UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Estudo estrutural e quantitativo do nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva submetidos à estimulação tátil e recuperados nutricionalmente

Aline Soares de Souza

Ribeirão Preto
2015

ALINE SOARES DE SOUZA

Estudo estrutural e quantitativo do nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva submetidos à estimulação tátil e recuperados nutricionalmente

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

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. João-José Lachat

Ribeirão Preto

2015

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

Souza, Aline Soares de

Estudo Estrutural e Quantitativo do Nervo Óptico de Ratos com Anemia Ferropriva Submetidos à Estimulação Tátil e Recuperados Nutricionalmente. Ribeirão Preto, 2015.

66 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Lachat, João-José.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Aline Soares de Souza

Título: Estudo estrutural e quantitativo do nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva submetidos à estimulação tátil e recuperados nutricionalmente

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área: Psicobiologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura:_____

Prof (a). Dr (a)._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico meu trabalho...

Aos meus pais, **Antônia** e **Cláudio**, por todo o apoio, incentivo e amor, são meus alicerces e fonte dos meus valores.

Aos meus irmãos, **Rogério** e **Renato** por serem bons exemplos nos quais me espelho e por sempre torcerem por mim.

À **Deus**, por guiar meus passos, por me dar forças e por não me deixar desistir de alcançar meus objetivos.

Obrigada!

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. João-José Lachat**, pela paciência e colaboração, e por me receber e me conceder a oportunidade de realizar um grande sonho.

À aqueles que dividiram bons momentos durante as realizações das perfusões e dissecações, compartilhando conhecimentos, à vocês **Patricia Pacagnella, Roberto Oliveira Soares, Everton Horiquni Barbosa, Natalia Nassif e Izilda Violante**.

Aos que participaram do “**Cantinho do Capuccino**” sempre com boas conversas.

À **Izilda Violante**, técnica do laboratório de Morfologia Experimental, pela disposição de sempre, pela paciência e amizade em todos os momentos, e pelos conhecimentos de processamento histológico que nunca se cansou de dividir.

À **Rosângela Catarina Peral**, secretária do nosso laboratório, pela amizade, por cuidar de nós com o amor e o carinho de uma mãe e por ser exemplo de força e fé.

À **Tereza Maglia**, Técnica do Laboratório de Microscopia eletrônica, pela paciência, auxílio e conselhos, e por refazer meu material no momento mais trágico e decisivo da minha pesquisa.

Ao **Antônio Renato Meirelles e Silva**, Técnico do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, por não desistir de me auxiliar mesmo com tantos problemas nos meus procedimentos de fotomicrografia, obrigada pela disposição e paciência.

Ao meu grande parceiro e amigo **Everton Horiquni Barbosa**, pela amizade e incansável ajuda e orientação; à **Natalia Nassif**, pela amizade e por não medir esforços para me ajudar em um dos momentos mais importantes e complicadas da minha pesquisa; à **Débora Silveira Martins**, pela amizade e parceria durante os dias, noites e madrugadas de estudo para ingressarmos no mestrado; ao meu grande amigo **Vinícius Warisaia**, por toda parceria, amor, e carinho doados a mim, além de ser peça fundamental na finalização da minha dissertação, e

à minha grande amiga **Adriana Sicuto de Oliveira Ueno**, pela amizade, irmandade, apoio emocional dentro e fora da pesquisa, agradeço também pelo auxílio para o ponto final dessa dissertação.

À **minha família**, por entender minha ausência em muitos momentos, pelo amparo e pela credibilidade depositada, e ao meu companheiro e amigo **Rui Daniel Mussolin Tamaki**, por torcer por mim e acreditar na minha capacidade, pelo apoio, amor e carinho.

À todos aqueles que surgiram na minha vida em meio essa jornada acadêmica, obrigada pelos bons momentos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de mestrado 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.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)

Resumo

A ingestão de dieta deficiente em ferro pode causar alterações estruturais no Sistema Nervoso Central (SNC) e, conseqüentemente, no nervo óptico com prejuízo no processo de mielinização. Essas alterações geradas pela anemia ferropriva pós-natal não são satisfatoriamente revertidas após a reposição de ferro. A estimulação tátil e o enriquecimento ambiental podem reduzir e/ou evitar os efeitos prejudiciais desta desnutrição sobre o SNC. O objetivo deste estudo foi avaliar estrutural e quantitativamente, o nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva submetidos à estimulação tátil e recuperação nutricional. Foram utilizados 4 grupos: **Controle (C)**, **Anêmico (A)**, e **Recuperados (R)**, dividido em **Recuperado Não Estimulado (RN)** e **Recuperado Estimulado (E)**, compostos aleatoriamente por 1 rata mãe e 6 filhotes machos. Os grupos foram divididos de acordo com a variável dieta oferecida, pela quantidade de ferro/kg de dieta. O grupo **C**, com 35 mg de ferro/kg de dieta, e o grupo **A**, com 4 mg de ferro/kg de dieta, contendo 6 filhotes cada, e o grupo **Recuperado**, com 35 mg de ferro/kg de dieta do dia 0 ao 21º dia e, 35 mg de ferro/kg de dieta a partir do 22º dia, contendo 12 filhotes. O grupo **R** foi subdividido em 2 grupos iguais, classificados de acordo com a variável estimulação: **Estimulado (E)**, submetido a estimulação tátil do dia 0 ao 32º dia, e **Não Estimulado (N)**. Durante o período de amamentação, as ratas mães se alimentaram da dieta determinada para cada grupo, e no período pós lactação os filhotes receberam as mesmas dietas de suas respectivas mães. No 21º dia as ratas mães foram eutanasiadas e no 32º dia, todos os filhotes foram anestesiados e perfundidos via transcardíaca, tendo seus nervos ópticos dissecados e os fragmentos selecionados foram fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato e então processados para inclusão em araldite. Na análise morfológica os nervos ópticos dos animais do grupo **RE** mostraram um aspecto estrutural muito semelhante às características dos nervos ópticos do grupo **C**, e com melhor aspecto em relação aos grupos **A** e **RN**, apresentando

grande quantidade de fibras nervosas mielínicas, bem agrupadas e compactadas, apresentando-se de forma uniforme por todo o nervo e com espaço intersticial reduzido. Na análise morfométrica, em relação ao número de vasos sanguíneos, os fatores dieta, recuperação e estimulação não apresentaram interferência. Em relação ao número de astrócitos, a estimulação não interferiu, e em relação a dieta, o grupo **A** apresentou maior número que os grupos **C** e **RN**. Na avaliação do número de oligodendrócitos, em relação ao fator dieta, o grupo **RN** apresentou maior número que os grupos **C** e **A**, os quais não apresentaram diferença significativa entre si. Já para o fator estimulação, o grupo **RE** apresentou menor número de oligodendrócitos quando comparado ao **RN**. Podemos concluir que: **1** - a dieta utilizada foi eficaz no desenvolvimento de anemia ferropriva leve nas ratas mães e severa nos filhotes; **2** - a associação das técnicas de estimulação tátil e recuperação nutricional resultou em uma reorganização estrutural do nervo óptico, semelhante ao grupo **C** e **3** - tal associação não interferiu no número de vasos sanguíneos, entretanto, resultou em uma normalização do número de astrócitos e de oligodendrócitos.

Palavras-chave: Deficiência de ferro, Anemia ferropriva, Estimulação tátil, Recuperação nutricional, Morfologia, Morfometria, Nervo óptico, Rato Wistar.

Abstract

Inadequate intake of dietary iron can cause structural changes in the Central Nervous System (CNS) and, thus, in the optic nerve with impaired myelination process. These changes generated by postnatal iron deficiency anemia are not satisfactorily reversed after replacement iron. The tactile stimulation and environmental enrichment can reduce and/or prevent the damaging effects of malnutrition on the CNS. The objective of this study was to evaluate structurally and quantitatively the optic nerve of Wistar rats with iron deficiency anaemia submitted to tactile stimulation and nutritional recovery. We used 4 groups randomly composed of 1 adult female rat and 6 male newborns that were divided into experimental groups according to the amount of iron/kg of diet provided: Control (C) - 35 mg iron/kg and Anemic (A) - 4 mg iron / kg, each containing 6 offsprings, and Recovered group (R) with 35 mg iron/kg from day 0 to day 21 and 35 mg iron/kg from day 22, containing 12 male newborn subdivided into two equal subgroups classified according variable stimulation: Stimulated (E) - from day 0 to day 32, and not stimulated (C). During the breastfeeding period, the mother rats fed the diet given to each group, and after lactation period the puppies received the same diets of their mothers. At day 21, the female rats were euthanized and at day 32 all juveniles were anesthetized and perfused transcardially, having their optic nerves dissected, and selected fragments were fixed in osmium tetroxide 1% and phosphate buffer and then processed for embedding in Araldite. In the morphological analysis the optic nerve of the animals in RE group showed a very similar structural aspect to the characteristics of the optic nerves in group C, and looking better than in groups A and RN, with lot of myelinated nerve fibers well grouped and compacted and this organization was present uniformly across the nerve, resulting in reduced interstitial space. In the morphometric analysis, the number of blood vessels, dietary factors, recovery and stimulation showed no

interference, since all groups showed no statistically significant difference. Regarding to the number of astrocytes, the stimulation did not influence it and, regarding to diet, the group presented a higher number of cells than groups C and RN. In assessing the number of oligodendrocytes, in relation to diet factor, RN group had a greater number of oligodendrocytes than C and A groups, which showed no significant difference between them. As for the stimulation factor, the RE group had fewer oligodendrocytes than the RN. With the results can be concluded that: **1-** the used diet was effective in the development of mild iron deficiency anaemia in mothers and severe in young rats; **2-** the association of tactile stimulation and nutritional recovery techniques resulted in a structural reorganization of the optic nerve, similar to C group and **3-** this association did not affect the number of blood vessels, however it resulted in a normalization of the number of astrocytes and oligodendrocytes.

Keywords: Iron deficiency, Anaemia, Tactile Stimulation, Nutritional Recovery, Morphology, Morphometry, Optic Nerve, Wistar Rat.

Sumário

Resumo

Abstract

Introdução.....	15
Método.....	19
Composição dos Grupos Experimentais.....	19
Manutenção dos Animais.....	23
Manutenção dos Materiais.....	24
Estimulação Tátil Neonatal.....	24
Dados Ponderais.....	24
Avaliação Hematológica (Exames Laboratoriais).....	25
Eutanásia, Coleta do Nervo Óptico e Processamento Histológico.....	25
Documentação, Análise Estrutural e Quantitativa das Amostras.....	27
Análise Estatística.....	28
Resultados.....	30
Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos das Ratas Mães.....	30
Peso corporal das ratas mães.....	30
Hemoglobina e hematócrito das ratas mães.....	31
Concentração de hemoglobina das ratas mães.....	32
Porcentagem de hematócritos das ratas mães.....	32
Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos dos Filhotes.....	35
Peso corporal dos filhotes.....	35
Hemoglobina e hematócrito dos filhotes.....	37
Concentração de hemoglobina dos filhotes.....	37

Porcentagem de hematócritos dos filhotes.....	38
Análise Morfológica: Aspecto Geral do Nervo Óptico.....	41
Análise Morfológica aos 32 Dias de Idade.....	43
Análise Morfométrica.....	49
Área Total da Secção T.ransversal.....	49
Número de Vasos San.guíneos.....	50
Número de Astrócito.s.....	51
Número de Oligode.ndrócitos.....	52
Discussão.....	60
Conclusão.....	;.....62
Referências.....	58

O ferro é vital para quase todos os organismos vivos, e como é um dos metais mais abundantes no corpo humano ele tem importantes funções nos processos celulares, tais como: síntese de DNA, RNA e proteínas; transporte de elétrons; respiração celular, proliferação e diferenciação celular e regulação da expressão de genes (Andrews, 1999; Conrad, Umbreit & Moore, 1999). Ele está ainda envolvido em numerosos processos bioquímicos importantes para o desenvolvimento e manutenção da função neurológica normal, como síntese de dopamina, serotonina, catecolamina e GABA (Beard, Connor & Jones, 1993).

A anemia ferropriva é uma das deficiências nutricionais mais prevalentes ainda negligenciadas do mundo sendo que o ferro é um micronutriente essencial e é onipresente na distribuição no corpo. Prejuízos no desenvolvimento cognitivo e motor de crianças também são vistos na deficiência de ferro. Há um crescente número de evidências para apoiar que o ferro tem papel importante em funções do sistema nervoso central, que incluem a síntese de neurotransmissores e mielinização do nervo (Monga, Walia, Gandhi, Chandra & Sharma, 2010).

A deficiência de ferro é, isoladamente, a deficiência nutricional mais comum no mundo. Atinge principalmente a população de países em desenvolvimento que possui menor acesso a dietas equilibradas e a serviços de saúde e é mais exposta a condições sanitárias precárias. O combate e a prevenção da deficiência de ferro são uma das prioridades na promoção da saúde. As estratégias para se alcançar este objetivo incluem a avaliação e correção da deficiência de ferro em gestantes, a estimulação ao aleitamento materno, a realização de profilaxia com sulfato ferroso oral em prematuros e recém nascidos de baixo peso, o enriquecimento de alimentos e o envolvimento da comunidade (Umbelino & Rossi, 2006).

A deficiência em ferro é o maior problema nutricional do mundo, atingindo em torno de 3 a 5 bilhões de pessoas (Beard, 2001; Cook, Skikne, & Baynes, 1994; Thorsdottir,

Gunnarson, Atladottir, Michaelsen & Palson, 2003; Yip, 2002). Nos EUA a deficiência em ferro afeta 9% das crianças entre um e dois anos de idade, 3% das crianças entre três e cinco anos, e 2% das crianças entre seis e onze anos. Esta deficiência acomete também 9% a 11% das mulheres em idade fértil (Looker, Dallman, Carroll, Gunter & Johnson, 1997).

No âmbito celular o ferro está envolvido em uma variedade de processos e sua deficiência afeta praticamente todos os sistemas orgânicos, inclusive o sistema nervoso (Yager & Hartfield, 2002). A absorção celular do ferro é determinada pelos receptores de transferrina presentes na superfície celular, sendo que a maior densidade de receptores de transferrina nas células gliais coincide com o período de maior atividade de mielinização (Lin & Connor, 1989; Moos & Morgan, 2002). A aquisição de ferro pelos oligodendrócitos está associada com sua maturação e habilidade para produzir mielina (Connor, Menzies, Burdo & Boyer, 2001).

Diversos estudos mostraram relações significativas entre a anemia ferropriva e as funções visuais. Há relatos de perda da acuidade visual por infusões subcutâneas de deferoxamina, droga utilizada para reduzir o ferro armazenado no corpo de pacientes submetidos a múltiplas transfusões de sangue (Borgna-Pignatti, De Stefano & Broglia, 1984; Bene, Manzler, Bene & Kranias, 1989; Olivieri et al., 1996). Crianças anêmicas apresentaram redução da latência do potencial evocado visual após suplementação de ferro (Algarin, Peirano, Garrido, Pizarro & Lozoff, 2003; Sarici et al., 2001). Provavelmente estas alterações estão relacionadas à atuação do ferro no processo de mielinização (Connor et al., 2001; Morath & Mayer-Proschel, 2001), sendo o nervo óptico constituído principalmente por fibras mielínicas.

Mesmo crianças saudáveis em período de amamentação demonstraram melhora da acuidade visual e desenvolvimento psicomotor após suplementação de ferro (Friel et al., 2003; Lozoff et al., 2003).

Em ratos com 30 dias de idade 75% das fibras do nervo óptico são mielínicas e o número de vasos sanguíneos normalmente se mantém estável desde a 2ª até a 12ª semana de idade (Scott & Foote, 1984). Este nervo é um sistema ideal para estudos, visto que ele apresenta uma boa fixação por perfusão transcardíaca e seu número de axônios é constante desde o globo ocular até o corpo geniculado lateral (Skoff, Toland & Nast, 1980). Portanto, uma única secção do nervo contém todos os contornos de axônios, podendo ser prontamente avaliados e/ou quantificados (Skoff et al., 1980).

Apesar de ter sido mostrado que o ferro é encontrado por todo o encéfalo do rato, sabe-se, que ele está localizado principalmente em oligodendrócitos e micróglia e pode também estar presente nos espaços intersticiais e associado com processos de células nervosas (Connor & Benkovic, 1992).

Rajan, Colburn e Davies (1976) mostraram que 80% do ferro no cérebro de ratos estava na fração de mielina. O ferro acumula-se no encéfalo do rato desde o nascimento até a fase adulta, sendo que sua captação máxima ocorre durante o período pós-desmame (Connor & Benkovic, 1992) e coincide com o pico da síntese de mielina.

Há evidências de que a deficiência em ferro maternal afeta a qualidade do leite ingerido pelos ratos neonatos. O leite secretado por ratas mães deficientes em ferro apresentou menor quantidade de gordura, ferro e energia, em comparação ao grupo controle (O'Connor, Picciano & Sherman, 1988).

Estudos recentes mostram que a ingestão de dieta com níveis inadequados de ferro pode causar alterações em parâmetros morfológicos e morfométricos, revelando atrasos no desenvolvimento de animais deficientes neste microelemento (De Maman, Homem & Lachat, 2008; De Maman, Melo, Homem, Tavares & Lachat, 2010) e que um período curto de severa carência de ferro na dieta em animais jovens resulta em prejuízos ao sistema nervoso que não

foram corrigidos após suplementação com ferro, mesmo que outros sinais da deficiência tenham sido revertidos (Feelt & Lozoff, 1996; De Maman et al., 2010).

Existem evidências de que a estimulação ambiental tem a capacidade de promover alterações plásticas no SNC em aspectos morfológicos (Bedi & Bhide, 1988; Carughi, Carpenter & Diamond, 1989; Lima, 1992), bioquímicos (Del Arco et al., 2007; Rocinholi, Lachat & Dutra de Oliveira, 2008), eletrofisiológicos (Edwards, Barry & Wyspianski, 1969; Rocinholi et al., 2008) e comportamentais (Rocinholi, Almeida & De Oliveiras, 1997; Santucci, Daud, Almeida & De Oliveira, 1994) de ratos.

A literatura tem mostrado que a estimulação tátil (*Handling*) e o ambiente enriquecido podem reduzir e/ou evitar os efeitos prejudiciais ocasionados pela desnutrição sobre o SNC (Bedi & Bhide, 1988; Lima, 1992; Rocinholi et al., 2008) e o comportamento em animais de laboratório (Crnic, 1983; Lima, 1988; Rocinholi, De Oliveira & Colafêmina, 2001).

Alguns efeitos da desnutrição são permanentes, porém certo grau de recuperação pode ser obtido por meio da estimulação e enriquecimento ambiental. Os efeitos da estimulação ambiental são claros e demonstram uma recuperação parcial da alteração do comportamento animal alterado por desnutrição (Pereira-da-Silva, Cabral-Filho & De-Oliveira, 2009).

Apesar de vários estudos terem relatado que a estimulação ambiental pode promover mudanças plásticas no SNC em vários aspectos e que os efeitos nocivos da deficiência em ferro no SNC de animais de laboratório alteram aspectos morfológicos, bioquímicos e comportamentais, nenhuma investigação procurou, até o momento correlacionar os possíveis efeitos da estimulação sensorial no nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva e recuperados nutricionalmente dos 22 aos 32 dias de idade.

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar estrutural e quantitativamente, ao nível de microscopia de luz, o nervo óptico de ratos com anemia ferropriva, sob o efeito da estimulação tátil e da recuperação nutricional.

Método

Composição dos Grupos Experimentais

Este estudo seguiu as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o protocolo para uso de animais em experimentação deste estudo (nº 163/2013) está de acordo com os princípios éticos em experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Foram utilizadas neste estudo 28 ratos da linhagem Wistar, sendo 4 ratas mães e 24 filhotes machos, provenientes do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As ratas e os filhotes foram transportadas para o Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular e Molecular e de Bioagentes Patogênicos e do Setor de Anatomia, do Departamento de Cirurgia e Anatomia, no Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde foram mantidos durante todo o tempo do experimento.

Para que não houvesse interferências genéticas nas ninhadas, no dia do nascimento (dia zero), os filhotes foram separados de suas mães e reunidos em uma caixa de polietileno. Cada rata mãe foi também colocada em uma caixa de polietileno e do total dos filhotes, foram retirados aleatoriamente, grupos de 6 animais para compor as ninhadas, e assim evitou-se que a formação dos grupos ocorresse apenas por ratos provenientes de uma mesma rata mãe.

No dia do nascimento 4 grupos foram formados de acordo com a variável dieta: **Controle (C)** e **Anêmico (A)** contendo 6 filhotes cada, e o grupo **Recuperado (R)** contendo 12 filhotes, este, por sua vez dividido em 2 subgrupos contendo 6 filhotes

cada, classificados de acordo com a variável estimulação em **Estimulado (E)** e **Não Estimulado (N)**, permanecendo nesta distribuição até o final do experimento.

A Tabela 1 mostra a composição dos grupos durante o período de lactação e pós-lactação, considerando as variáveis: idade (períodos: lactação e pós-lactação), dieta (Controle, Anêmico e Recuperado) e estimulação (Estimulados e Não Estimulados).

Durante todo o período de lactação (do dia 0 ao 21º dia) as ratas mães do grupo **C** foram mantidas com dieta contendo 35 mg de Ferro/Kg de dieta, enquanto as ratas mães dos grupo **A** e dos grupos Recuperados (Recuperado Não Estimulado - **RN** e Recuperado Estimulado - **RE**) receberam dieta com 4 mg de Ferro/Kg. Após o desmame (do 22º ao 32º dia) os filhotes do grupo **A** e **C** receberam as mesmas dietas fornecidas às suas respectivas ratas mães, enquanto que os dos grupos **RN** e **RE** passaram a receber uma dieta com 35 mg de Ferro/Kg de dieta, similar aos animais do grupo **C**. Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à dieta em comedouro de aço inoxidável e à água deionizada em bebedouro de vidro.

Durante todo o período de experimentação todos os grupos receberam dietas isocalóricas formuladas segundo a AOAC-95 (Cunnif, 1995). A composição das dietas, mistura de sais e mistura de vitaminas são apresentadas nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente, e a única diferença entre as dietas dos grupos foi a quantidade de ferro presente na mistura mineral.

Tabela 1.

Grupos Experimentais de Acordo Com as Variáveis: Idade, Dieta e Estimulação. Dieta Controle (C), Dieta Deficiente em Ferro (A) e Dieta Deficiente em Ferro no Período de Lactação e Adequada no Período Pós-lactação (R). Animais Estimulados (E) e Animais Não Estimulados (N). Totalizando Quatro Grupos Experimentais: Controle (C), Anêmico (A), Recuperado Não Estimulado (RN) e Recuperado Estimulado (RE).

Grupos	Período (Idade)	Dieta	Situação Experimental
C	Lactação (0-21 dias)	35 mg de Ferro/Kg de dieta	Controle
A		4 mg de Ferro/Kg de dieta	Anêmico
RN		4 mg de Ferro/Kg de dieta	Recuperado Não Estimulado
RE		4 mg de Ferro/Kg de dieta	Recuperado Estimulado
C	Pós-lactação (22-32 dias)	35 mg de Ferro/Kg de dieta	Controle
A		4 mg de Ferro/Kg de dieta	Anêmico
RN		35 mg de Ferro/Kg de dieta	Recuperado Não Estimulado
RE		35 mg de Ferro/Kg de dieta	Recuperado Estimulado

Tabela 2.

Composição da Dieta Basal Segundo a AOAC (Cunnif, 1995), Utilizada Para os Grupos Controle, Anêmico e Recuperado Durante Todo o Período Experimental.

Componentes	Percentil
Caseína	20%
Colina	0.15%
Mistura Salina*	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-95. Mistura de Sais Deficientes em Ferro.

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-95.

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
Vitamina D3 200.000 UI/g	0.75

* Em gelatina

Manutenção dos Animais

A manutenção dos animais foi feita em caixas de polietileno (41 x 40 x 17 cm) com tampa de aço inoxidável. Durante a lactação (0 a 21 dias) os animais de cada ninhada (composta por 1 rata mãe e 6 filhotes machos) foram alojadas conjuntamente e no 21º as ratas mães foram sacrificadas e os filhotes permaneceram em suas respectivas caixas, com 6 animais durante todo o período de pós-lactação (22 a 32 dias). Todos os grupos foram mantidos em biotério totalmente adaptado às condições ambientais com temperatura controlada em torno de 22º C, com um ciclo claro-escuro de 12 h com luz artificial, e em média 60% de umidade.

Manutenção dos Materiais

Para evitar a contaminação com o ferro existente no meio ambiente, todo material utilizado para confecção das dietas foi lavado previamente. As vidrarias foram higienizadas com uma solução de ácido nítrico a 30% (v/v) e água deionizada, e os materiais plásticos foram utilizados com solução de EDTA 5% (p/v) e água deionizada.

Estimulação Tátil Neonatal

Os filhotes do grupo estimulado (**RE**) foram submetidos a Estimulação Tátil Neonatal individual, cinco dias por semana, durante 3 minutos, nos períodos de lactação e pós-lactação (desde o dia zero ao 32º dia). Durante o período determinado para a realização da estimulação tátil, as ratas mães de todos os grupos foram separadas de seus filhotes, independentemente se os filhotes seriam estimulados ou não para que fossem evitadas possíveis variáveis.

A Estimulação Tátil Neonatal dos filhotes foi realizada a partir da técnica *Handling*, que consistiu em segurar o animal com uma das mãos, enquanto que os dedos da outra mão do experimentador deslizavam no dorso do animal no sentido crânio-caudal.

Durante o período de lactação (dia zero ao 21º dia), ao final da estimulação tátil, todos os filhotes eram recolocados em suas respectivas caixas, onde permaneciam agrupados, e a respectiva rata mãe era retornada a caixa. Já no período pós-lactação, ao final da realização da estimulação, os filhotes permaneciam em suas respectivas caixas de acordo com seus grupos experimentais.

Dados Ponderais

Os dados de peso corporal das ratas mães (**M**) e dos filhotes foram registrados no dia 0, 7, 14 e 21 do período de lactação e após o desmame os pesos corporais dos

filhotes foram registrados no 28° e 32° dia de idade. Por meio dessas pesagens foi possível a investigação do ganho de peso corporal semanal dos animais.

Os dados de peso individual das ratas mães registrados no 21° dia e dos filhotes ao 32° dia de idade foram utilizados para a realização dos cálculos das quantidades de fármacos a serem administrados para a anestesia e de substâncias para perfusão transcardíaca dos filhotes.

Avaliação Hematológica (Exames Laboratoriais)

Para avaliação hematológica foi realizada uma coleta de sangue das ratas mães no 21° dia de lactação e nos filhotes no 21° e no 32° dia de idade; coleta esta realizada a partir de uma punção cardíaca, sendo que nas ratas mães foi realizada antes da eutanásia e nos filhotes imediatamente antes do procedimento de perfusão transcardíaca.

A avaliação hematológica foi realizada no laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP a partir de amostras de 1 mL de sangue de cada animal, sendo a amostra anticoagulada com uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato de potássio (EDTA) a 10%. As determinações hematológicas foram realizadas sempre no mesmo dia da coleta, sendo avaliadas as concentrações de hemoglobina, através do método da cianometahemoglobina, e a porcentagem de hematócrito, pelo método do microhematócrito.

Eutanásia, Coleta do Nervo Óptico e Processamento Histológico

No 21° as ratas mães foram eutanasiadas e aos 32 dias de idade, todos os filhotes dos diversos grupos experimentais foram profundamente anestesiados com cloridrato de quetamina (22mg/Kg), via intraperitoneal, perfundidos por via transcardíaca com uma solução de salina tamponada (PBS) 0,05M, pH 7,3; seguida de uma mistura fixadora de

paraformaldeído 2% e glutaraldeído a 1% dissolvidos em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,3. Foi estabelecida uma relação de 1 mL/g de peso corporal para determinar as quantidades de soluções utilizadas para a realização da perfusão de cada animal.

Logo após a perfusão os animais foram decapitados e suas cabeças colocadas imediatamente na mesma solução fixadora por 24 horas a 4°C. Após este período, com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi DRC, Carl Zeiss) e através da utilização de instrumentos de microcirurgia os nervos ópticos foram dissecados e extremo cuidado foi tomado para que não houvesse ressecamento dos mesmos. Primeiramente utilizando um bisturi uma incisão para exposição dos ossos do crânio foi feita caudalmente ao osso occipital em direção ao osso nasal expondo totalmente as suturas na superfície do crânio. Uma abertura no crânio foi realizada com a utilização de uma tesoura cirúrgica a partir da região superior do forame magno na porção posterior do crânio e seguiu cortando o crânio rostralmente sobre a fissura inter-hemisférica até o final das placas crânio frontal. Com a utilização de um fórceps ósseo todas as placas da superfície superior e lateral do crânio foram removidas cuidadosamente para que o tecido nervoso não fosse lesado. O osso nasal foi fragmentado na região entre os globos oculares e uma secção foi feita separando o bulbo olfatório do lobo frontal. Em seguida o nervo óptico era separado dos globos oculares com a remoção dos últimos. Então com uma espátula inserida entre a superfície ventral do encéfalo e do crânio, o encéfalo era erguido, e com uma espátula menor os nervos ópticos eram tracionados caudalmente até serem removidos por completo do canal óptico. Com o encéfalo totalmente extraído o mesmo era colocado na bancada com o nervo óptico para cima e então este era seccionado com a utilização de uma microtesoura. A estrutura escolhida para estudo foi a porção do nervo óptico entre o quiasma óptico e o início de sua deflexão para o globo ocular (Figura 1).

Os seguimentos dos nervos foram refixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por um período de 2 a 3 horas a 4° C e em seguida processados para inclusão em araldite. Procurou-se tomar o cuidado em orientar os fragmentos selecionados para que as fibras do nervo fossem cortadas transversalmente e, com um ultra micrótomo (Dupont Sorval modelo Porter Blum MT-2B), com navalha de vidro, foram obtidos cortes de 0,5 micrômetros de espessura, colocados em lâminas histológicas, corados com azul de Toluidina a 1% e recobertos com lamínulas. As lâminas assim obtidas foram utilizadas para a realização de análises ao nível de microscopia de luz e documentação fotográfica.

Figura 1. Fotomacrografia de vista ventral do encéfalo do rato com preservação e exposição dos nervos ópticos. Em destaque a sua deflexão (**Df**), o quiasma óptico (**QO**) e o trato óptico (**TO**). A porção utilizada para análise está marcada entre as duas barras paralelas em vermelho.

Documentação, Análise Estrutural e Quantitativa das Amostras

Para a realização das análises morfológicas e para documentação das amostras foi utilizado um microscópio Axiophot do Carl Zeiss no qual foi acoplado uma câmera Axio Vision MRC também da Carl Zeiss, conectados a um computador tipo IBM PC com um software AxioVision versão 4.8. A aquisição das imagens foi realizada no

Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para a avaliação morfológica foram considerados os aspectos estruturais do nervo óptico, como a forma e os componentes celulares do nervo, como células gliais e vasos sanguíneos. Para a avaliação morfométrica considerou-se medidas de área total e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo, número de vasos sanguíneos, número de astrócitos e de oligodendrócitos.

Para a realização das avaliações morfológica e morfométrica, no momento da documentação das fotos uma imagem foi capturada com uma objetiva com ampliação de 40X para a realização da medida da área total da secção transversal do nervo óptico (com ampliação final de 64 vezes de aumento) e com uma objetiva com ampliação de 100X (com ampliação final de 160 vezes de aumento) em imersão foram selecionadas duas imagens de 0,23 mm², totalizando 0,56 mm² da área total da secção transversal, representando aproximadamente 30% da área total do nervo óptico, área esta selecionada para a quantificação de astrócitos, oligodendrócitos e vasos sanguíneos. Foi utilizado o software ImageJ 1.46, para as medidas da área total e diâmetro mínimo por meio do contorno da secção transversal do nervo óptico (excluindo suas membranas envoltórias) e as quantificações citadas anteriormente.

Análise Estatística

Os dados de peso, níveis de hemoglobina e porcentagem de hematócritos dos animais foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas (dieta e dias ou estimulação e dias dependendo da comparação a ser feita), e para as análises que apresentaram resultado significativo ($p < 0,05$), um teste *post-hoc* de

Newman Keuls foi realizado. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Statistica (*StatSoft* Versão 12.0).

Já para as avaliações estatísticas dos dados morfométricos: densidade de vasos sanguíneos, astrócitos e oligodendrócitos, foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) de uma via (fator único: dieta - para os grupos **C**, **A** e **RN**) e para esses resultados o nível de confiança considerado também foi igual ou superior a 95% ($p \leq 0,05$) e o teste *post-hoc* empregado também foi o *Newman Keuls*.

Para a verificação dos resultados da estimulação tátil, foram utilizados os dados dos grupos **RN** e **RE**, e foi também realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de uma via (fator único: estimulação).

Resultados

Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos das Ratas Mães

Peso corporal das ratas mães.

Os dados de peso corporal das ratas mães dos grupos Controle (**MC**), Anêmico (**MA**), Recuperado Não Estimulado (**MRN**) e Recuperado Estimulado (**MRE**) durante o período de lactação dos filhotes (do dia zero ao 21º dia) estão expostos na Tabela 5 e no Figura 2.

No que se refere ao peso corporal das ratas mães (Figura 2 e Tabela 5), em relação às dietas ofertadas, o peso corporal das ratas mães alimentadas com dieta adequada em ferro e as ratas mãe alimentadas com dieta deficiente em ferro, se apresentaram similares, porém **MA** apresentou menor peso corporal quando comparada com as ratas mães **MC**, **MRN** e **MRE** em todos os dias de pesagem. Em relação aos dias o peso corporal das ratas mães de todos os grupos apresentou perda progressiva com o passar dos dias do experimento. Já observando o fator estimulação, os valores de peso corporal das ratas mães não alteraram muito quando comparados os valores das que tiveram seus filhotes estimulados e as que seus filhotes não foram estimulados.

Tabela 5.

Peso Corporal em Gramas, das Ratas Mães (MC: Rata Mãe do Grupo C, MA: Rata Mãe do Grupo A, MRN: Rata Mãe do Grupo RN e MRE: Rata Mãe do Grupo RE), no Período de Lactação (0 a 21 dias), n = 1.

Peso Corporal das Ratas mães				
DIAS	MC	MA	MRN	MRE
0	325	323	339	341
7	319	311	328	319
14	309	302	319	294
21	304	296	310	291

Figura 2. Peso corporal das ratas mães dos grupos MC, MA, MRN e MRE aos 0, 7, 14 e 21 dias do período de lactação dos filhotes.

Hemoglobina e hematócrito das ratas mães.

Os valores de concentração de hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) das ratas mães estão apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 3 e 4.

Concentração de hemoglobina das ratas mães

Em relação á concentração de hemoglobina das ratas mães (Tabela 6 ou Figura 3), diante do fator dieta e dias foi possível verificar que os valores obtidos para a rata mãe que se alimentou com dieta adequada apresentou maiores níveis de concentração de hemoglobina quando comparados com os valores obtidos para as ratas mães que se alimentaram com dieta deficiente em ferro tanto no 18º como no 21º dia, porém no 21º dia essa diferença se apresentou bem maior, indicando que com o passar dos dias do período de lactação as ratas mães que se alimentavam com a dieta deficiente em ferro, apresentavam cada vez mais menor concentração de hemoglobina e portanto, um maior desenvolvimento da anemia ferropriva e que a rata mãe alimentada com dieta controle apresentou aumento dos nível de concentração de hemoglobina indicando que a dieta controle foi eficiente na manutenção e incremento dos níveis de ferro necessários e dentro dos níveis de normalidade. Em relação à estimulação, a concentração de hemoglobina das ratas mães dos animais estimulados e não estimulados apresentaram valores semelhantes indicando que não há interferência da estimulação tátil nos valores de concentração de hemoglobina.

Porcentagem de hematócrito das ratas mães.

Em relação aos dados de porcentagem de hematócrito das ratas mães (apresentados na Tabela 6 ou Figura 4), diante do fator dieta e dias foi possível verificar que os valores obtidos para a rata mãe que se alimentou com dieta adequada apresentou maiores percentuais de hematócrito quando comparados com os valores obtidos para as ratas mães que se alimentaram com dieta deficiente em ferro tanto no 18º como no 21º dia, indicando que com o passar dos dias do período de lactação as ratas mães que se alimentavam com a dieta deficiente em ferro, apresentavam menor porcentagem de

hematócritos e também portanto, um maior desenvolvimento da anemia ferropriva e que a rata mãe alimentada com dieta controle apresentou aumento da porcentagem de hematócrito indicando que a dieta controle foi eficiente na manutenção e incremento dos níveis de ferro necessários e dentro dos níveis de normalidade. Em relação à estimulação, a porcentagem de hematócrito das ratas mães dos animais estimulados e não estimulados apresentaram valores similares indicando também portanto que não há interferência da estimulação tátil no percentual de hematócrito.

Tabela 6.

Dados Hematológicos das Ratas Mães MC, MA, MRN e MRE, nos Dias 18 e 21 do Período de Lactação, n = 1. Valores de Concentração de Hemoglobina em g/dL e Valores Concentração de Hematócrito em %.

Avaliação Hematológica das Ratas Mães				
	MC	MA	MRN	MRE
Hemoglobina (g/dL)				
18	13,2	11,8	13,1	12,6
21	14,4	10,2	10,7	10,0
Hematócrito (%)				
18	45	38	39	38
21	47	36	38	36

Figura 3. Taxa de hemoglobina das ratas mães dos grupos MC, MA e MRN E MRE aos 18 e 21 dias do período de lactação.

Figura 4. Porcentagem de Hematócrito (%) das ratas mães dos grupos MC, MA, MRN e MRE aos 18 e 21 dias do período de lactação.

Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos dos Filhotes

Peso corporal dos filhotes.

Os dados de peso corporal dos filhotes dos grupos **C**, **A**, **RN** e **RE** durante o período de lactação e pós-lactação dos filhotes estão expostos na Tabela 7 e Figura 5.

Diante do fator dia, a ANOVA revelou que houve aumento do peso corporal em todos os grupos durante os 32 dias do experimento, sendo que este aumento progressivo foi estatisticamente significativo durante todo o período de lactação e pós-lactação ($p \leq 0,05$).

Em relação ao fator dieta a ANOVA mostrou que só houve diferença significativa no peso corporal dos filhotes dos grupos **C** e **A** a partir do 21º dia, diferença esta que permaneceu até o 32º dia, indicando que os animais que foram alimentados com dieta controle apresentaram maior peso quando comparados com os animais alimentados com dieta deficiente em ferro ($p=0,0001$). Já em relação aos grupos **A** e **RN**, a ANOVA revelou que houve diferença significativa entre os grupos nos dias 28 ($p=0,013$) e 32 ($p=0,001$), indicando que os filhotes dos grupos que foram alimentados com dieta controle (a partir do 22º dia) apresentaram maior peso corporal do que os animais alimentados com dieta deficiente em ferro. Em contrapartida, quando comparados os grupos **C** e **RN**, a ANOVA revelou que houve diferença significativa no peso corporal dos grupos nos dias 28 ($p=0,0001$) e 32 ($p=0,011$), e no 21º dia entretanto, não houve diferença significativa porém é possível notar que os filhotes do grupo **RN** possuem uma tendência a apresentarem menor peso corporal em relação ao grupo **C** ($p=0,058$).

Em relação ao fator estimulação a ANOVA revelou de todos os momentos os quais os animais dos grupos **RN** e **RE** tiveram seus pesos corporais analisados, nenhum

apresentou diferença significativa, indicando que não houve diferença do peso corporal dos filhotes do grupo estimulado e do grupo não estimulado ($p>0,05$).

Tabela 7.

Valores Médios ($\pm$ EPM) em Gramas do Peso Corporal dos Filhotes, nos Períodos de Lactação (0 a 21 dias) e Pós-Lactação (22 a 32 dias), $n = 6$.

	Peso Corporal dos Filhotes (g)			
	C	A	RN	RE
0	6,74 $\pm$ 0,09	6,59 $\pm$ 0,29	6,50 $\pm$ 0,20	6,83 $\pm$ 0,14
7	18,58 $\pm$ 0,69	19,31 $\pm$ 0,68	17,33 $\pm$ 0,70	20,66 $\pm$ 0,93
14	32,38 $\pm$ 1,72	35,11 $\pm$ 0,99	33,00 $\pm$ 1,95	32,00 $\pm$ 1,53
21	54,00 $\pm$ 1,46	54,17 $\pm$ 1,30	45,50 $\pm$ 0,22	49,00 $\pm$ 0,63
28	88,00 $\pm$ 1,59	89,33 $\pm$ 2,19	79,50 $\pm$ 2,88	74,17 $\pm$ 3,61
32	108,83 $\pm$ 1,72	112,67 $\pm$ 1,56	97,17 $\pm$ 3,62	96,33 $\pm$ 5,19

Figura 5. Peso corporal médio (em gramas) dos filhotes dos Grupos: C, A, RN e RE, nos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 32. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, * fator dia ($p<0,05$); # fator dieta = CvsA ($p<0,05$); Δ fator dieta = CvsRN ($p<0,05$).

Hemoglobina e hematócrito dos filhotes.

Os valores de concentração de hemoglobina (g/dL) e de porcentagem de hematócrito (%) dos filhotes estão representados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. A Tabela 8 exhibe todos os valores médios e erro padrão das médias da avaliação hematológica dos filhotes.

Concentração de hemoglobina dos filhotes.

Em relação ao fator dia (Figura 6 ou Tabela 8), a ANOVA revelou que em todos os grupos quando comparados os resultados de concentração de hemoglobina, só houve diferença significativa entre o 21º e 32º dia. Na comparação dos resultados do grupo **C** houve diferença significativa entre os resultados do dia 21 e 32 ($p=0,0001$), indicando que houve aumento da concentração de hemoglobina com o passar dos dias do experimento, porém na comparação dos resultados dos dias 18 e 21 não houve significância ($p=0,267$). Na comparação dos resultados do grupo **A**, houve diferença significativa entre os dias 21 e 32 ($p=0,027$) indicando diminuição da concentração de hemoglobina com o passar dos dias do experimento, no entanto, na comparação dos resultados nos dias 18 e 21 não houve diferença significativa ($p=0,857$). E por último, na comparação dos resultados do grupo **RN**, houve diferença significativa nos dias 21 e 32 ($p=0,0001$), indicando aumento da concentração de hemoglobina com o passar dos dias do experimento, porém na comparação dos resultados dos dias 18 e 21 não houve diferença significativa ($p=0,585$).

Diante do fator dieta, a ANOVA revelou que houve diferença significativa da concentração de hemoglobina dos grupos **C** e **A** nos dias 18 ($p=0,006$), 21 ($p=0,001$) e 32 ($p=0,0001$) indicando que em todas as análises da concentração de hemoglobina o grupo controle apresentou maiores índices em relação ao grupo anêmico. Em relação

aos grupos **C** e **RN**, a ANOVA mostrou que houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de concentração de hemoglobina no 18º dia ($p=0,004$) e 21º dia ($p=0,002$), em contrapartida, no 32º dia a ANOVA não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos alimentados com dieta controle e dieta recuperada ($p=0,139$). Já para os grupos **A** e **RN**, a ANOVA revelou que não houve diferença estatisticamente significativa no 18º ($p=1,0$), e 21º dia ($p=1,0$), indicando que neste período os níveis de concentração de hemoglobina são equivalentes nestes dois grupos, porém, quando comparados os dados destes grupos no 32º dia, a ANOVA revela uma diferença estatisticamente significativa, indicando que a concentração de hemoglobina se apresenta maior no grupo alimentado com dieta recuperada do que no grupo que se alimentou de dieta deficiente em ferro ($p=0,0001$).

Em relação ao fator estimulação o Teste t entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dias ($p>0,05$), indicando que o grupo estimulado e o grupo não estimulado apresentaram níveis equivalentes de concentração de hemoglobina.

Porcentagem de hematócrito dos filhotes.

Em relação ao fator dia (Figura 7 ou Tabela 8), a ANOVA revelou que em todos os grupos quando comparados os resultados de porcentagem de hematócrito do 18º dia com 21º dia e, o 21º dia com o 32º dia, houve apenas diferença significativa entre o 21º e 32º dia. Na comparação dos resultados do grupo **C** houve diferença significativa entre os resultados do dia 21 e 32 ($p=0,0001$), indicando que houve aumento da concentração de hemoglobina com o passar dos dias do experimento, e já para a comparação dos resultados dos exames do dia 18 e 21, não houve significância ($p=0,225$). Na comparação dos resultados do grupo **A**, houve diferença significativa ($p=0,027$) na

comparação dos resultados dos dias 21 e 32, indicando diminuição da porcentagem de hematócrito com o passar dos dias do experimento, sendo que na comparação dos resultados dos dias 18 e 21 não houve significância ($p=0,955$). E por último, na comparação dos resultados do grupo **R**, houve diferença significativa ($p=0,0001$) na comparação dos resultados dos dias 21 e 32, indicando aumento da porcentagem de hematócrito com o passar dos dias do experimento, porém na comparação dos resultados do dia 18 e 21 não houve significância ($p=0,865$).

Diante do fator dieta, a ANOVA revelou que houve diferença significativa da porcentagem de hematócrito dos grupos **C** e **A** nos dias 18 ($p=0,046$), 21 ($p=0,002$) e 32 ($p=0,0001$) indicando que em todas as análises da porcentagem de hematócrito o grupo controle apresentou maiores índices em relação ao grupo anêmico. Em relação aos grupos **C** e **RN**, a ANOVA mostrou que houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de porcentagem de hematócrito no 18º dia ($p=0,025$) e 21º dia ($p=0,001$), em contrapartida, no 32º dia a ANOVA não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos alimentados com dieta controle e dieta recuperada ($p=0,415$) indicando que a porcentagem de hematócrito dos grupos **C** e **RN** são equivalentes. Já para os grupos **A** e **RN**, a ANOVA revelou que não houve diferença estatisticamente significativa no 18º ($p=1,0$), e 21º dia ($p=1,0$), indicando que neste período os nível de porcentagem de hematócrito são equivalentes nestes dois grupos, porém, quando comparados os dados destes grupos no 32º dia, a ANOVA revela uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$), indicando que a concentração de hemoglobina se apresenta maior no grupo alimentado com dieta recuperada do que no grupo que se alimentou de dieta deficiente em ferro ($p=0,0001$).

Em relação ao fator estimulação o Teste t entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dias ($p>0,05$), indicando

que o grupo estimulado e o grupo não estimulado apresentaram níveis equivalentes de porcentagem de hematócrito.

Tabela 8.

Valores Médios ($\pm$ EPM) em g/dL Para os Valores de Hemoglobina e em % Para os Valores de Hematócrito dos Filhotes ao Longo do Calendário Experimental, aos 18, 22 e 32 Dias de Idade, $n = 6$, $p \leq 0,05$.

Avaliação Hematológica dos Filhotes				
	C	A	RN	RE
Hemoglobina (g/dL)				
18	$7,40 \pm 0,03$	$5,40 \pm 0,04$	$5,40 \pm 0,04$	$5,35 \pm 0,22$
21	$7,96 \pm 0,09$	$5,90 \pm 0,06$	$5,90 \pm 0,06$	$4,93 \pm 0,18$
32	$11,00 \pm 0,03$	$4,21 \pm 0,04$	$10,05 \pm 0,09$	$10,83 \pm 0,06$
Hematócrito (%)				
18	$23,16 \pm 0,23$	$18,33 \pm 0,11$	$18,33 \pm 0,11$	$18,33 \pm 0,25$
21	$25,16 \pm 0,29$	$19,16 \pm 0,19$	$19,16 \pm 0,19$	$19,16 \pm 0,19$
32	$37,00 \pm 0,10$	$13,80 \pm 0,06$	$35,16 \pm 0,17$	$35,5 \pm 0,15$

Figura 6. Concentração de Hemoglobina (g/dL) dos filhotes dos grupos C, A, RN e RE aos 18, 21 e 32 dias.

Figura 7. Porcentagem de Hematócrito (%) dos filhotes dos grupos **C**, **A**, **RN** e **RE** aos 18, 21 e 32 dias.

Análise Morfológica: Aspecto Geral do Nervo Óptico.

Por meio da análise morfológica microscópica com aumento de 64X, dos nervos ópticos dos ratos estudados, foi possível verificar que a maioria dos cortes transversais apresentou formato oval envolto por meninges (Figura 8).

Já com aumento de 160X foi possível observar vasos sanguíneos, células neurogliais (astrócitos e oligodendrócitos), processos astrocíticos, espaços intersticiais e axônios com diferentes características em relação à mielinização. Neste aumento, os axônios e sua bainha de mielina são mais facilmente visualizados e as células da glia podem ser diferenciadas.

A distinção das neuróglia apesar de complexa é possível através da observação da coloração, e das características morfológicas estruturais como o posicionamento do núcleo e da cromatina, além de outras peculiaridades. Para os astrócitos a coloração do azul de toluidina confere uma tonalidade clara, apresenta núcleo ovalado, nucléolos nem sempre evidentes e a cromatina condensada margeia as bordas da membrana; além de

apresentarem prolongamentos citoplasmáticos em várias direções (processos astrocíticos terminais), característica singular esta que conferem a ele o formato de estrela. Já os oligodendrócitos, a coloração com azul de toluidina confere a eles uma coloração mais intensa, seus núcleos são grandes, podendo ser ovalados, redondos ou mesmo com formato irregular bem evidentes e sua cromatina reveste interiormente sua membrana nuclear (Figura 8).

Figura 8. Fotomicrografia da secção transversal do nervo óptico de rato do grupo **C** de 32 dias, possibilitando a visualização de alguns vasos sanguíneos e membrana envoltória do nervo (meninge). Aumento ao microscópio: 64X. Coloração: azul de toluidina a 1%.

Figura 9. Fotomicrografias de secção transversal do nervo óptico de rato do grupo **C** de 32 dias. Nesta imagem é possível a visualização de vasos sanguíneos (**V**), astrócitos (**A**), oligodendrócitos (**O**), e processos astrocíticos (**PA**). Ampliação final ao microscópio: 160X. Coloração: azul de toluidina à 1%.

Análise morfológica aos 32 dias de idade.

Os nervos ópticos dos animais do grupo **C** apresentaram grande quantidade de fibras nervosas mielínicas que se mostraram bem agrupadas e compactadas separadas em grupos, organização esta que se apresenta de forma uniforme por todo o nervo, com espaço intersticial reduzido, fibras com lesões discretas e grande quantidade de vasos sanguíneos

Nos nervos ópticos dos animais do grupo **A** as fibras nervosas mostravam-se também agrupadas, mas menos compactadas e com presença de vacualizações, sugerindo uma menor densidade em relação ao grupo **C**, e dentre elas, muitas se apresentavam com lesões na estrutura da bainha de mielina, com axônios aparentemente dilatados.

Em relação aos animais do grupo **RN**, as características se mantiveram próximas das descritas para o grupo **A**, porém o agrupamento das fibras estava melhor organizado e com aparência de maior quantidade e menos lesões da bainha de mielina.

Já o nervo óptico dos animais do grupo **RE** mostrou um aspecto estrutural muito semelhante às características dos nervos ópticos do grupo **C**.

Figura 10. Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo Controle (C) aos 32 dias de idade. As imagens à esquerda mostram a secção transversal dos nervos ópticos e, as imagens à direita mostram a organização estrutural dos nervos ópticos com seus componentes celulares: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (Vs), Processos astrocíticos (PA) e Espaços intersticiais (Ei). Ampliação final ao microscópio: 64X (imagens à esquerda) e 160X (imagens à direita). Coloração: azul de toluidina à 1%.

Figura 11. Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo Anêmico (A) aos 32 dias de idade. As imagens à esquerda mostram a secção transversal dos nervos ópticos e, as imagens à direita mostram a organização estrutural dos nervos ópticos com seus componentes celulares: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS), Processos astrocíticos (PA) e Vacualizações (Vc). Ampliação final ao microscópio: 64X (imagens à esquerda) e 160X (imagens à direita). Coloração: azul de toluidina à 1%.

Figura 12. Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo Recuperado Não Estimulado (RN) aos 32 dias de idade. As imagens à esquerda mostram a secção transversal dos nervos ópticos e, as imagens à direita mostram a organização estrutural dos nervos ópticos com seus componentes celulares: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos sanguíneos (VS) e Processos astrocíticos (PA). Ampliação final ao microscópio: 64X (imagens à esquerda) e 160X (imagens à direita). Coloração: azul de toluidina à 1%.

Figura 13. Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo Recuperado Estimulado (**RE**) aos 32 dias de idade. As imagens à esquerda mostram a secção transversal dos nervos ópticos e, as imagens à direita mostram a organização estrutural dos nervos ópticos com seus componentes celulares: Astrócitos (**A**), Oligodendrócitos (**O**), Vasos Sanguíneos (**VS**) e Processos astrocíticos (**PA**). Ampliação final ao microscópio: 64X (imagens à esquerda) e 160X (imagens à direita). Coloração: azul de toluidina à 1%.

Análise Morfométrica

Área total da secção transversal do nervo óptico.

O valor médio ($\pm$ EPM) em mm^2 da área total da secção transversal dos nervos ópticos dos animais do grupo **C** foi de $1,30 \pm 0,08$, do grupo **A** foi de $1,49 \pm 0,07$, do grupo **RN** foi de $1,33 \pm 0,06$ e do grupo **RE** foi de $1,33 \pm 0,07$.

A análise de variância não revelou diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis utilizadas, ou seja, referente aos fatores dias, dieta e estimulação, o que significa que não há diferença entre os grupos estudados, entre animais alimentados com dieta adequada e dieta deficiente em ferro, ou mesmo não há diferença entre os grupos de animais estimulados e não estimulados.

Número de vasos sanguíneos.

O valor médio ($\pm$ EPM) do número de vasos sanguíneos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais aos 32 dias do grupo **C** foi de $19,90 \pm 2,48$, do grupo **A** foi de $21,94 \pm 3,27$, do grupo **RN** foi de $25,00 \pm 2,16$ e do grupo **RE** foi de $29,17 \pm 3,44$.

Em relação ao fator dieta a ANOVA mostrou que aos 32 dias de idade não houve diferença significativa no número de vasos nos animais dos Grupos **C**, **A** e **RN**, afirmando que tantos os animais alimentados com dieta controle, os anêmicos e os recuperados, possuem a mesma quantidade de vasos ($p > 0,05$). Os animais do grupo **C** possuem a mesma quantidade de vasos que o grupo **A** ($p = 0,590$) e o grupo **RN** ($p = 0,623$). Além disso os grupos **A** e **RN** também possuem a mesma quantidade de vasos ($p = 0,700$).

Em relação ao fator estimulação o Teste t entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que não houve diferença significativa ($p = 0,329$).

Número de astrócitos.

O valor médio ($\pm$ EPM) do número de astrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais aos 32 dias do grupo **C** foi de $101,28 \pm 4,46$, do grupo **A** foi de $116,07 \pm 3,77$, do grupo **RN** foi de $104,46 \pm 5,58$ e do grupo **RE** foi de $121,73 \pm 6,49$.

Em relação ao fator dieta a Análise de Variância mostrou que houve diferença significativa no número de astrócitos nos Grupos **C** e **A**, indicando que os animais alimentados com dieta deficiente em ferro possuem maior quantidade de astrócitos quando comparados com os animais alimentados com dieta controle; esta mesma característica foi encontrada em algumas doenças neurodegenerativas e o aumento dessa célula glial é considerado prejudicial, liberando citocinas e provocando inflamação, assim, inibindo a regeneração axonal (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010) e também outro fato importante considerado por Cavallotti, D.; Cavallotti, C., Pescosolido, Iannetti, e Pacella (2001) é que resultados similares foram relatados como consequência do envelhecimento.

Já em relação aos grupos **C** e **RN**, não houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados nutricionalmente possuem a mesma quantidade de astrócitos que os animais controle ($p=0,092$). Em contrapartida quando comparados os grupos **A** e **RN**, também não houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados possuem a mesma quantidade de astrócitos que os animais anêmicos ($p=0,067$), entretanto é possível notar que os animais do grupo **RN** possuem uma tendência a apresentarem menor quantidade de astrócitos em relação ao grupo **A**.

Em relação ao fator estimulação o Teste t entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que não houve diferença significativa ($p=0,071$), indicando que a estimulação tátil não

interferiu no número de astrócitos encontrados no grupo estimulado, sendo este número semelhante ao encontrado no grupo não estimulado.

Número de oligodendrócitos.

O valor médio ($\pm$ EPM) do número de oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais aos 32 dias do grupo **C** foi de $76,28 \pm 6,61$, do grupo **A** foi de $79,34 \pm 3,31$, do grupo **RN** foi de $108,93 \pm 2,64$ e do grupo **RE** foi de $93,75 \pm 1,94$.

Em relação ao fator dieta a ANOVA mostrou que não houve diferença significativa no número de oligodendrócitos nos Grupos **C** e **A**, indicando que tanto os animais alimentados com dieta deficiente em ferro quanto os animais alimentados com dieta controle possuem a mesma quantidade de oligodendrócitos ($p=0,749$). Já em relação aos grupos **C** e **RN**, houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados nutricionalmente possuem maior quantidade de oligodendrócitos que os animais controle ($p=0,001$). Em relação aos grupos **A** e **RN**, também houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados apresentaram maior quantidade de oligodendrócitos que os animais anêmicos ($p=0,0008$). Em relação ao fator estimulação o Teste t entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que houve diferença significativa ($p=0,0009$), indicando que o grupo **RE** apresentou menor quantidade de oligodendrócitos que o grupo **RN**.

Discussão

O delineamento experimental deste estudo utilizou o modelo de dieta deficiente em ferro ofertada às ratas mães durante o período de lactação e a utilização da mesma dieta para os filhotes no período pós-lactação, modelo este já utilizado por Barbosa et al. (2015), Beard, Erikson, e Jones (2002), Beard et al. (2006), Beard et al. (2007) e De Maman et al. (2006). O modelo de recuperação nutricional deste estudo, no qual os animais alimentados por mães que foram mantidas com dieta deficiente em ferro e após o desmame receberam dieta adequada em ferro com 35mg/kg de dieta até o 32º dia é também similarmente descrito por De Maman et al. (2006). Já o modelo de estimulação tátil utilizado neste estudo, no qual os animais do grupo estimulado foram expostos a técnica de estimulação tátil manual (*Handling*) desde o dia 0 até o 32º dia tem como referência na literatura os estudos desenvolvidos em nosso laboratório por Barbosa et al. (2015) e Rocinholi et al. (2008). As metodologias descritas anteriormente foram utilizadas para analisar estrutural e quantitativamente, ao nível de microscopia de luz, o nervo óptico de ratos Wistar com anemia ferropriva submetidos à estimulação tátil e recuperação nutricional, a partir de um estudo do nervo óptico de ratos.

No período de lactação, foi possível verificar perda progressiva de peso corporal das ratas mães de todos os grupos, provavelmente provocada pela produção de leite, amamentação e desgaste energético, visto que a prole exige atenção e cuidado, como relatado por Barbosa (2015), Beard et al. (2006), De Maman et al. (2008), De Maman et al. (2010), Homem (2004), Lachat (2010).

Os dados hematológicos das ratas mães permitem concluir que a dieta deficiente em ferro utilizada para alimentação das ratas mães dos grupos **A**, **RN** e **RE** durante o período de lactação foi eficiente para induzir nas ratas mães um estado de anemia

ferropriva leve já que a concentração de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito estão abaixo dos valores de normalidade de 14 g/dL para hemoglobina e 45% para hematócrito, para ratos hípidos, descritas por Matsuzawa e Sakazume (1994) e Suckow, Weisbroth e Franklin (2005).

Já para o peso corporal dos filhotes registrados durante o período de lactação, mostrou um aumento progressivo no peso dos filhotes de todos os grupos, ou seja, tanto os animais amamentados pelas ratas mães que foram mantidas com dieta adequada em ferro quanto os animais amamentados pelas ratas mães que foram mantidas com dieta deficiente em ferro apresentaram ganho de peso durante o período em que eram apenas lactentes. Porém, houve diferença significativa no peso corporal dos filhotes dos grupos **C** e **A** a partir do 21º dia, mostrando que os animais que foram mantidos com dieta controle apresentaram maior peso quando comparados com os animais que foram mantidos com dieta deficiente em ferro, sendo que esta diferença se estendeu até o 32º dia, o que indica que a deficiência de ferro das ratas mães durante o período de lactação influencia no peso corporal dos filhotes, sendo esta mesma alteração identificada também por Barbosa et al. (2013) e De Maman et al. (2008). Esta diferença entre os pesos corporais dos filhotes dos grupos **C** e **A** pode ser explicada pela conclusão de O'Connort et al. (1988), de que o leite produzido por ratas mães que foram mantidas com dieta deficiente em ferro (8mg/kg de ferro), possui baixa concentração de ferro e quantidade de gordura diminuída quando comparado com o leite das ratas mães não anêmicas. Ademais, observou-se que a ingesta de leite diária é maior nos filhotes de ratas mães anêmicas quando comparada a ingesta dos filhotes da ninhada da rata mãe controle. Assim, devido o leite produzido pelas ratas mães anêmicas ter menor qualidade em relação ao leite das ratas mães controle, os filhotes anêmicos compensam essa deficiência com o aumento da ingestão diária, o que possivelmente justifica a

semelhança dos valores de pesos corporal entre os filhotes dos grupos **C**, **A**, **RN** e **RE** durante o período de lactação.

Ainda em relação ao peso corporal dos filhotes na comparação dos grupos **RN** e **RE** para verificação da interferência da estimulação tátil nos dados ponderais, não houve diferença entre os animais estimulados e os não estimulados, informação esta também já descrita nas pesquisas de Silveira e colaboradores (2004 e 2006), Soares e colaboradores e Barbosa e colaboradores (2013). Quanto aos dados analisados relacionadas com a recuperação nutricional pôde-se concluir que houve diferença significativa entre os grupos **A** e **RN** nos dias 28 e 32, indicando que os filhotes dos grupos que foram mantidos por 21 dias com dieta deficiente em ferro e após o desmame com dieta controle, mesmo que por apenas 10 dias (a partir do 22º dia) apresentaram maior peso corporal do que os animais mantidos com dieta deficiente em ferro por todo o período do experimento, porém ainda não alcançando o valor de peso corporal dos animais do grupo controle, indicando que a reposição de ferro não foi eficaz o suficiente para levar esses animais a valores de peso corporal iguais aos referentes para normalidade; características estas já identificadas no estudo de De Maman et al. (2006).

A análise dos exames hematológicos, em relação a concentração de hemoglobina os filhotes dos grupos **A**, **RN** e **RE** durante o período de lactação mostrou concentrações de hemoglobina e porcentagem de hematócrito bem inferior aos níveis do grupo **C** nos dias 18 e 21, indicando que a quantidade de ferro ofertada na dieta deficiente em ferro (com 4mg/kg de dieta) foi eficaz para induzir anemia severa nos animais, considerada presente em ratos nos quais a concentração de hemoglobina atinge níveis abaixo de 6 g/dL e a porcentagem de hematócrito atingem 24%, dados de referência descritos por Beard, Wiesinger e Connor (2003), Schalm, Jain e Carroll (1975) e Tanaka et al. (1995). Alterações similares foram encontradas nas pesquisas de Barbosa et al. (2013), Beard et

al. (2006), De Maman et al. (2008); De Maman et al. (2010) que também fizeram uso da mesma dieta deficiente em ferro utilizada no presente estudo. Já na avaliação da recuperação nutricional a partir do 22º dia foi possível verificar que no 32º dia, a concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito dos animais do grupo controle e dos animais submetidos à recuperação nutricional tem os valores hematológicos equivalentes o que indica que a utilização da recuperação nutricional foi eficaz, permitindo que os valores dos exames dos animais recuperados se aproximassem da normalidade obtida nos valores dos filhotes do grupo controle, resultados também descritos no estudo de De Maman et al. (2006).

Em relação ao fator estimulação a comparação dos resultados dos exames hematológicos dos grupos **RN** e **RE**, revelou que a estimulação tátil não interferiu nos resultados, indicando que o grupo estimulado e o grupo não estimulado apresentaram níveis equivalentes de concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito, resultado este também encontrado por Barbosa et al. (2013).

O nervo óptico escolhido para o presente estudo foi selecionado por ser frequentemente utilizada como modelo exemplar para o estudo de um processo celular específico no período de desenvolvimento, com a mielinização das fibras nervosas que fazem dele, já como mostrado nos trabalhos de Barbosa et al. (2013), De Maman et al. (2008), De Maman et al. (2010), Melo, Pinazo-Duran, Salgado-Borges e Tavares (2008), Lachat (2010).

Em relação à análise estrutural deste estudo, os nervos ópticos dos animais do grupo controle apresentaram grande quantidade de fibras nervosas mielínicas que se mostraram bem agrupadas e compactadas separadas em grupos por trabéculas de tecido conjuntivo, com espaço intersticial reduzido, fibras com lesões discretas e grande quantidade de vasos sanguíneos. Nos nervos ópticos dos animais do grupo **A** as fibras

nervosas mostravam-se também agrupadas, mas menos compactadas e com aumento do espaço intersticial, sugerindo uma menor densidade em relação ao grupo **C**, e dentre elas, muitas se apresentavam com lesões na estrutura da bainha de mielina, com axônios aparentemente dilatados, sendo que as características encontradas neste estudo também foram verificadas em outros trabalhos do nosso laboratório por Barbosa et al (2013), De Maman et al. (2008), De Maman et al.(2010), Lachat (2010).

Em relação à recuperação nutricional, as características se mantiveram próximas das descritas para o grupo **A**, porém o agrupamento das fibras estava melhor organizado e com aparência de maior quantidade e menos lesões da bainha de mielina o que foi também visualizado por De Maman (2006).

Já para a análise do efeito da estimulação, o nervo óptico dos animais do grupo **RE** mostrou um aspecto estrutural muito semelhante às características dos nervos ópticos do grupo **C**, indicando um possível efeito protetor da estimulação tátil neonatal minimizando alterações decorrentes da deficiência de ferro, sendo este efeito também observado em nosso laboratório por Barbosa et al. (2013).

Na análise quantitativa, as medidas de área do nervo óptico não mostraram diferenças estatisticamente significativa em relação aos fatores dieta e estimulação, sendo estes resultados similares aos já também encontrados no nosso laboratório nas pesquisas de Barbosa et al. (2013), De Maman et al. (2008), De Maman et al. (2010) o que indica que a deficiência de ferro não gera alterações macroscópicas do nervo óptico, sendo isto explicado possivelmente por se tratar de um micronutriente, pois, já para pesquisas que utilizam deficiência de macronutrientes, como a deficiência proteica, constatarem alterações na área total do nervo óptico, com uma redução de aproximadamente de 15% quando comparada a área total do nervo óptico de animais controle (Conradi, Sjöström, Karlsson, & Sourander (1985).

A análise da quantidade de vasos sanguíneos em relação ao fator dieta não mostrou diferença significativa no número de vasos nos animais que foram mantidos com dieta adequada em ferro e os que foram mantidos com dieta deficiente em ferro, indicando que o fator dieta não influencia na quantidade de vasos sanguíneos, resultados estes também encontrados por Barbosa et al. (2013), porém De Maman (2006), mostrou que a quantidade de vasos sanguíneos estava reduzida no grupo anêmico. Já em relação ao fator estimulação neste estudo não houve diferença significativa na comparação dos grupos **RN** e **RE**, porém na pesquisa de Barbosa et al. (2013), que mostrou aumento na quantidade de vasos sanguíneos no nervo óptico dos animais que passaram por estimulação e independente da condição de dieta, aumento este que ele atribui à estimulação tátil neonatal como papel importante na neovascularização, contudo, não foram encontrados na literatura artigos que comprovem esse dado, mas existem pesquisas que demonstraram que o enriquecimento ambiental aumenta a ramificação vascular tanto cortical como no nervo óptico (Barbosa, 2015; Sirevaag, Black, Shafron & Greenough, 1988) e síntese de fatores pró-angiogênicos (Bengoetxea, Argandoña & Lafuente, 2008).

A análise das células gliais revelou que houve diferença significativa no número de astrócitos nos grupos **C** e **A**, indicando que os animais alimentados com dieta deficiente em ferro possuem maior quantidade de astrócitos quando comparados com os animais alimentados com dieta controle, resultados também encontrados em nervos ópticos de ratos por Barbosa et al. (2013), Cavallotti, Cavallotti, Pescosolido e Pacella (2003) e De Maman et al. (2006) e em macacos Rhesus por Snadell e Peters (2001). Em relação aos grupos **C** e **RN**, não houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados nutricionalmente possuem a mesma quantidade de astrócitos que os animais controle, e em contrapartida quando comparados os grupos **A** e **RN**, também

não houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados possuem a mesma quantidade de astrócitos que os animais anêmicos, entretanto foi possível identificar uma tendência dos animais do grupo **RN** apresentarem menor quantidade de astrócitos em relação ao grupo **A**. Resultado controverso foi encontrado por De Maman (2006), que relata um aumento do número de astrócitos no nervo óptico dos ratos do grupo recuperado mesmo após a reposição de ferro. Em relação ao fator estimulação, a comparação entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que não houve diferença significativa, indicando que a estimulação tátil não interferiu no número de astrócitos encontrados no grupo estimulado, sendo este número semelhante ao encontrado no grupo não estimulado o que significa que a quantidade de astrócito não é influenciada pela estimulação tátil, resultado também encontrado por Barbosa et al. (2013), entretanto, pesquisas já mostraram que o ambiente enriquecido aumenta a densidade e o tamanho de astrócitos (Diamond, Krech & Rosenzweig, 1964; Sirevaag & Greenough, 1987; Sirevaag & Greenough, 1991).

Já em relação ao número de oligodendrócitos, diante do fator dieta, os resultados analisados indicaram estatisticamente que tanto os animais alimentados com dieta deficiente em ferro quanto os animais alimentados com dieta controle possuem a mesma quantidade de oligodendrócitos, sendo este resultado contraditório ao encontrado por Barbosa et al. (2013) e De Maman (2006), que relatam que animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro apresentam número inferior de oligodendrócitos em relação aos animais que se alimentaram com dieta adequada em ferro. Em relação a comparação do número de oligodendrócitos dos animais dos grupos **C** e **RN**, houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados nutricionalmente possuem maior quantidade de oligodendrócitos que os animais controle o que também foi encontrado por Gong e Amemiya (1999), onde ratos com deficiência em manganês

tiveram aumento do número de oligodendrócitos e mantiveram o aumento mesmo após a sua reposição. E por fim, em relação aos grupos **A** e **RN**, também houve diferença significativa, indicando que os animais recuperados apresentaram maior quantidade de oligodendrócitos que os animais anêmicos, o que já foi comentado também pelos autores citados anteriormente com pesquisas com deficiência de manganês.

Em relação ao fator estimulação, a comparação entre os grupos **RN** e **RE**, revelou que houve diferença significativa, indicando que o grupo **RE** apresentou menor quantidade de oligodendrócitos que o grupo **RN**, resultado contraditório ao encontrado por Barbosa et al. (2013), que mostrou importante no aumento de oligodendrócitos, nos animais estimulados assim como para Sirevaag e Greenough (1987), que mostraram aumento número final de oligodendrócitos no córtex visual de ratos que eram criados em ambiente enriquecido.

Conclusão

A análise dos resultados desta investigação permite estabelecer as seguintes conclusões:

O modelo experimental utilizado foi eficaz no desenvolvimento de anemia ferropriva leve nas ratas mães e severa nos filhotes a partir da utilização da dieta com 4 mg de ferro/kg de ração, resultados estes confirmados por meio dos exames hematológicos realizados.

A dieta carente em ferro aplicada não provocou a mesma intensidade de perda de peso nas ratas mães quando comparadas aos lactentes. Foi possível verificar menor crescimento ponderal nos animais amamentados por ratas mães anêmicas quando em comparação com os filhotes da rata mãe controle.

A reposição de ferro foi eficiente na restauração dos índices hematológicos (concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito), porém, não foi completamente eficiente para o ganho de peso corporal dos filhotes, que se mostraram superiores em relação ao grupo anêmico, mas inferiores ao grupo controle.

O método de estimulação tátil utilizado (*Handling*), não interferiu no peso corporal dos filhotes anêmicos. Também não houve interferência da estimulação tátil nos dados hematológicos dos filhotes estimulados quando comparados com os não estimulados.

A anemia ferropriva ocasionou alterações morfológicas e morfométricas no nervo óptico.

A associação das técnicas de estimulação tátil e recuperação nutricional mostrou-se eficaz na minimização das alterações morfológicas causadas pela deficiência de ferro, mostrando uma melhora na organização estrutural do nervo óptico dos animais

recuperados e estimulados que se assemelha a organização estrutural dos animais controle. Enquanto que, o grupo recuperado porém, não estimulado permaneceu semelhante ao grupo anêmico.

Morfometricamente essa associação não interferiu no número de vasos sanguíneos, entretanto, resultou em uma normalização do número de astrócitos e de oligodendrócitos.

Referências

- Algarin, C., Peirano, P., Garrido, M., Pizarro, F., & Lozoff, B. (2003). Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. *Pediatric Research*, 53, 217-223.
- Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 341, 1986-1995.
- Barbosa, E. H. (2013). Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar hígdos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Barbosa, E. H., Soares, R. O., Braga, N. N., Almeida, S. S., & Lachat, J. J. (2015). Effects of environmental enrichment on blood vessels in the optic tract of malnourished rats: A morphological and morphometric analysis. *Nutritional Neuroscience*, Mar 11. [Epub ahead of print].
- Beard, J.L., Connor, J. R., & Jones, B.C. (1993). Iron in the brain. *Nutrition Reviews*, 51, 157-170.
- Beard, J. L. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism, and neuronal functioning. *The Journal of Nutrition*, 131, 568S-579S.
- Beard, J. L., Erikson, K. M., & Jones, B. C. (2002). Neurobehavioral analysis of developmental iron deficiency in rats. *Behavioral Brain Research*, 134, 517-524.
- Beard, J. L., Wiesinger, J. A., & Connor, J. R. (2003). Pre-and postweaning iron deficiency alters myelination in Sprague-Dawley rats. *Developmental Neuroscience*, 25, 308-315.
- 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. *Behavioral Brain Research*, 170, 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, 1176-1182.
- Bedi, K. S., & Bhide, P. G. (1988). Effects of environmental diversity on brain morphology. *Early Human Development*, 17, 107-143.
- Bene, C., Manzler, A., Bene, D., & Kranias, G. (1989). Irreversible ocular toxicity from single "challenge" dose of deferrioxamine. *Clinical Nephrology*, 31, 45-48.
- Bengoetxea, H., Argandoña, E. G., & Lafuente, J. V. (2008). Effects of visual experience on vascular endothelial growth factor expression during the postnatal development of the rat visual cortex. *Cerebral Cortex*, 18, 1630-1639.
- Borgna-Pignatti, C., De Stefano, P., & Broglia, A. M. (1984). Visual loss in patient on high-dose subcutaneous deferrioxamine. *Lancet*, 24, 681.

- Carughi, A., Carpenter, K.J., & Diamond, M.C. (1989). Effect of environmental enrichment during nutritional rehabilitation on body growth, blood parameters and cerebral cortical development of rats. *The Journal of Nutrition*, 119, 2005-2016.
- Cavallotti, D., Cavallotti, C., Pescosolido, N., Iannetti, G. D., & Pacella, E. (2001). A morphometric study of age changes in the rat optic nerve. *Ophthalmologica*, 215, 366-371.
- Connor, J.R., & Benkovic, S. A. (1992). Iron regulation in the brain: Histochemical, Biochemical and Molecular Considerations. *Annals of Neurology*, 32, S51-S61.
- Connor, J. R., Menzies, S. L., Burdo, J. R., & Boyer, P.J. (2001). Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatric Neurology*, 25, 118-129.
- Conradi, N. G., Sjöström, A., Karlsson, B., & Sourander, P. (1985). Functional development of the visual system in normal and protein deprived rats II. Morphometric and biochemical studies on adult optic nerve. *Acta Physiologica Scandinavica*, 125(2), 277-283.
- Conrad, M.E., Umbreit, J. N., & Moore, E. G. (1999). Iron absorption and transport. *The American Journal of the Medical Sciences*, 318, 213-229.
- Crnic, L. S. (1983). Effects of nutrition and environment on brain biochemistry and behavior. *Developmental Psychobiology*, 16, 129-145.
- Cuniff, P. (1995). Official methods of analysis of AOAC International. In: Association of Official Analytical Chemists International, 16, 58-63.
- Del Arco, A., Segovia, G., Canales, J. J., Garrido, P., De Blas, M., García-Verdugo J.M., & Mora, F. (2007). Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neural Transmission*, 114, 43-48.
- De Maman, A.S. (2006). Análise morfométrica do nervo óptico de ratos Wistar após recuperação da anemia ferropriva (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- De Maman, A.S., Homem, J.M., & Lachat, J.J. (2008). Early iron deficiency produces persistent damage to visual tracts in Wistar rats. *Nutritional Neuroscience*, 11, 283-289.
- De Maman, 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, 901-908.
- Diamond, M. C., Krech, D., & Rosenzweig, M. R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 123, 111-119.
- Edwards, H.P., Barry, W.F., & Wyspianski, J. O. (1969). Effects of differential rearing

- on photic evoked potential and brightness discrimination in the albino rat. *Developmental Psychobiology*, 2, 133-1381.
- 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, 693-701.
- Friel, J. K., Aziz, K., Andrews, W. L., Harding, S. V., Courage, M. L., & Adams, R. J. (2003). A double-masked, randomized control trial of iron supplementation in early infancy in healthy term breast-fed infants. *Journal of Pediatrics*, 143, 582-586.
- Gong, H., & Amemiya, T. (1999). Optic nerve changes in manganese-deficient rats. *Experimental Eye Research*, 68, 313-320.
- 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.
- Lachat, D. (2010). Análise ultra estrutural do nervo óptico de ratos wistar hígdos e com anemia ferropriva neonatal (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- Lima, J. G. (1988). Avaliação das alterações comportamentais, ponderais e bioquímicas do sistema nervoso central de ratos com restrição proteica, expostos a estimulação ambiental (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Lima, J. G. (1992). Estudo morfológico e morfométrico do corpo caloso de ratos submetidos a diferentes tipos de dieta e à estimulação sensorial e ambiental (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Lin, H. H., & Connor, J. R. (1989). The development of the transferrin-transferrinreceptor system in relation to astrocytes, MPB and galactocerebroside in normal and myelindeficient rat optic nerves. *Developmental Brain Research*, 49, 281-293.
- 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 Network*, 277, 973-976.
- Lozoff, B., Andraca, I. D., Castillo, M., Smith, J. B., Walter, T., & Pino, P. (2003). Behavioral and developmental effects of preventing iron-deficiency anemia in healthyfull-term infants. *Pediatrics*, 112, 846-854.
- Matsuzawa, T., & Sakazume, M. (1994). Effects of fasting on haematology and clinical chemistry values in the rat and dog. *Comparative Haematology International*, 4, 152-156.
- Melo, P., Pinazo-Durán, M. D., Salgado-Borges, J., & Tavares, M. A. (2008). Correlation of axon size and myelin occupancy in rats prenatally exposed to methamphetamine. *Brain research*, 1222, 61-68.
- Monga, M., Walia, V., Gandhi, A., Chandra, J., & Sharma, S. (2010). Effect of iron

- deficiency anemia on visual evoked potential of growing children. *Brain and Development*, 32, 213–216.
- Moos, T., & Morgan, E. V. (2002). A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain. *Developmental Neuroscience*, 24, 99-105.
- Morath, D. J., & Mayer-Proschek, M. (2001). Iron Modulates the differentiation of a distinct population of glial precursor cells into oligodendrocytes. *Developmental Biology*, 237, 232-243.
- 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, 477-485
- Pereira-da-Silva, M. S., Cabral-Filho, J.E., & De-Oliveira, L. M. (2009). Effect of early malnutrition and environmental stimulation in the performance of rats in the elevated plus maze. *Behavioral Brain Research*, 205, 286-289.
- Rajan, K. S., Colburn, R. W., & Davies, J. (1976). Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas. *Life Sciences*, 18, 423-432.
- Rocinholi, L. F., Almeida, S. S., & De Oliveira, L. M. (1997). Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 407-413.
- Rocinholi, L. F., De Oliveira, L. M., & Colafêmina, J. F. (2001). Malnutrition and environmental stimulation in rats: wave latencies of the brainstem auditory evoked potentials. *Nutritional Neuroscience*, 4, 199-212.
- Rocinholi, L. F., Lachat, J. J., & Dutra de Oliveira, J. E. (2008). Auditory evoked potential in handled and non-handled iron-deficient rats. *Psychology & Neuroscience*, 1, 129 – 134.
- Santucci, L. B., Daud, M. M., Almeida, S. S., & De Oliveira, L. M. (1994) Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to the diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 393-398.
- Sarici, S. U., et al. (2001). The effect of iron supplementation on visual-evoked potentials in infants with iron-deficiency anemia. *Journal of Tropical Pediatrics*, 47, 132-135.
- Schalm, O. W., Jain, N. C., & Carroll, E. J. (1975). *Veterinary hematology*: Third Edition. Lea & Febiger.
- Scott, T. M., & Foote, J. (1984). The postnatal development of blood vessels in the optic nerve of normotensive and hypertensive rats. *Journal of Anatomy*, 138, 635-642.

- Sirevaag, A. M., & Greenough, W. T. (1987). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses.: III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Research*, 424, 320-332.
- Sirevaag, A. M., Black, J. E., Shafron, D., & Greenough, W. T. (1988). Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats. *Developmental Brain Research*, 43, 299-304.
- Sirevaag, A. M., & Greenough, W. T. (1991). Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Research*, 540, 273-278.
- 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, 237-253.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32, 638-647.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7-35.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., & Franklin, C. L. (Eds.). (2005). *The laboratory rat*. Academic Press.
- 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, 257-263.
- Umbelino, D. C., & Rossi E. A. (2006). Deficiência de ferro: consequências biológicas e propostas de prevenção. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 27, 103-112.
- Yager, J. Y., & Hartfield, D. S. (2002). Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. *Pediatric Neurology*, 27, 85-92.
- Yip, R. (2002). Prevention and control of iron deficiency: policy and strategy issues. *Journal of Nutrition*, 132, 802S-805S.