrificadas no 18º ($F_{(3,36)} = 2.935554$, $p < 0,05$) como no 21º dia ($F_{(3,63)} = 11.49247$, $p < 0,001$) deste período. O teste *post-hoc* indicou que as ratas-mães apresentavam pesos maiores no início do período de lactação (dia 0) do que nas semanas seguintes (7º, 14º, 18º e 21º dias) ($p < 0,05$).

Gráfico 1 - Peso corporal das ratas mães durante o período de lactação (de 0 a 21 dias).

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado

Avaliação do Peso Corporal dos Filhotes

A ANOVA mostrou efeito de dieta, idade e interações dieta x idade, estimulação x idade e dieta x estimulação x idade nos pesos corporais dos filhotes nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. O teste de *post-hoc* revelou que animais controle © apresentavam pesos maiores do que Anêmicos (A) ($p < 0,05$) e ainda que os pesos de todos os animais (C e A) aumentavam semanalmente ($0 < 7^\circ < 14^\circ < 21^\circ < 28^\circ$). Quanto aos efeitos de interação dieta x idade, o teste de *post-hoc* mostrou que tanto animais C como A apresentavam ganho de peso semanal ($C0 < C7^\circ < C14^\circ < C21^\circ < C28^\circ$ e $A0 < A7^\circ < A14^\circ < A21^\circ < A28^\circ$). Este teste mostrou que animais C apresentavam maiores pesos corporais do que filhotes A em todos os dias medidos (0, 7º, 14º, 21º e 28º), apesar dos filhotes C e A não apresentarem diferenças nos pesos corporais no dia do nascimento (peso C dia 0 = peso A dia 0). A análise do efeito de interação estimulação x idade mostrou que ratos não estimulados (N) apresentavam pesos corporais maiores do que estimulados (E) no 7º dia de idade (tanto anêmicos quanto controles), entretanto este efeito se inverteu no 28º dia ($N28^\circ < E28^\circ$). Adicionalmente, o teste *post-hoc* indicou que tanto animais E como N apresentavam aumento no peso corporal durante o período avaliado ($N0 < N7^\circ < N14^\circ < N21^\circ < N28^\circ$ e $E0 < E7^\circ < E14^\circ < E21^\circ < E28^\circ$). (**gráfico 2**)

O teste *post-hoc* para o efeito de interação dieta x estimulação x idade mostrou que todos os grupos (CN, CE, AN e AE) apresentaram ganho de peso ao longo do período avaliado ($0 < 7 < 14 < 21 < 28$). Esta análise mostrou que o grupo CN apresentou pesos maiores do que AN aos 14, 21 e 28 dias de idade, o grupo CE apresentou pesos maiores do que AE no 7º, 14º, 21º e 28º e do que CN aos 28 dias, e ainda o grupo AN mostrou peso maior que AE no 7º dia, apesar de todos os animais apresentarem pesos iguais no início do tratamento ($CN_0 = CE_0 = AN_0 = AE_0$). O resumo dos efeitos apontados pela Análise de Variância (ANOVA) e no teste de *post-hoc* (Newman Keuls) pode ser observado na **tabela 5**.

O grupo CE apresentou pesos maiores do que AE aos 18, 22 e 32 dias e também maior que CN aos 18 e 32 dias. O grupo AN apresentou pesos maiores do que AE aos 18 dias e o grupo CN mostrou pesos maiores do que AN aos 22 e 32 dias. O resumo dos efeitos apontados na Análise de Variância (ANOVA) e no teste *post-hoc* (Newman Keuls) no Peso Corporal dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade pode ser observado na **Tabela 6**.

A análise dos pesos corporais nos dias 18º, 22º e 32º apontou efeito de dieta, estimulação e idade e das interações dieta x estimulação, dieta x idade e dieta x estimulação x idade. O teste *post-hoc* mostrou que animais C apresentavam pesos maiores do que A bem como ratos E mostravam maiores pesos do que N e ainda filhotes aos 18 dias apresentavam pesos menores do que aos 22 e estes menores do que aos 32 dias.

Tabela 5 – Análise estatística (ANOVA e Newman Keuls) do Peso Corporal dos filhotes dos grupos CN, CE, AN, AE aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de idade.

Variável	ANOVA	Newman Keuls
Dieta	($F_{(1,28)}=16.195, p<0,001$)	$C > A$
Idade	($F_{(4,112)}=4773.754, p<0,0001$)	$0 < 7 < 14 < 21 < 28$
Dieta x Idade	($F_{(4,112)}=26.612.754, p<0,0001$)	$C_0 < C_7 < C_{14} < C_{21} < C_{28}$ $A_0 < A_7 < A_{14} < A_{21} < A_{28}$ $C_0 = A_0; C_7 > A_7; C_{14} > A_{14};$ $C_{21} > A_{21}; C_{28} > A_{28}$
Estimulação x Idade	($F_{(4,112)}=5.360, p<0,0001$)	$N_0 < N_7 < N_{14} < N_{21} < N_{28}$ $E_0 < E_7 < E_{14} < E_{21} < E_{28}$ $N_7 > E_7; N_{28} < E_{28}$
DietaxEstimulação x Idade	($F_{(4,112)}=2.510, p<0,05$)	$CN_0 < CN_7 < CN_{14} < CN_{21} < CN_{28}$ $CE_0 < CE_7 < CE_{14} < CE_{21} < CE_{28}$ $AN_0 < AN_7 < AN_{14} < AN_{21} < AN_{28}$ $AE_0 < AE_7 < AE_{14} < AE_{21} < AE_{28}$ $CN > AN$ aos 14, 21 e 28 dias $CE > AE$ aos 7, 14, 21 e 28 dias $AN_7 > AE_7$ e $CN_{28} < CE_{28}$

Tabela 6 – Resumo dos efeitos da análise estatística (ANOVA e Newman Keuls) no peso corporal dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Variável	ANOVA	Newman Keuls (p<0,05)
Dieta	(F _(1,81) =126.4414, p<0,0001)	C > A
Estimulação	(F _(1,81) =5.3823, p<0,05)	N < E
Idade	(F _(2,81) =468.4214, p<0,0001)	18<22<32
Dieta x Estimulação	(F _(1,81) =7.2776, p<0,05)	CN>AN;CE>AE; CN<CE
Dieta x Idade	(F _(2,81) =20.2624, p<0,0001)	C18<C22<C32; A18<A22<A32 C18>A18;C22>A22; C32>A32
Dieta x Estimulação x Idade	(F _(2,81) =2.510, p<0,05)	CN18<CN22<CN32;CE18<CE22<CE32; AN18=AN22<AN32; AE18<AE22<AE32 CN>AN aos 22 e 32 dias; CE>AE aos 18, 22 e 32 dias; AN18>AE18 e CN<CE aos 18 e 32 dias

Para o efeito de interação dieta x estimulação o teste *post-hoc* mostrou que ratos CN e CE apresentavam pesos maiores do que AN e AE, respectivamente e ainda que o grupo CE apresentava peso maior do CN. O teste de comparações múltiplas mostrou ainda que animais C e A apresentavam pesos maiores aos 32 dias do que aos 22 e estes maiores do que os animais de 18 dias de idade. Adicionalmente, os filhotes C aos 18, 22 e 32 dias pesavam mais do que os filhotes A nas respectivas idades. Quanto ao efeito de interação dieta x estimulação x idade o teste de *post-hoc* mostrou que os grupos CN, CE, AN e AE pesavam mais aos 32 do que aos 22 dias e os grupos CN, CE e AE também pesavam mais nestas idades do que aos 18 dias. A análise revelou que o grupo CE apresentou pesos maiores do que AE aos 18, 22 e 32 dias e também maior que CN aos 18 e 32 dias. O grupo AN apresentou pesos maiores do que AE aos 18 dias e o grupo CN mostrou pesos maiores do que AN aos 22 e 32 dias. O resumo dos efeitos apontados na Análise de Variância (ANOVA) e no teste *post-hoc* (Newman Keuls) no Peso Corporal dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade pode ser observado na **Tabela 6**.

Adicionalmente a estas análises foi realizada outra análise para verificar as diferenças também nos pesos corporais dos animais RN e RE aos 28 e 32 dias de idade, grupos que foram incluídos no período de pós-lactação. A ANOVA apontou efeitos de dieta (F_(2,41)=45.0469, p<0,0001), estimulação (F_(1,41)=5.9290, p<0,05), idade (F_(1,41)=232.2333, p<0,0001) e dieta x idade (F_(1,41)=5.9290, p<0,05) nos pesos corporais dos animais aos 28 e 32 dias. O teste *post-hoc* revelou que ratos C apresentaram pesos maiores do que R, e estes dois grupos mostraram pesos maiores do que o grupos A. Adicionalmente, ratos CE e AE apresentaram pesos maiores do que CN e AN e os ratos aos 28 dias de idade pesaram menos do que animais aos 32 dias de idade (**tabela 6**). Para o efeito de interação dieta x idade, a análise de *post-hoc* mostrou que animais C, A e R apresentaram pesos maiores aos 28 do que aos 32 dias de idade. Este teste mostrou que animais C apresentaram maiores pesos corporais do que A e R aos 28 e 32 dias e que ratos A pesavam menos do que ratos R nestas mesmas idades (p<0,05).

Os pesos corporais dos filhotes nos dias 0, 7, 14, 18, 21, 22, 28 e 32 dos grupos CN, CE, AN, AE, RN e RE podem ser observados no **gráfico 2**.

Gráfico 2 - Peso Corporal dos Filhotes nos dias 0, 7, 14, 18, 21 (período de lactação) e 22, 28 e 32 (período de pós-lactação). As barras verticais nos histogramas representam os respectivos desvios padrões dos grupos.

CN= controle não estimulado

CE= controle estimulado

RN= recuperado normal

AN= anêmico não estimulado

AE= anêmico estimulado

RE= recuperado estimulado

Avaliação Hematológica das Ratas-Mães e Filhotes

1. Avaliação da Hemoglobina (Hb) e Hematócrito (Ht) das ratas-mães

A ANOVA apontou efeito de dieta na quantidade de Hb ($F_{(1,32)}=6.464346$, $p<0,01$) e na porcentagem de Ht ($F_{(1,32)}=9.825170$, $p<0,005$) das ratas-mães no 18º e 21º dia do período de lactação. O teste de *post-hoc* mostrou que ratas-mães do grupo C apresentaram quantidades de Hb (**gráfico 3^A**) e Ht (**gráfico 3^B**) maiores do que as ratas-mães do grupo A ($p<0,05$).

Gráfico 3 – Hemoglobina (A) e Hematócrito (B) das ratas-mãe aos 18 e 21 dias do parto.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado

2. Avaliação do Hemoglobina (Hb) e Hematócrito (Ht) dos filhotes

A análise da Hb e do Ht dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade apontou efeito de dieta, idade e de interação dieta x idade, sendo que o teste *post-hoc* mostrou maior quantidade de Hb e Ht nos ratos C do que nos animais A e também mostrou menor quantidade de Hb e porcentagem de Ht nos animais mais jovens (18 e 22 dias de idade) quando comparados a ratos aos 32 dias de idade. Para a análise do efeito de interação dieta x idade o teste *post-hoc* mostrou que os ratos C apresentaram maior quantidade de Hb e Ht do que animais A aos 18, 22 e 32 dias de idade. Este teste apontou ainda que filhotes C aos 32 dias de idade mostraram maior quantidade de Hb e porcentagem de Ht do que C aos 18 e 22 dias, entretanto, os animais A aos 32 dias apresentaram menor quantidade de Hb (**gráfico 4^A**) e Ht (**gráfico 4B**) do que A aos 18 e 22 dias de idade.

O resumo dos efeitos apontados na Análise de Variância (ANOVA) e no teste *post-hoc* (Newman Keuls) para a quantidade de Hb e porcentagem de Ht dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade pode ser observado na **tabela 7**.

Gráfico 4 - Quantidade de Hemoglobina (g/dl) (A) e Hematócrito (%) (B) dos filhotes aos 18, 22, 32 dias de idade.

CN= controle não estimulado

AN= anêmico não estimulado

RN= recuperado não estimulado

CE= controle estimulado

AE= anêmico estimulado

RE= recuperado estimulado

Tabela 7 – Resumo da Análise Estatística (ANOVA e Newman Keuls) da quantidade de Hb e porcentagem de Ht dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Variável	ANOVA	Newman Keuls ($p < 0,05$)
Dieta – Hb	($F_{(1,75)}=469.5394$, $p < 0,0001$)	C > A
Idade – Hb	($F_{(2,75)}=6.3157$, $p < 0,005$)	18 e 22 < 32
Dieta x Idade – Hb	($F_{(2,75)}=56.4509$, $p < 0,0001$)	C18 e C22 < C32; A18 e A22 > A32 C18 > A18; C22 > A22; C32 > A32
Dieta – Ht	($F_{(1,75)}=403.6252$, $p < 0,0001$)	C > A
Idade – Ht	($F_{(2,75)}=21.5498$, $p < 0,005$)	18 e 22 < 32
Dieta x Idade – Ht	($F_{(2,75)}=70.6970$, $p < 0,0001$)	C18 e C22 < C32; A18 e A22 > A32 C18 > A18; C22 > A22; C32 > A32

Adicionalmente a estas análises, foi realizada análise da quantidade de Hb e porcentagem de Ht dos filhotes somente aos 32 dias de idade, para verificar também as diferenças nos animais RN e RE, grupos estes, que foram incluídos no período de pós-lactação. A ANOVA apontou efeito de dieta na quantidade de Hb ($F(2,40)=142.7679$, $p < 0,0001$) e porcentagem de Ht ($F(2,40)=201.8142$, $p < 0,0001$), sendo que o teste de *post-hoc* mostrou que filhotes C apresentavam Hb (**gráfico 4^A**) e Ht (**gráfico 4B**) maiores do que ratos A e R, e os filhotes R também mostraram estes índices maiores do que ratos A ($p < 0,05$).

Avaliação Morfológica e Morfométrica

1. Avaliação morfológica

O nervo óptico do rato mostra em geral uma forma cilíndrica levemente achatada apresentando uma aparência oval nos cortes transversais do nervo. Está envolto por uma membrana externa que é a meninge. Em seu aspecto microscópico apresenta fibras nervosas (axônios mielinizados) de diversos diâmetros agrupadas em fascículos que por sua vez são separados por trabéculas de tecido conjuntivo facilmente identificáveis mesmo em pequeno aumento (**figura 4^A**). Em maior aumento (**figura 4B**) pode-se ver com mais detalhes as estruturas do interior do nervo como os vasos (V), trabéculas (T), fascículos (F) e as células gliais: astrócitos (A) e oligodendrócitos (O).

Figura 4 – Fotomicrografias de secções transversas do nervo óptico de rato controle não estimulado com 22 dias de idade coradas com azul de toluidina. Em **A**, a secção mostra todo o perímetro do nervo com sua grande quantidade de axônios densamente empacotados, parcialmente separados em fascículos por trabéculas de tecido conjuntivo, vasos e células gliais. Em **B**, um maior aumento do nervo, para mostrar com mais detalhes as fibras axonais, formando fascículos (F), trabéculas conjuntivas (T), vasos (V) e as células gliais A = astrócitos, O = oligodendrócitos. Em **A** o aumento foi de 425 x, em **B** o aumento final foi de 850 X.

Os resultados obtidos na análise histológica de todos os grupos experimentais mostraram que os animais do grupo *Anêmico Não Estimulado* (**figura 8**) apresentaram espaço intersticial aumentado entre as fibras, com aumento do diâmetro destas, revelando

um menor aglomerado de fibras quando comparado aos grupos *Controle Não Estimulado* (**figura 5**) e *Controle Estimulado* (**figura 6**). Os *Anêmicos Não Estimulados* também mostraram uma maior desorganização trabecular com trabéculas menores, maior espaço intersticial entre as fibras e poucos vasos mais visíveis aos 22 e 32 dias (**figura 8**) enquanto que os *Anêmicos Estimulados* apresentaram trabéculas mais organizadas e mais vasos aos 18 dias que aos 22, ficando estes mais visíveis aos 32 dias.

Quanto aos *Controles*, os *Estimulados* apresentaram maior número de vasos, trabéculas mais definidas que nos *Não Estimulados*, delimitando melhor os fascículos. A distribuição e o diâmetro das fibras mostraram-se similares em ambos os grupos.

Os animais *Recuperados Não Estimulados* mostraram lesões semelhantes e/ou mais graves (maior desorganização trabecular e fascicular) que aquelas observadas nos animais *Anêmicos Não Estimulados* (**figura 9**). Os *Recuperados Estimulados* mostraram um número pouco maior de vasos e uma melhor organização do nervo que aquela dos *Recuperados Não Estimulados*.

Figura 5 – Fotomicrografias de secções transversais do nervo óptico de ratos controle não estimulados com 18, 22 e 32 dias de idade, coradas com azul de toluidina. Aumento final: coluna da esquerda 190X, coluna da direita 300X.

Figura 6 – Fotomicrografia de secções transversais do nervo óptico de ratos controle estimulados com 18, 22 e 32 dias de idade, coradas com azul de toluidina. Aumento final: coluna da esquerda 190X, coluna da direita 300X.

Figura 7 – Fotomicrografia de secções transversais do nervo óptico de ratos anêmicos estimulados com 18, 22 e 32 dias de idade, corados com azul de toluidina. Aumento final: coluna da esquerda 190X, coluna da direita 300X.

Figura 8 – Fotomicrografia de secções transversais do nervo óptico de ratos anêmicos não estimulados com 18, 22 e 32 dias, corados com azul de toluidina.. Aumento final: coluna da esquerda 190X, coluna da direita 300X.

Figura 9 – Fotomicrografias de secções transversais do nervo óptico de ratos recuperados estimulados (superior) e ratos recuperados não estimulados (abaixo) com 32 dias de idade, coradas com azul de toluidina. Aumento final: coluna da esquerda 190X, coluna da direita 300X.

2. Avaliação Morfométrica

A **tabela 8**, mostra as médias e os respectivos desvios padrões obtidos do nervo óptico com o uso do MiniMop, considerando os parâmetros: área, perímetro e diâmetro mínimo e respectivos desvios conforme as idades nos seis grupos experimentais estudados.

Tabela 8 - Médias e desvios padrões dos diversos grupos experimentais estudados para os parâmetros Área, Perímetro e Diâmetro.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado,
AN= anêmico não estimulado, AE= anêmico estimulado,
RN= recuperado não estimulado RE= recuperado estimulado
Total= médias das medidas sem considerar idades.

	Grupo experimental	Idade (dias)			
		18	22	32	Total
Á R E A mm²	CN	0,14+-0,01	0,14+-0,02	0,16+-0,04	0,15+-0,023
	CE	0,13+-0,02	0,20+-0,02	0,21+-0,02	0,18+-0,02
	AN	0,16+-0,04	0,17+-0,04	0,16+-0,04	0,16+-0,04
	AE	0,13+-0,02	0,16+-0,04	0,17+-0,04	0,15+-0,03
	RN			0,20+-0,03	
	RE			0,17+-0,04	
P E R Í M E T R O mm	CN	1,38+-0,05	1,38+-0,11	1,47+-0,17	1,41+-0,11
	CE	1,37+-0,07	1,65+-0,11	1,70+-0,10	1,57+-0,09
	AN	1,50+-0,18	1,51+-0,15	1,48+-0,15	1,49+-0,05
	AE	1,34+-0,13	1,47+-0,19	1,48+-0,18	1,43+-0,16
	RN			1,67+-0,13	
	RE			1,53+-0,17	
D I Â M E T R O mm	CN	0,35+-0,02	0,38+-0,03	0,38+-0,04	0,37+-0,03
	CE	0,36+-0,04	0,43+-0,03	0,44+-0,00	0,39+-0,02
	AN	0,38+-0,05	0,39+-0,05	0,39+-0,06	0,38+-0,05
	AE	0,35+-0,03	0,39+-0,05	0,41+-0,05	0,38+-0,04
	RN			0,43+-0,03	
	RE			0,41+-0,05	

Tabela 9 – Graus de efeitos nas interações entre grupos e idades em relação a cada medida (Área, Perímetro, Diâmetro).

Área	Perímetro	Diâmetro
(p<0,05)		
CE18 < (CE22 e CE32) (CN18, CN22, CN32) < RN CN < RN	CE18 < (CE22, CE32) AE18 < (AE22, AE32) CN < RN	CE18 < (CE22, CE32) CN < (RN, CE)

Considerando-se um nível de probabilidade de 0,05%, (**tabela 9**) observa-se que os animais Controles Estimulados são os únicos a apresentar diferenças em relação à idade nos três parâmetros estudados, ou seja, os animais com 18 dias de idade apresentaram as medidas de área, perímetro e diâmetro menores do que aos 22 e 32 dias de idade.

Por outro lado, os animais Anêmicos Estimulados somente em perímetro apresentaram menores valores aos 18 dias de idade do que aos 22 e 32 dias.

Os animais Recuperados Não Estimulados apresentaram valores maiores para os três parâmetros em relação aos animais Controles Não estimulados independentemente da

idade. Apenas no parâmetro área, os animais Recuperados Não Estimulados apresentaram valores maiores do que os animais Controles Não Estimulados aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Os animais Controles Estimulados apenas em diâmetro mínimo apresentaram valores maiores que os animais Controles Não Estimulados, independentemente da idade.

O **gráfico 5** mostra a disposição dos valores de área, perímetro e diâmetro mínimo para os grupos e suas idades. Observa-se que para qualquer um dos três parâmetros analisados os maiores valores encontram-se nos grupos *controle Estimulado* aos 22 e 32 dias de idade assim como para os *Recuperados Não Estimulados*. Os menores valores são observados para os animais de 18 dias entre *Anêmicos Estimulados* e *controles Estimulados ou Não Estimulados*.

Para os grupos experimentais independentemente da idade, **gráfico 6 (a, b, c)**, observa-se que há um comportamento parecido para área e diâmetro mostrando os CE o maior valor e, porém ficando o maior valor em perímetro para os AN. O maior valor para área está com os CE ficando os CN com 83% deste valor, os AN com 88,8% e os AE com 83,3% deste valor. Quanto ao perímetro os AN obtiveram o maior valor ficando os CN com 94,6% deste valor, CE com 93,9% e os AE 95,9%. Em diâmetro os CE mostraram o maior valor, ficando os CN com 94,8% e os AN e AE com 97,4 %. Estas porcentagens mantêm relação com os valores do grupo de maior média (CE) o qual foi considerado como 100%.

Quanto a densidade glial (número de células gliais /mm², **tabelas 10 e 11**), os dados obtidos mostraram algumas tendências claramente visíveis no estudo morfológico e que podem também ser vistas nos **gráficos 7 e 8**.

Gráfico 5 - Medidas de Área (a), Perímetro (b) e Diâmetro Mínimo (c) do nervo óptico para os vários grupos experimentais (CN, CE, AN, AE, RN, RE) e suas respectivas idades (18, 22, 32 dias).

CN= controle não estimulado

CE= controle estimulado

AN= anêmico não estimulado

AE= anêmico estimulado

RN= recuperado normal

RE= recuperado estimulado

Gráfico 6 – Área (a), Perímetro (b), Diâmetro (c) do nervo óptico para os seis grupos experimentais independentemente da idade de cada grupo

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
 AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado
 RN=recuperado não estimulado RE=recuperado estimulado

Tabela 10 – Contagem de células gliais nos vários grupos e idades. A coluna “Total” refere-se à contagem celular do grupo independentemente da idade em dias.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado,
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado
RN= recuperado não estimulado RE= recuperado estimulado

grupos	Número de células gliais por mm ²				
	dias	18	22	32	Total
CN		1211,03+-216,13	825,44+-237,06	1110,53+-358,45	1049+-270,55
CE		1260,32+-253,97	721,36+-204,61	695,83+-63,54	892,5+-174,04
AN		1099,53+-447,27	889,22+-202,45	742,72+-248,52	910,49+-299,41
AE		1011,56+-283,51	1075,7+-221,66	558,38+-180,47	881,88+-228,55
RN				809,9+-297,86	809,9+-297,86
RE				838,48+-217,97	838,48+-217,97

Tabela 11 – Graus de efeitos nas interações entre grupos e idades relacionadas à densidade glial.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado,
AN= anêmico não estimulado, AE= anêmico estimulado,
RN= recuperado não estimulado RE= recuperado estimulado

Densidade glial
CN18 > (CN22, RN)
CE18 > (CE22, CE32, RN, RE)
AE32 < (AE18, AE22)

Nos **gráficos 7 e 8** é possível ver que a média do número de células para o grupo *Controle não Estimulado* é maior que a dos outros grupos assim como seu desvio padrão e coloca-se oposta aos valores do grupo *Anêmico Não Estimulado*. Por outro lado o valor da média e desvio padrão do grupo *controle Estimulado* e *Anêmico Estimulado* não diferem muito entre si, aumentando um pouco o desvio para o grupo *Anêmico Estimulado*. Os mesmos valores para os dois grupos de *Recuperados* não diferem marcadamente entre si, revelando apenas uma tendência de maior aumento para os *Estimulados*.

O grupo dos animais *Recuperados* (Estimulados ou Não) mostrou menor número de células gliais em relação aos grupos Controles (Estimulados ou Não Estimulados)

As médias individuais por idade entre os grupos não revelaram grande diferença exceto pelos valores superiores do grupo *Controle Não Estimulado* em relação aos outros grupos.

Gráfico 7 – Densidade de células gliais independentemente da idade dos grupos.

CN= controle não estimulado

CE= controle estimulado

AN= anêmico não estimulado

AE= anêmico estimulado

RN= recuperado normal

RE= recuperado estimulado

Gráfico 8 – Densidade de células gliais considerando as idades dos grupos. 18, 22, 32 = idades em dias de cada grupo.

CN= controle não estimulado

CE= controle estimulado

AN= anêmico não estimulado

AE= anêmico estimulado

RN= recuperado normal

RE= recuperado estimulado

A análise estatística mostrou que, para o grupo dos animais *Controles Não Estimulados* o maior número de células acumulou-se nos mais jovens (aos 18 dias) do que aos 22 dias de idade. O grupo dos animais *Controles Estimulados* também apresentou maior quantidade de células nos animais mais jovens (18 dias) do que aos 22 ou 32 dias de idade. Os animais do grupo dos *Anêmicos Estimulados* apresentaram maior quantidade de células gliais aos 18 dias do que aos 22 e 32 dias.

O **gráfico 8**, revela que os *Controles Estimulados* concentram mais células gliais nas idades mais jovens em relação aos *Controles Não Estimulados* o que parece coincidir com os dados observados para os vasos. Quando se considera os *Anêmicos*, observa-se que para os *Não Estimulados* também há uma tendência em concentrar mais células gliais nos mais jovens tendendo a diminuir isto com o avanço da idade. Ao se observar os *Anêmicos Estimulados* nota-se uma diminuição de células paralelamente ao avanço da idade. Com

relação aos *Recuperados*, os *Estimulados* parecem mostrar tendência de aumento do número celular em relação aos *Não Estimulados*. A média dos *Recuperados* mostra níveis sugestivos de que a estimulação não provocou aumento real de células em relação a outros grupos.

O **gráfico 7**, considerando a média dos grupos, sem considerar as respectivas idades mostra também que as diferenças entre grupos foram realmente pequenas quanto ao número de células gliais, chamando atenção apenas ao fato de que os *Controles Não Estimulados* mostram uma tendência a um maior número de células que os outros grupos.

A distribuição do número de vasos nos diversos grupos experimentais estudados é mostrada na **tabela 12 e 13** e nos **gráficos 9 e 10**. A análise desses dados mostrou uma diferença bastante visível entre os grupos. No grupo *Estimulado* (Controles e Anêmicos) com 18 dias de idade em relação a outros grupos chega a apresentar uma média de 37 vasos cada um, enquanto que as menores quantidades ficaram para os *Recuperados Não Estimulados* (7,8 vasos) e *Recuperados Estimulados* (16,4 vasos).

O grupo *Controle Não Estimulado* expressa uma média de 20,5 vasos por superfície de corte do nervo aos 18 dias ficando maior esta média aos 22 dias e menor aos 32 dias de idade.

O grupo *Controle Estimulado*, apesar de apresentar maior quantidade de vasos aos 18 dias não mostra diferenças aos 22 e 32 dias, tendo ficado a média do grupo pouco acima da do grupo *Controle Não Estimulado*.

Os animais *Anêmicos Não Estimulados*, mostraram uma menor quantidade de vasos aos 18 dias (17 vasos) aumentando isto para níveis semelhantes aos 22 e 32 dias (25 vasos), tendo ficado a média do grupo próxima à dos *Controles Estimulados* (23 vasos).

Tabela 12 – Número de vasos por superfície de corte do nervo óptico conforme sua classificação em grupos nutricionais e idades. A coluna “Total” representa a média de todos os animais de um determinado grupo, sem levar em conta o fator idade.

CN= controle não estimulado

CE= controle estimulado

AN= anêmico não estimulado

AE= anêmico estimulado

RN= recuperado não estimulado

RE= recuperado estimulado

Contagem de Vasos				
	idade			
Grupo	18	22	32	Total
CN	20,5+-7,8	24,79+-14,4	16,22+-10,7	20,5+-11,1
CE	37,78+-16,8	16,75+-14,2	16,33+-16,2	23,62+-15,7
AN	17,38+-6,5	25,57+-12,7	26,4+-14,3	23,12+-11,2
AE	37,62+-15,2	26,56+-14,0	25,86+-8,0	30,01+-12,4
RN			7,89+-8,9	
RE			16,45+-19,8	

Tabela 13 – Graus de efeitos nas interações entre grupos e idades relacionadas à Contagem de Vasos

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado
RN= recuperado não estimulado RE= recuperado estimulado

Contagem de Vasos
RN, RE) < (CE18, AE18) > (CN32, CE22)
RN < AE18

Gráfico 9 – Mostra a densidade de vasos por corte de nervo óptico segundo a divisão em grupos experimentais e idades. Apesar do alto desvio padrão observado, há evidentemente maiores valores para os animais estimulados mais jovens.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado
RN= recuperado normal RE= recuperado estimulado

Gráfico 10 - Mostra a densidade de vasos por corte de nervo óptico segundo a divisão em grupos experimentais. Apesar do grande desvio padrão parece haver tendência de que os animais Estimulados apresentem mais vasos na média do grupo.

CN= controle não estimulado CE= controle estimulado
AN= anêmico não estimulado AE= anêmico estimulado
RN= recuperado normal RE= recuperado estimulado

Apesar do grupo *Anêmico Estimulado* mostrar aos 18 dias valor semelhante ao dos *Controles Estimulados* (37 vasos) volta a cair aos 22 e 32 dias de idade para níveis muito próximos entre si (26,5 e 25,8 vasos, respectivamente) situando a média do grupo em 30 vasos.

Os testes de ANOVA e Bonferroni mostraram que os animais Estimulados independentemente de serem Controles ou Anêmicos apresentam um maior número de vasos aos 18 dias de idade quando comparados a outros grupos ou com idades maiores. **(tabela 13)**

Discussão

O trabalho foi iniciado provocando-se uma deficiência nutricional de ferro em *ratas* que, posteriormente amamentaram os filhotes, os quais foram utilizados na presente investigação. Assim, a primeira observação, foi sobre o peso destas ratas, onde se constatou que com o passar do tempo, houve uma queda significativa dos valores de peso corporal entre 18 e 21 dias em relação ao dia zero do experimento mostrando que se um rato adulto normal vier a receber dieta deficiente em ferro e se a situação nutricional persistir, isto afetará seu peso. Esta queda de peso das ratas-mães também pode ser justificada pelo fato de que a fêmea ao amamentar alimenta-se com menos regularidade e ainda tem de produzir nutrientes para os filhotes. Estes resultados estão de acordo com inúmeras citações da literatura ao se referirem à desnutrição materna seja ela protéica ou de micronutrientes, como modelo experimental para a desnutrição de filhotes. (Rocinho e cols., 1997, De los Monteros e cols., 2000, Plantz e cols., 1981, Langini e cols., 1999,)

Os dados revelaram ainda que o peso corporal dos *filhotes* foi influenciado pela idade, estimulação tátil, dieta e suas interações desde o dia 0 até 28º, mostrando que nos ratos controles os pesos foram maiores que nos anêmicos. Os pesos aumentaram semanalmente em ambos os grupos, indicando que embora os anêmicos continuassem crescendo e ganhando peso, estes sempre estiveram abaixo daquele do de um indivíduo controle, sugerindo que os efeitos do prejuízo inicial aos tecidos devido à deficiência em ferro no animal jovem não foram passíveis de recuperação. (Felt e Lozof, 1996). Em contraste a isto observou-se que os ratos controles estimulados apresentaram pesos corporais maiores que os não estimulados aos 18, 22 e 32 dias de idade embora tenham tido o mesmo peso ao nascer, o que já foi observado anteriormente por Lima (1992) ao usar estimulação tátil em ratos (“handling”) associada porém à desnutrição protéica. Mas a deficiência de ferro embora diminua evidentemente o ritmo de crescimento não parece influir severamente no peso corporal (De los Monteros e cols, 2000) a ponto de prejudicar a recuperação de outras funções do organismo (Algarin e cols, 2003).

Deste modo, o peso corporal dos filhotes Controle sofreu efeito da estimulação com o avanço da idade, sendo que os animais Não Estimulados apesar de mostrarem peso maior que os animais Estimulados ao 7º dia de idade foram diminuindo seu ritmo de crescimento até aos 28 dias chegando a inverter posições com os animais Estimulados que ainda continuaram crescendo, indicando que a estimulação favoreceu o ganho de peso corporal nestes animais, isto é, facilitou a reação do organismo deficiente em relação ao ganho de peso prejudicado pela anemia, o que de certo modo está de acordo com resultados de Crnic (1983) e Lima (1992). Conradi e cols., (1989) aplicando privação protéica em ratos, relatam que se tal privação no início da vida for acima de vinte dias, os animais deficientes tendem a atrasar o desenvolvimento em quatro dias.

Dentro do grupo dos animais Estimulados, os animais Controle mantiveram pesos maiores que os animais Anêmicos e Não estimulados mostrando que independentemente da condição nutricional, a estimulação influenciou no ganho de peso. Já dentro do grupo Controle, os animais Estimulados mostraram pesos maiores que os Não Estimulados aos 18 e 22 dias de idade, sugerindo que à medida que aumenta a idade no grupo Controle as curvas de peso entre os dois grupos tendem a aproximar-se, isto é, a estimulação parece ter melhor efeito em animais mais jovens. Entre os animais Anêmicos, apenas aos 18 dias de idade os Não

Estimulados tiveram pesos maiores que os Estimulados, sugerindo novamente que a Estimulação influi no ganho de peso mesmo entre os animais deficientes em ferro. Por outro lado também entre os animais Controles o ganho de peso maior foi dos Estimulados em relação aos Não Estimulados.

Quanto aos animais Recuperados, seus pesos estiveram maiores que os dos animais Anêmicos aos 28 e 32 dias, porém menores que os dos Controles, sugerindo que a anemia mesmo que corrigida ainda deixa o indivíduo deficiente em peso em relação aos que nunca sofreram a deficiência. Estes resultados estão de acordo com aqueles de Felt e Lozof, (1996). Convém ainda lembrar que animais Recuperados sofreram deficiência em ferro até aos 21 dias, após o que voltaram a receber dieta com teor normal de ferro .

Quanto às avaliações *hematológicas* de mães e filhotes os resultados também apontaram coerência com os dados de peso, já que a dieta influiu na quantidade de hemoglobina (Hb) e na porcentagem de hematócrito (Ht) entre 18 e 21 dias de idade nas ratas-mães, dentro de período de lactação, fazendo com que aquelas do grupo Controle apresentassem quantidades maiores de hemoglobina que as Anêmicas.

Em relação aos filhotes, todos os grupos mostraram influência tanto de dieta, como de idade. Os animais Controle apresentaram maiores índices de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) que os Anêmicos, sendo tal índice menor para os mais jovens, porém entre os animais Anêmicos os menores valores para estes dois itens pesquisados estiveram nos animais mais velhos (32 dias), sugerindo uma não recuperação com o passar da idade nestes itens hematológicos, ao contrário dos animais controles. Isto novamente mostra coerência com os dados de peso corporal vistos no atual trabalho.

Os valores de hematócrito e hemoglobina nos animais Controles eram superiores aos dos Anêmicos e Recuperados, que por sua vez ainda mantiveram valores maiores que os Anêmicos.

Deste modo, pelos resultados obtidos podemos observar que o método usado para conseguir o modelo nutricional desejado foi eficiente para mães e filhotes, tanto para o parâmetro de peso quanto para os parâmetros hematológicos analisados. Porém, uma dificuldade neste trabalho consistiu na ausência de literatura específica sobre a deficiência nutricional de ferro em animais jovens associada aos efeitos da estimulação tátil em ratos e seus efeitos sobre o nervo óptico. Há referências a outros micro-nutrientes no nervo óptico, tais como magnésio (Gong e cols. 2003), manganês (Ryu e cols. 2002, Gong e Amemya 1999) cobre e zinco (Oi e cols, 1997), cálcio (Tohno e cols. 2000, Ren e cols. 2000), fósforo (Ayuka e cols. 2001), iodo (Kretchmer e cols. 1996) e mesmo o ferro (Beard e cols. 1993, Morris e cols. 1992), porém não associado à estimulação tátil.

Quanto aos resultados obtidos na análise histológica de todos os grupos experimentais, mostrou-se que os animais do grupo Anêmico Não Estimulado (**figura 7**) apresentaram espaço intersticial aumentado entre as fibras, com aumento de diâmetro destas, revelando um menor aglomerado de fibras quando comparado aos do grupo Controles Estimulados (**figura 6**) e Não Estimulados (**figura 5**). O grupo Anêmico Não Estimulado mostrou maior espaço intersticial entre as fibras do que aquele dos animais Anêmicos Estimulados (**figura 8**).

A anemia causa alterações morfológicas no nervo óptico e que são parcialmente reduzidas pela estimulação tátil. Isto permite concluir que a deficiência de ferro causou alterações no nervo óptico do rato levando a mudanças estruturais de suas fibras e também no interstício do nervo. Por outro lado, a estimulação tátil reduziu em parte tais alterações, mostrando uma melhora no aspecto geral do nervo.

Dentre os animais Não Estimulados, os Recuperados, mostraram lesões semelhantes e/ou mais graves que aquelas dos animais Anêmicos (**figura 9**), sendo que estes animais, quando estimulados, mostraram uma melhora no aspecto das lesões, reforçando portanto que a estimulação realizada, leva a uma melhora no aspecto geral do nervo óptico, nesta situação experimental (**figura 5**).

Os resultados da análise morfométrica dos parâmetros do nervo óptico (área, perímetro, diâmetro) mostram seu crescimento com o aumento da idade dos animais, indicando que, apesar da deficiência de ferro, o crescimento do nervo óptico, paralelamente ao crescimento corporal dos animais não foi impedido. Estes resultados são contrários aqueles de Conradi e cols (1985), os quais mostram uma redução da área de corte do nervo em 15%, embora o autor não tenha trabalhado com desnutrição férrica e sim protéica. Outros autores (Cavallotti e cols, 2002) por outro lado, referem-se a um aumento no diâmetro do nervo óptico apesar de também ter trabalhado com desnutrição protéica, mas falam porém de um espessamento das meninges do nervo e não de edema intersticial acentuado e proliferação de vasos como o encontrado no presente trabalho.

No grupo dos Controles, os animais Estimulados mostraram um aumento nas medidas dos três parâmetros dos 18 aos 32 dias de idade, o que implica num crescimento contínuo do nervo, seja por estar ainda dentro do período de crescimento, seja pela estimulação ou pelo aumento do número de vasos no seu interior.

Quanto aos Controles, independentemente da idade, os Estimulados também apresentaram maiores valores que os Não Estimulados, porém somente para o parâmetro de diâmetro mínimo.

Por outro lado, os Controles Não Estimulados, independentemente da idade, apresentaram valores menores que os Recuperados Não Estimulados nos três parâmetros, indicando que os Recuperados Não Estimulados (anteriormente Anêmicos) talvez tenham alcançado valores maiores que os Controles Não Estimulados não devido recuperação, mas possivelmente por expansão do nervo devido ao edema ou ao enfibramento das trabéculas em seu interior.

Os animais do grupo Anêmico Estimulado, apenas em perímetro apresentaram crescimento dos 18 aos 32 dias de idade, o que talvez se deva à irregularidade do perímetro causada pelo aumento dos vasos periféricos ao nervo.

A análise estatística da densidade glial mostrou que os animais Anêmicos Estimulados apresentaram mais células gliais nas idades mais jovens (18 e 22 dias) do que aos 32 dias de idade, o que de certo modo contraria os achados de Sandell e cols. (2001) que relatam ter encontrado aumento de células gliais com o passar da idade mas, não associado à desnutrição, e sim em processo normal de envelhecimento em macaco Rhesus e não com ratos, além de terem pesquisado exclusivamente oligodendrócitos. Peters (2002) também relata dados semelhantes em humanos, mas sem associar à desnutrição ou deficiência de ferro.

Por outro lado, os Controles Estimulados também mostraram uma diminuição de densidade glial dos 18 aos 32 dias, sugerindo que a estimulação aumenta a densidade glial nas idades mais jovens, quando é maior a taxa de mielinização. Os Recuperados apresentaram menor número de células gliais que os Controles de 18 dias (Estimulados ou Não), sugerindo que os Recuperados em realidade não se recuperaram totalmente.

O **gráfico 7**, revela que os Controles Estimulados concentram mais células gliais nas idades mais jovens em relação aos Controles Não Estimulados, reforçando a hipótese de que a estimulação antecipa o processo de mielinização. Quando se considera os Anêmicos, observa-se que para os Não Estimulados também há uma tendência em concentrar mais

células gliais nos mais jovens tendendo a diminuir, com o avanço da idade. Ao se observarem os Anêmicos Estimulados percebe-se que a estimulação melhora a mielinização nos anêmicos, o que não ocorre nos Recuperados. Para este gráfico, embora tenha sido feito o desvio padrão, o seu objetivo principal é apenas mostrar a tendência das colunas.

Com relação aos Recuperados, os Estimulados mostraram leve tendência de aumento do número de células gliais em relação aos Não Estimulados. As médias obtidas para os Recuperados mostram níveis sugestivos de que a estimulação não provocou aumento real de células gliais em relação a outros grupos, prejudicando portanto a mielinização nos mesmos.

O **gráfico 6**, considerando a média dos grupos sem considerar as respectivas idades, indica que as diferenças entre os grupos foram realmente pequenas quanto ao número de células gliais, chamando atenção apenas o fato de que os Controles Não Estimulados mostraram uma tendência para um maior número de células que os outros grupos.

A análise do número de vasos nos diversos grupos experimentais estudados, revelou que os Controles Não Estimulados são os que menos vasos apresentaram e os Anêmicos Estimulados os que mais vasos apresentam, indicando que o aumento do número de vasos está relacionado à estimulação. Tal diferença porém já não é tão evidente entre os Controles Estimulados e Anêmicos Não Estimulados. Mas há um contraste marcante por exemplo entre os Recuperados em relação aos outros grupos, cujos valores se mostraram claramente menores. Isto portanto, sugere que os Recuperados (tendo sido anêmicos) na realidade não mostraram sinais de recuperação quanto à dieta, a não ser entre eles próprios, onde se nota que os valores dos Recuperados Estimulados são praticamente duas vezes maiores que os dos Recuperados Não Estimulados, indicando portanto que, os vasos presentes em maior número onde há maior necessidade de oxigenação devido ao reparo tecidual. Isto pode significar que a anemia diminui muito tal capacidade mas que a estimulação provoca uma visível tentativa de recuperação do organismo no processo (**gráfico 9**). Mesmo entre os não recuperados também se observa que os dois grupos Estimulados mostram uma tendência a terem mais vasos que os não estimulados. Considerando os grupos por idades ainda podemos notar que a estimulação antecipou a fase de proliferação de vasos para o período de 18 dias enquanto que para os não estimulados esta fase parece prolongar-se ao longo dos 22 e 32 dias (**gráfico 8**). Peters (2002) estudando os efeitos do envelhecimento sobre a mielina relata que mesmo com o avanço da idade em ratos normais a mielinização embora diminua muito ainda continua ocorrendo. Estes dados mostram coerência com os nossos resultados morfológicos e morfométricos, assim como também com aqueles hematológicos e ponderais.

A análise estatística do número de vasos nos diversos grupos experimentais revela que os animais Estimulados de 18 dias apresentaram predominantemente maior quantidade de vasos em relação aos Estimulados de idade mais avançada. Considerando que uma maior quantidade de vasos está relacionada a uma maior necessidade dos tecidos em nutrientes e oxigenação e que a estimulação aumenta a quantidade de vasos, então a estimulação tátil influi na regeneração do tecido nervoso e por conseguinte na mielinização. Quanto a estes dados nada semelhante foi encontrado na literatura.

Conclusões

1. Com relação ao *peso corporal*, o objetivo de desnutrir as ratas-mãe foi plenamente alcançado, e está de acordo com o que propõe a literatura, visto que durante a amamentação desde o parto até aos 21 dias quando desmamaram os filhotes, as ratas perderam peso gradualmente. Quanto aos filhotes, tanto os controles quanto os anêmicos, foram ganhando peso gradualmente, entretanto houve uma superioridade do peso corporal dos animais controles em relação aos anêmicos. Entre os anêmicos, também evidenciou-se uma superioridade de peso dos animais estimulados em relação aos não estimulados, diferença esta que permaneceu até o final do experimento. Portanto, a estimulação influiu no peso corporal, melhorando-o.
2. Os dados *hematológicos* confirmaram que a dieta diminuiu a hemoglobina e o hematócrito das ratas-mãe anêmicas até o desmame, confirmando portanto o estado de anemia pretendido. Quanto aos filhotes, também aqueles do grupo anêmico, mostraram menor quantidade de hemoglobina e taxa de hematócrito em relação aos animais controles. Os animais do grupo dos recuperados, apesar de mostrarem valores maiores do que os dos animais anêmicos não se recuperaram totalmente em relação aos animais controles. As taxas de hemoglobina e hematócrito decresceram com o aumento da idade para os anêmicos e aumentou para os controles não tendo este decréscimo sido corrigido pela estimulação. A anemia neste caso parece não ter sido influenciada pela estimulação.
3. O estudo *morfológico* mostrou que a estrutura do nervo óptico foi alterada tanto pela anemia quanto pela estimulação, sendo que a anemia provocou uma desorganização trabecular, menor número de vasos, aumento do diâmetro das fibras e do espaço intersticial entre elas, bem como uma menor densidade destas no nervo óptico desses animais. A estimulação por sua vez levou a uma melhor definição das trabéculas e maior número de vasos nos mais jovens.
4. A avaliação *morfométrica* dos parâmetros do nervo, (área, perímetro e diâmetro mínimo), apontaram para um efeito favorável da estimulação no desenvolvimento do nervo óptico tanto nos animais controles quanto nos anêmicos. A maior densidade de células gliais nos animais com 18 dias de idade mostrada, principalmente nos animais estimulados revelou uma coincidência entre seu aumento e a estimulação, isto tudo, reforçado pela também coincidente presença mais numerosa dos vasos nas idades mais jovens e principalmente de animais estimulados. A estimulação, portanto, modificou os aspectos morfológicos e morfométricos do nervo óptico, melhorando as lesões provocadas pela anemia através de uma melhor vascularização do nervo com conseqüente melhora na eficiência da mielinização.
5. O modelo e os métodos usados para se conseguir a anemia foram eficientes e trouxeram dados ainda não vistos na literatura, reforçando em parte, resultados de outros investigadores sobre as conseqüências da anemia no sistema nervoso central.
6. As conseqüências da anemia podem ser corrigidas pelo menos parcialmente através da estimulação tátil (*handling*).

Bibliografia

- ALGARIN C, PEIRANO P, GARRIDO M, PIZARRO F, LOZOFF B., Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. **Pediatr Res.** v 53, p 217-23, 2003
- AYUKA, J.; MATTHEW, S.B.T.; TAYEBJEEB, M.; GITTOES, N.J.L. A Blind Panic. **The Lancet.** v.357, p.1262, 2001.
- BEARD, J.L.; CONNOR, J.R.; JONES, B.C. Iron in the brain. **Nutr. Rev.** v. 51, p. 157-170, 1993.
- BEARD, J. Iron deficiency alters brain development and functioning. **J. Nutr.** v. 133, p.1468-1472, 2003.
- BEDI, K.S. ; WARREN, M.A. The effects of under nutrition during early life on the rat optic nerve fiber number and size-frequency distribution. **J. Comp. Neurol.** v. 219, p.125-132, 1983.
- BUTT, A.M; RANSOM, B.R. Morphology of astrocytes and oligodendrocytes during development in the intact rat optic nerve. **J. Comp. Neurol.** v. 338, p.141-158, 1993.
- CAVALLOTTI C, PACELLA E, PESCOSOLIDO N, TRANQUILLI-LEALI FM, FEHER J. Age-related changes in the human optic nerve. **Can J Ophthalmol.** v.37, p 389-394, 2002
- CHEN, Q.; CONNOR, J.R.; and BEARD, J.L. Brain iron, transferrin and ferritin concentrations are altered in developing iron-deficient rats. **J. Nutr.** v.125, p. 1529-1535, 1995.
- CONNOR, J.R.; BENKOVIC, S.A. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. **Ann. Neurol.** v.32, p. 51-61, 1992.
- CONRADI, G.N.; SJOSTROM, A.; KARLSSON, B.; SOURANDER, P. Functional development of the visual system in normal and protein deprived rats II. Morphometric and biochemical studies on adult optic nerve. **Acta Physiol. Scand.** v. 125, p. 277-283, 1985.
- CONRADI, N.G.; SJOSTROM, A.; RYDENHAG, B. Functional development of the visual system in normal and protein-deprived rats. VIII. Post-natal development of optic nerve axons. **Acta Physiol. Scand.** v. 136, p 597-603, 1989.
- CRNIC, L.S.; Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. **Develop. Psychobiol.** v. 16, p.129-145, 1983.
- CUNNIF P, Official methods of analysis of AOAC International. chap. 45, p 58-63, 1995.

- DANGATA, Y.Y.; KAUFMAN, M.L.I. Myelinogenesis in the optic nerve of C57BL x CBA F1 hybrid mice: a morphometric analysis. **Eur. J. Morphol.** v. 35, p. 3-17, 1997.
- De los MONTEROS, A.E.; KORSACK, R.A.; TRAN, T.; VU, D. de VELLIS, J. EDMOND, J. Dietary iron and the integrity of the developing rat brain: a study with the artificially-reared rat pup. **Cell. Mol. Biol.** v. 46, p 501-15, 2000.
- DWORK, A.J.; Effects of diet and development upon the uptake and distribution of cerebral iron. **J. Neurol. Scien.** v. 134, p. 45-51.1995.
- EDGERTON, V. R.; BRYANT, S.L.; GILLESPIE, C.A.; and GARDNER, G. W. Iron deficiency anemia and physical performance and activity of rats. **J. Nutr.** v. 102, p. 381-400, 1972.
- FELT, B.T. and LOZOF, B. Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. **J. Nutr.** v. 126, p. 693-701, 1996.
- FINDLAY, E.N.G.K.; REID, R.; AMSTRONG, S. The effects of iron deficiency during development on passive avoidance learning in the adult rat. **Physiol. Behav.** v. 27, p. 1089-1986, 1981.
- FRANCOIS, C.; NGUYEN-LEGROS, J.; PERCHERON, G. Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains. **Brain Res.** v. 215, p. 317-22. 1981.
- GODLEWSKI, A. Morphometry of myelin fibers in corpus callosum and optic nerve of aging rats. **J. Hirnforsch.** v. 32, p. 39-46, 1991.
- GONG, H.; AMEMIYA, T. Optic nerve changes in manganese-deficient rats. **Exp. Eye Res.** v. 68, p. 313-20, 1999.
- GONG, H.; AMEMIYA, T. Optic nerve changes in zinc-deficient rats. **Exp. Eye Res.** v 72, p. 363-369, 2001.
- GONG, H.; TAKAMI, Y.; AMEMIYA, T. Ultrastructure of the optic nerve in magnesium-deficient rats., **Ophthalmic Res.** v.35, p 84-92, 2003.
- GREENE, C.E. Transactions of the American Philadelphical Society. **Anatomy of the rat.** Hafner Publishing CO, N.York, 1955.
- HILDEBRAND, C.; WAXMAN, S. G. Postnatal differentiation of rat optic nerve fibers: electron microscopic observations on the development of nodes of Ranvier and axoglial relations. **J. Comp. Neurol.** v. 224, p. 25-37, 1984.
- HILL, J.M.; SWITZER, R.C. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. **Neuroscience.** v.11, p. 595-603,1984.

- HIRAYAMA, Y. Histochemical localization of zinc and copper in rat ocular tissues. **Acta Histochem.** v. 89, p.107-111, 1990.
- HORSBURGH, G.M.; SEFTON, A.J. The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat. **J. Comp. Neurol.** v. 243, p. 547-560, 1986.
- HORTON, J.C.; GREENWOOD, M.M.; HUBEL, D.H. Non-retinotopic arrangement of fibers in cat optic nerve. **Nature.** v. 282, p.720-722, 1979.
- HUNTER, A.; BEDI, K.S. A quantitative morphological study of inters train variation in the developing rat optic nerve. **J. Comp. Neurol.** v. 245, p. 160-166, 1986.
- JEFFERY, G. ; Distribution of uncrossed and crossed retinofugal axons in the cat optic nerve and their relationship to patterns of fasciculation. **Vis Neurosci.** v. 5, p. 99-104, 1990.
- KASARSKIS, E.J. Zinc metabolism in normal and zinc-deficient rat brain. **Exp. Neurol.** v. 85, p. 114-127, 1984.
- KERN, T.J.; RIIS, R.C. Optic nerve hypoplasia in three Miniature Poodles. **J. Am.Vet. Med. Assoc.** v. 178, p. 49-54, 1981.
- KIERNAN, J A, Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve. **J. Anat.** v 141, p 139-154, 1985.
- KRETCHMER, N.; BEARD, J.L.; CARLSON, S. The role of nutrition in the development of normal cognition. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 63, p. 997-1001, 1996.
- LAM, K. ; SEFTON, A.J.; BENNETT, M.R. Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. **Brain Res.** v. 255, p 487-491, 1982.
- LANGINI, S H.; DEL RIO, E R G.; PITA, M L M. Erythrocyte protoporphyrin during recovery from malnutrition in rats. **Arch Latino Am Nutr.** v 49, p 238-243, 1999.
- LIMA, J.G. **Estudo morfológico e morfométrico do corpo caloso de ratos submetidos a diferentes tipos de dieta e à estimulação sensorial e ambiental.** Ribeirão Preto, 1992. 115 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- LOZOFF, B. Behavioral alterations in iron deficiency. **Adv. Pediatr.** v. 35, p. 331-359, 1988.
- LOZOFF, B. Nutrition and behavior. **Am. Psychol.** v. 54, p. 231-236, 1989.
- MASSARO, T.F.; WIDMAYER, P. The effect of iron deficiency on cognitive performance in the rat .**Am. J. Clin. Nutr.** v 34, p 864-870, 1981.

- MATHESON, D.F. ; Some quantitative aspects of myelination of the optic nerve in rat. **Brain Research**. v. 24, p 257-269, 1970.
- MATUTE, C.; GARCIA-BARCINA, J.M.; MILEDI, R. Expression of neurotransmitter receptors and Ca²⁺ channels in the adult fornix and optic nerve. **Neuroreport**. v. 21-25, p. 1457-1460, 1994.
- MOOS, T.; Brain iron homeostasis. **Dan. Med. Bull.** v. 49, p. 279-301, 2002.
- MORRIS, C.M.; CANDY, J.M.; OAKLEY, A.E.; BLOXHAM, C.A.; EDWARDSON, J.A. Histochemical distribution of non-haem iron in the human brain. **Acta Anat.** v. 144, p. 235-257, 1992.
- ORTON, R.B.; D.E.; VEBER, L.L.; SULH, H.M. Ocular and auditory toxicity of long-term, high-dose subcutaneous deferoxamine therapy. **Can. J. Ophthalmol.** v. 20, p. 153-156, 1985.
- PASCUAL, R.; HERVIAS, M.C.; FIGUEROA, H.R. Effects of preweaning environmental stimulation on neuronal and behavioral impairment produced by undernutrition. **Biol. Neonate**. v. 70, p. 165-172, 1996.
- PETERS A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: A review. **J Neurocytol.** v 31, p 581-93, 2002
- PLANTZ RG, WILLISTON JS, JEWETT DL. Effects of undernutrition on development of far-field auditory brain stem responses in rat pups. **Brain Res.** v 213, p 319-326, 1981
- QI X, GUY J, NICK H, VALENTINE J, RAO N. Increase of manganese superoxide dismutase, but not of Cu/Zn-SOD, in experimental optic neuritis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v 38, p 1203-1212, 1997
- RAJAN, K.S.; COLBURN, R. W.; DAVIES, J.M. Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas. **Life Science**. v.18, p. 423-432, 1976.
- RASMINSKY, M. Conduction in normal and pathological nerve fibers. In: SWASH, M.; and CKENNARD, (ed) **Scientific Basis of Clinical Neurology**, New York, 1985, (Edinburgh), p.390-399.
- REESE, B.E. The distribution of axons according to diameter in the optic nerve and optic tract of the rat. **J. Neuroscience**. v. 22, p. 1015-1024, 1987.
- REN, Y.; RIDSDALE, A.; CODERRE, E.; STYS, P.K. Calcium imaging in live rat optic nerve myelinated axons in vitro using confocal laser microscopy. **J. Neurosci. Methods**. v. 30-102, p. 165-176, 2000.
- RICCI, A.; BRONZETTI, E.; AMENTA, F. Effect of ageing on the nerve fiber population of rat optic nerve. **Gerontology**. v. 34, p. 231-235, 1988.

- ROCINHOLI LF, ALMEIDA SS, DE-OLIVEIRA LM. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Braz J Med Biol Res.** v 30, p 407-413, 1997
- ROCINHOLI, L.F.; De OLIVEIRA, L.M.; COLAFEMINA, J. Malnutrition and environmental stimulation in rats: wave latencies of the brainstem auditory evoked potentials. **Nutr. Neurosc.** v. 4, p 199-212, 2001.
- RUSSELL, R.M.; COX, M.E.; SOLOMONS, N. Zinc and the special senses. **Ann. Intern. Med.** v. 99, p. 227-239, 1983.
- RYU S, BROWN SL, KOLOZSVARY A, EWING JR, KIM JH. Noninvasive detection of radiation-induced optic neuropathy by manganese-enhanced MRI. **Radiat Res.** v 157, p 500-5, 2002
- SANDELL, J.H. ; PETERS, A. Effects of age on nerve fibers in the Rhesus Monkey optic nerve. **Journal of Comp Neurol.** v. 429, p. 541-553, 2001.
- SHEARD, N. F. Iron deficiency and infant development. **Nutr. Rev.** v. 52, p. 137-146, 1994.
- SOBOTKA, T.J.; WHITTAKER, P.; SOBOTKA, J.M.; BRODIE, R.E.; QUANDER, D.Y.; ROBL, M.; BRYANT, M.; BARTON, C.N.; Neurobehavioral dysfunctions associated with dietary iron overload. **Phys and Behav.** v. 59-2, p. 313-219, 1996.
- TANAKA, M.; KARIYA, F.; KAIHATSU, K.; NAKAMURA, K.; ASAKURA T.; KURODA, Y.; OHIRA, Y. Effects of chronic iron deficiency anemia on brain metabolism. **Jap. Jour. of Phys.** v. 45, p. 257-263, 1995.
- TOHNO, Y.; TAKANO, Y.; TOHNO, S.; MORIWAKE, Y.; MINAMI, T.,; NISHIWAKI, F.; YAMAA, M.O.; UTSUMI, M.; YURI, K. Age-related variations of elements as compared among optic, radial, and sciatic nerves. **Biol. Trace Elem. Res.** v. 77, p. 119-129, 2000.
- WIGGINS, R.C.; FULLER, G.; ENNA, S.J. Under nutrition and the development of brain neurotransmitter systems. **Life Sciences.** v. 35, p. 2085-2094, 1984.