**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA CIÊNCIAS E LETRAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA**

EVERTON HORIQUINI BARBOSA

**INTERAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE FERRO E ESTIMULAÇÃO TÁTIL:
AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ÓPTICO DE RATOS WISTAR
NO PERÍODO PÓS-NATAL PRECOCE**

RIBEIRÃO PRETO

2017

EVERTON HORIQUINI BARBOSA

**INTERAÇÃO ENTRE DEFICIÊNCIA DE FERRO E ESTIMULAÇÃO
TÁTIL: AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ÓPTICO DE
RATOS WISTAR NO PERÍODO PÓS-NATAL PRECOCE**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como
parte das exigências para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof^o Dr^o João-José Lachat

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Everton Horiquini.

Interação entre deficiência de ferro e estimulação tátil: avaliação ultraestrutural do nervo óptico de ratos wistar no período pós-natal precoce. Ribeirão Preto, 2017.

124 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.

1. Deficiência de ferro. 2. Ultraestrutura. 3. Estimulação tátil. 4. Morfologia. 5. Morfometria. 6. Nervo óptico. 7. Ratos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Everton Horiqini Barbosa

Título: Interação entre deficiência de ferro e estimulação tátil: avaliação ultraestrutural do nervo óptico de ratos wistar no período pós-natal precoce

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: Psicobiologia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho à minha avó materna, **Jandira Morandini Horiquni**, que sempre me chamou de doutor, mesmo antes de tudo acontecer. E que da maneira mais simples acreditou em mim, e mostrou seu amor. Agradeço as várias horas dedicadas em oração para que tudo corresse bem durante todos esses anos de estudo em outras cidades e em outro país. Essa proteção foi importante e necessária.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha Família, que se fez presente em todos os momentos, com palavras de apoio e incentivo. Agradeço à minha mãe, **Maria José Horiqini Barbosa** e ao meu pai, **Amir Soares Barbosa**, que sempre me olharam com orgulho, e isso me impulsionava a fazer o melhor sempre. Aos meus irmãos, **Amir Horiqini Barbosa** e **Tamiris Horiqini Barbosa**, que sempre se fizeram presentes, prontos para ajudar em tudo. Obrigado.

Agradeço ao Professor Doutor **João-José Lachat**, grande mestre e amigo, que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Neuroanatomia, sempre disposto a ajudar. Foi, e é importante no meu crescimento científico e intelectual. Obrigado por confiar e acreditar na minha capacidade.

Agradeço à Professora Doutora **Robbin Gibb** e ao Professor Doutor **Bryan Kolb** que me supervisionaram durante o doutorado sanduíche, agradeço a maravilhosa recepção e por deixarem minha chegada e estadia mais fácil. Sou grato pela oportunidade que me deram de participar de discussões científicas profundas e de participar de pesquisas importantes do laboratório. Agradeço ao Professor **Douglas Bray**, pelos ensinamentos sobre a microscopia eletrônica, pela paciência e claro, pela amizade.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de doutorado e a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (**FAEPA**) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Por ultimo e de maneira especial, agradeço a minha noiva, **Mariana Ducatti Almeida**, que sempre demonstrou sua cumplicidade e amor, me apoiando e me incentivando. Agradeço sua paciência diante do meu desejo de realizar o estágio fora do país. Agradeço por ter vivido isso comigo, de forma participativa e não somente como expectadora. Agradeço tudo o que você representou durante o doutorado e o que representa na minha vida. E se conquistei mais esse objetivo, foi também graças a você. Obrigado. Eu te amo.

“Ore a Deus, mas continue remando...”.

(Provérbio Russo)

RESUMO

Barbosa, E. H. (2017). Interação entre deficiência de ferro e estimulação tátil: avaliação ultraestrutural do nervo óptico de ratos wistar no período pós-natal precoce. Tese de Doutorado, Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A deficiência de ferro é a carência nutricional mais frequente no mundo, uma vez que a população de crianças é uma das que mais sofre com essa condição. É sabido que o desenvolvimento cerebral é determinado não apenas por um plano genético, mas sim por uma forte interação de fatores genéticos e ambientais. Evidências emergentes sugerem que a estimulação precoce pode oferecer grande eficácia terapêutica, uma vez que o cérebro é notavelmente responsivo a essa interação com o ambiente. Dado que a estimulação tátil (TS) tem sido previamente demonstrada ser uma abordagem terapêutica eficaz e com potencial aplicação em seres humanos, o objetivo deste estudo foi verificar se a exposição à estimulação tátil desde o dia pós-natal (P) 1 até P32 durante 3 min/dia, poderia ser utilizada para prevenir alterações estruturais do nervo óptico de ratos mantidos com uma dieta deficiente em ferro durante o desenvolvimento pós-natal. Foram utilizados 72 ratos machos recém-nascidos (Wistar), sendo que as ratas-lactantes foram mantidas com dieta isocalórica com 35mg/Fe por kg de ração (Grupo ANTS) ou com 4mg/Fe por kg de ração (Grupo DNTS) durante todo o período de lactação e os filhotes receberam a dieta de suas respectivas ratas-lactantes após o desmame (P22-32). Metade dos filhotes de cada grupo foi submetida à TS diária (Grupo ATS e DTS), durante todo o período experimental (P01-32). Foram realizadas análises estrutural e ultraestrutural, em 3 diferentes idades, para avaliar a integridade tecidual e também a fim de determinar se as mudanças observadas na citoarquitetura do nervo óptico foram significativamente diferentes entre os grupos e idades. Verificou-se que os animais mantidos com dieta deficiente em ferro apresentaram baixo peso corporal a partir do desmame, revelando uma curva de crescimento menos acentuada. A baixa concentração de hemoglobina e hematócritos indicam que esses animais sofreram com anemia severa em todos os períodos estudados. A análise ultraestrutural qualitativa mostrou que a deficiência de ferro imposta durante o período crítico do desenvolvimento leva a sérios danos as fibras das células ganglionares da retina, com efeitos sobre o envoltório de mielina que frequentemente apresentou afrouxamento lamelar e em idades mais avançadas foram encontradas degenerações mielínicas e axonais. A análise ultraestrutural quantitativa mostrou que a dieta deficiente em ferro leva a um atraso no processo de mielinização que pode ser parcialmente revertido pelo tratamento com estimulação tátil. Além disso, fica claro que as fibras de menor diâmetro são mais sensíveis às lesões geradas pela deficiência de ferro e também ao tratamento, enquanto que as fibras de maior diâmetro são afetadas de forma desproporcional tanto pela deficiência de ferro quanto pela estimulação tátil. As lesões sugerem que a

transmissão dos sinais elétricos pode estar prejudicada, interferindo com as funções normais do sistema visual.

Palavra-chave: Deficiência de ferro. Ultraestrutura. Estimulação tátil. Morfologia. Morfometria. Nervo óptico. Ratos.

ABSTRACT

Barbosa, E. H. (2017). Iron deficiency and tactile stimulation interaction: ultrastructural evaluation of the optic nerve from developing rats. Tese de Doutorado, Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Iron deficiency has a critical impact on maturational mechanisms of the brain and the damage related to neuroanatomical parameters is not satisfactorily reversed after iron replacement. However, emerging evidence suggest that enriched early experience may offer great therapeutic efficacy in cases of nutritional disorders postnatally, since the brain is remarkably responsive to its interaction with the environment. Given the fact that tactile stimulation (TS) treatment has been previously shown to be an effective therapeutic approach and with potential application to humans, here we ask whether exposure to TS treatment, from postnatal day (P) 1 to P32 for 3 min/day, could also be employed to prevent neuroanatomical changes in the optic nerve of rats maintained on an iron-deficient diet during brain development. It was verified that the animals maintained with iron deficient diet presented low weight from the weaning, revealing a lower growth curve. The low concentration of hemoglobin and hematocrits indicate that these animals suffered from severe anemia in all studied periods. The qualitative ultrastructural analysis showed that the iron deficiency imposed during the critical period of development leads to serious damage to the fibers from retinal ganglion cells, with effects on the myelin sheath that frequently presented lamellar loosening and myelin degenerations and axonal at more advanced age. Quantitative ultrastructural analysis has shown that the iron deficient diet leads to a delay in the myelination process that can be partially reversed by treatment with tactile stimulation. In addition, it is clear that the smaller diameter fibers are more sensitive to the iron deficiency and also to the treatment, whereas the larger fibers are disproportionately affected by both iron deficiency and tactile stimulation. The lesions suggest that the transmission of electrical signals may be impaired, interfering with the normal functions of the visual system.

Keywords: Iron deficiency. ultrastructure. Tactile stimulation. Morphology. Morphometry. Optic Nerve. Rat.

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais e cuidados.....	23
3.2. Composição das ninhadas e dos grupos experimentais	23
3.3. Tratamento de dietas.....	25
3.4. Estimulação tátil	27
3.5. Peso corporal dos animais	27
3.6. Hematologia	28
3.7. Sacrifício, coleta do material e processamento histológico.....	28
3.8. Aquisição das fotomicrografias e eletronicmicrografias	29
3.9. Quantificação ultraestrutural do nervo óptico	30
3.9.1. Área e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo óptico	30
3.9.2. Número de fibras amielínicas do nervo óptico.....	30
3.9.3. Número de fibras mielínicas do nervo óptico.....	30
3.9.4. Área do axônio do nervo óptico	30
3.9.5. Área da fibra mielínica do nervo óptico	31
3.9.6. Taxa de mielinização do nervo óptico	31
3.9.7. Área da bainha de mielina	31
3.9.8. Espessura da bainha de mielina	31
3.9.9. Razão G	32
3.10. Análise estatística	32

4. RESULTADOS	33
4.1. Peso corporal e análise hematológica das ratas-lactantes.....	34
4.1.1. Peso corporal das ratas-lactantes	34
4.1.2. Análise hematológica das ratas-lactantes	34
4.2. Peso Corporal e análise hematológicos dos filhotes.....	36
4.2.1. Peso corporal dos filhotes.....	36
4.2.2. Análise hematológicos dos filhotes	36
4.3. Análise qualitativa da ultra-estrutura do nervo óptico	39
4.3.1. Visão geral da ultra-estrutura do nervo óptico	39
4.3.2. Desenvolvimento ultra-estrutural normal do nervo óptico.....	39
4.3.3. Efeito da dieta deficiente em ferro durante o desenvolvimento do nervo óptico ...	47
4.3.4. Efeito da estimulação tátil durante o desenvolvimento do nervo óptico.....	55
4.3.5. Efeito da estimulação tátil durante o desenvolvimento do nervo óptico de ratos deficiente em ferro.....	62
4.4. Quantificação Ultraestrutural do Nervo Óptico.....	70
4.4.1. Área e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo óptico	70
4.4.2. Número de fibras amielínicas do nervo óptico	70
4.4.3. Número de fibras mielínicas do nervo óptico.....	71
4.4.4. Número total de fibras mielínicas do nervo óptico.....	71
4.4.5. Taxa de mielinização do nervo óptico	73
4.4.6. Histograma e correlação de distribuição de frequência.....	74
4.4.6.1 Histograma da área dos axônios	75
4.4.6.2 Histograma da área das fibras.....	76
4.4.6.3 Histograma da área da mielina	77
4.4.6.4 Histograma da Razão-G.....	78
4.4.6.5 Correlação da espessura da bainha de mielina/Diâmetro do axônio	79
4.4.6.6 Correlação da Razão-G/Diâmetro do axônio.....	81
4.4.7. Fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico	82
4.4.7.1 Número de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico	83
4.4.7.2 Área de axônios de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico	83

4.4.7.3 Área de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico	84
4.4.7.4 Área da mielina de fibras de grande calibre do nervo óptico	85
4.4.7.5 Espessura da bainha de mielina de fibras de grande calibre do nervo óptico ...	86
4.4.7.6 Razão-G de fibras de grande calibre do nervo óptico	87
4.4.8. Fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico	88
4.4.8.1 Número de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico	88
4.4.8.2 Área de axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico.....	89
4.4.8.3 Área de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico.....	90
4.4.8.4 Área da mielina de fibras de pequeno calibre do nervo óptico	91
4.4.8.5 Espessura da bainha de mielina de fibras de pequeno calibre do nervo óptico.	92
4.4.8.6 Razão-G de fibras de pequeno calibre do nervo óptico.....	93
5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÕES.....	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
8. ANEXOS	123

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a deficiência de ferro é a carência nutricional mais frequente no mundo, podendo levar a incapacidade ou até a morte (WHO, 2001). Fatores como a obesidade, o sedentarismo e drogas ilícitas contribuem para a taxa global de doença, entretanto, em 2002, a deficiência de ferro foi considerada um dos fatores mais importantes para a elevação da taxa global de doença (WHO, 2005). Esta condição afeta tanto os países não industrializados, bem como praticamente todos os países industrializados, e assim se destaca como um sério problema de saúde pública, de desenvolvimento social e de política econômica (WHO, 2001; 2005). Aproximadamente 50% dos casos de anemia tem a deficiência de ferro como agente causal, contudo, para cada caso de anemia ferropriva existem de 2-5 casos de deficiência de ferro que não levam à anemia, deste modo, o número de indivíduos que sofrem com a deficiência de ferro no mundo se aproxima a 4 bilhões (WHO, 2001; Boy et al., 2009), sendo que em sua maioria o diagnostico permanece desconhecido.

De acordo com a pesquisa de 1999-2002 da National Health and Nutrition Examination Survey a prevalência de anemia ferropriva nos Estados Unidos varia dependendo da idade, sexo, e etnia, porém sua prevalência continua relativamente estável na população em geral. Apesar da estabilidade, é fato que a anemia devido à deficiência de ferro é predominante entre as minorias, como é o caso de crianças de famílias com dificuldades econômicas e gestantes com baixa-renda (NHANES, 2002). Ainda nos Estados Unidos, a deficiência de ferro afeta aproximadamente 2,4 milhões de crianças e 7,8 milhões de mulheres, dos quais, apenas 20% (490 mil) e 40% (3,3 milhões) respectivamente, foram diagnosticadas com anemia ferropriva (Looker et al., 1997; Brotanek et al., 2007). No Brasil, não há levantamento de dados nacionais sobre a prevalência de anemia ferropriva, mas os poucos estudos regionais mostram, que ao contrario dos Estados Unidos, existe uma tendência ao aumento da prevalência de anemia nas crianças na idade pré-escolar. Por exemplo, estudos mostram que na cidade de São Paulo, em 1974, cerca de 22% das crianças entre 6 e 60 meses de idade eram anêmicas, dez anos mais tarde, em 1984, o percentil subiu para 35,6% e continuou subindo, alcançando 46,9% em 1995 (Sigulem et al., 1978; Monteiro e Szarfarc, 1987; Monteiro et al., 2000). No estado da Paraíba, também fica evidente o aumento da prevalência de anemia em crianças na idade pré-escolar, que passou de 19,3% em 1981 para 36,4% em 1992 (De Oliveira et al., 2002).

A Organização Mundial da Saúde estima que em países em desenvolvimento, um terço das crianças com até 14 anos de idade são anêmicas e a frequência estimada para a deficiência de ferro sem anemia pode dobrar. Essa condição é mais prevalente e severa em

crianças jovens (6-24 meses de vida), expondo o cérebro em desenvolvimento a uma inadequada quantidade de ferro (WHO, 2001; 2005; 2007). E durante essa fase da vida, esse micronutriente é necessário para várias reações fisiológicas, agindo como cofator para várias enzimas relacionadas ao metabolismo energético, síntese de DNA, RNA e proteínas, além da respiração, proliferação e diferenciação celular, o ferro também está envolvido na regulação da expressão gênica e transporte de elétrons (Conrad e Umbreit, 2000; Lozoff e Georgieff, 2006; Andrews e Schmidt, 2007; Greminger et al., 2014). O ferro, além das diversas funções citadas acima, está envolvido na síntese e empacotamento de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e o GABA, e ainda participa da recaptação e degradação destes neurotransmissores (Beard et al., 1993).

Em adição, um acumulado de evidências mostra que o ferro é importante na síntese de colesterol e lipídio, os quais são componentes essenciais para o desenvolvimento e manutenção da estrutura da bainha de mielina (Yu et al., 1986; Greminger et al., 2014). Em cérebros em desenvolvimento, uma marcação histoquímica para ferro só se mostra positiva em regiões mielinogênicas mesmo antes do processo de mielinização ter início. Outras observações histoquímicas demonstram que regiões cerebrais com mais mielina apresentam maiores concentrações de transferrina, que são proteínas responsáveis pelo transporte do íon ferro. Deste modo, é essencial ressaltar que a maioria do ferro encontrado no sistema nervoso de ratos está localizada na fração de mielina, podendo chegar a 80% do total, e o restante, 20% do ferro, em frações mitocondriais e sinaptossomais. Além disso, os períodos de alta absorção férica e de alta densidade de receptor de transferrina no sistema nervoso, especialmente nas células gliais, coincidem com o período de maior atividade do processo de mielinização e de proliferação tardia de oligodendrócitos. Assim, salientando que o desenvolvimento saudável da mielina está relacionado à aquisição/absorção de ferro pelos oligodendrocitos (Connor e Menzies, 1996; Connor et al., 2001; Moos e Morgan, 2002; Todorich et al., 2009). Outro fato que corrobora a importância da relação da aquisição de ferro e a mielinização é que a ferritina inicialmente acumulada nas micróglias passa a se acumular nos oligodendrócitos, célula responsável pelo processo de mielinização do sistema nervoso central (Cheepsunthorn et al., 1998). Assim, com todas essas informações, atribui-se ao ferro um papel importante durante a mielinogênese e um relacionamento funcional entre a captação de ferro e a produção de mielina.

Os efeitos do desequilíbrio nutricional no sistema nervoso são agravados quando ocorrem durante o desenvolvimento cerebral e há evidências de que quanto mais cedo a alteração nutricional, mais grave, duradouro ou permanente são seus efeitos no cérebro

(Morgane et al., 1992; Morgane et al., 2002) . Deste modo, baseado no desenvolvimento do sistema nervoso, pesquisadores afirmam que existe uma fase considerada altamente vulnerável aos insultos nutricionais, definida como “período crítico do desenvolvimento”. (Dobbing e Sands, 1979; Rice e Barone Jr, 2000; Morgane et al., 2002). Já é bem sabido que o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso do rato ocorre durante a fase de amamentação (0 a 21 dias de vida). Smart et al. (1973) corroboram essa afirmação a partir de uma comparação entre desnutrição pré-natal e a pós-natal, mostrando que a desnutrição proteica imposta na fase de amamentação é mais agressiva comparada com a desnutrição na fase gestacional. Ainda neste sentido, Wiggins (1982) mostra que desnutrição pode afetar a mielinização, causando alterações persistentes, e que este processo celular é especialmente vulnerável durante o desenvolvimento pós-natal de roedores.

Em ratos mantidos com dieta deficiente em ferro, há um significativo aumento de transferrina e uma baixa na concentração de ferritina. O ferro é estocado no cérebro como ferritina, o que indica que as concentrações cerebrais de ferro estão diminuídas e um aumento compensatório de transportadores acontece para aumentar o influxo de íons ferro para o sistema nervoso na tentativa de normalizar a concentração de ferritina cerebral (Erikson et al., 1997). Entretanto, pesquisas com animais indicam que as baixas na concentração de ferro no cérebro podem ser revertidas com uma dieta rica em ferro, mas isso dependendo da gravidade e do tempo desse insulto nutricional (Lundström et al., 1977). Ainda nesse sentido, suplementação de ferro precoce na vida pós-natal, revertem completamente as concentrações de ferro cerebral na vida adulta, entretanto, alterações estruturais, déficits funcionais e cognitivos podem permanecer indicando lesões resistentes aos tratamentos (Connor et al., 2001; Pinero et al., 2001; Lozoff et al, 2006; Kennedy et al., 2016). Pesquisas prévias realizadas em nosso laboratório reforçam as indicações de que a deficiência de ferro gera alterações estruturais e ultraestruturais persistentes, com resultados que mostram que ratos que sofreram deficiência de ferro por todo o período de lactação e passaram por suplementação ferro até o 35º dia de vida, não apresentaram reversão satisfatória das alterações citoarquitetônicas do nervo óptico (DeMaman et al., 2008; DeMaman et al., 2010). Assim, a nutrição adequada durante o início da vida é um dos fatores ambientais mais importantes que garante o desenvolvimento normal do cérebro (Barbosa et al., 2016; Barbosa et al., 2016b).

Sabe-se que o sistema nervoso responde de forma notável as interações com ambiente e isso pode moldar o seu desenvolvimento. Estudos têm mostrado mudanças nos processos bioquímicos, moleculares e na morfologia do desenvolvimento cerebral devido a estimulações

ambientais, realizadas principalmente durante as fases precoces do desenvolvimento (Kolb et al., 1998; Kolb e Whishaw, 1998; Will et al., 2004; Horiquni-Barbosa e Lachat, 2016; Soares et al., 2017). Tem sido demonstrado que animais expostos a um ambiente enriquecido, que é uma combinação de estímulos sensoriais, sociais e físicos, pode levar a mudanças neuroanatômicas que diferem de animais que foram criados em condição padrão, além disso, os benefícios de um ambiente estimulante não se limitam às alterações morfológicas, mudanças comportamentais também são discutidas (Van Praag, Kempermann e Gage, 2000; Mohammed et al., 2002). Outro ponto de destaque é que existem pesquisas que relacionam o ambiente enriquecido ao sistema visual, e neste sentido, os resultados sugerem que o sistema visual é totalmente plástico e responsável ao enriquecimento ambiental o que leva a um desenvolvimento acelerado, tanto em aspectos morfológicos quanto em aspectos funcionais. Estas novas descobertas deixam claro o potencial da estimulação ambiental como uma estratégia não invasiva e promissora para atenuar os déficits causados pelo atraso ou alterações do desenvolvimento do sistema nervoso e também para promover a recuperação das funções normais frente a condições patológicas que afetam o cérebro adulto (Cancedda et al., 2004; Sale et al., 2004, Sale et al., 2009; Spolidoro et al., 2009).

A estimulação tátil – estimulação sensorial da pele – é considerada em ratos uma estimulação ambiental que mimetiza o cuidado materno, como o comportamento de *lamber* e o *grooming*, e em humanos pode ser entendida como uma estimulação sensorial da pele, como uma massagem. Esta estimulação também tem sido utilizada como modelo experimental para se estudar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente afetam o desenvolvimento de sistema nervoso (Kolb e Gibb, 2007; Imanaka et al., 2008; Guzzetta et al., 2009; Gibb et al., 2010; Kolb e Gibb, 2010; Richards et al., 2012; Horiquni-Barbosa e Lachat, 2016). A estimulação tátil realizada em ratos no período pós-natal precoce, por meio do comportamento de *lamber* e de higiene fornecida pela rata lactante, influencia na estrutura e funcionalidade do cérebro, por meio de fatores de crescimento que são moléculas cruciais para a plasticidade cerebral, à exemplo disso, existem trabalhos que sugerem o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e o Fator de Crescimento Neuronal (NGF), deste modo, a estimulação tátil realizada em laboratório por pesquisadores, parece utilizar mecanismos semelhantes de ação no sistema nervoso (Liu et al., 1997; Sale et al., 2004; Weaver et al., 2004).

Neste sentido, já existem trabalhos mostrando que a estimulação tátil realizada por pesquisadores gera resultados no cérebro, uma vez que os animais estimulados sintetizam maior quantidade de fatores de crescimento como BDNF, NGF, Fator de Crescimento

Semelhante à Insulina (IGF) e o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) e isso pode levar, como mostrado, a uma série de benefícios, incluindo um desenvolvimento cerebral acelerado, maior proliferação de células gliais e neuronal (Liu et al., 1997; Pham et al., 1997; Weaver et al., 2004; Sale et al., 2009; Guzzetta et al., 2009; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012).

Vários estudos indicam que a substancia branca do sistema nervoso central, a mielina, também exibem mudanças dependentes de experiência. Por exemplo, Sanchez et al., (1998) mostra que macacos mantidos em um ambiente enriquecedor apresentam um maior corpo caloso - maior trato comissural de substancia branca do cérebro - comparados com macacos mantidos em ambiente padrão. Gyllensten e Malmfors (1963) mostram que por outro lado, um ambiente empobrecido também pode acarretar em uma plasticidade negativa, pois, ratos criados no escuro desde o nascimento apresentam um retardo no processo de mielinização. Recentemente, um trabalho do nosso laboratório mostrou que a estimulação tátil pode atuar aumentando a densidade de oligodendrócitos o que poderia levar a um aumento do processo de mielinização, o mecanismo pela qual ocorre o aumento de oligodendrócitos ainda é desconhecido (Horiquni-Barbosa e Lachat 2016), entretanto o aumento de fatores de crescimento ocasionados pela estimulação tátil pode atuar neste sentido.

Deste modo, uma vez que a deficiência de ferro afeta bilhões de pessoas no mundo e uma das principais consequências da falta de ferro são as alterações no processo de mielinização, e diante da estimulação tátil que é um procedimento não invasivo, de baixo custo e com potencial para ser usado em humanos, e com resultados prévios que mostram seus efeitos na substancia branca do nervo óptico de ratos, nossa hipótese é que a utilização de uma experiência positiva precoce poderia proteger ou minimizar os efeitos deletérios da deficiência de ferro sobre o desenvolvimento da mielina. Portanto, a proposta deste trabalho é avaliar se a exposição a estimulação tátil também poderia ser utilizada para prevenir as mudanças ultraestruturais na mielinização do nervo óptico de ratos mantidos com dieta deficiente em ferro no período de desenvolvimento pós-natal precoce.

2.1. Objetivo Geral

- Analisar os efeitos da deficiência de ferro imposta durante todo período crítico do desenvolvimento cerebral e os possíveis efeitos protetores gerados pela estimulação tátil neonatal imposta também durante todo o período crítico.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a influência da deficiência de ferro precoce no crescimento corporal e em análise sanguínea dos filhotes.
- Analisar a influência da deficiência de ferro precoce no desenvolvimento do nervo óptico de ratos, através da utilização de microscopia eletrônica de transmissão.
- Analisar a influência da estimulação tátil neonatal no crescimento corporal e em análise sanguínea dos filhotes.
- Analisar a influência da estimulação tátil neonatal no desenvolvimento do nervo óptico de ratos, através da utilização de microscopia eletrônica de transmissão.
- Analisar os efeitos protetores da estimulação tátil neonatal no crescimento corporal e no desenvolvimento do nervo óptico de ratos mantidos com dieta deficiente em ferro.

3.1. Animais e cuidados

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina do Campus da USP de Ribeirão Preto (Processo nº 104/2014 – Anexo I).

Foram utilizados 72 ratos recém-nascidos albinos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os ratos recém-nascidos foram recebidos no dia de seu nascimento (P0) e alojados no biotério setorial do Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Cirurgia e Anatomia. As ninhadas foram compostas com apenas seis filhotes machos para cada rata-lactante a fim de garantir livre acesso ao leite materno; os filhotes foram distribuídos aleatoriamente para evitar a formação de ninhadas com filhotes provenientes de uma mesma mãe e então, alojados em caixas de polipropileno (41 × 40 × 17 cm) até o desmame (21º dia de vida), quando os filhotes passaram a ocupar caixas de polipropileno, em pares. As caixas possuíam tampas, alimentadores e tampas de garrafas de aço inoxidável e todos os materiais usados para alojamento e cuidados dos animais foram previamente lavados com ácido nítrico a 30% de solução (v/v) e enxaguados com água deionizada e foram substituídos semanalmente, evitando a contaminação com ferro do meio ambiente. A temperatura do ambiente foi mantida a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade em torno de 60%, com um ciclo de claro/escuro de 12 horas.

3.2. Composição das ninhadas e dos grupos experimentais

A fim de evitar possíveis interferências genéticas nas análises, no dia do nascimento (dia zero), os filhotes foram separados de suas mães e reunidos em uma caixa. Cada rata-mãe foi colocada separada em caixas de polipropileno e do conjunto total de filhotes foram retirados, de forma aleatória, seis animais para compor cada ninhada, evitando-se assim que sua formação ocorra apenas por ratos provenientes de uma mesma rata-mãe.

Os filhotes foram separados em dois grupos de acordo com tratamento dietético: 6 ratas-lactantes foram mantidas com dieta adequada em Fe (**A** - 35 mg de Fe por kg de ração) e outras 6 ratas-lactantes foram mantidas com dieta deficiente em Fe (**D** – 4 mg de Fe por Kg de ração) durante o período de lactação; os filhotes foram mantidos com a mesma ração de suas respectivas ratas-lactantes durante o período pós-lactação.

Ainda no dia do nascimento, os animais dos grupos **A** e **D** foram novamente separados em dois grupos: sem estimulação tátil (**NTS** – Non-Tactile Stimulated) e estimulação tátil (**TS** – Tactile Stimulated). Desta forma, foram estabelecidos quatro grupos: dieta adequada em Fe e sem estimulação tátil (**ANTS**); dieta adequada em Fe e estimulação tátil (**ATS**); dieta deficiente em Fe e sem estimulação tátil (**DNTS**); e por último, dieta deficiente em Fe e estimulação tátil (**DTS**). Cada grupo foi composto por 3 ratas-lactantes e 18 recém-nascidos. A **Tabela 1** mostra a formação dos grupos durante o período de lactação e pós-lactação, considerando as variáveis: idade x dieta x ambiente.

Tabela 1- Grupos experimentais conforme a sua condição de idade, dieta e ambiente. Dieta adequada (A) e dieta deficiente (D). Animais não estimulados (NTS) e animais estimulados (TS). Totalizando quatro grupos experimentais: Adequado não estimulado (ANTS), Adequado estimulado (ATS), Deficiente não estimulado (DNTS) e Deficiente estimulado (DTS).

Grupos	Período (Idade)	Dieta	Ambiente	Nº de ninhadas	Nº de Filhotes
ANTS	Lactação (0-21 dias)	dieta adequada	não-estimulado	3	18
ATS			estimulado	3	18
DNTS		dieta deficiente	não-estimulado	3	18
DTS			estimulado	3	18
ANTS	Pós-lactação (21-32 dias)	dieta adequada	não-estimulado	3	18
ATS			estimulado	3	18
DNTS		dieta deficiente	não-estimulado	3	18
DTS			estimulado	3	18

3.3. Tratamento de dietas

A dieta adequada e a deficiente em ferro utilizadas no presente estudo possuíam a mesma quantidade de calorias (isocalóricas) e foram preparadas de acordo com a AOAC – Association of Official Agricultural Chemists recommendations (Cunniff, 1995). A única diferença exibida na composição das dietas era a quantidade de ferro, sendo que a dieta dos animais do grupo **ANTS** e **ATS** apresentavam conteúdo de 35 mg de ferro/Kg de ração enquanto que a dieta dos animais do grupo **DNTS** e **DTS** apresentavam 4 mg de ferro/Kg de ração.

Em todos os grupos a dieta foi ingerida pelas ratas-mães durante o período de lactação e passou a ser ingerida diretamente pelos filhotes após o desmame. As ninhadas tiveram acesso a dieta e a água deionizada 24h/dia. A composição das dietas, mistura de sais e mistura de vitaminas estão inseridas na **Tabela 2, 3 e 4**, respectivamente.

Tabela 2 - Composição da dieta basal utilizada para os grupos que foram mantidos com dieta adequada ou deficiente em ferro, segundo a AOAC (Cunniff, 1995).

Componentes	Percentil
Caseína	20%
Colina	0.15%
Mistura de Minerais*	0.27%
Mistura Vitamínica	0.10%
Amido de Milho (Maisena)	20%
Óleo de Milho	5%
DL-Metionina	0.10%
Glicose H ₂ O	49.38%
*Mistura Salina deficiente em Ferro.	

Tabela 3 - Composição da mistura de sais minerais de acordo com AOAC (Cunnif, 1995).

Componentes	Quantidade (g/100g)
MgSO ₄ , Anidro	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

Tabela 4 - Composição da mistura de vitaminas de acordo com AOAC (Cunnif, 1995).

Componentes	Quantidade (g/100g)
Acido 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 D3 200.000 UI/g	0.75

3.4. Estimulação tátil

Os filhotes dos grupos ATS e DTS foram submetidos à estimulação individual, realizada uma vez ao dia, cinco dias por semana, do P1 ao P32. Durante o processo de estimulação no período de lactação (do 1° ao 21° dia de idade), as ratas-lactantes foram removidas de suas caixas de origem e alojadas em caixas temporárias com ração e água disponíveis. Cada filhote foi submetido, de forma individualizada, à estimulação tátil; o filhote foi tomado em uma das mãos do pesquisador, e com os dedos da outra mão foram realizados deslizamentos em sua região dorsal, no sentido crânio-caudal, por 3 minutos. Todos os filhotes foram devolvidos para sua respectiva rata-lactante após a estimulação. Durante o processo de estimulação no período pós-lactação (do 22° ao 32° dia de idade), os filhotes foram submetidos ao mesmo procedimento de estimulação tátil descrito, entretanto, após o tratamento diário os filhotes foram alojados em pares. A estimulação tátil ocorreu entre as 9:00 e 12:00, pelo mesmo experimentador. O mesmo protocolo de estimulação tátil foi usado por Santucci et al., (1994), Rocinholi et al., (1997), Rocinholi et al., (2008), Pereira-da-Silva et al., (2009), Horiqini-Barbosa e Lachat (2016) e Horiqini-Barbosa et al., (2017).

3.5. Peso corporal dos animais

As ratas-lactantes foram pesadas semanalmente, desde o dia do parto até o 21° dia de amamentação, quando ocorreu o desmame dos filhotes, totalizando 3 semanas. Os dados de peso corporal das ratas-lactantes foram registrados a fim de verificar a influência da dieta nos parâmetros somáticos durante a lactação.

O peso corporal dos filhotes também foi registrado semanalmente, desde o dia de nascimento até o 28° dia de idade. Os dados de peso corporal dos filhotes foram registrados a fim de verificar a influência da dieta e da estimulação tátil na curva de crescimento dos filhotes. Os filhotes também foram pesados individualmente nos dias de sacrifício, aos 18, 22 e 32 dias de idade, para a realização dos cálculos das quantidades de fármacos a serem administrados para a anestesia e de substâncias para perfusão transcardíaca.

3.6. Hematologia

As ratas-lactantes foram sacrificadas para análise hematológica com o intuito de verificar alteração na concentração de hemoglobina e na porcentagem de hematócrito, sendo este um indicativo de anemia ferropriva. Desta forma, as ratas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (22mg/kg) via intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas com solução aquosa de EDTA a 10% como anticoagulante.

No 18°, 21° e 32° dia de idade, seis filhotes de cada grupo foram submetidos ao mesmo procedimento de coleta de sangue por punção cardíaca, também a fim de verificar alteração na concentração de hemoglobina e na porcentagem de hematócrito. Os métodos utilizados para determinar as concentrações de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito foram, respectivamente, o método cianometemoglobina por colorimetria e o método de micro-hematócrito (Drabkin, 1948; Pinero et al., 2000).

As avaliações foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

3.7. Sacrifício, coleta do material e processamento histológico

Depois da coleta de sangue, as mães foram sacrificadas e descartadas e os filhotes perfundidos por via transcardíaca com solução salina tamponada 0,05 M, pH 7,3 seguido por uma mistura fixadora de paraformaldeído a 2% e de glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. O volume de solução para perfusão estabelecido para cada animal foi de 1ml/g de peso corporal. Após a perfusão transcardíaca, os animais foram decapitados e os cérebros foram removidos e imediatamente colocados na mesma mistura fixadora durante 24h a 4°C, para finalizar o processo de fixação. Depois deste período, os nervos ópticos foram dissecados com auxílio de um estereomicroscópio (Stemi DRC, Carl Zeiss®) e a fim de padronizar a amostra, foi descartada a porção entre o globo ocular e a deflexão do nervo óptico e somente a porção entre a deflexão e o quiasma óptico foi utilizada (Figura 1). Subsequentemente, as amostras do tecido foram lavadas em tampão fosfato 0,1M em pH 7,3 e pós-fixados com tetroxido de ósmio a 1% diluídos em PBS a 0,1 M, pH 7,3, durante 2 horas a 4°C. Os tecidos osmificados foram desidratados por meio de uma série de acetona em concentrações crescentes, incluídos em araldite 502 em moldes de silicone e orientados de forma que suas fibras fossem cortadas transversalmente.

Figura 1 - Vista ventral do encéfalo do rato com preservação e exposição do nervo óptico, em destaque a sua deflexão (Df), o quiasma óptico (QO) e o trato óptico (TO). A porção utilizada entre a deflexão e o quiasma óptico (*).

De cada nervo óptico foram obtidas secções semi-finas com 0,5µm de espessura, coradas com azul de toluidina à 1% e observadas em microscópio de luz para avaliar a morfologia geral e a qualidade da fixação do tecido. Após avaliação inicial, utilizando um ultramicrotomo (Dupont Sorval Modelo Porter Blum MT-2B) com navalha de diamante (Ted Pella Inc., USA), foram obtidas secções ultrafinas com 60nm de espessura, cortadas perpendicularmente ao longo eixo do nervo, e coletadas sobre grades de cobre de 200 *mesh* e subsequentemente, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

3.8. Aquisição das fotomicrografias e eletronicografias

A aquisição das imagens das secções semi-finas do nervo óptico foi realizada utilizando uma câmera (AxioCam MR5, Carl Zeiss®) acoplada a um Fotomicroscópio Óptico (Axiophot 2 plus, Carl Zeiss®), conectados a um computador equipado com o software AxioVision 4.8.1. As fotomicrografias foram capturadas com objetivas de 10X em imersão, com ampliação final ao microscópio de 50X.

Para a obtenção das imagens das secções ultrafinas foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Hitachi H-7500) equipado com uma câmera digital. Para cada nervo, 6 eletronicografias com aumento final de 5,000x e 8 eletronicografias com

aumento final de 10,000x foram obtidas. Deste modo, ao final, foram obtidas 14 electronmicrografias por animal.

3.9. Quantificação ultraestrutural do nervo óptico

Todas as avaliações quantitativas da estrutura dos nervos foram realizadas nas fotomicrografias e nas eletronmicrografias com o auxílio de um software de análise de imagens, o ImageJ *software* (National Institutes of Health, USA).

3.9.1. Área e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo óptico

Utilizando as fotomicrografias, a área total (μm^2) e o diâmetro mínimo (μm) da secção transversal dos nervos ópticos foram obtidos por meio do contorno externo da secção transversal do nervo óptico, excluindo as membranas envoltórias.

3.9.2. Número de fibras amielínicas do nervo óptico

O número de fibras amielínicas foi quantificado nas eletronmicrografias e a densidade estimada (por mm^2) para cada grupo (ANTS, ATS, DNTS e DTS) e idade estudados (18, 21 e 32 dias de idade).

3.9.3. Número de fibras mielínicas do nervo óptico

O número de fibras mielínicas foi quantificado nas eletronmicrografias e a densidade estimada (por mm^2) para cada grupo (ANTS, ATS, DNTS e DTS) e idade estudados (18, 21 e 32 dias de idade).

3.9.4. Área do axônio do nervo óptico

A área do axônio (μm^2) foi obtida por meio do contorno do axônio. A partir dos valores obtidos, o número de fibras foi organizado em dois grupos: fibras de pequeno calibre e fibras grande calibre. O grupo de fibras de pequeno calibre foi composto por fibras que possuíam axônios $\leq 0.3 \mu\text{m}^2$, enquanto que o grupo de fibras de grande calibre foi composto por fibras que possuíam axônios $> 0.3 \mu\text{m}^2$.

3.9.5. Área da fibra mielínica do nervo óptico

A área da fibra (μm^2) foi obtida por meio do contorno externo da circunferência da bainha de mielina.

3.9.6. Taxa de mielinização do nervo óptico

A taxa de mielinização foi calculada por meio da proporção fibras mielínicas/amielínicas do nervo óptico. Resultando na porcentagem de fibras já mielinizadas do nervo óptico em cada idade, além de revelar o avanço do processo de mielinização em percentil.

$$\text{Taxa de mielinização (\%)} = \frac{\text{Fibras mielínicas}}{\text{Fibras amielínicas}} \times 100$$

3.9.7. Área da bainha de mielina

A área da bainha de mielina (μm^2) foi obtida por meio da diferença entre os valores de área obtidos com o contorno externo e interno da circunferência da bainha de mielina.

$$\text{Área da bainha de mielina} = \text{Área da fibra} - \text{Área do axônio}$$

3.9.8. Espessura da bainha de mielina

Também foi quantificado o diâmetro mínimo do axônio e da fibra mielínica (μm) e a partir desses dados a espessura da bainha de mielina foi calculada, por meio da diferença entre estas duas medidas.

$$\text{Espessura da bainha de mielina (\mu m)} = \frac{\text{Diâmetro da fibra} - \text{Diâmetro do axônio}}{2}$$

3.9.9. Razão-G

A partir dos dados obtidos de diâmetros dos axônios e das fibras mielínicas, foi calculada a Razão-G. Este dado é obtido a partir da razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra. Esta relação é amplamente utilizada como um índice funcional, a partir de dados estruturais, da ótima mielinização do axônio. Podendo variar entre 0 e 1, sendo o nível ideal, entre 0,60 e 0,80 para as fibras do nervo óptico.

$$RazãoG = \frac{Diâmetro\ do\ axônio}{Diâmetro\ da\ fibra}$$

3.10. Análise estatística

Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o Statistica 12 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados foram inicialmente submetidos a testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e submetidos à análise de variância (ANOVA) de três vias (dieta *vs.* estimulação *vs.* dia) com medida repetida para a variável dia. Em todas essas análises foram realizados o teste *post-hoc* de *Newman-Keuls* quando apropriado. O nível considerado de significância estatística foi de $p < 0,05$, e o *n.s* indica a ausência de significância estatística. Todos os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.1. Peso corporal e análise hematológica das ratas-lactantes

4.1.1. Peso corporal das ratas-lactantes

No dia da chegada das ninhadas, não foram encontradas diferenças significativas entre as ratas-lactantes, confirmando que todas as ratas utilizadas estavam com a mesma condição nutricional ao início do tratamento, segundo o peso corporal.

A análise do peso corporal das ratas-lactantes mostrou efeito do fator dia [$F(3,12) = 82,60$; $P < 0,001$], com redução significativa do peso corporal total em todos os grupos ($P \leq 0,001$), atingindo uma perda de peso corporal de aproximadamente 13% para o grupo de ratas-lactantes mantidas com dieta adequada em ferro e de aproximadamente 15% para o grupo de ratas-lactantes mantidas com dieta deficiente em ferro, após as 3 semanas de aleitamento dos filhotes. Não houve efeito do fator dieta [$F(1,4) = 0,53$; $P = 0,684$ n.s.], mostrando que a dieta deficiente em ferro não alterou o peso corporal das ratas-lactantes durante todo o período de lactação.

4.1.2. Análise hematológica das ratas-lactantes

A análise dos parâmetros hematológicos das ratas-lactantes mostrou que não houve efeito do fator dia para a concentração de hemoglobina [$F(1,8) = 1,566$; $P = 0,246$ n.s.] e porcentagem de hematócrito [$F(1,8) = 3,47$; $P = 0,07$ n.s.], indicando que os níveis hematológicos foram similares nas idades analisadas.

Houve diminuição significativa dos parâmetros hematológicos das ratas-lactantes mantidas com dieta deficiente em ferro quando comparadas com as ratas-lactantes mantidas com dieta adequada em ferro de idade pareada, mostrando efeito do fator dieta tanto para concentração de hemoglobina [$F(1,8) = 7,166$; $P < 0,001$] quanto para o percentual de hematócrito [$F(1,8) = 55,49$; $P < 0,001$], sendo que a concentração de hemoglobina se mostrava com níveis significativamente baixo ao P21 ($P \leq 0,05$) e, o percentual de hematócrito se mostrava significativamente baixo ao P18 e P21 ($P < 0,001$), indicando que as ratas-lactantes desenvolveram uma modesta anemia ferropriva ao final da lactação, como exposto na Tabela 5.

Tabela 5 – Peso corporal das ratas lactantes aos 0, 7, 14, 21 dias de vida, porcentagem de perda de peso corporal e concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócritos das ratas-lactantes aos 18 e 21 dias de vida¹.

Peso corporal ² e Análise hematológica das ratas-lactantes												
	ANTS			ATS			DNTS			DTS		
Idade	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)
P0 ²	330,0	-	-	330,0	-	-	329,0	-	-	328,0	-	-
P7	322,0	-	-	326,0	-	-	315,5	-	-	318,0	-	-
P14	305,3	-	-	303,0	-	-	301,5	-	-	298,0	-	-
P18	-	13,7	45,0	-	13,2	44,0	-	11,6	37,6 [#]	-	12,0	38,0 [#]
P21	285,5*	14,1	47,3	287,5*	14,5	47,0	276*	11,2 [#]	37,3 [#]	278,0*	11,9 [#]	36,6 [#]
Perda de peso total (%)	13.4	-	-	12.8	-	-	16.1	-	-	15.2	-	-

¹ Valores são médias $\pm$ SEM; n =3.

²No P0, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, confirmando que todas as ratas utilizadas estavam com a mesma condição nutricional ao início do tratamento, segundo o peso corporal.

* Comparado com o valor de P0, $p \leq 0,05$.

Comparado com os animais do grupo mantidos com dieta adequada, com idade pareada, $p \leq 0,001$.

4.2. Peso Corporal e análise hematológicos dos filhotes

4.2.1. Peso corporal dos filhotes

Ao nascimento, não foram encontradas diferenças significativas entre os recém-nascidos, confirmando que todos os ratos estavam com a mesma condição nutricional ao início do tratamento.

A análise estatística do peso corporal dos filhotes mostrou efeito do fator dieta [$F(5,100) = 2728,55$; $P < 0,001$], sendo que os filhotes do grupo DNTS passaram a ter peso corporal inferior a partir da terceira semana de idade quando comparados aos filhotes do grupo ANTS de idade pareada. A análise estatística também mostrou efeito do fator dia [$F(1,20) = 69,41$; $P < 0,001$], com um aumento progressivo do peso corporal durante todo o período de lactação e pós-lactação ($P < 0,001$), muito embora, a curva de crescimento dos filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro apresentou progressão suave, indicando uma taxa de crescimento inferior comparado aos animais mantidos com dieta adequada em ferro. Não houve diferença entre os animais estimulados e não estimulados em nenhuma das condições nutricionais, indicando que o fator estimulação não tem relevância sobre o peso corporal neste estudo, como exposto na Tabela 6.

4.2.2. Análise hematológica dos filhotes

A análise estatística dos parâmetros hematológicos dos filhotes indicou efeito do fator dia para a concentração de hemoglobina [$F(2,40) = 13,184$; $P < 0,001$] e para a porcentagem de hematócrito [$F(2,40) = 13,674$; $P < 0,001$]. O teste post-hoc mostrou progressão da concentração de hemoglobina ($P \leq 0,001$) e porcentagem de hematócrito ($P \leq 0,001$) aos 32 dias de idade nos filhotes dos grupos que foram mantidos com dieta adequada em ferro mas não aos 21 dias de idade. Em relação aos filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro, não houve aumento progressivo das concentrações de hemoglobina em nenhuma das idades analisadas, indicando que os baixos níveis de hemoglobina e hematócrito eram permanentes nas idades avaliadas.

A análise também mostrou efeito do fator dieta para a concentração de hemoglobina [$F(1,20) = 75,688$; $P < 0,001$] e para a porcentagem de hematócrito [$F(1,20) = 107,465$; $P < 0,001$], e em todas as idades, o teste post-hoc mostrou que houve uma redução significativa da concentração de hemoglobina ($P \leq 0,001$) e do percentual de hematócrito ($P \leq 0,001$) nos

filhotes do grupo DNTS, mantidos com dieta deficiente em ferro, quando comparados com os animais do grupo ANTS, mantidos com dieta adequada em ferro, de idade pareada. Esse resultado indica que esses animais desenvolveram a condição de anemia severa na última data analisada.

Como esperado, não houve diferenças nos testes hematológicos entre animais estimulados e não estimulados, independente da condição nutricional (Tabela 6).

Tabela 6 – Peso corporal dos filhotes aos 0, 7, 14, 18, 21, 28, 32 dias de vida, concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócritos dos filhotes aos 18, 21 e 32 dias de vida¹.

Peso corporal ² e Análise hematológica dos filhotes												
ANTS				ATS			DNTS			DTS		
Idade	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)	Peso (g)	HGB (g/dL)	HCT (%)
P0	6,7	-	-	6,7	-	-	7,0	-	-	6,7	-	-
P7*	18,0	-	-	19,0	-	-	17,7	-	-	16,2	-	-
P14*	32,6	-	-	34,2	-	-	30,5	-	-	30,0	-	-
P18*	-	7,9	25,3 [#]	-	7,6	24,7 [#]	-	5,4	18,3	-	5,8	18,8
P21*	54,1 [#]	7,8	24,8 [#]	54,8	7,6	25,5 [#]	45,5	5,6	18,3	44,3	5,2	18,3
P28*	84,4 [#]	-	-	89,3	-	-	65,3	-	-	63,5	-	-
P32*	107,6 [#]	11,2*	37,2 [#]	109,2	11,6*	37,0 [#]	76,0	4,3	14,0	72,5	4,6	14,3

¹ Valores são médias $\pm$ SEM; n =6.

²No P0, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, confirmando que todas os filhotes utilizados estavam com a mesma condição nutricional ao início do tratamento, segundo o peso corporal.

* Comparado com o valor da idade anterior, $p \leq 0,001$.

Comparado com os animais do grupo mantidos com dieta deficiente em ferro, com idade pareada, $p \leq 0,001$.

4.3. Análise qualitativa da ultra-estrutura do nervo óptico

4.3.1. Visão geral da ultra-estrutura do nervo óptico

Para interpretar as alterações ultra-estruturais relacionados com alterações nutricionais que afetam as fibras nervosas mielínicas do nervo óptico, é necessário conhecer a aparência normal dos perfis das fibras nervosas mielínicas nas micrografias eletrônicas obtidas neste estudo (Figura 2, 3 e 4).

Verificou-se que a fibra mielínica era composta por um axônio com axoplasma pálido e com o citoesqueleto visível, formado por neurofilamentos e microtúbulos; perfis de mitocôndrias também foram facilmente encontradas no axoplasma e apresentavam formato arredondado e eram eletrondensas. Revestindo os axônios estavam as bainhas de mielina que no nervo óptico são formadas pelos oligodendrócitos. A fibra mielínica que foi seccionada ao nível internodal foi identificada pelo compacto revestimento de mielina. Em contraste, a fibra seccionada na extremidade do segmento da bainha de mielina, ao nível paranodal, era revestida por uma fina bainha de mielina que estava separada do axônio por um anel de citoplasma contínuo e bem definido, deixando o axônio bem centralizado. Ao nível do nodo de Ranvier, o axônio era desprovido de revestimento de mielina e o aspecto característico de um axônio ao nível nodal é a presença de um revestimento eletrodense sobre a superfície interna do axolema, e este revestimento interno é essencial para identificação precisa de fibras seccionadas a este nível, entretanto, quando não aparente, é impossível distinguir perfis nodais de fibras nervosas amielínicas, outra característica da fibra seccionada ao nível nodal é o aumento de perfis de microtúbulos no axoplasma. As fibras amielínicas eram menores em diâmetro e podem estar agrupadas ou isoladas, possuem o axoplasma pálido e é possível visualizar neurofilamentos, microtúbulos e mitocôndrias.

4.3.2. Desenvolvimento ultra-estrutural normal do nervo óptico

O início da mielinização dos axônios das células ganglionares da retina tem início aos 7 dias de idade e foi verificado que aos 18 dias de idade muitas fibras já passaram por este processo. Entretanto, a grande maioria das fibras ainda continua em processo de mielinização ou está sem o revestimento de mielina; as fibras mielínicas variam em área, podendo ser divididas em fibras de pequeno ou grande calibre. A espessura da bainha de mielina também varia, mas sem uma classificação específica, existindo fibras de pequeno calibre com bainhas delgadas ou com bainhas espessas, o mesmo ocorre para fibras de grande calibre, isso acontece principalmente porque o processo de mielinização ainda está em processo nesta

idade. Fibras mielínicas com excesso de revestimento são encontradas, podendo ser o resultado da formação continuada de mielina, formando revestimentos demasiadamente grandes para a área do axônio. A causa dos axônios com excesso de mielina é desconhecida (Figura 2).

Os animais com 21 dias de idade apresentam maior quantidade de axônios revestidos pela bainha de mielina quando comparados com os animais de 18 dias. Além da maior quantidade de fibras mielínicas, os axônios são maiores e a bainha de mielina mais espessa. Presume-se que nesta fase entre o dia 18 e o dia 21 do desenvolvimento, novos axônios foram envolvidos por mielina, e os axônios já antes encapsulados, cresceram em diâmetro e seus envoltórios se tornaram mais espessos (Figura 3).

O processo de mielinização do nervo óptico é finalizado ao fim da quinta semana de idade, sendo que aos 32 dias de idade poucos axônios sem o envoltório de mielina foram encontrados nos nervos ópticos de ratos mantidos com dieta adequada em ferro, indicando que nesta idade o processo está quase finalizado. A quantidade de fibras de grande calibre nesta idade parece ser maior quando comparado com os animais de 21 dias de idade. Além disso, a bainha de mielina parece mais grossa nos axônios de grande calibre, mas não nos de pequeno calibre. O que indica que nesta fase final do desenvolvimento os axônios crescem em diâmetro, mas seus envoltórios não se tornam mais espessos (Figura 4).

Figura 2. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 18 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e não estimulados. (A) Duas células gliais são mostradas, um astrócito aparece abaixo na imagem com núcleo claro e com cromatina dispersa, mas justaposta nas bordas do envelope nuclear, rico em citoplasma, é possível notar suas organelas como mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático; acima na imagem um oligodendrócito com núcleo irregular, pequeno, bastante escuro e com cromatina condensada, neste perfil não foi possível notar muito de seu citoplasma. É possível observar, quatro fibras revestidas por bainhas muito grandes para seus axônios, e são referidas com excesso de revestimento (Seta). A área das fibras mielínicas pode variar, sendo possível classificá-las em fibras de pequeno calibre (B - Seta) e fibras de grande calibre (C- Seta). (D) As fibras mielínicas seccionadas ao nível do nodo de Ranvier, os axônios são desprovidos de revestimento e o aspecto característico de um axônio ao nível nodal é a presença de um revestimento denso sobre a superfície interna do axolema; este revestimento interno é essencial para identificação precisa de fibras seccionadas a este nível, entretanto, quando não aparente, é impossível distinguir perfis nodais de fibras nervosas amielínicas (Cabeça de seta). As fibras mielínicas seccionadas ao nível paranodal são revestidas por uma fina bainha que está separada do axônio por um anel de citoplasma contínuo e bem definido, deixando o axônio bem centralizado (Seta). Em contraste, (E) as fibras mielínicas que foram seccionadas ao nível internodal são identificadas pelo compacto revestimento de mielina (Seta). (F) Dois exemplos de fibras seccionados ao nível paranodal sendo possível notar as incisuras de Schmidt-Lanterman (Seta). As fibras amielínicas são menores em diâmetro e também possuem o axoplasma pálido e é possível visualizar neurofilamentos, microtúbulos e mitocôndrias (Cabeça de seta). Barra de escala = 2 μ m em A-C; 1 μ m em D-F.

Figura 3. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 21 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e não estimulados. Maior quantidade de fibras com envoltório de mielina é encontrado nestes animais em comparação com animais de 18 dias. A área das fibras mielínicas é variado, sendo possível encontrar fibras mielínicas de grande calibre (A - Seta) e fibras mielínicas de pequeno calibre (B - Seta). É possível notar fibras que foram seccionadas ao nível paranodal (C e D; Seta), entretanto, surgem em menor quantidade que nos animais de 18 dias. Fibras amielínicas também são encontradas com facilidade nesta idade (E – Retângulo). Um exemplo de fibra mielínica seccionada de forma oblíqua e excluída da análise quantitativa por não passar no critério de inclusão feito pelo índice de circularidade do axônio (E – Seta). Barra de escala = 2 μ m em A e B; 1 μ m em C-E.

Figura 4. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 32 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e não estimulados. Foram encontradas nesta idade grande quantidade de fibras mielínicas, de pequenos e grandes calibres (A e B) e somente poucas fibras sem o revestimento de mielina foram evidenciadas (C-E - Seta). Nesta idade, algumas fibras apresentavam alterações no envoltório de mielina, como afrouxamento da bainha de mielina (F-H – Seta). Um exemplo de fibra mielínica seccionada de forma oblíqua e excluída da análise quantitativa por não passar no critério de inclusão feito pelo índice de circularidade do axônio está em destaque na figura (I – Seta). Barra de escala = 2 μ m em A e B; 1 μ m em C-I.

4.3.3. Efeito da dieta deficiente em ferro durante o desenvolvimento do nervo óptico

A deficiência de ferro leva as fibras mielínicas a sofrerem uma série de alterações, geralmente iniciadas com a degeneração da bainha de mielina. A alteração mais comumente causada pela deficiência de ferro é o afrouxamento (divisão) lamelar, que aos 18 dias de idade, a extensão desta alteração ultraestrutural pode variar desde casos leves onde o afrouxamento divide poucas lamelas de mielina, até casos extremos onde o afrouxamento divide várias lamelas. Nesta fase inicial da degeneração das fibras das células ganglionares da retina, o axônio ainda está saudável (Figura 5).

Ainda aos 18 dias de idade, outra alteração do revestimento de mielina associada a deficiência de ferro foi encontrada, as bolhas de mielina. Estas lesões são encontradas em menor quantidade que o afrouxamento lamelar. Os perfis de balões de mielina são considerados edemas que ocorrem entre as lamelas de mielina, com conteúdo geralmente claro, presume-se que as bolhas sejam formadas por fluido e por este motivo, na maioria dos casos o axônio é achatado contra um dos lados da protuberância formada entre as lamelas. O tamanho das bolhas encontradas foi variado. Poucos axônios foram encontrados em processo de degeneração nesta idade, sendo mais comuns os danos na bainha de mielina (Figura 5).

Aparentemente, os ratos de 21 dias de idade mantidos com dieta deficiente em ferro apresentam menor quantidade de fibras mielínicas quando comparado com ratos mantidos com dieta adequada em ferro. As lesões identificadas foram mais graves comparadas aos ratos de 18 dias de idade, indicando progressão das lesões. Foram encontrados envoltórios com frouxidão que variavam de leves até casos graves. Fibras com excesso de mielina também eram comuns nos nervos ópticos destes animais. Nesta idade também foram identificados axônios em processo de degeneração, com vacúolos no axoplasma (Figura 6).

Os animais de 32 dias de idade e mantidos com dieta deficiente em ferro apresentam grande desorganização tecidual, com fibras em vários estágios de degeneração. Todos os tipos de degeneração citados foram encontrados nesta idade; fibras com afrouxamento lamelar, bolhas de mielina, axônios edemaciados. Alguns axônios apresentavam vacúolos no axoplasma e todos os vacúolos possuíam perfis arredondados, o que indica que estes vacúolos são esféricos. Vacuolização no tecido conjuntivo entre as fibras também foram comumente encontrados, possuindo tamanho e formato irregular (Figura 7). É possível notar que perfis de fibras de grande calibre com finos envoltórios de bainha de mielina e também uma grande quantidade de fibras seccionadas em nível paranodal, o que pode ser um indicativo de uma tentativa de remielinização.

Figura 5. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 18 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados. (A-C) Várias fibras apresentam revestimento de mielina com afrouxamento das lamelas, sendo esta consequência mais comum encontrada nos animais deficientes em ferro (Seta). (D) Outra lesão do revestimento de mielina encontrado com bastante frequência foi a formação das bolhas de mielina, característicos pelo acúmulo de fluido entre as lamelas gerando uma protuberância que pode ou não achatá-lo (Seta). (E) É possível distinguir fibras mielínicas seccionadas em todos os níveis: ao nível do nodo de Ranvier, ao nível paranodal, ao nível intermodal. Além disso, notam-se fibras mielínicas de pequeno calibre (Seta) e grande calibre (Cabeça de seta) e também fibras amielínicas (Retângulo). (F) Em destaque várias lesões, incluindo afrouxamento da mielina, bolha de mielina (Cabeça de seta), vacúolos no axoplasma (Seta) e no tecido conjuntivo. Barra de escala = 2µm em A-D; 1µm em E-F.

Figura 6. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 21 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados. Foram encontradas nesta idade maior quantidade de fibras mielínicas, de pequenos e grandes calibres, comparado aos animais de 18 dias indicando progressão do processo de mielinização. (A e B) Lesões nos envoltórios de mielina foram encontradas com facilidade, como o afrouxamento das lamelas de mielina (Seta) e as bolhas de mielina (Cabeça de seta) que empurram o axônio para as extremidades. Também é possível encontrar vacúolos no tecido conjuntivo (C – Seta) e no axoplasma (D – Seta). Fibras mielínicas com excesso de revestimento são encontradas (D e E – Cabeça de seta), podendo ser o resultado da formação continuada de mielina, formando revestimentos demasiadamente grandes para a área do axônio. (F e G) É possível observar lesões graves na bainha de mielina de alguns axônios. Barra de escala = 2µm em A, B e G; 1µm em C-F.

Figura 7. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 32 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados. Maior quantidade de fibras com envoltório de mielina é encontrado nestes animais em comparação com os animais da idade anterior, indicando que mesmo nos animais deficientes em ferro a progressão do processo de mielinização ocorre. (A e B) Lesões nos envoltórios de mielina foram encontradas com facilidade, como o afrouxamento das lamelas de mielina (Seta) e as bolhas de mielina (Cabeça de seta) que empurram o axônio para as extremidades, entretanto as lesões nessa fase ocorrem com maior frequência e com mais gravidade. (C) É possível notar um perfil de uma fibra de grande calibre com fino envoltório de mielina (Seta) e um perfil de uma fibra de pequeno calibre com separação grave das lamelas de seu envoltório de mielina. (D – Seta) Vacuolizações no axoplasma (Seta) e entre as lamelas formando bolhas (Cabeça de seta) são facilmente encontradas. (E) É possível observar lesões graves nesta idade, como axônios edemaciados e com um fino envoltório de mielina (Cabeça de seta) ou mesmo um envoltório de mielina vazio com apenas fragmento do remanescente do axônio (Seta). Barra de escala = 2µm em A-C; 1µm em D-I.

4.3.4. Efeito da estimulação tátil durante o desenvolvimento do nervo óptico

Aos 18 dias de idade, o nervo óptico dos animais mantidos com dieta adequada em ferro e estimulados apresentam características semelhantes aos animais não estimulados, exceto pela aparente maior quantidade de fibras com revestimento de mielina; muitos axônios de pequeno e grande calibre revestidos com mielina foram encontradas, perfis de fibras seccionadas em nível internodal, paranodal e nodal são facilmente visualizados na figura 8. Nesta idade, como nos nervos ópticos de animais não estimulados, foram encontradas fibras mielínicas com excesso de revestimento. A estimulação tátil, aparentemente não alterou a espessura da bainha de mielina nesta idade, sendo possível encontrar fibras finas com revestimentos finos ou espessos, e o mesmo para as fibras de grande calibre.

Os nervos ópticos de ratos estimulados aos 21 dias de idade apresentam maior quantidade de fibras mielínicas quando comparados com ratos de 18 dias de idade, indicando que o desenvolvimento do processo de mielinização nesta idade está acontecendo normalmente. Aparentemente os ratos estimulados não possuem maior quantidade de fibras mielínicas comparado aos ratos não estimulados de idade pareada (Figura 9)

Com o processo de mielinização chegando a final, poucos axônios sem revestimento de mielina foram encontrados aos 32 dias de idade. Grande similaridade entre os animais estimulados e não estimulados foram encontradas, não sendo possível distinguir particularidades na análise ultra-estrutural qualitativa, fazendo-se necessário a análise quantitativa (Figura 10).

Figura 8. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 18 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e estimulados. A área das fibras mielínicas variou entre fibras de pequeno calibre (cabeça de seta) e fibras de grande calibre (Seta), e quantidade se mostrou, aparentemente, similar aos animais ANTS de idade pareada (A). Fibras com revestimento de mielina excessivo foram encontradas, apontando para uma formação continuada de mielina, resultando em revestimentos demasiadamente grandes para a área do axônio (B - Setas). Foi possível notar fibras mielínicas que foram seccionadas ao nível internodal, identificadas pelo compacto revestimento de mielina (C - Seta), em contraste, é possível notar fibras mielínicas seccionadas ao nível paranodal, identificadas por uma fina bainha que está separada do axônio por um anel de citoplasma bem definido, deixando o axônio centralizado (D - Cabeça de seta). Notam-se fibras amielínicas isoladas (E – Seta) ou em grupos (Retângulo). Além disso, é possível identificar fibras de pequeno calibre com revestimentos de mielina que variavam entre finos e espessos (G e H). Barra de escala = 2 μ m em A-D; 1 μ m em E-H.

Figura 9. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 21 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e estimulados. Maior quantidade de fibras com envoltório de mielina foi encontrada nestes animais em comparação com animais de 18 dias. Nota-se que a área das fibras mielínicas foi variado, sendo possível encontrar fibras mielínicas de grande calibre (A, B e C - Seta) e fibras mielínicas de pequeno calibre (A, B e C – Cabeça de seta). Um exemplo de fibra seccionada ao nível paranodal sendo possível notar as incisuras de Schmidt-Lanterman (D – Cabeça de seta), outro exemplo encontrado foi o de uma fibra com revestimento de mielina separado e com axônio apresentando fragmentos, indicando processo de degeneração da fibra (D - Seta). Fibras sem o revestimento de mielina foram encontradas em menor número e dispostas em grupos pequenos (E – Retângulo) ou isoladas (F e G – Seta). Fibras mielínicas de grande calibre foram encontradas com mais facilidade nesta idade (H – Cabeça de seta). Barra de escala = 2µm em A e C; 1µm em B e D-H.

Figura 10. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 32 dias, mantidos com dieta adequada em ferro e estimulados. Foram encontradas nesta idade grande quantidade de fibras mielínicas, de pequenos (A e B - Seta) e grandes calibres (A e B – Cabeça de seta) e somente poucas fibras sem o revestimento de mielina foram evidenciadas (C e D - Seta). Nesta idade, algumas fibras apresentavam alterações no envoltório de mielina, como afrouxamento da bainha de mielina (E e F – Seta). Barra de escala = 2 μ m em A e B; 1 μ m em C-F.

4.3.5. Efeito da estimulação tátil durante o desenvolvimento do nervo óptico de ratos deficiente em ferro

Aos 18 dias de idade os nervos ópticos dos animais mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentavam várias alterações características, como o afrouxamento das lamelas e poucos vacúolos ou axônios com indicação de degeneração. Entretanto, o tecido se mostra melhor organizado e com menos lesões quando comparados com os ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados de idade pareada, indicando um possível efeito protetor (Figura 11). Nesta idade, animais mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentavam, aparentemente, maior quantidade de axônios mielínicos comparados com os ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados, entretanto, menor quantidade que comparados com os ratos mantidos com dieta adequada em ferro. Tais indicações sugerem que o efeito remediativo, apesar de presente, não foi eficiente o bastante para levar o tecido a recuperação completa.

Os ratos de 21 dias de idade mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentam menor quantidade de fibras mielínicas quando comparado com ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados de 18 dias, mostrando um desenvolvimento bastante adequado. Quando comparados com os ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados, os animais apresentam processo de mielinização mais acentuado, espelhando os resultados dos animais mantidos com dieta adequada em ferro e não estimulados. As lesões identificadas nos nervos dos ratos de 21 dias de idade não foram mais graves comparadas com a idade passada. Foram encontrados envoltórios com frouxidão que variavam de leves até casos graves independentemente da área da fibra. Fibras com excesso de mielina também foram comumente encontradas no nervo óptico destes animais. Ainda nesta idade também foram identificados poucos axônios em processo de degeneração, com vacúolos no axoplasma (Figura 12), diferentemente dos animais mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados. Estas características mostram que o efeito protetor permanece aos 21 dias.

Os animais de 32 dias de idade e mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentam maior quantidade de fibras com envoltórios mielínicos comparados com os ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados, indicando que o atraso do processo de mielinização causado pela deficiência de ferro pode ser revertido pela estimulação tátil, todavia, não completamente pois os ratos mantidos com dieta adequada em ferro apresentam maior quantidade de fibras mielínicas. Os nervos destes animais ainda apresentam lesões como vacuolizações no tecido conjuntivo e nos axônios, também foram encontradas fibras em

vários estágios de degeneração, mas sempre em menor quantidade quando comparados com ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados (Figura 13).

Em todas as idades, grande quantidade de fibras seccionadas em nível paranodal e nodal foi identificada, podendo ser um indicativo de remielinização.

Figura 11. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 18 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados. Nesta idade, aparentemente, maior quantidade de axônios com revestimento de mielina foi identificada quando comparada com a quantidade de fibras no nervo óptico dos ratos mantidos com dieta deficiente em ferro e não estimulados de idade pareada, entretanto, menor quantidade quando comparada com os ratos mantidos com dieta adequada em ferro (A – C). Um exemplo de fibra mielínica seccionada de forma oblíqua e excluída da análise quantitativa por não passar no critério de inclusão feito pelo índice de circularidade do axônio (D – Seta). Vacuolização no tecido conjuntivo entre as fibras foram encontrados com dificuldade, possuindo tamanho e formato irregular (E – Cabeça de seta). Foi possível evidenciar fibras com revestimento de mielina com afrouxamento das lamelas, sendo esta consequência mais comum encontrada nos animais deficientes em ferro (E - Seta). Grande quantidade de fibra ainda não apresenta revestimento de mielina (F). Um exemplo de fibra mielínica seccionada ao nível paranodal (G - Seta) e um exemplo de fibra seccionada de forma oblíqua (H – Seta). Barra de escala = 2µm em A-D; 1µm em E-H.

Figura 12. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 21 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados. Foram encontradas nesta idade maior quantidade de fibras mielínicas, de pequenos e grandes calibres, comparado aos animais de 18 dias indicando progressão do processo de mielinização (A - D). Lesões nos envoltórios de mielina foram encontradas com facilidade, como o afrouxamento das lamelas de mielina e as bolhas de mielina que empurram o axônio para as extremidades (E – Cabeça de seta) e também é possível encontrar vacúolos no tecido conjuntivo (E – Seta). Fibras mielínicas com excesso de revestimento foram encontradas (F – Seta), podendo ser o resultado da formação continuada de mielina, formando revestimentos demasiadamente grandes para a área do axônio. Um exemplo de fibra com lesão grave no axônio e no revestimento de mielina (G). Barra de escala = 2 μ m em A-D; 1 μ m em E-G.

Figura 13. Electronmicrografia da ultraestrutura das fibras mielínicas e amielínicas no nervo óptico de ratos de 32 dias, mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados. Maior quantidade de fibras com envoltório de mielina é encontrado nestes animais em comparação com os animais da idade anterior, indicando que mesmo nos animais deficientes em ferro a progressão do processo de mielinização ocorre de maneira perceptível. Com facilidade notam-se lesões nos envoltórios de mielina, entretanto a quantidade de lesões encontradas nestes animais é menor em comparação com os animais deficientes em ferro e não estimulados, o que indica um efeito remediativo (A - C). É possível notar fibras de grande calibre e fibras de pequeno calibre e também poucas fibras sem o envoltório de mielina (D - G). Um exemplo de uma fibra com vacúolo no axoplasma (H - Seta) e com afrouxamento da lamela (I - Seta). Foi possível observar lesões graves nesta idade, como dois exemplos de axônios em processo de degeneração, apresentando fragmentos no axoplasma (J - Seta). Barra de escala = 2µm em A-C; 1µm em D-J.

4.4. Quantificação Ultraestrutural do Nervo Óptico

4.4.1. Área e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo óptico

Em P18, P21 e P32, a área da secção transversal do nervo óptico e o diâmetro mínimo foram semelhantes entre os filhotes com a mesma idade, mantidos em dieta adequada ao ferro ou com deficiência de ferro. Não foram observadas diferenças significativas na área da secção transversal do nervo óptico e diâmetro mínimo quando os ratos estimulados foram comparados com ratos não estimulados com a mesma idade. Assim, estes resultados indicam que a dieta deficiente em ferro e a estimulação tátil não alteraram a área do nervo óptico.

4.4.2. Número de fibras amielínicas do nervo óptico

Houve um efeito significativo do fator dia ($F = 2,32$; $P < 0,001$), indicando uma diminuição da densidade de fibras amielínicas relacionada à idade em todos os grupos ($P < 0,05$), apontando para o progresso do processo de mielinização das fibras e como a deficiência de ferro pode atrasá-lo, pois a diminuição do número de fibras amielínicas no nervo óptico dos filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro apresentou regressão suave, indicando uma taxa de mielinização inferior comparado aos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro.

A ANOVA também mostrou que houve efeito do fator dieta ($F (1,16) = 182,794$; $P < 0,001$), indicando que a densidade de fibras amielínicas no nervo óptico de filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro era significativamente maior em todas as idades estudadas em comparação com ratos mantidos com dieta adequada em ferro de idade pareada ($P < 0,001$). Houve também efeito do fator estimulação ($F (1,16) = 75,878$; $P < 0,001$) que mostra que os filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentaram regressão acentuada das fibras amielínicas do nervo óptico que se assemelha aos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro. Apesar da diminuição da densidade de fibras amielínicas do nervo óptico de filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados, aos P32 dias de idade a semelhança se perde, e a densidade de fibras foi significativamente maior que a densidade de fibras dos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro, sugerindo que mesmo estes animais apresentando uma recuperação da velocidade de mielinização a estimulação tátil não foi suficiente para normalizar este processo celular (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico do total de fibra amielínicas do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras amielínicas de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.3. Número de fibras mielínicas do nervo óptico

Com base no índice de circularidade (sendo que o índice de um círculo perfeito é 1.0), apenas as fibras cortadas transversalmente que apresentam índice maior que 0.6 foram incluídas nas medições. Este método de exclusão resultou em 2713 fibras mielínicas medidas nos nervos ópticos de filhotes do grupo ANTS, 2828 fibras mielínicas do grupo ATS, 2696 fibras mielínicas de filhotes do grupo DNTS e 2622 fibras mielínicas de filhotes do DTS grupo. O total foi de 10859 fibras mielínicas, que posteriormente foram organizadas em fibras de pequeno calibre ($n = 7318$) e grande calibre ($n = 3541$), de acordo com a área do axônio (axônio com área menor ou maior que $0,3 \mu\text{m}^2$).

Os dados incluídos nesta sessão foram analisados sem a divisão entre as fibras de pequeno calibre e grande calibre do nervo óptico dos filhotes estudados.

4.4.4. Número total de fibras mielínicas do nervo óptico

A análise estatística da densidade de fibras mielínicas totais do nervo óptico indicou efeito do fator dia ($F(2,32) = 50,02$; $P < 0,001$), mostrando um aumento progressivo da quantidade de fibras mielínicas ao longo das idades estudadas para todos os grupos (P

$<0,001$), apontando para o desenvolvimento do processo de mielinização do nervo óptico. Apesar do aumento total de fibras ao longo das idades estudadas, o número de fibras mielínicas foi afetado pelo fator dieta ($F(1,16) = 73,07$; $P < 0,001$), resultando em uma redução de fibras mielínicas no nervo óptico dos filhotes deficientes em ferro, em comparação com os ratos mantidos em uma dieta adequada em ferro de idade pareada e em todas as idades ($P < 0,001$), indicando um possível atraso do desenvolvimento da mielina no nervo óptico dos filhotes deficientes em ferro. Em contraste, a análise estatística mostrou um efeito do fator estimulação ($F(1,16) = 7,27$; $P < 0,05$), sugerindo um efeito protetor da estimulação tátil, confirmado pelo fato de que enquanto a dieta deficiente de ferro diminuiu, a estimulação tátil aumentou a densidade total de fibras mielinizadas no nervo óptico dos filhotes do grupo deficiente, mas estimulado, nos dias P21 e P32 ($P < 0,001$) resultando em uma densidade comparável aos ratos mantidos com uma dieta adequada em ferro de idade pareada. Este não foi o caso no dia P18 ($P = 0,83$), onde se nota uma diminuição das fibras mielinizadas (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico do total de fibra mielínicas do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 6 e 8 eletromicrografias/animal com aumento final de 5,0000x e 10,000x, respectivamente, foram quantificadas. * $p < 0,05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.5. Taxa de mielinização do nervo óptico

Em posse do número total de fibras mielínicas e amielínicas, a taxa de mielinização do nervo óptico dos filhotes foi calculada para cada animal e idade. A análise revelou que houve efeito do fator dia ($F(2,32) = 1999,66$; $P < 0,001$) e demonstrou que a taxa de mielinização foi progressiva para todos os grupos, entretanto a progressão da taxa de mielinização nos animais mantidos com dieta deficiente em ferro foi menor quando comparada à taxa de mielinização dos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro. Os filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentaram uma melhora significativa na progressão da taxa, mas não alcançou a normalidade em nenhuma das idades. Nos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro e não estimulados (os controles), a taxa de mielinização se mostrou acentuada, sendo que aos P18 dias de idade os filhotes possuíam 41,5% das fibras já com o envoltório de mielina, aos P21 dias de idade os filhotes possuíam 68,4% e aos P32 dias de idade, os filhotes alcançaram 89,6% das fibras já mielinizadas. Os filhotes mantidos com dieta adequada e estimulados apresentaram uma taxa de mielinização similar aos filhotes não estimulados, sendo que estes possuíam 41%, 71,3% e 93,8% das fibras já mielinizadas aos P18, P21 e P32, respectivamente (figura 16 A).

A análise estatística revelou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 918,63$; $P < 0,001$) mostrando que os filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro apresentaram uma taxa anormal de mielinização em todas as idades ($P < 0,001$). Os dados revelaram que apenas 28,3% das fibras estava mielinizadas aos P18 dias de idade e apenas 46,8% aos P21 dias de idade. No último dia analisado, somente 66,2% das fibras estavam mielinizadas e tal percentagem é comparável aos filhotes controles de 21 dias de idade.

Houve efeito do fator estimulação ($F(1,16) = 205,43$; $P < 0,001$) mostrando que os filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentaram taxa de mielinização estatisticamente superior quando comparados com os filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro sem estimulação. Entretanto, quando comparados aos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro de idade pareada, é possível notar que mesmo com uma melhora significativa da taxa de mielinização os filhotes ainda apresentaram uma taxa de mielinização inferior, não alcançando a taxa de mielinização de animais controle. Revelando que a proteção imposta pela estimulação tátil foi parcial, neste parâmetro analisado. Para estes animais, os dados revelaram que 34% das fibras estava mielinizada aos P18 dias de idade e 65% aos P21 dias de idade. No último dia analisado, 77,4% das fibras se mostravam com o envoltório de mielina (Figura 16 B).

Figura 16 - Gráficos da taxa de mielinização do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e a taxa de mielinização foi obtida por meio da proporção de fibras mielínicas/amielínicas do nervo óptico. **A** - * $p < 0.05$ indica efeito do fator dia. **B** - * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6. Histograma e correlação de distribuição de frequência

Os dados obtidos da área do axônio, área da fibra, área da mielina e razão-G foram reunidos para a construção de histogramas de distribuição de frequência. Este tratamento dos

dados teve o intuito de mostrar se as medidas possuem uma distribuição dependente de idade, da dieta ou da estimulação. Os histogramas de distribuição de frequência da área do axônio, área da fibra, área da mielina foram separados em intervalos de classe de $0.05 \mu\text{m}^2$. Além disso, foi realizada a correlação entre a espessura da bainha de mielina e da razão-G com o diâmetro do axônio.

4.4.6.1. Histograma da área dos axônios

O histograma de distribuição da área dos axônios do nervo óptico dos animais estudados está representado na figura 17 e mostra uma distribuição similar entre os grupos com o pico entre $0,1$ a $0,2 \mu\text{m}^2$ em todos os grupos aos P18. Aos P21 e P32, o pico variou entre $0,05$ a $0,15 \mu\text{m}^2$ em todos os grupos. Não foram observadas diferenças na distribuição da área dos axônios do nervo óptico quando os grupos foram comparados, sendo que todos os grupos, em todas as idades apresentam uma distribuição unimodal deslocada para a esquerda, indicando que a maioria dos axônios tinha entre $0,1$ e $0,45 \mu\text{m}^2$.

Figura 17. Histograma da área dos axônios das fibras do nervo óptico aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS (terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletronicografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6.2. Histograma da área das fibras

O histograma da área das fibras do nervo óptico mostrou similaridade entre as fibras de todos os grupos e idades estudado, como apresentado na figura 18. O gráfico mostra que existe uma uniformidade de frequência, deixando a distribuição com certo grau de achatamento e com cauda longa. Mesmo assim, a distribuição mostra que todos os grupos e em todas as idades apresentam uma distribuição unimodal deslocada para a esquerda, indicando que a maioria dos axônios tinha entre 0,2 e 0,45 μm^2 .

Figura 18. Histograma da área das fibras do nervo óptico aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS (terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletromicrografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6.3. Histograma da área da mielina

Mais uma vez o histograma de distribuição mostra similaridade entre os grupos estudados, como mostra a figura 19. Os dados de frequência da área da mielina das fibras do nervo óptico indicam que o pico variou entre 0,1 a 0,2 μm^2 em todos os grupos e idades deixando a distribuição deslocada para a esquerda com formato unimodal. Somente nas idades de P32, os gráficos de distribuição apresentavam uma cauda longa o que indica que com o progresso do desenvolvimento a área da mielina aumentava.

Figura 19. Histograma da área da mielina das fibras do nervo óptico aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS (terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletronicografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6.4. Histograma da Razão-G

O histograma de distribuição da razão-G das fibras do nervo óptico dos animais estudados está representado na figura 20 e mostra grande similaridade entre os grupos com o pico entre 0.8 e 0.85 em todos os grupos, entretanto foi observada uma variação de distribuição entre 0.6 até 9.5. Não foram observadas diferenças na distribuição da razão-G das fibras do nervo óptico quando os grupos foram comparados, sendo que todos os grupos, em todas as idades apresentam uma distribuição unimodal deslocada para a direita, indicando que a maioria das fibras apresentava uma razão-G alta.

Figura 20. Histograma da razão-G das fibras do nervo óptico aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS (terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletronicografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6.5. Correlação da Espessura da bainha de mielina/Diâmetro do axônio

A correlação espessura da bainha de mielina / diâmetro do axônio das fibras do nervo óptico dos animais estudados está mostrado na figura 21. A espessura da bainha de mielina de cada fibra avaliada está representada na figura por um ponto preto (•) e a grande maioria das fibras avaliadas possuíam baixa espessura da bainha de mielina e axônios com pequenos calibres, o que leva a um acúmulo de pontos pretos na parte inferior esquerda do gráfico, esses dados também sugerem que essas fibras possuem uma alta razão-G. Também foi

possível observar, nos animais com P32 dias, fibras que foram mensuradas e que apresentavam alta espessura de mielina e axônios com grandes diâmetros, essas fibras são representadas pelos pontos pretos na parte superior direita do gráfico, esses dados também indicam uma alta razão-G. Os dados de razão-G foram distribuídos na figura anterior (figura 20)

Por último, é ainda possível observar poucas fibras com alta espessura de mielina e axônios com pequenos diâmetros ou baixa espessura de mielina e axônios com grandes diâmetros, com os pontos pretos distribuídos na parte superior esquerda e inferior direita, respectivamente. Com esses dados é possível deduzir que essas fibras apresentam uma baixa razão-G.

Figura 21. Gráfico de dispersão da correlação da Espessura da bainha de mielina/Diâmetro do axônio aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS

(terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletronicografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. A espessura da bainha de mielina de cada fibra mensurada está representada no gráfico por um ponto preto (•). Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.6.6. Correlação da Razão-G/Diâmetro do axônio

Está mostrado na figura 22 a correlação razão-G / diâmetro do axônio das fibras do nervo óptico dos animais estudados. A Razão-G de cada fibra avaliada está representada na figura por um ponto preto (•) e a grande maioria das fibras avaliadas possuíam alta razão-G e pequeno diâmetro de axônio, o que leva a um acúmulo de pontos pretos na parte superior esquerda do gráfico, esses dados também sugerem que essas fibras possuem uma alta condutibilidade. Nos animais com P32 dias foi possível observar uma maior extensão de variabilidade, sendo possível notar fibras com alta razão-G e grande diâmetro de axônio, esses dados são representados pelos pontos pretos na parte superior direita do gráfico e também indicam que são fibras com alta condutibilidade.

Por último, complementando os dados anteriores da correlação da espessura de mielina (figura 21) é ainda possível observar que quase não existem fibras com baixa razão-G tanto em axônios com pequeno ou grande diâmetro, essas fibras são representadas pelos pontos pretos distribuídos na parte inferior do gráfico. Com esses dados é possível deduzir que essas fibras apresentam uma baixa condutibilidade.

Figura 22. Gráfico de dispersão da correlação da razão-G / diâmetro do axônio aos P18 dias (coluna da esquerda), aos P21 dias (coluna central) e aos P32 dias de idade (coluna da direita) dos grupos ANTS (primeira linha), ATS (segunda linha), DNTS (terceira linha) e DTS (quarta linha). Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de 8 eletronicografias com aumento final de 10,000x foram mensuradas. A razão-G de cada fibra mensurada está representada no gráfico por um ponto preto (•). Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7. Fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico

Nesta sessão, somente fibras com axônios maiores que $0,3 \mu\text{m}^2$ foram incluídos para análise estatística.

4.4.7.1. Número de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico

A análise da densidade de fibras mielínicas de grande calibre (axônio com área maior que $0,3 \mu\text{m}^2$) revelou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 22,74$; $P < 0,001$), estimulação ($F(1,16)$

= 8,93; $P < 0,001$) e interação entre dieta e estimulação ($F_{1,16} = 9,89$; $P < 0,001$), demonstrando que os filhotes mantidos em dieta deficiente em ferro exibiram uma densidade reduzida de fibras de grande calibre em relação aos filhotes mantidos com dieta adequada em ferro de idade pareada e em todas as idades ($P < 0,05$; Figura 23). No entanto, enquanto a dieta deficiente de ferro resultou na diminuição da densidade de fibras mielínicas de grande calibre, a estimulação tátil resultou em um aumento da densidade de fibras no grupo mantido com dieta deficiente em ferro, mas estimulado, entretanto, a análise estatística só revelou significância aos P18 ($P < 0,05$), mas não aos P21 ($P = 0,060$) e nem aos P32 dias de idade ($P < 0,084$).

Figura 23 - Gráfico da densidade de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0,05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7.2. Área de axônios de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico

A análise da área de axônios de grande calibre revelou um efeito significativo do fator dieta ($F_{1,16} = 75,99$, $P < 0,001$). Mais especificamente, houve uma diminuição da área dos axônios grandes em resposta à deficiência de ferro nos dias P21 e P32 ($P < 0,05$), mas não no dia P18 ($P < 0,56$). A análise também mostrou um efeito significativo do fator estimulação ($F_{1,16} = 6,37$, $P < 0,05$). No entanto, a estimulação tátil também reduziu a área dos grandes axônios nos dias P21 e P32 ($P < 0,05$). Além disso, os animais mantidos com uma dieta com

deficiente em ferro e estimulados não apresentaram uma correção desses parâmetros, exibindo o mesmo área de axônio em relação aos ratos de idade pareada mantidos em dieta deficiente em ferro sem tratamento de estimulação. Estes resultados indicam que as fibras mielínicas de grande calibre foram menos afetadas pelo tratamento de estimulação tátil do que as fibras mielínicas de pequeno calibre na avaliação da área do axônio (Figura 24).

Figura 24 - Gráfico da área do axônio de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas os axônios de fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0,05$ indica efeito do fator dieta. ** $p < 0,05$ indica efeito do fator estimulação. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7.3. Área de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico

A análise da área de fibras de grande calibre revelou um efeito significativo do fator dieta ($F(1,16) = 4,63$, $P < 0,05$), indicando que os ratos mantidos em uma dieta deficiente em ferro apresentaram área reduzida de fibras de grande calibre nos dias P21 e P32 ($P < 0,05$). Não houve efeitos significativos do fator estimulação ($F(1,16) = 0,123$, $P = 0,73$ n.s) nem uma interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 0,168$; $P = 0,68$ n.s) na análise da área de fibras de grande calibre, revelando que enquanto a dieta deficiente em ferro reduziu a área de fibras de grande calibre, o tratamento de estimulação tátil não aumentou (Figura 25).

Figura 25 - Gráfico da área das fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7.4. Área da mielina de fibras de grande calibre do nervo óptico

Não houve efeito do fator dieta ($F(1,16) = 0,487$, $P = 0,49$ n.s) ou fator estimulação ($F(1,16) = 0,017$, $P = 0,89$ n.s), nem interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 0,010$, $P = 0,92$ n.s). Houve apenas um efeito significativo da idade ($F(2,32) = 18,26$, $P < 0,001$), indicando um aumento relacionado com a idade na área da mielina ocorrido em ratos mantidos em uma dieta adequada ao ferro, apontando para o desenvolvimento da área da mielina ($P < 0,05$; Figura 26).

Figura 26 - Gráfico da área da mielina de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todos os envoltórios de fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7.5. Espessura da bainha de mielina de fibras de grande calibre do nervo óptico

A análise não mostrou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 0,271$, $P = 0,60$ n.s) e nem do fator estimulação ($F(1,16) = 0,001$, $P = 0,97$ n.s). Nenhuma interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 0,459$, $P = 0,50$ n.s) foi mostrada pela ANOVA. Houve apenas um efeito significativo relativo ao fator idade ($F(2,32) = 12,45$, $P < 0,001$), indicando um aumento relacionado com a idade na espessura da bainha de mielina que ocorreu em ratos mantidos em uma dieta adequada ao ferro, apontando para o desenvolvimento da área da mielina ($P < 0,05$; Figura 27).

Figura 27 - Gráfico da espessura da bainha de mielina de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todos os envoltórios de fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.7.6. Razão-G de fibras de grande calibre do nervo óptico

A análise revelou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 7,65$, $P < 0,05$), indicando que os ratos mantidos em uma dieta deficiente em ferro apresentaram índice de razão-G reduzido, mas somente no P21 ($P < 0,05$). Não houve efeito do fator estimulação ($F(1,16) = 0,009$, $P = 0,77$ n.s) indicando que a estimulação não altera o índice de razão-G das fibras de grande calibre do nervo óptico (Figura 28). A análise também não revelou nenhum efeito de interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 0,92$, $P = 0,35$ n.s).

Figura 28 - Gráfico da razão-G de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas os axônios de fibras mielínicas de grande calibre de 8 eletromicrografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8. Fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico

Nesta sessão, somente fibras com axônios menores que $0,3 \mu\text{m}^2$ foram incluídos para análise estatística.

4.4.8.1. Número de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico

A análise estatística da densidade de fibras mielínicas de pequeno calibre (axônio com área menor que $0,3 \mu\text{m}^2$) do nervo óptico dos filhotes mostrou efeito do fator dia ($F(2,32) = 50,02$; $P < 0,001$), indicando um aumento progressivo da quantidade de fibras de pequeno calibre ao longo de todas as idades estudadas ($P < 0,001$), apontando para o desenvolvimento do processo de mielinização do nervo óptico. Apesar do aumento das fibras de pequeno calibre ao longo das idades estudadas, o número de fibras mielínicas de pequeno calibre foi afetado pelo fator dieta ($F(1,16) = 73,07$; $P < 0,001$), resultando em uma redução de fibras mielínicas no nervo óptico dos filhotes deficientes em ferro de idade pareada e em todas as idades ($P < 0,001$), indicando um possível atraso do desenvolvimento da mielina no nervo óptico dos filhotes deficientes em ferro. Houve também um efeito do fator estimulação ($F(1,16) = 7,27$; $P < 0,05$), mostrando que estimulação tátil aumentou a densidade de fibras de pequeno calibre em ratos mantidos em uma dieta deficiente em ferro o que sugere um efeito

protetor da estimulação tátil, indicando que enquanto uma dieta com deficiência de ferro diminuiu a densidade de fibras mielínicas de pequeno calibre, a estimulação tátil aumentou a densidade de fibras mielínicas de pequeno calibre em P21 e P32 ($P < 0,001$) resultando em uma densidade comparável aos filhotes mantidos em dieta adequada ao ferro, mas não ao P18 ($P < 0,83$; Figura 29).

Figura 29 - Gráfico da densidade de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletromicrografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0,05$ indica efeito do fator dieta. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8.2. Área de axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico

Os axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre foram afetados pelo fator dieta ($F(1,16) = 85,3$, $P < 0,001$), estimulação ($F(1,16) = 46,1$, $P < 0,001$) e interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 6,6$, $P < 0,05$). Estes resultados indicam que a área dos axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre foi significativamente reduzida no nervo óptico de ratos mantidos em uma dieta deficiente em ferro e, por outro lado, foi significativamente aumentado em ratos estimulados. De acordo com o teste *post-hoc*, a interação entre dieta e estimulação mostrou que o tratamento com estimulação tátil reverteu a redução de área causado pela deficiência de ferro em todas as idades estudadas ($P < 0,05$; Figura 30).

Figura 30 - Gráfico da área do axônio de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas os axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. ** $p < 0.05$ indica efeito do fator estimulação. # $p < 0.05$ indica efeito da interação entre dieta e estimulação. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8.3. Área de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico

A análise da área de fibras de pequeno calibre revelou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 245,5$, $P < 0,001$), sugerindo que comparado com os filhotes mantidos com uma dieta adequada, os filhotes mantidos com uma dieta deficiente, mostrou uma redução da área de fibras de pequeno calibre ($P < 0,001$). No entanto, os ratos estimulados apresentaram fibras de pequeno calibre significativamente maiores ($F(1,16) = 235,2$; $P < 0,001$), mas apenas em nos dias P21 e P32 ($P < 0,001$). Houve efeito da interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 9,7$; $P < 0,05$), mostrando que o tratamento com estimulação tátil reverteu a redução da área causado pela deficiência de ferro em todas as idades estudadas, resultando em uma área comparável ao de ratos mantidos com uma dieta adequada em ferro.

Figura 31- Gráfico da área das fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas as fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. ** $p < 0.05$ indica efeito do fator estimulação. # $p < 0.05$ indica efeito da interação entre dieta e estimulação. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8.4. Área da mielina de fibras de pequeno calibre do nervo óptico

Houve um efeito significativo do fator dieta ($F(1,16) = 109,7$; $P < 0,001$). A área da mielina das fibras de pequeno calibre de ratos mantidos com uma dieta deficiente em ferro foi significativamente reduzida em todas as idades estudadas ($P < 0,001$). Houve também um efeito significativo do fator estimulação ($F(1,16) = 87,0$; $P < 0,001$) e a área da mielina em ratos estimulados foi significativamente maior nos dias P21 e P32 ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento com estimulação tátil em ratos mantidos com uma dieta deficiente em ferro reverteu a redução da área de mielina em fibras de pequeno calibre em todas as idades estudadas ($P < 0,05$).

Figura 32 - Gráfico da área da mielina de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todos os envoltórios de fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. ** $p < 0.05$ indica efeito do fator estimulação. # $p < 0.05$ indica efeito da interação entre dieta e estimulação. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8.5. Espessura da bainha de mielina de fibras de pequeno calibre do nervo óptico

A análise revelou efeito do fator dieta ($F(1,16) = 118,6$, $P < 0,001$) indicando que a espessura da bainha de mielina das fibras de pequeno calibre de ratos mantidos com uma dieta deficiente em ferro foi significativamente menor em todas as idades estudadas ($P < 0,001$). Houve também um efeito significativo do fator estimulação ($F(1,16) = 127,2$, $P < 0,001$), mostrando que as fibras de pequeno calibre do nervo óptico dos animais mantidos com dieta adequada e estimulados apresentam maior espessura da bainha de mielina nas idades P21 e P32 ($P < 0,001$) e os animais mantidos com dieta deficiente em ferro e estimulados apresentaram espessura comparável aos animais controles em todas as idades.

Houve também um efeito significativo da idade ($F(2,32) = 130,4$, $P < 0,001$), indicando um aumento da espessura da bainha de mielina relacionado com a idade, apontando para o desenvolvimento da mielina ($P < 0,05$).

Figura 33 - Gráfico da espessura da bainha de mielina de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todos os envoltórios de fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. * $p < 0.05$ indica efeito do fator dieta. ** $p < 0.05$ indica efeito do fator estimulação. # $p < 0.05$ indica efeito da interação entre dieta e estimulação. Valores são médias $\pm$ EPM.

4.4.8.6. Razão-G de fibras de pequeno calibre do nervo óptico

Não houve efeito do fator dieta ($F(1,16) = 3,6$, $P = 0,07$ n.s) ou fator estimulação ($F(1,16) = 7,2$, $P = 0,89$ n.s), nem interação entre dieta e estimulação ($F(1,16) = 0,05$, $P = 0,50$ n.s). A análise também não revelou efeito significativo da idade ($F(2,32) = 22,3$, $P < 0,79$). Os resultados indicaram que tanto a dieta ou a estimulação não afetaram o índice de razão-G nas fibras de pequeno calibre dos animais estudados.

Figura 34 - Gráfico da razão-G de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico aos P18 dias, aos P21 dias e aos P32 dias de idade dos grupos ANTS, ATS, DNTS e DTS. Cada grupo incluiu 5 animais e todas os axônios de fibras mielínicas de pequeno calibre de 8 eletronicografias/animal com aumento final de 10,000x foram quantificadas. Valores são médias $\pm$ EPM.

No presente estudo, abordamos a possibilidade de prevenir mudanças ultraestruturais no conjunto de fibras do nervo óptico de ratos deficientes em ferro expostos a uma experiência enriquecedora imediatamente após a introdução da dieta deficiente. A análise ocorreu em três fases: 18 dias de idade, quando a mielinização se inicia; 21 dias de idade, quando a mielinização está em progresso; e 32 dias de idade, quando o processo de mielinização está praticamente finalizado. Os principais achados deste trabalho sobre o desenvolvimento das fibras do nervo óptico foram que a dieta deficiente em ferro resultou em (a) diminuição da taxa de mielinização com base na quantidade de fibras mielínicas e amielínicas, entretanto, (b) sem alteração da velocidade de condução com base na razão-G e na (c) distribuição da área das fibras. A estimulação tátil também produziu dados interessantes como a (d) normalização da taxa de mielinização de ratos deficientes em ferro. E por último, outro ponto a se considerar é que quando os dados são examinados separadamente, ou seja, divididos em fibras de pequeno e grande calibre, a análise mostrou que (e) as fibras de pequeno calibre parecem responder de forma mais robusta à deficiência de ferro e à estimulação tátil se comparadas com as fibras de grande calibre, indicando uma maior sensibilidade das fibras menores. A discussão dos resultados do presente estudo foi considerada separadamente, pensando na clareza e melhor entendimento para o leitor.

5.1. Efeito da deficiência de ferro nos dados ponderal e hematológico das ratas-lactantes

A avaliação do peso corporal das ratas-lactantes mostra que não houve efeito produzido pelo tratamento nutricional utilizado, uma vez que as ratas-lactantes dos grupos adequados e deficientes em ferro estavam sob a mesma condição nutricional e ponderal no início do experimento e demonstraram similaridades ao final do experimento. Estes resultados mostram que a utilização de uma dieta deficiente em ferro durante o período de amamentação não gera diferenças de peso corporal nas ratas-lactantes quando comparadas às ratas-lactantes mantidas com uma dieta adequada em ferro, sendo que resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores (Homem, 2004; Beard, et al., 2006; DeMaman, 2006; 2010; Lachat, 2010, Horiquni-Barbosa et al., 2017). Contudo, de forma estatisticamente significativa, as ratas-lactantes apresentaram perda progressiva de peso ao longo do período de amamentação em todos os grupos e independente da dieta utilizada.

A perda progressiva de peso das ratas-lactantes ao longo do período de lactação pode ser explicada pela utilização da massa corporal para produção e oferta de leite para os filhotes e pela alta demanda energética relacionada aos cuidados maternos, a consequência óbvia do

dispêndio energético da rata-lactante neste período é a perda de peso, como demonstrado no presente trabalho e corroborado por diversos outros estudos (Beard, et al., 2006; DeMaman et al., 2008; 2010; Horiqini-Barbosa e Lachat 2016; Horiqini-Barbosa et al., 2017).

Em ratos saudáveis, a taxa de referência de hemoglobina se aproxima de 14 g/dL e o percentual de hematócrito de 45 % (Suckow et al., 2005; Sharp e Villano, 2012), sugerindo que a dieta deficiente em ferro utilizada neste estudo induziu às ratas-lactantes a condição de anemia leve, uma vez que a taxa de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito se mostraram ligeiramente abaixo da normalidade nas datas analisadas. Os achados relativos à hematologia das ratas-lactantes obtidos no presente trabalho estão de acordo com resultados presentes na literatura (DeMaman et al., 2008; 2010; Horiqini-Barbosa e Lachat, 2016; Horiqini-Barbosa et al., 2017).

5.2. Efeito da estimulação tátil nos dados ponderal e hematológico de ratos deficientes em ferro

No presente estudo, a carência férrica materna experimental foi utilizada para induzir a deficiência de ferro nos filhotes lactentes, que em seguida foram desmamados e mantidos com a mesma dieta de suas respectivas ratas-lactantes. Foi utilizada a dieta com baixo teor férrico (4mg/kg) para provocar a deficiência de ferro e metodologias similares são empregada por vários outros autores na literatura, como Felt e Lozoff (1996), Beard, et al. (2002; 2006; 2007), DeMaman et al. (2008; 2010), Horiqini-Barbosa e Lachat, (2016) e Horiqini-Barbosa et al., (2017). A estimulação tátil neonatal utilizada neste estudo foi realizada individualmente, uma vez ao dia, com duração de 3 minutos/sessão, sendo este protocolo utilizado também por outros autores, como Santucci et al. (1994), Rocinholi et al. (1997), Rocinholi et al. (2008), Pereira-da-Silva et al. (2009) e também em artigos publicados pelo nosso laboratório (Horiqini-Barbosa e Lachat, 2016; Horiqini-Barbosa et al., 2017).

Os dados relativos ao peso corporal dos filhotes obtidos no presente estudo estão de acordo com resultados encontrados na literatura (DeMaman et al., 2008; Horiqini-Barbosa et al., 2017). A avaliação do peso corporal no dia do nascimento confirma que todos os ratos recém-nascidos demonstraram a mesma condição nutricional no início do experimento. Durante o período de lactação, os resultados de peso corporal mostraram similaridade entre os filhotes do grupo adequado e deficiente em ferro, no entanto, tal similaridade se perde a partir do último dia de lactação e essa diferença se manteve até o último dia de análise de peso corporal, assim, o peso dos filhotes do grupo deficiente se mostrou significativamente menor quando comparado ao peso dos filhotes do grupo adequado. Apesar da similaridade durante a

lactação e a discrepância do peso após esse período, todos os filhotes, independente do tratamento dietético, demonstraram aumento progressivo do peso corporal ao longo das semanas de avaliação. No entanto, a curva de crescimento nos filhotes do grupo adequado foi mais acentuada quando comparada com a curva de crescimento dos filhotes do grupo deficiente.

Diversos trabalhos existentes na literatura demonstram que um insulto nutricional produzido pela baixa disponibilidade de proteína na dieta da rata-lactante influencia de modo significativo a taxa de crescimento dos filhotes durante a lactação (Prestes-Carneiro et al., 2006; Valadares et al., 2010). Deste modo, O'Connor et al., (1988) analisaram o leite produzido por ratas-lactantes que se alimentavam com dieta deficiente em ferro (8mg/kg de ferro) e concluíram que o leite produzido por essas ratas anêmicas possuíam baixa concentração de ferro e baixa quantidade de gordura quando comparado com o leite das ratas mantidas com dieta adequada em ferro, todavia, a quantidade de proteína se apresentava similar entre os leites das ratas anêmicas e ratas controle. Além disso, esses autores observaram que os filhotes de ninhadas com ratas-lactantes anêmicas demonstraram maior ingestão diária de leite. Sendo assim, a quantidade equivalente de proteína entre os leites e a maior taxa de lactação nos filhotes do grupo deficiente pode ser uma possível explicação para a similaridade de peso entre os filhotes dos grupos adequada e deficiente durante o período de lactação. Resultados constatados por Los Monteros et al., (2000) corroboram os resultados de peso corporal aqui discutidos, que através de um procedimento de amamentação artificial com leite deficiente em ferro preparado em laboratório, não obteve efeito no peso corporal dos ratos amamentados. A diferença no peso corporal dos filhotes do grupo deficiente, que teve início ao final da lactação, se manteve durante o período pós-lactação, sendo que dados semelhantes foram observados em outros estudos (Beard, et al., 2006, DeMaman, 2008).

Com relação a influencia da estimulação tátil no peso corporal dos filhotes, a análise mostrou que não houve diferenças entre os filhotes estimulados e não estimulados, resultado esse que corrobora os estudos de Silveira et al., (2004; 2006), Imanaka et al. (2008), Horiqini-Barbosa e Lachat (2016) e Horiqini-Barbosa et al. (2017). No entanto, em contraste aos achados deste estudo, alguns autores relatam o aumento de peso corporal em animais que foram expostos à estimulação tátil (Panagiotaropoulos et al., 2004; Soares et al., 2012). O peso corporal entre filhotes que são expostos a diferentes ambientes é uma questão ainda mal resolvida, pois o resultado pode ser afetado por variáveis simples. Pesquisas sugerem evidências que poderiam explicar o aumento de peso corporal, mostrando que a rata-lactante de filhotes que foram expostos à estimulação tátil tem a frequência do

comportamento materno aumentado e por consequência a relação mãe-filhote se torna mais aguçada. Sendo assim, uma vez que elas exibem maior frequência e duração do comportamento de lambar os filhotes e também exibem com maior frequência o *arched-back nursing*, caracterizado pela amamentação com o arco dorsal aumentado, isso poderia induzir o aumento de peso durante o período de lactação, pois os filhotes teriam acesso ao leite durante mais tempo (Levine, 1994; Liu et al., 1997; Pryce et al., 2001; Garoflos et al., 2008).

Adicionalmente aos dados de peso corporal, os filhotes do grupo deficiente apresentaram concentrações de hemoglobina e porcentagem de hematócrito muito abaixo dos níveis dos filhotes do grupo adequado em ferro, indicando que a baixa quantidade de ferro na dieta empregada foi capaz de induzir, ao final do período experimental, a condição de anemia severa, que é considerada presente em ratos, quando a concentração de hemoglobina associada a porcentagem de hematócrito atingem níveis abaixo de 6 g/dL e 24% respectivamente (Schalm et al., 1975; Tanaka et al., 1995; Beard et al., 2003). Dados similares foram relatados por outros pesquisadores (Beard, et al, 2006; DeMaman, 2008; DeMaman et al., 2010).

5.3. Efeito da estimulação tátil no número total de fibras do nervo óptico de ratos deficientes em ferro

Não foram encontradas diferenças significativas nos dados de área e de diâmetro mínimo da secção transversal do nervo óptico de ratos em idade pareada e em nenhuma das variáveis analisadas, sugerindo que a deficiência de ferro e a estimulação tátil neonatal não causam alterações macroscópicas no nervo óptico. Resultados semelhantes já foram relatados em estudos que expunham ratos a diferentes ambientes como a estimulação tátil utilizada aqui (Horiquni-Barbosa e Lachat 2016; Horiquni-Barbosa et al., 2017) e a um ambiente enriquecido (Barbosa et al., 2016); essas medidas também foram investigadas em ratos mantidos com dieta deficiente em proteína (Almeida e Guedes 2008; Barbosa et al., 2016) e deficiente em ferro (DeMaman et al 2008; Horiquni-Barbosa et al., 2017) em idades precoces e também não levaram a nenhuma mudança significativa.

O desenvolvimento do sistema nervoso central envolve uma sucessão de eventos extremamente coordenados, que ocorrem em padrões temporais determinados (Rice e Barone, 2000; Nicolay et al., 2007). Inicialmente as células neurais precursoras se diferenciam, dando origem as células progenitoras neuronais e progenitoras gliais, assim, estas células dão origem aos neurônios e as células gliais, os astrócitos e os oligodendrócitos imaturos. Mais tarde, ocorre a maturação dos oligodendrócitos, que se estendem e passam a envolver o axônio dos

neurônios, dando origem a mielina do sistema nervoso central (Rowitch e Kriegstein, 2010; Garzon-Muvdi e Quinones-Hinojosa, 2010; Takebayashi e Ikenaka, 2015). Esses eventos que ocorrem durante o desenvolvimento cerebral não são apenas determinados por um plano genético, mas pela forte interação entre fatores genéticos e ambientais, que tem um efeito crucial no cérebro em desenvolvimento e como consequência, se reflete na função (Sale et al., 2009). Durante este período, o sistema nervoso torna-se extremamente plástico e altamente sensível às mudanças ambientais que podem modificar esses processos celulares de desenvolvimento (Kolb e Whishaw 1998; Landi et al. 2007a, b; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012).

Diversos artigos na literatura discutem como a nutrição adequada durante este período crítico é um fator essencial que garante o desenvolvimento estrutural e funcional normal do cérebro (Rice e Barone, 2000). E, embora não exista dúvida de que todos os nutrientes são essenciais para um desenvolvimento neurológico adequado, o ferro parece desempenhar um papel importante neste período (Alamy e Bengelloun, 2012). Uma dieta deficiente em ferro durante o desenvolvimento do cérebro pode resultar em mudanças estruturais inadequadas e, consequentemente, déficits comportamentais (Valadares e Sousa Almeida, 2005; Fukuda et al., 2007; Valadares et al., 2010; Pacagnella et al., 2013; Barbosa et al., 2016). Um dos processos celulares do desenvolvimento que sofre com as consequências da deficiência de ferro é a mielinização, como demonstrado em várias pesquisas.

No presente estudo, o nervo óptico foi examinado no início, no pico e ao final do processo de mielinização, sendo assim, permitindo a possibilidade de analisar as mudanças ultraestruturais decorrente da falta de ferro ao longo do desenvolvimento, além disso, permitindo a análise dos efeitos positivos da estimulação ambiental. Na análise qualitativa do nervo óptico dos filhotes do grupo mantido com dieta deficiente foi possível observar vários tipos de lesões nas fibras mielínicas, como o afrouxamento das lamelas, fibras com excesso de mielina e bolhas de mielina. Em idade avançada foi possível notar vacúolos no axoplasma das fibras mielínicas e axônios edemaciados ou degenerados. Alterações ultraestruturais similares foram encontradas na citoarquitetura do nervo óptico de ratos submetidos a outros tipos de deficiências de metais, como zinco (Gong e Amemiya, 2001), cobre (Dake e Amemiya, 1991), manganês (Gong e Amemiya, 1999), cádmio (Demir et al., 2003) e magnésio (Gong et al., 2003). Deste modo, nossos dados confirmam a importância de elementos traço e contribui para um melhor entendimento do desenvolvimento normal e a mielinização desse nervo craniano. Outro fator importante a se considerar é que parece haver uma ordem hierárquica de acontecimentos em nossos achados, sendo que o envoltório de mielina parece demonstrar

lesões em momentos mais precoces e somente em análise na idade mais avançada foi possível notar maior densidade de lesões nos axônios, o que pode indicar que os oligodendrócitos são células mais sensíveis à falta de ferro quando comparadas aos axônios das células ganglionares da retina, que compõem o nervo óptico. Tal observação pode estar relacionada com a necessidade que os oligodendrócitos possuem de utilizar o ferro para a síntese de proteínas relacionadas a mielina, como a proteína básica de mielina e proteína proteolípídica da mielina que são essenciais para a produção e manutenção dos envoltórios de mielina (Todorich et al., 2009; Franco et al., 2015).

Ainda em relação a análise qualitativa ultraestrutural, o tecido dos animais mantidos com uma dieta deficiente em ferro e tratados com estimulação tátil apresentava uma melhor organização estrutural com formação de feixes de fibras mais compactos e robustos, o que indica uma possível aceleração do desenvolvimento do nervo óptico, sendo que suas fibras mielínicas se mostravam, aparentemente, maiores e em maior quantidade quando comparadas aos animais mantidos com uma dieta deficiente em ferro e sem nenhum tratamento, dados qualitativos mostrando os efeitos positivos da estimulação tátil sobre o desenvolvimento do sistema visual são encontrados na literatura (Horiqini-Barbosa e Lachat 2016), entretanto, utilizando microscopia de luz. Como já comprovado por vários pesquisadores as estruturas do sistema visual não é diferente do resto do sistema nervoso, sendo assim, também apresentam um programa de desenvolvimento influenciado por fatores genéticos bem como por fatores ambientais. (Hooks e Chen 2007; Morishita e Hensch 2008; Horiqini-Barbosa e Lachat 2016). A interação entre genes e ambiente durante o desenvolvimento do sistema visual foi alvo de estudos clássicos realizados por David Hubel e Torsten Wiesel (Nobel de Fisiologia e Medicina em 1981), da qual se ocupavam em investigar principalmente as consequências da redução de experiências visuais. Nestes estudos, ratos e gatos foram submetidos ao ambiente empobrecido (no escuro) ou a privação monocular resultando em alterações anatômicas e funcionais do sistema visual, o que levou os autores a cunharem o termo “período crítico” do desenvolvimento do sistema visual de mamíferos (Wiesel e Hubel 1963; Hubel e Wiesel 1970). Por outro lado, os estudos mais recentes lançam mão de estratégias para investigar os efeitos de experiências positivas durante o desenvolvimento do sistema visual, como é o caso de utilização de ambientes enriquecidos e a estimulação sensorial. Nestas pesquisas atuais, os resultados revelam que, por meio de dados comportamentais em tarefas de discriminação visual, o ambiente enriquecido acelera a maturação do sistema visual (Cancedda et al., 2004) e isso foi confirmado posteriormente por meio de dados eletrofisiológicos (Landi et al., 2007a), como conclusão esses autores atribuem a maturação acelerada do sistema visual ao

aumento da síntese de fatores neurotróficos e confirmam essa hipótese em outra pesquisa, que demonstra que animais mantidos em ambiente enriquecido possuem elevados níveis de BDNF e que o desenvolvimento do sistema nervoso desses animais se assemelha ao desenvolvimento de animais transgênicos que superexpressam essa neurotrofina (Landi et al., 2007b).

Desta forma, as características observadas nos animais estimulados do presente estudo, podem estar associadas ao aumento da síntese de fatores de crescimento como BDNF, IGF, NGF e o FGF-2 que a estimulação tátil neonatal pode gerar, como já comprovado por pesquisadores (Liu et al., 1997; Pham et al., 1997; Weaver et al., 2004; Guzzetta et al., 2009; Sale et al., 2009; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012). Além disso, a aparente maior quantidade de fibras mielínicas pode ser explicada por um mecanismo adicional ao aumento dos fatores tróficos acima citados, pois, estudo indica que o ambiente enriquecido na fase neonatal pode diminuir a intensidade do processo de morte celular programada, desta forma, resultando em um aumento da quantidade final de fibras por consequência de um menor aparamento celular (Young et al., 1999). A melhora observada nos animais deficientes em ferro, mas tratados com estimulação, pode estar relacionada a associação entre o aumento da liberação de fatores de crescimento e a diminuição da morte celular programada, entretanto, não existem trabalhos que mostram o nível de apoptose em ratos que foram submetidos à estimulação tátil neonatal.

A análise quantitativa das fibras mielínicas e amielínicas do nervo óptico no presente estudo confirmam as observações morfológicas acima discutidas sendo possível observar que os filhotes do grupo deficiente apresentavam maiores quantidades de fibras amielínicas e menores quantidades de fibras mielínicas quando comparados aos filhotes mantidos com dieta adequada, além disso, os filhotes do grupo deficiente e tratados com estimulação tátil apresenta uma melhora estatisticamente significativa desses dados. Os dados relacionados à taxa de mielinização no presente estudo são resultantes de razão entre os dados de densidade de fibras amielínicas e fibras que já possuem o envoltório de mielina, com isso, é possível analisar o surgimento progressivo da mielina. A análise mostrou que os filhotes do grupo deficiente em ferro apresentavam alta densidade de fibras amielínicas e baixa densidade de fibras mielínicas se comparado aos filhotes do grupo mantido com dieta adequada de idade pareada, desta forma, quando calculada a razão entre as fibras amielínicas e mielínicas, os filhotes do grupo deficiente apresentam uma baixa taxa de mielinização ao longo das análises, indicando um atraso no processo de mielinização em todos os períodos estudados. Estes dados confirmam que uma dieta balanceada em ferro garante um processo adequado de mielinização no nervo óptico. Além disso, estudos prévios do nosso laboratório reportam que ratos

mantidos com uma dieta deficiente em ferro durante o período de desenvolvimento cerebral pós-natal experienciaram robustas modificações morfológicas, que incluem, por exemplo, a diminuição no número de oligodendrócitos (Horiqini-Barbosa et al 2017), desta forma, a diminuição na taxa de mielinização dos animais do presente estudo pode estar relacionada com o desenvolvimento alterado dos oligodendrócitos, que ocorre a partir do período embrionário mas principalmente no início do período pós-natal precoce por meio de diferenciação de células precursoras que migram e se proliferam no nervo óptico (Barres e Raff, 1994; Bergles e Richardson, 2016), justamente o período utilizado para a introdução da deficiência de ferro nos ratos do presente estudo.

Sendo assim, é possível que a deficiência de ferro utilizada no neste estudo tenha influenciado a densidade de oligodendrócitos no nervo óptico por meio de alterações em etapas do seu desenvolvimento, como por exemplo, alterando o número inicial de células precursoras ou o número de mitoses realizadas durante a proliferação, além disso, a disponibilidade de fatores mediadores de sobrevivência também pode ter sido afetada pela falta de ferro (Barres e Raff, 1999; Horiqini-Barbosa, 2016). Outro ponto a se destacar ainda sobre o desenvolvimento das células responsáveis pela mielinização do Sistema Nervoso Central, os oligodendrócitos, é que o número final dessas células também é regulado pela morte celular fisiológica programada, e de acordo com Barres et al., (1992) aproximadamente metade dos novos oligodendrócitos formados sofrem apoptose durante o desenvolvimento. É claro que a partir dos nossos trabalhos que mostram uma redução do número de oligodendrócitos devido à falta de ferro ainda é impossível concluir, com certeza, o real motivo ou qual desses processos está sendo afetado pela falta deste componente nutricional, e também é de nosso entendimento que mais estudos são necessários para esclarecer como os mecanismos de maturação foram afetados.

Os filhotes do grupo deficiente em ferro e tratados com estimulação tátil mostraram melhora significativa da taxa de mielinização, pois apresentavam maior densidade de fibras mielínicas e menor densidade de fibras amielínicas se comparado aos filhotes do grupo mantido com dieta deficiente sem tratamento e de idade pareada, deste modo, esses dados indicam um melhor desenvolvimento da mielina do nervo óptico desses animais. Sobretudo, mesmo com melhora significativa da taxa de mielinização, esses filhotes ainda apresentavam uma taxa inferior à encontrada nos filhotes do grupo mantidos com dieta adequada. Mais uma vez, esses dados podem estar associados ao desenvolvimento dos oligodendrócitos, visto que a estimulação tátil pode levar ao aumento da síntese de fatores de crescimento (Liu et al.,

1997; Pham et al., 1997; Weaver et al., 2004; Guzzetta et al., 2009; Sale et al., 2009; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012).

Múltiplas sinalizações estão associadas ao desenvolvimento do oligodendrócitos e a mielinização, incluindo neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento, e dessa longa lista, fazem parte o IGF e o FGF. O IGF é produzido no fígado e despejado na circulação sanguínea, podendo chegar ao encéfalo assim que ultrapassa a barreira hemato-encefálica, muito embora, o IGF também seja produzido por células do sistema nervoso. Esse fator trófico tem um papel importante não só na sobrevivência de oligodendrócitos imaturos, mas também é considerado um dos principais fatores que promovem o amadurecimento dos oligodendrócitos e consequentemente a produção de mielina (McMorris et al., 1986, 1993; Armstrong et al., 1992; Jiang et al., 1999; D'Ercole e Ye, 2008; Paula et al., 2014). Outros estudos corroboram a informação que o IGF pode influenciar a mielinização, uma vez que ratos transgênicos que superexpressam esse fator de crescimento apresentam uma hipermielinização do sistema nervoso. Em contrapartida, mas ainda na mesma linha de explicação, animais *knockouts* para o gene IGF (*null mutation*) apresentam uma grande redução no número de oligodendrócitos que leva a uma hipomielinização (Carson et al., 1993; Beck et al., 1995; Jiang et al., 1999; Luzi et al 2004; Zeger et al., 2007).

Estudos mostram que os níveis de IGF no sistema nervoso também estão relacionados à experiência. D'Ercole e Ye (2008), por exemplo, mostraram que os níveis de IGF no cérebro de ratos podem aumentar em resposta ao exercício físico. Outros estudos demonstraram aumento no nível de IGF no córtex visual, córtex auditivo, cerebelo e retina de ratos em resposta à estimulação tátil (Sale et al., 2004; Ciucci et al., 2007; Guzzetta et al., 2009; Sale et al., 2009). Essas pesquisas mostrando uma ligação entre o ambiente e o desenvolvimento do sistema nervoso pode explicar os achados no presente estudo, uma vez que os animais deficientes em ferro e estimulados apresentam uma recuperação da taxa de mielinização.

Outras pesquisas que apoiam os nossos achados, demonstram que a estimulação tátil pode levar um aumento do FGF (Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012), que é produzido na pele e também ultrapassa barreira hemato-encefálica para alcançar as células do sistema nervoso. É provado que o FGF promove a proliferação dos progenitores de oligodendrócitos o que também poderia explicar a recuperação da taxa de mielinização dos ratos deficientes em ferro e tratados com estimulação tátil. Visto que os dois fatores tróficos atuam na mielinização e que a estimulação tátil pode aumentar suas sínteses, é difícil determinar qual deles teve

maior relevância nos resultados encontrados aqui, e isso não exclui a possibilidade de que esses fatores de crescimento estejam atuando em conjunto.

Outro ponto importante a se destacar é que estudos apontam para um aumento do número de vasos sanguíneos no nervo óptico de ratos estimulados durante a fase pós-natal precoce, por meio do ambiente enriquecido ou mesmo a estimulação tátil (Barbosa et al., 2016; Horiquni-Barbosa e Lachat, 2016). Isso poderia facilitar a entrega dos fatores IGF e FGF nesta estrutura. Deste modo, os resultados relacionados à taxa de mielinização corroboram e indicam que o processo de mielinização apresentam mudanças dependentes de experiências, entretanto, este efeito remediativo parece apresentar limitações, pois, apesar da melhora, estes animais estimulados ainda apresentavam taxa de mielinização inferior aos animais mantidos com dieta adequada.

No presente estudo, observamos uma redução na área do axônio e na área da fibra e também uma redução na área da bainha de mielina de fibras do nervo óptico de ratos mantidos com dieta deficiente em ferro, porém, esses dados são mais proeminentes em fibras de pequeno calibre e não em fibras de grande calibre. Entretanto, utilizando histogramas de distribuição de frequência foi possível notar que as fibras do nervo óptico, quando não separadas entre pequeno e grande calibre, apresentavam comportamento de distribuição similar em todas as medidas. Isso indica que houve um encolhimento nas fibras do nervo óptico de filhotes mantidos com uma dieta deficiente em ferro, mas isso não alterou a distribuição de frequência das fibras. Além disso, não houve um distúrbio nos dados da razão-G, que marcaram valores aproximados de 0.8 em todos os grupos. Esta similaridade entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da bainha de mielina das fibras do nervo óptico dos animais aqui estudados pode ser compreendida, pois houve uma proporcional diminuição de área tanto nos axônios como em seus envoltórios de mielina, fazendo com os valores da razão diâmetro do axônio/mielina se mantivessem proporcionais, o que levou à similaridade de valores.

A razão entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra é amplamente utilizada como um índice funcional e estrutural da ótima mielinização do axônio e pode variar entre 0 e 1. Inicialmente foi estimada uma razão-G ideal de 0.6 com base na velocidade de condução, entretanto, após vários estudos utilizando essa estratégia estrutural como índice funcional concluiu-se que valores marcando 0.6 estão mais relacionados ao sistema nervoso periférico e não ao sistema nervoso central que atinge valores de ~0.77 (Chomiak e Hu, 2009), deste modo, exibindo um valor muito próximo do encontrado no presente estudo. É claro que o nervo óptico é uma estrutura que didaticamente é incluída como parte do sistema nervoso periférico, mas esta estrutura apresenta características de uma estrutura do sistema nervoso central desde

seu surgimento embrionário que ocorre a partir da vesícula Diencefálica até sua mielinização, que é realizada por oligodendrócitos e não por células de Schwann (Martin, 2014). Lee et al., (2012) utilizando uma dieta deficiente em ferro desde o período gestacional também revela dificuldades em correlacionar as alterações na velocidade de condução e os defeitos ultraestruturais como a razão-G e a espessura da mielina em outro nervo craniano, o nervo auditivo de ratos. Mesmo assim, esses autores foram capazes de encontrar, assim como no presente estudo, um atraso na maturação adequada dos axônios baseando-se na área do axônio.

5.4. Efeito da estimulação tátil nas fibras de grande calibre do nervo óptico de ratos deficientes em ferro

Com relação à análise quantitativa de fibras mielínicas de grande calibre do nervo óptico no presente estudo, foi encontrada uma menor quantidade de fibras mielínicas em filhotes mantidos com uma dieta deficiente em ferro quando comparada aos filhotes mantidos com dieta adequada, além disso, os filhotes do grupo deficiente e tratados com estimulação tátil apresenta uma melhora estatisticamente significativa desses dados, a ponto de normalizar a quantidade de fibras mielínicas de grande calibre, espelhando os dados dos animais controle. Esses repetem a mesma dinâmica de quando os dados são analisados em conjunto, tanto fibras de pequeno calibre como fibras de grande calibre, sendo assim, a explicação para esses dados são os mesmos. Do qual, a deficiência de ferro pode alterar a mielinização através das mudanças geradas no desenvolvimento dos oligodendrócitos (Horiquni-Barbosa et al., 2017) enquanto que a estimulação tátil, como já demonstrada pode aumentar a síntese de fatores que contribuem para o adequado desenvolvimento da mielina (Sale et al., 2004; Ciucci et al., 2007; Guzzetta et al., 2009; Sale et al., 2009; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012)

Além da diminuição na densidade de fibras mielínicas, os animais mantidos com uma dieta deficiente em ferro apresentaram menores axônios de grande calibre quando comparados aos animais mantidos com dieta adequada em ferro, e mesmo após o tratamento esses resultados se mantiveram, deste modo, indicando que a estimulação tátil não reverte essa alteração induzida nos axônios de grande calibre. Quando a análise é feita medindo a área da fibra, os resultados se repetem, e também mostram que os animais mantidos com dieta deficiente em ferro possuem fibras menores comparados com animais mantidos com dieta adequada em ferro e essas diferenças se mantiveram nos animais estimulados. Isso mostra que

a estimulação tátil não foi capaz de reverter as mudanças na área dos axônios e fibras de grande calibre.

Estudos prévios indicam que os neurofilamentos são componentes estruturais com importante papel na determinação do diâmetro axonal e que o aumento do diâmetro do axônio de fibras mielínicas durante o desenvolvimento cerebral reflete o aumento da quantidade de neurofilamentos no axoplasma (Pant e Veeranna, 1995), deste modo, segundo os achados de Lee et al. (2012), animais mantidos com dieta deficiente em ferro apresentam diminuição significantes na quantidade de neurofilamentos e na quantidade de proteínas que regulam a fosforilação dos neurofilamentos em axônios do nervo auditivo, o que pode explicar nossos achados que demonstram uma diminuição do calibre do axônio.

Apesar da diminuição no numero de fibras mielínicas de grande calibre, a área e a espessura da bainha de mielina se mantiveram similares em todos os períodos analisados. O mesmo foi encontrado para os valores da razão-G. Não podemos excluir a possibilidade de que o as fibras de grande calibre são menos sensíveis à deficiência de ferro e à estimulação tátil, entretanto, isso representa uma hipótese que não podemos verificar, uma vez que os dados coletados aqui não permite esta análise. Sugerimos que mais estudos sejam realizados a fim de responder tais questionamentos. Lee et al. (2012) também levantam a possibilidade que a deficiência de ferro poderia levar a uma perda seletiva de axônios de áreas específicos.

5.5. Efeito da estimulação tátil nas fibras de pequeno calibre do nervo óptico de ratos deficientes em ferro

A análise quantitativa de fibras mielínicas de pequeno calibre do nervo óptico mostra que foi encontrada uma menor quantidade de fibras mielínicas no nervo óptico de filhotes mantidos com dieta deficiente em ferro quando comparada aos filhotes mantidos com dieta adequada, além disso, essa alteração foi normalizada nos filhotes do grupo deficiente, mas tratado com estimulação tátil. Esses dados indicam mais uma vez que enquanto a deficiência de ferro causa mudanças no processo de mielinização, a estimulação tátil consegue atuar de modo a reverter tais seus efeitos negativos, mostrando que a estimulação tátil pode ser usada como uma estratégia para minimizar danos cerebrais, como vem sendo demonstrado na literatura (Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012; Horiquni e Lachat, 2016; Horiquni-Barbosa et al., 2017).

As fibras de pequeno calibre tiveram suas áreas axonais e áreas de fibras diminuídas como efeito da falta de ferro, esses resultados estão de acordo com dados de autores que

mostram uma diminuição no diâmetro axonal devido a uma baixa na quantidade de neurofilamentos (Lee et al., 2012). Entretanto, ao contrario do exposto em fibras de grande calibre, a estimulação tátil leva a uma melhora estatisticamente significativa desses dados, a ponto de normalizar a área dos axônios e de fibras mielínicas de pequeno calibre, espelhando os dados dos animais controle. Não sabemos o mecanismo que leva a essa recuperação da área do axônio e da fibra, mas esses dados podem corroborar nossa hipótese que as fibras de grande calibre apresentam menor sensibilidade em resposta à estimulação tátil uma vez que as fibras de pequeno calibre tiveram uma recuperação total das alterações relacionadas à deficiência de ferro.

Além da menor quantidade de fibras mielínicas de pequeno calibre, menor área de axônios e de fibras, os envoltórios de mielina nessas fibras também se mostraram alteradas em resposta a falta de ferro durante o desenvolvimento pós-natal precoce, com diminuição significativa da área e da espessura da bainha de mielina, diferente das fibras de grande calibre, outra vez sugerindo que as fibras de grande calibre apresentam menor sensibilidade à deficiência de ferro precoce. Apesar dessa alteração no envoltório de mielina nas fibras de pequeno calibre, a estimulação tátil gerou uma recuperação importante mostrando que essas fibras pequenas são sensíveis tanto a falta de ferro como a estimulação tátil. Aqui, é possível que a estimulação tátil, como já demonstrado, tenha aumentado a síntese de fatores de crescimento que colaboram para melhor desenvolvimento da mielina, como FGF ou o IGF (Sale et al 2004; Ciucci et al., 2007; Guzzetta et al., 2009; Sale et al., 2009; Gibb et al., 2010; Richards et al., 2012). Além dos fatores já descritos, estudo recente mostra que a estimulação tátil durante período precoce do desenvolvimento aumenta o numero de vasos sanguíneos no nervo óptico de ratos, o que também pode ter contribuído para uma recuperação do desenvolvimento da bainha de mielina, uma vez que o aporte sanguíneo influencia a proliferação e crescimento de células gliais locais (Skoff et al., 1980; DeMaman, 2008; Horiqini e Lachat, 2016; Horiqini-Barbosa et al., 2017).

Mesmo apresentando alterações ultraestruturais importantes como diminuição da área do axônio, da fibra, da mielina e da espessura da bainha, a Razão-G dessas fibras de pequeno calibre ainda se manteve similar entre os grupos.

Em geral, nossos dados permitem desenhar uma descrição ultraestutural das mudanças que ocorrem em fibras de pequeno e grande calibre do nervo óptico devido a uma dieta deficiente em ferro sustentada durante o desenvolvimento cerebral pós-natal precoce e a estimulação tátil durante mesmo período. Nossos resultados estão em concordância com os estudos prévios sobre o processo de mielinização do sistema nervoso central de ratos, tanto

mantidos com uma dieta adequada, quanto mantidos com uma deficiente em ferro, entretanto, nossos resultados adicionam perspectivas ao assunto, como a diferença de resultados entre fibras de pequeno e grande calibre, ou mesmo a possibilidade de observar os dados de modo progressivo, uma vez que as análises foram feitas em idades diferentes e progressivas. Além disso, a utilização da estimulação tátil aplicada durante o período pós-natal precoce gera efeito neuroprotetor contras as alterações relacionadas à deficiência de ferro, e isso também é encarado por nós como uma novidade.

Esses resultados enfatizam a noção de que o desenvolvimento cerebral pode ser moldado em idade precoce por fatores ambientais, como a estimulação sensorial fornecida pela estimulação tátil. Esses resultados podem ter implicações significativas para os bebês que estejam em risco de desenvolvimento cerebral perturbado. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos relacionados a esses efeitos neuroprotetores encontrados aqui.

A análise ponto a ponto deste trabalho permite estabelecer as seguintes conclusões:

- O modelo experimental utilizado, com dieta de 4mg de ferro/kg de ração, não induziu maior perda de peso das ratas-lactantes quando comparada as ratas-mães que foram mantidas com dieta adequada em ferro. Entretanto, essa dieta deficiente em ferro induziu anemia ferropriva leve nas ratas-lactantes, esses dados foram comprovados através da interação dos resultados obtidos nos exames hematológicos de concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito.
- Os filhotes amamentados por ratas-lactantes anêmicas apresentaram alteração do desenvolvimento ponderal, constatado pelo menor peso corporal em relação aos filhotes amamentados por ratas-lactantes não anêmicas. Além disso, os filhotes das ratas-lactantes anêmicas apresentaram anemia do tipo severa, confirmada através da interação dos resultados de concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito.
- O modelo experimental de estimulação neonatal por estimulação tátil, não foi eficaz no aumento de peso corporal entre os animais controle e nem sobre a recuperação do peso corporal dos filhotes anêmicos. Também não houve alteração dos resultados de concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito entre animais estimulados ou não estimulados.
- A taxa de mielinização foi altamente modificada pelo modelo experimental de dieta utilizado, resultando em atraso de mielinização baseado na razão entre fibras mielínicas e amielínicas. Por outro lado, a estimulação tátil foi capaz de reverter essas alterações.
- As fibras de grande calibre parecem ser menos sensíveis às modificações geradas pela deficiência de ferro e pela estimulação tátil. Por outro lado, as fibras de pequeno calibre são sensíveis tanto a falta de ferro como a estimulação tátil.

7 _____ *R*EFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS*

*De acordo com as normas da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Alamy, M., & Bengelloun, W. A. (2012). Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(6), 1463-1480.

Almeida, M. F. L., Silveira, A. C. D., Guedes, R. C. A., Hokoç, J. N., & Martinez, A. M. B. (2005). Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutritional neuroscience*, 8(2), 91-99.

Andrews, N. C., & Schmidt, P. J. (2007). Iron homeostasis. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 69-85.

Armstrong, R. C., Dorn, H. H., Kufta, C. V., Friedman, E., & Dubois-Dalcq, M. E. (1992). Pre-oligodendrocytes from adult human CNS. *Journal of Neuroscience*, 12(4), 1538-1547.

Barbosa, E. H., Soares, R. O., Braga, N. N., Almeida, S. D. S., & Lachat, J. J. (2016). Effects of environmental enrichment on blood vessels in the optic tract of malnourished rats: A morphological and morphometric analysis. *Nutritional neuroscience*, 19(5), 224-230.

Barbosa, E. H., Vallim, J. H., Lachat, J. J., & de Castro, V. L. S. (2016). Assessments of motor abnormalities on the grid-walking and foot-fault tests from undernutrition in Wistar rats. *Journal of motor behavior*, 48(1), 5-12.

Barres, B. A., & Raff, M. C. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 12(5), 935-942.

Barres, B. A., & Raff, M. C. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of cell biology*, 147(6), 1123-1128.

Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70(1), 31-46.

Beard, J. L., Connor, J. R., & Jones, B. C. (1993). Iron in the brain. *Nutrition reviews*, 51(6), 157-170.

Beard, J. L., Erikson, K. M., & Jones, B. C. (2002). Neurobehavioral analysis of developmental iron deficiency in rats. *Behavioural brain research*, 134(1), 517-524.

Beard, J. L., Felt, B., Schallert, T., Burhans, M., Connor, J. R., & Georgieff, M. K. (2006). Moderate iron deficiency in infancy: biology and behavior in young rats. *Behavioural brain research*, 170(2), 224-232.

Beard, J. L., Unger, E. L., Bianco, L. E., Paul, T., Rundle, S. E., & Jones, B. C. (2007). Early postnatal iron repletion overcomes lasting effects of gestational iron deficiency in rats. *The Journal of nutrition*, 137(5), 1176-1182.

Beard, J. L., Wiesinger, J. A., & Connor, J. R. (2003). Pre-and postweaning iron deficiency alters myelination in Sprague-Dawley rats. *Developmental neuroscience*, 25(5), 308-315.

Beck, K. D., Powell-Braxton, L., Widmer, H. R., Valverde, J., & Hefti, F. (1995). Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron*, 14(4), 717-730.

Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(2), a020453.

Boy, E., Mannar, V., Pandav, C., De Benoist, B., Viteri, F., Fontaine, O., & Hotz, C. (2009). Achievements, challenges, and promising new approaches in vitamin and mineral deficiency control. *Nutrition reviews*, 67(s1), S24-S30.

Brotanek, J. M., Gosz, J., Weitzman, M., & Flores, G. (2007). Iron deficiency in early childhood in the United States: risk factors and racial/ethnic disparities. *Pediatrics*, 120(3), 568-575.

Cancedda, L., Putignano, E., Sale, A., Vieg, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2004). Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *The Journal of neuroscience*, 24(20), 4840-4848.

Carson, M. J., Behringer, R. R., Brinster, R. L., & McMorris, F. A. (1993). Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron*, 10(4), 729-740.

Centers for Disease Control and Prevention. National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. <http://www.cdc.gov/>. Accessed September 7, 2017

Cheepsunthorn, P., Palmer, C., & Connor, J. R. (1998). Cellular distribution of ferritin subunits in postnatal rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 400(1), 73-86.

Chomiak, T., & Hu, B. (2009). What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PloS one*, 4(11), e7754.

Ciucci, F., Putignano, E., Baroncelli, L., Landi, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2007). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PloS one*, 2(5), e475.

Connor, J. R., & Menzies, S. L. (1996). Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*, 17(2), 83-93.

Connor, J. R., Menzies, S. L., Burdo, J. R., & Boyer, P. J. (2001). Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatric neurology*, 25(2), 118-129.

Conrad, M. E., & Umbreit, J. N. (2000). Iron absorption and transport—an update. *American journal of hematology*, 64(4), 287-298.

Cunniff, P. Official methods of analysis of AOAC International. Chap. 45, p. 58-63, 1995.

Dake, Y., & Amemiya, T. (1991). Electron microscopic study of the optic nerve in copper deficient rats. *Experimental eye research*, 52(3), 277-281.

de Oliveiraa, R. S., da Silva Dinizb, A., Benignac, M. J. C., Miranda-Silvaa, S. M., Lolaa, M. M., Gonçalvesa, M. C., ... & Santosd, L. M. P. (2002). Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. *Rev Saúde Pública*, 36(1), 26-32.

DeMaman, A. S. (2006). Análise morfolométrica do nervo óptico de ratos wistar após recuperação da anemia ferropriva. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DeMaman, A. S. (2010). Estudo ultraestrutural do nervo óptico de ratos wistar após recuperação da anemia ferropriva. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DeMaman, A. S., Melo, P., Homem, J. M., Tavares, M. A., & Lachat, J. J. (2010). Effectiveness of iron repletion in the diet for the optic nerve development of anaemic rats. *Eye*, 24(5), 901-908.

DeMaman, A., Homem, J., & Lachat, J. J. (2008). Early iron deficiency produces persistent damage to visual tracts in Wistar rats. *Nutritional Neuroscience*, 11(6), 283-289.

Demir, N., AKKOYUNLU, G., Yargicoglu, P., Agar, A., TANRIÖVER, G., & Demir, R. (2003). Fiber structure of optic nerve in cadmium-exposed diabetic rats: an ultrastructural study. *International journal of neuroscience*, 113(3), 323-337.

D'Ercole, A., & Ye, P. (2008). Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*, 149(12), 5958-5962.

Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. Early human development, 3(1), 79-83.

Drabkin, D. L. (1948). The standardization of hemoglobin measurement. *The American journal of the medical sciences*, 215(1), 110.

Erikson, K. M., Pinero, D. J., Connor, J. R., & Beard, J. L. (1997). Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *The Journal of nutrition*, 127(10), 2030-2038.

Felt, B. T., & Lozoff, B. (1996). Brain iron and behavior of rats are not normalized by treatment of iron deficiency anemia during early development. *Journal of Nutrition*, 126(3), 693-701.

Franco, P. G., Pasquini, L. A., Pérez, M. J., Rosato-Siri, M. V., Silvestroff, L., & Pasquini, J. M. (2015). Paving the way for adequate myelination: The contribution of galectin-3, transferrin and iron. *FEBS letters*, 589(22), 3388-3395.

Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., Hernandez, A. S., Valadares, C. T., & Almeida, S. S. (2007). Effects of early protein malnutrition and scopolamine on learning and memory in the Morris water maze. *Nutritional neuroscience*, 10(5-6), 251-259.

Garoflos, E., Stamatakis, A., Rafrogianni, A., Pondiki, S., & Stylianopoulou, F. (2008). Neonatal handling on the first postnatal day leads to increased maternal behavior and fos levels in the brain of the newborn rat. *Developmental psychobiology*, 50(7), 704-713.

Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Neural stem cell niches and homing: recruitment and integration into functional tissues. *ILAR journal*, 51(1), 3-23.

Gibb, R. L., Gonzalez, C. L., Wegenast, W., & Kolb, B. E. (2010). Tactile stimulation promotes motor recovery following cortical injury in adult rats. *Behavioural brain research*, 214(1), 102-107.

Gong, H., & Amemiya, T. (1999). Optic nerve changes in manganese-deficient rats. *Experimental eye research*, 68(3), 313-320.

Gong, H., & Amemiya, T. (2001). Optic nerve changes in zinc-deficient rats. *Experimental eye research*, 72(4), 363-369.

Gong, H., Takami, Y., & Amemiya, T. (2003). Ultrastructure of the optic nerve in magnesium-deficient rats. *Ophthalmic research*, 35(2), 84-92.

Greminger, A. R., Lee, D. L., Shrager, P., & Mayer-Pröschel, M. (2014). Gestational iron deficiency differentially alters the structure and function of white and gray matter brain regions of developing rats. *The Journal of nutrition*, 144(7), 1058-1066.

Guzzetta, A., Baldini, S., Bancalé, A., Baroncelli, L., Ciucci, F., Ghirri, P., ... & Maffei, L. (2009). Massage accelerates brain development and the maturation of visual function. *The Journal of Neuroscience*, 29(18), 6042-6051.

Gyllensten L, Malmfors T (1963) Myelination of the optic nerve and its dependence on visual function—a quantitative investigation in mice. *J Embryol Exp Morphol* 11(1):255–266

Homem, J. M. (2004). Efeitos da anemia ferropriva e da estimulação tátil sobre a morfologia do nervo óptico em ratos. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Hooks, B. M., & Chen, C. (2007). Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. *Neuron*, 56(2), 312-326.

Horiquni-Barbosa, E., & Lachat, J. J. (2016). Tactile stimulation during development alters the neuroanatomical organization of the optic nerve in normal rats. *Experimental brain research*, 234(6), 1737-1746.

Horiquni-Barbosa, E., Gibb, R., Kolb, B., Bray, D., & Lachat, J. J. (2017). Tactile stimulation partially prevents neurodevelopmental changes in visual tract caused by early iron deficiency. *Brain research*, 1657, 130-139.

Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *The Journal of physiology*, 206(2), 419-436.

Imanaka, A., Morinobu, S., Toki, S., Yamamoto, S., Matsuki, A., Kozuru, T., & Yamawaki, S. (2008). Neonatal tactile stimulation reverses the effect of neonatal isolation on open-field and anxiety-like behavior, and pain sensitivity in male and female adult Sprague-Dawley rats. *Behavioural brain research*, 186(1), 91-97.

Jiang, F., Levison, S. W., & Wood, T. L. (1999). Ciliary neurotrophic factor induces expression of the IGF type I receptor and FGF receptor 1 mRNAs in adult rat brain oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research*, 57(4), 447-457.

Kennedy, B. C., Wallin, D. J., Tran, P. V., & Georgieff, M. K. (2016). Long-term brain and behavioral consequences of early-life iron deficiency. In *Fetal Development* (pp. 295-316). Springer International Publishing.

Kolb, B., & Gibb, R. (2007). Brain plasticity and recovery from early cortical injury. *Developmental psychobiology*, 49(2), 107-118.

Kolb, B., & Gibb, R. (2010). Tactile stimulation after frontal or parietal cortical injury in infant rats facilitates functional recovery and produces synaptic changes in adjacent cortex. *Behavioural brain research*, 214(1), 115-120.

Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (1998). Brain plasticity and behavior. *Annual review of psychology*, 49(1), 43-64.

Kolb, B., Forgie, M., Gibb, R., Gorny, G., & Rowntree, S. (1998). Age, experience and the changing brain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(2), 143-159.

Lachat, D. (2010). Análise ultraestrutural do nervo óptico de ratos wistar hípidos e com anemia ferropriva neonatal. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

Landi, S., Cenni, M. C., Maffei, L., & Berardi, N. (2007). Environmental enrichment effects on development of retinal ganglion cell dendritic stratification require retinal BDNF. *PLoS One*, 2(4), e346.

Landi, S., Sale, A., Berardi, N., Viegi, A., Maffei, L., & Cenni, M. C. (2007). Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *The FASEB Journal*, 21(1), 130-139.

Lee, D. L., Strathmann, F. G., Gelein, R., Walton, J., & Mayer-Pröschel, M. (2012). Iron deficiency disrupts axon maturation of the developing auditory nerve. *Journal of Neuroscience*, 32(14), 5010-5015.

Levine, S. (1994). Maternal behavior as a mediator of pup adrenocortical function. *Ann NY Acad Sci*, 746, 260-275.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659-1662.

Looker, A. C., Dallman, P. R., Carroll, M. D., Gunter, E. W., & Johnson, C. L. (1997). Prevalence of iron deficiency in the United States. *Jama*, 277(12), 973-976.

Los Monteros, A. D., Korsak, R. A., Tran, T., Vu, D., Vellis, J. D., Edmond, J., & LeVine, S. M. (2000). Dietary iron and the integrity of the developing rat brain: a study with the artificially-reared rat pup. *Cellular and molecular biology*, 46(3), 501-515.

Lozoff, B., & Georgieff, M. K. (2006). Iron deficiency and brain development. In *Seminars in pediatric neurology* (Vol. 13, No. 3, p. 158).

Lozoff, B., Beard, J., Connor, J., Felt, B., Georgieff, M., & Schallert, T. (2006). Long-Lasting Neural and Behavioral Effects of Iron Deficiency in Infancy. *Nutrition reviews*, 64(s2), S34-S43.

Lundström, U., Siimes, M. A., & Dallman, P. R. (1977). At what age does iron supplementation become necessary in low-birth-weight infants?. *The Journal of pediatrics*, 91(6), 878-883.

Luzi, P., Zaka, M., Rao, H. Z., Curtis, M., Rafi, M. A., & Wenger, D. A. (2004). Generation of transgenic mice expressing insulin-like growth factor-1 under the control of the myelin basic protein promoter: increased myelination and potential for studies on the effects of increased IGF-1 on experimentally and genetically induced demyelination. *Neurochemical research*, 29(5), 881-889.

Martin, J. H. (2014). *Neuroanatomia-: Texto e Atlas*. AMGH Editora.

McMORRIS, F. A., Mozell, R. L., Carson, M. J., Shinar, Y., Meyer, R. D., & Marchetti, N. (1993). Regulation of Oligodendrocyte Development and Central Nervous System Myelination by Insulin-like Growth Factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 692(1), 321-334.

McMorris, F. A., Smith, T. M., DeSalvo, S., & Furlanetto, R. W. (1986). Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(3), 822-826.

Mohammed, A. H., Zhu, S. W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., ... & Bogdanovic, N. (2002). Environmental enrichment and the brain. *Progress in brain research*, 138, 109-133.

Monteiro, C. A., & Szarfarc, S. C. (1987). Estudo das condições de saúde das crianças no Município de São Paulo, SP (Brasil), 1984-1985: V-Anemia. *Revista de Saúde Pública*, 21(3), 255-260.

Monteiro, C. A., Szarfarc, S. C., & Mondini, L. (2000). Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Revista de Saúde Pública*, 34(6 supl.), 62-72.

Moos, T., & Morgan, E. H. (2002). A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain. *Developmental neuroscience*, 24(2-3), 99-105.

Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R. J., Bronzino, J. D., Tonkiss, J., & Galler, J. R. (1992). Malnutrition and the developing central nervous system. *The vulnerable brain and environmental risks*, 1, 3-44.

Morgane, P. J., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(4), 471-483.

Morishita, H., & Hensch, T. K. (2008). Critical period revisited: impact on vision. *Current opinion in neurobiology*, 18(1), 101-107.

Nicolay, D. J., Doucette, J. R., & Nazarali, A. J. (2007). Transcriptional control of oligodendrogenesis. *Glia*, 55(13), 1287-1299.

O'Connor, D. L., Picciano, M. F., & Sherman, A. R. (1988). Impact of maternal iron deficiency on quality and quantity of milk ingested by neonatal rats. *British Journal of Nutrition*, 60(03), 477-485.

Pacagnella, P. A. P., Parpinelli, P. M. S. D. A., & Lachat, J. J. (2013). The morphological and developmental changes of the anterior commissure of male Wistar rats submitted to protein malnutrition in the postnatal period. *Nutritional neuroscience*, 16(2), 61-68.

Panagiotaropoulos, T., Papaioannou, A., Pondiki, S., Prokopiou, A., Stylianopoulou, F., & Gerozissis, K. (2004). Effect of neonatal handling and sex on basal and chronic stress-induced corticosterone and leptin secretion. *Neuroendocrinology*, 79(2), 109-118.

Pant, H. C., & Veeranna. (1995). Neurofilament phosphorylation. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(9-10), 575-592.

Paula, M. L., Cui, Q. L., Hossain, S., Antel, J., & Almazan, G. (2014). The PTEN inhibitor bisperoxovanadium enhances myelination by amplifying IGF-1 signaling in rat and human oligodendrocyte progenitors. *Glia*, 62(1), 64-77.

Pereira-da-Silva MS, Cabral-Filho JE, de-Oliveira LM (2009) Effect of early malnutrition and environmental stimulation in the performance of rats in the elevated plus maze. *Behav Brain Res* 205(1):286–289

Pham, T. M., Söderström, S., Henriksson, B. G., & Mohammed, A. H. (1997). Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behavioural brain research*, 86(1), 113-120.

Piñero, D. J., Jones, B. C., & Beard, J. L. (2001). Variations in dietary iron alter behavior in developing rats. *The Journal of nutrition*, 131(2), 311-318.

Piñero, D.J., Li, N.Q., Connor, J.R., Beard, J.L., 2000. Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. *J. Nutr.* 130 (2), 254–263

Prestes-Carneiro, L. E., Laraya, R. D., Silva, P. R. C., Moliterno, R. A., Felipe, I., & Mathias, P. C. (2006). Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve,

hematological parameters and macrophage function of rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(6), 414-420.

Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental psychobiology*, 38(4), 239-251.

Rice, D., & Barone Jr, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*, 108(Suppl 3), 511.

Richards, S., Mychasiuk, R., Kolb, B., & Gibb, R. (2012). Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behavioural brain research*, 231(1), 86-91.

Rocinholi LF, Almeida SS, De-Oliveira LM (1997) Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Braz J Med Biol Res* 30(3):407–413

Rocinholi, L. D. F., Lachat, J. J., & Oliveira, J. E. D. D. (2008). Auditory evoked potential in handled and non-handled iron-deficient rats. *Psychology & Neuroscience*, 1(2), 129-134.

Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468(7321), 214.

Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in neurosciences*, 32(4), 233-239.

Sale, A., Putignano, E., Cancedda, L., Landi, S., Cirulli, F., Berardi, N., & Maffei, L. (2004). Enriched environment and acceleration of visual system development. *Neuropharmacology*, 47(5), 649-660.

Sanchez M, Hearn EF, Do D, Rilling JK, Herndon JG (1998) Differential rearing affects corpus callosum size and cognitive function of rhesus monkeys. *Brain Res* 812(1):38–49

Santucci LB, Daud MM, Almeida SS, De Oliveira LM (1994) Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 49(2):393–398

Schalm, O. W., Jain, N. C., & Carroll, E. J. (1975). *Veterinary hematology* (No. 3rd edition). Lea & Febiger.

Sharp, P., & Villano, J. S. (2012). *The laboratory rat*. CRC press.

Sigulem, D. M., Tudisco, E. S., Goldenberg, P., Athaide, M. M., & Vaisman, E. (1978). Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*, 12(2), 168-178.

Silveira, P. P., da Silva Benetti, C., Ayres, C., Pederiva, F. Q., Portella, A. K., Lucion, A. B., & Dalmaz, C. (2006). Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behavioural brain research*, 173(2), 205-210.

Silveira, P. P., Portella, A. K., Clemente, Z., Bassani, E., Tabajara, A. S., Gamaro, G. D., ... & Dalmaz, C. (2004). Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiology & behavior*, 80(5), 739-745.

Skoff, R. P., Toland, D., & Nast, E. (1980). Pattern of myelination and distribution of neuroglial cells along the developing optic system of the rat and rabbit. *Journal of Comparative Neurology*, 191(2), 237-253.

Smart, J. L., Dobbing, J., Adlard, B. P. F., Lynch, A., & Sands, J. (1973). Vulnerability of developing brain: relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on behavior and brain composition of adult rats. *The Journal of nutrition*, 103(9), 1327-1338.

Soares, R. O., Horiquni-Barbosa, E., Almeida, S. S., & Lachat, J. J. (2017). Environmental enrichment protects spatial learning and hippocampal neurons from the long-lasting effects of protein malnutrition early in life. *Behavioural Brain Research*, 335, 55-62.

Soares, R. O., Oliveira, L. M., Marchini, J. S., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L., & Almeida, S. S. (2012). Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation on behavioral and biochemical parameters in rats submitted to the elevated plus-maze test. *Nutritional neuroscience*, 16(3), 104-112.

Spolidoro, M., Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Plasticity in the adult brain: lessons from the visual system. *Experimental Brain Research*, 192(3), 335-341.

Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., & Franklin, C. L. (Eds.). (2005). *The laboratory rat*. Academic Press.

Takebayashi, H., & Ikenaka, K. (2015). Oligodendrocyte generation during mouse development. *Glia*, 63(8), 1350-1356.

Tanaka, M., Kariya, F., Kaihatsu, K., Nakamura, K., Asakura, T., Kuroda, Y., & Ohira, Y. (1995). Effects of chronic iron deficiency anemia on brain metabolism. *The Japanese journal of physiology*, 45(2), 257-263.

Todorich, B., Pasquini, J. M., Garcia, C. I., Paez, P. M., & Connor, J. R. (2009). Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. *Glia*, 57(5), 467-478.

Valadares, C. T., & de Sousa Almeida, S. (2005). Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. *Nutritional neuroscience*, 8(1), 39-47.

Valadares, C. T., Fukuda, M. T. H., Françolin-Silva, A. L., Hernandez, A. S., & Almeida, S. S. (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience*, 13(6), 274-282.

Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3), 191.

Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., ... & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7(8), 847-854.

Wiesel, T. N., & Hubel, D. H. (1963). Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *Journal of neurophysiology*, 26(6), 1003-1017.

Wiggins, R. C. (1982). Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Research Reviews*, 4(2), 151-175.

Will, B., Galani, R., Kelche, C., & Rosenzweig, M. R. (2004). Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). *Progress in neurobiology*, 72(3), 167-182.

World Health Organization, & Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Assessing the iron status of populations. *Geneva: World Health Organization*.

World Health Organization. (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers. Geneva: WHO; 2001. *World Health Organization*

World Health Organization. (2002). The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO; 2002. World Health Organization.

World Health Organization. (2005). Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva: WHO; 2005. World Health Organization.

Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M., & During, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature medicine*, 5(4).

Yu, G. S., Steinkirchner, T. M., Rao, G. A., & Larkin, E. C. (1986). Effect of prenatal iron deficiency on myelination in rat pups. *The American journal of pathology*, 125(3), 620.

Zeger, M., Popken, G., Zhang, J., Xuan, S., Lu, Q. R., Schwab, M. H., ... & Ye, P. (2007). Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*, 55(4), 400-411.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 104/2014, sobre o projeto intitulado “*Interação entre deficiência de ferro e estimulação tátil: uma avaliação ultraestrutural do nervo óptico de ratos Wistar no período pós-natal precoce*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor João José Lachat** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 24 de novembro de 2014.

We certify that the protocol nº 104/2014, entitled “*Interaction between iron deficiency and tactile stimulation: ultrastructural evaluation of the optic nerve in Wistar rats during early postnatal period*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/24/2014.

Ribeirão Preto, 24 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP