UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS EFEITOS
DA ESTIMULAÇÃO TÁTIL NEONATAL SOBRE O NERVO ÓPTICO
DE RATOS WISTAR HÍGIDOS OU SUBMETIDOS A UMA DIETA
DEFICIÊNTE EM FERRO NO PERÍODO PÓS-NATAL PRECOCE**

Everton Horiquni Barbosa

Ribeirão Preto

2013

EVERTON HORIQUINI BARBOSA

Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar hígidos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce

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^o João-José Lachat

Ribeirão Preto

2013

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.

Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar hígidos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce. Ribeirão Preto, 2013.

89 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, 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. Anemia ferropriva. 3. Estimulação tátil. 4. Morfologia. 5. Morfometria. 6. Nervo óptico. 7. Ratos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Everton Horiqini Barbosa

Título: Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos wistar hígidos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a 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...

À minha mãe, **Maria José Horiquni Barbosa**, que me deu valores e que me incentivou em todos os momentos, com o máximo de amor e carinho que uma mãe pode dar. Foi, e é, o coração da minha família.

Ao meu querido pai, **Amir Soares Barbosa**, que mesmo sem saber, me deu coragem e me mostrou que com perseverança e trabalho duro posso superar qualquer obstáculo. Foi, e é, a força da minha família.

Ao meu irmão, **Amir Horiquni Barbosa**, grande amigo e que sempre torceu por mim, e que fez falta quando nos distanciamos.

À minha irmã, **Tamiris Horiquni Barbosa** (Mirinha), que sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos, nos angustiantes e nos felizes, sempre com um ombro e colo a disposição.

E à minha doce **Mari**, pelo incentivo, sempre demonstrado com muito carinho e frases confortantes. Obrigado pela paciência nos momentos que faltei.

Graças ao esforço e amor de cada um deles, eu pude chegar até aqui.

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

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

Aos amigos do **Laboratório de Neuroanatomia**, Patricia Pacagnella, Denise Lachat e Aline Soares de Souza e aos amigos do **Laboratório de Nutrição e Comportamento**, Roberto Oliveira Soares e Natalia Nassif. Obrigado pela amizade, dentro e fora da Universidade.

À **Izilda Violante**, Técnica do laboratório de Morfologia experimental, que sempre esteve disposta a ajudar em todos os momentos, sempre paciente e amiga, me mostrando os detalhes do processamento histológico sempre que preciso.

À **Tereza Maglia**, Técnica do Laboratório de Microscopia eletrônica, que me ensinou, sempre muito paciente e com conversas sinceras.

Ao **Antônio Renato Meirelles e Silva**, Técnico do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, que me ensinou parte dos procedimentos de fotomicrografia, discutindo sobre o assunto, sempre com muito entusiasmo.

E um agradecimento especial a todos que doaram preciosos minutos no “**Cantinho do Cappuccino**”, sempre com conversas saudáveis e carinhosas.

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.

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

(Provérbio Russo)

RESUMO

Barbosa, E. H. (2013). Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar hígidos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce. Dissertação de Mestrado, Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Diante da deficiência de ferro que leva a processos degenerativos do sistema nervoso central e da estimulação tátil neonatal como uma estratégia não invasiva e promissora para atenuar os déficits causados pela degeneração, assim, justifica-se comparar em ratos submetidos à dieta deficiente em ferro (**A** - 4mg/kg) ou dieta adequada em ferro (**C** - 35mg/kg) os efeitos da estimulação tátil neonatal, em relação aos aspectos morfológicos e morfométricos das células gliais, fibras mielínicas e vasos sanguíneos do nervo óptico, aos 18, 22 e 32 dias de idade. Foram utilizadas 12 ninhadas de ratos *Wistar*, compostas por 12 ratas-mãe e 72 filhotes machos recém-nascidos, que por sua vez, foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta submetida às ratas-mãe (**A** e **C**). Metade das ninhadas do grupo **A** e **C** foram submetidas à estimulação tátil (**E**) e a outra metade não recebeu nenhuma forma de estímulo (**N**). Resultando, portanto, nos seguintes grupos experimentais: grupo controle não estimulado (**CN**), grupo controle estimulado (**CE**), grupo anêmico não estimulado (**AN**), e grupo anêmico estimulado (**AE**), cada grupo foi composto por 3 ratas-mães e 18 filhotes. Aos 18, 22 e 32 dias de vida, seis animais de cada grupo experimental foram profundamente anestesiados e perfundidos por via transcardíaca. Os nervos ópticos foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi DRC, Carl Zeiss) e esses fragmentos foram refixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato e então processados para inclusão em araldite. Na análise dos aspectos morfológicos dos nervos ópticos dos ratos do grupo **AN**, foi observada grande quantidade de fibras com aumento do diâmetro axonal indicando aumento de líquido intracelular e, por conseguinte edema axonal. Ainda, foram encontradas bainhas de mielina desconfiguradas, caracterizando frouxidão lamelar ou desprendimento da bainha de mielina de seu axônio, além do mais, é notório o aumento de espaços entre as fibras. Os astrócitos e os oligodendrócitos também demonstravam sinais claros de sofrimento celular, apresentando deformidades da membrana nuclear, como invaginação ou irregularidade do envelope nuclear. Os nervos ópticos dos ratos anêmicos e submetidos à estimulação neonatal apresentaram diminuição dos efeitos deletérios

da deficiência de ferro. Não houve diferença das características dos nervos ópticos dos grupos **CN** e **CE**. De acordo com o resultado de quantificação de células gliais, constata-se que os animais alimentados com dieta inadequada em ferro apresentaram maior quantidade de astrócitos e menor quantidade de oligodendrócitos em todas as idades estudadas e essas medidas não são alteradas pela estimulação tátil neonatal. A quantificação de vasos sanguíneos mostra que a dieta deficiente em ferro não tem qualquer efeito sobre a densidade de vasos, entretanto a estimulação tátil neonatal aumenta significativamente o número de vasos no nervo óptico. A quantificação revelou grande aumento de fibras nervosas mielínicas lesadas nos animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro e também revelou que a estimulação tátil neonatal diminui o número de fibras lesadas. Os dados do presente estudo mostram que animais alimentados com dieta deficiente em ferro sofrem alterações celulares importantes durante o desenvolvimento pós-natal precoce do nervo óptico quando comparados com controle. Também é possível notar que a estimulação tátil neonatal, realizada no período crítico do desenvolvimento do SNC foi eficaz, minimizando a quantidade de fibras mielínicas lesadas e aumentando a quantidade de vasos sanguíneos.

Palavra-chave: Deficiência de ferro. Anemia ferropriva. Estimulação tátil. Morfologia. Morfometria. Nervo óptico.

*A*BSTRACT

ABSTRACT

Barbosa, E. H. (2013). Morphological and morphometric evaluation of the effects of neonatal tactile stimulation on the optic nerve of healthy wistar rats subjected to a iron-deficient diet in the early post-natal period. Dissertação de Mestrado, Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Previous studies showed that iron deficiency leads to degenerative processes in the CNS and neonatal tactile stimulation is a noninvasive and promising strategy to attenuate the deficits caused by the degeneration, it is important to compare in rats, subjected to iron-deficient diet (A - 4mg/kg) or iron-adequate diet (C - 35mg/kg), the effects of neonatal tactile stimulation on the morphometric aspects of the optic nerve, such as the quantification of glial cells, blood vessels and myelinated fibers, at 18, 22 and 32 days of age. A total of twelve litters of Wistar rats was used, consisting of 12 dam and 72 male newborns, which were divided into two groups according to the diet given to the dam (A and C). Half of the litters in group A and C was subjected to tactile stimulation (E) and the other half received no stimulation (N). Finally, resulting in four experimental groups: non-stimulated control group (CN), stimulated control group (CE), the non-stimulated anemic group (AN), and the stimulated anemic group (AE), each group consisted of 3 dam and 18 pups. At 18, 22 and 32 days of life, six pups of each group was anesthetized and sacrificed by transcardiac perfusion. The optic nerve of the pups was dissected and immersed in 1% osmium tetroxide and embedded in araldite. Morphological analysis of the AN group showed that a large amount of fibers with increased axonal diameter which indicates excessive intracellular fluid and therefore axonal swelling. Furthermore, it was found disarranged myelin sheaths, characterized by lamellar loose or myelin detached from its axon. In addition, there was an increase of spaces between the fibers. Astrocytes and oligodendrocytes also showed clear signs of cell suffering, with deformities of the nuclear membrane, such as invagination or irregularity of the nuclear envelope. The analysis of the AE group showed a decrease of the deleterious effects of iron deficiency. There was no difference in the characteristics of the optic nerves of CN and CE groups. According to the result of glial cells quantification, it was found that animals fed with iron-deficient diet had a higher amount of astrocytes and a lower amount of oligodendrocytes at all ages studied, and these numbers were not altered by tactile stimulation. The blood vessels quantification shows that the iron-deficient diet has no effect

on the vessel density, however, the neonatal tactile stimulation increased significantly the number of vessels in optic nerve. Morphometry showed a significant increase of the number of damaged fibers on optic nerve of animals that were fed with iron-deficient diet and neonatal tactile stimulation reduced the number of damaged fibers in these animals. The present study showed that animals fed with iron-deficient diet presented significant cellular changes during the early postnatal development of the optic nerve compared with their paired controls. It was also noted that the neonatal tactile stimulation, performed during the critical period of development of the CNS was effective, minimizing the amount of damaged fibers and increasing the amount of blood vessels.

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

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS e MÉTODOS.....	26
2.1. Composição das Ninhadas e dos Grupos Experimentais	27
2.2. Manutenção dos Animais	28
2.3. Manutenção dos Materiais.....	30
2.4. Estimulação Tátil Neonatal	31
2.5. Dados Ponderais	31
2.6. Dados Hematológicos (Exames Laboratoriais)	32
2.7. Sacrifício, Coleta do Material e Processamento Histológico	32
2.8. Documentação, Avaliação Morfológica e Morfométrica das Amostras	33
2.9. Avaliação Estatística	36
3. RESULTADOS	37
3.1. Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos das Ratas-Mães.....	38
3.1.1. Peso Corporal das Ratas-Mães	38
3.1.2. Hemoglobina e Hematócrito das Ratas-Mães	40
3.2. Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos dos Filhotes.....	42
3.2.1. Peso Corporal dos Filhotes.....	42
3.2.2. Hemoglobina e Hematócrito dos Filhotes	45
3.3. Avaliação Morfológica: Aspecto Geral do Nervo Óptico.....	47
3.3.1. Análise Morfológica aos 18 Dias de Idade	51
3.3.2. Análise Morfológica aos 22 Dias de Idade	53
3.3.3. Análise Morfológica aos 32 Dias de Idade	55
3.4. Avaliação Morfométrica.....	57
3.4.1. Área Total e Diâmetro Mínimo da Secção Transversal	57
3.4.2. Número Total de Vasos Sanguíneos	58
3.4.3. Número Total de Astrócitos	59
3.4.4. Número Total de Oligodendrócitos	61

3.4.5. Percentual de Astrócitos e Oligodendrócitos	62
3.4.6. Número Total de Fibras Nervosas Mielínicas Lesadas	64
4. DISCUSSÃO	67
5. CONCLUSÕES.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

A deficiência de ferro é a carência nutricional mais frequente no mundo, sendo um dos principais fatores que levam a incapacidade e a morte (WHO, 2001; Boy et al., 2009). Em 2002, a deficiência de ferro foi considerada um dos fatores mais importantes que contribuem para a taxa global de doença, ficando acima de fatores como a obesidade, o sedentarismo e drogas ilícitas (WHO, 2005). É responsável por quase um milhão de mortes por ano, correspondendo a 1,3% das mortes masculinas e 1,8% das mortes femininas no mundo. É também atribuída a deficiência de ferro, aproximadamente um quinto das mortes perinatal e um décimo das mortes maternas, nos países em desenvolvimento (WHO, 2002). É uma desordem nutricional que afeta tanto países não industrializados, bem como praticamente todos os países industrializados, se destacando como um sério problema de saúde pública, de desenvolvimento social e econômico (WHO, 2001; 2005).

A consequência mais óbvia da deficiência de ferro é a anemia ferropriva. Aproximadamente 50% dos casos de anemia tem a deficiência de ferro como agente causal e para cada caso de anemia ferropriva existem de 2 a 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, varia aproximadamente de 2 a 4 bilhões (WHO, 2001; Boy et al., 2009).

Nos Estados Unidos a deficiência de ferro afeta 2,4 milhões de crianças e 7,8 milhões de mulheres, dos quais, a anemia ferropriva foi encontrada em aproximadamente 20% (490 mil) e 40% (3,3 milhões) respectivamente (Looker, Dallman, Carrol, Gunter & Johnson, 1997; Brotanek, Gosz, Weitzman, & Flores, 2007). No Brasil, não há levantamento de dados nacionais sobre a prevalência de anemia ferropriva, mas os poucos estudos regionais mostram uma tendência de aumento da prevalência em 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, Tudisco, Goldenberg, Athaide & Vaisman, 1978; Monteiro & Szarfarc, 1987; Monteiro, Szarfarc & Mondini, 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).

O rígido metabolismo férrico é o que mantém a concentração corporal de ferro bem estabelecida, sendo que recém-nascidos possuem cerca de 250mg de ferro/kg de peso corporal, e por outro lado, adultos possuem de 35 a 40mg de ferro/kg de peso corporal e que, em condições normais, se mantém constantes por toda a vida. Essa quantidade em excesso nos recém-nascidos é devido ao depósito de ferro placentário, do qual o recém-nascido recebe

o ferro da mãe (Conrad & Umbreit, 2000; 2002; Friedman et al., 2012). Mesmo assim, ao longo do primeiro ano de vida, aconselha-se a suplementação de ferro, visando prevenir a carência deste microelemento e suas consequências (Dewey et al., 2002). Por volta de 70% da concentração corporal de ferro, cerca de 2,5 gramas, está disposto nas moléculas de hemoglobina dos eritrócitos circulantes, 10% está nas mioglobinas, citocromos e enzimas respiratórias, correspondentes a 0,4 gramas, e os 20% restantes, aproximadamente 1 grama, é armazenado como ferritina e hemossiderina (Conrad, Umbreit & Moore, 1999; Conrad & Umbreit, 2002).

Aproximadamente 2mg de ferro/dia são absorvidas na forma heme e na forma inorgânica pelas células do epitélio intestinal, os chamados enterócitos, que se localizam na parte superior das vilosidades duodenais. Para tanto, o ferro passa do lúmen intestinal para o plasma sanguíneo, e em seguida é absorvido pelas células através do processo de endocitose, onde será utilizado ou será armazenado como ferritina ou hemossiderina (Conrad & Umbreit, 2002; Donovan, Roy & Andrews, 2006; Andrews & Schmidt, 2007).

Esse mesmo processo de absorção e armazenamento celular de ferro ocorre nas células nervosas, apesar de algumas particularidades como a transição através da barreira hematoencefálica e a barreira líquorica (Jefferies et al., 1984; Batista-Nascimento, Pimentel, Andrade Menezes & Rodrigues-Pousada, 2012).

O ferro é essencial para quase todos os organismos vivos, através da ampla e generalizada participação em vários processos metabólicos importantes para o desenvolvimento, como a 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 & Umbreit, 2000; Andrews & Schmidt, 2007).

No âmbito da neurobiologia, o ferro, além das diversas funções já citadas, está envolvido na síntese e empacotamento de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e o GABA, e ainda em relação à neuroquímica, está envolvido na recaptação e degradação destes neurotransmissores (Beard, Connor & Jones, 1993; Yager & Hartfield, 2002). No encéfalo, as estruturas que se destacam quanto à quantidade de ferro armazenadas são: globo pálido lateral e medial, substância negra, núcleo denteado, putamem, núcleo rubro, tálamo, núcleo caudado e em menor extensão o núcleo estriado. No córtex cerebral e no córtex cerebelar as concentrações de ferro são baixas. (Rajan, Colburn & Davis, 1976; Francois, Nguyen-Legros & Percheron, 1981; Hill & Switzer, 1984; Morris, Keith, Edwardson & Pullen, 1992).

Em adição, o ferro se mostra um componente essencial na síntese de um dos lipídios que formam e mantém a estrutura da bainha de mielina, o cerebrosídeo (Yu, Steinkirchner, Rao &

Larkin, 1986). Observações bioquímicas demonstram que regiões cerebrais com mais mielina apresentam maiores concentrações de transferrina. Deste modo, é importante ressaltar que aproximadamente 80% do ferro no sistema nervoso de ratos estão localizados na fração de mielina e o restante em frações mitocondriais e sinaptossomais (Beard et al., 1993; Connor & Fine, 1987). Além disso, o pico da absorção férrica e a alta densidade de receptor de transferrina no sistema nervoso, especificamente nas células gliais, coincidem com o período de maior atividade do processo de mielinização e de proliferação tardia de oligodendrócitos (Beard et al., 1993; 2001; Connor & Menzies, 1996; 2001; Moos & Morgan, 2002; Todorich, Pasquini, Garcia, Paez & Connor, 2009). Outro fato importante ocorre no início do processo de mielinização, sendo que a ferritina inicialmente acumulada nas micróglias passa a se acumular nos oligodendrócitos, célula responsável pelo processo de mielinização do sistema nervoso central (Sanyal, Polak & Szuchet, 1996; Cheepsunthorn, Palmer & Connor, 1998). Assim, com todas essas informações, atribui-se ao ferro um papel importante durante o desenvolvimento do sistema nervoso e um relacionamento funcional entre a captação de ferro e a produção de mielina.

Desta forma, conhecendo o desenvolvimento neural, é possível afirmar que existe uma fase considerada altamente vulnerável perante insultos nutricionais, definida por muitos pesquisadores como “período crítico” do desenvolvimento. Contudo, o início do desenvolvimento do sistema nervoso surge de um processo chamado neurulação que ocorre no embrião humano por volta da segunda semana gestacional e em ratos por volta do oitavo dia gestacional. A partir da neurulação até o final do desenvolvimento neural, as células passam por vários processos, como a proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose (ou apoptose) e mielinização (Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone Jr, 2000).

Durante o desenvolvimento neural, em todas as espécies, existe um período transitório de crescimento acelerado, conhecido como o “surto de crescimento cerebral” (Rice & Barone Jr, 2000). Nas várias espécies de mamíferos, o surto de crescimento cerebral ocorre em fases diferentes, e por isso podem ser consideradas como tendo predomínio do desenvolvimento cerebral na fase pré-natal, perinatal ou pós-natal. Contudo, é obvio que o desenvolvimento ocorre de forma contínua, e a transição entre os períodos pré, peri e pós-natal ocorre de forma tênue e sem grandes alterações, mesmo sabendo que o ambiente extrauterino é mais complexo e com mais informações do que o ambiente intrauterino (Dobbing, 1979). A ontogenia do desenvolvimento neural em roedores é parecida com a dos humanos, obedecendo a certa relação tempo/evento. Nos seres humanos o desenvolvimento do sistema nervoso tem seu pico na fase pré-natal e os roedores têm considerável desenvolvimento neural na fase pós-

natal. Portanto, a valorização e o conhecimento do calendário de desenvolvimento do sistema nervoso tem grande importância nos estudos relacionados a hipóteses de vulnerabilidade do sistema e insultos nutricionais (Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone Jr, 2000).

Já é bem conhecido que o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso do rato ocorre durante a fase de amamentação (0 a 21 dias de vida). Smart, Dobbing, Adlard, Lynch e Sands (1973) corroboram com essa afirmação a partir de uma comparação entre a 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, os resultados indicam menor peso do cérebro e do cerebelo nos animais desnutridos a partir do nascimento. Ainda neste sentido, Wiggins (1982) mostra que a desnutrição pode afetar a mielinização, causando alterações persistentes, e que este processo é especialmente vulnerável durante o desenvolvimento pós-natal de roedores, pois, sabe-se que o processo de mielinização ocorre do primeiro ao 35º dia de vida e a proliferação tardia de oligodendrócitos acontece do quinto ao 12º dia de vida (Berardi, Pizzorusso & Maffei 2000; Morgane, Mokler & Galler, 2002; Hensch, 2004; 2005; Spolidoro, Sale, Berardi & Maffei, 2009).

A deficiência de ferro que se destaca como a desordem nutricional mais frequente no mundo, e atinge principalmente crianças na idade pré-escolar, ou seja, durante a fase do desenvolvimento neural, se torna então, de grande relevância para a neurociência. Pesquisas indicam que a baixa concentração de ferro no cérebro causada pela deficiência de ferro pode ser revertida com uma dieta rica em ferro, mas isso dependendo da gravidade e duração do insulto nutricional (Lundström, Siimes & Dallman, 1977). Ainda nesse sentido, estudos recentes com deficiência de ferro, em ratos no período pré-natal e suplementação de ferro precoce na vida pós-natal, reverteram completamente as concentrações de ferro cerebral na vida adulta, entretanto, alterações estruturais, déficits funcionais e cognitivos podem permanecer (Connor, Menzies, Burdo, & Boyer, 2001; Pinero, Jones & Beard, 2001; Jorgenson, Sun, O'Connor & Georgieff, 2005; Lozoff & Georgieff, 2006; Unger et al., 2007). Reforçando as indicações de que a deficiência de ferro gera alterações estruturais persistentes, pesquisas prévias realizadas em nosso laboratório, mostraram que ratos que sofreram deficiência de ferro por todo o período de lactação e passaram por suplementação de ferro a partir do 22º dia de vida pós-natal, não apresentaram reversão satisfatória das alterações estruturais e ultraestruturais do sistema nervoso (DeMaman, Homem & Lachat, 2008; DeMaman, Melo, Homem, Tavares & Lachat, 2010).

Estudos demonstram que a deficiência de ferro na infância gera déficit de atenção, baixo escore de inteligência e distúrbios de percepção, entretanto essas mesmas alterações não

ocorrem quando a deficiência de ferro é imposta na vida adulta, o que indica que o ferro é importante durante a fase de desenvolvimento cerebral (Beard et al., 1993; Lozoff et al., 2006). Pesquisadores também têm demonstrado que essa deficiência pode ter um impacto significativo no comportamento afetivo de crianças e essas apresentam baixos escores em testes de desenvolvimento mental e motor (escala de Bayley), expressam também, hesitação com o examinador durante os testes, infelicidade por parte ou toda a sessão, cansaço, inquietação ou tensão corporal, além disso, essas crianças não tiveram melhora após a terapia de suplementação de ferro na maioria dos estudos (Lozoff, 1989; 1998; Beard et al., 1993).

Os efeitos da deficiência de ferro frente ao comportamento de roedores já foram bem investigados, resultando em baixa atividade locomotora e reversão dos padrões de termoregulação e atividade diurna (Glover & Jacobs, 1972; Youdim, Yehuda & Bem-Uriah, 1981; Hunt, Zito, Erjavec & Johnson, 1994), diminuição da exploração de ambientes novos, pouco responsivo e aumento da latência de resposta a estímulos aversivos (Weinberg, Dallman & Levine, 1980), a deficiência de ferro também induz comportamentos típicos de ansiedade como menor número de entradas e menor tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado (Li et al., 2011). Algumas dessas alterações comportamentais têm como base biológica, modificações na bioquímica dopaminérgica e/ou serotoninérgica. (Youdim et al., 1981; Felt & Lozoff, 1996; Beard, Erikson & Jones, 2002; Beard, 2003; Beard et al., 2006; Unger et al., 2007).

Nos modelos animais a deficiência de ferro pode ser induzida em diferentes estágios do desenvolvimento, com intuito de interferir em processos celulares específicos do desenvolvimento cerebral. Entretanto, durante o surto de crescimento cerebral em ratos, as células e seus vários processos de desenvolvimento também estão sensíveis a estímulos enriquecedores e com isso, podem tornar o cérebro mais capacitado e por esse motivo é essencial que estímulos sejam realizados durante as primeiras semanas após o nascimento, quando a atividade sensorial leva ao requinte estrutural do sistema nervoso. Essas mudanças ocorrem de forma funcional e estrutural na organização do sistema nervoso, e isso caracteriza neuroplasticidade (Sale, Berardi & Maffei, 2009).

Resultados existentes sugerem que estímulos do tipo enriquecimento ambiental podem acelerar, de forma notável, o desenvolvimento e/ou reorganizar estruturas do sistema nervoso central, resultados estes, tanto em aspectos estruturais 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 (Van-Praag, Kempermann & Gage, 2000; Mohammed et al., 2002; Cancedda et al., 2004; Sale, 2004; 2009; Spolidoro et al., 2009).

A estimulação neonatal por manipulação tátil também tem sido utilizada como modelo experimental para se estudar os mecanismos pelos quais variações precoces do ambiente afetam o desenvolvimento de sistema nervoso. Pesquisas que fazem uso da estimulação tátil neonatal em ratos utilizam procedimentos simples, usualmente a técnica é realizada pela manipulação do experimentador, por um período de 3 a 15 minutos durante as primeiras semanas de vida, no período hiporresponsivo do filhote. (Levine, 1962; Denenberg, 1964; Meerlo, Horvath, Nagy, Bohus & Koolhaas, 1999).

Foram descritos em muitos estudos por meio de testes de ansiedade, efeitos positivos da estimulação tátil neonatal. Em comparação com os controles, os animais estimulados foram considerados menos ansiosos em testes clássicos, como o labirinto em cruz elevado (Núñez et al., 1995; Vallée et al., 1997; Meerlo et al., 1999), a caixa claro/escuro (Fernández-Teruel, 2002) e campo aberto (Vallée et al., 1997; Meerlo et al., 1999).

Estudos recentes demonstraram que a estimulação tátil em ratos no período pós-natal precoce, através do comportamento de lambar e de higiene fornecida pela rata-mãe, influenciam na estrutura e função do hipocampo, por meio de moléculas cruciais para a plasticidade, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento neuronal (NGF) (Weaver et al., 2004; Liu et al., 1997; Pham, Soderstrom, Henriksson & Mohammed, 1997; Sale et al., 2009). Outro foco de estudo em centros de pesquisas são os efeitos negativos causados pela separação ou privação materna, entretanto, tais efeitos foram revertidos pela estimulação tátil, entre eles a normalização do crescimento cerebral e corporal do filhote através da secreção do hormônio do crescimento (Schanberg & Field, 1987).

A massagem e a estimulação multissensorial em bebês podem ser comparadas a estimulação tátil feitas em animais de laboratório. A massagem está cada vez mais inserida na assistência neonatal em humanos, e os resultados apontam efeito positivo sobre a taxa de ganho de peso e menor nível de cortisol em bebês estimulados, além disso, estudos recentes apontam que a massagem pode afetar o desenvolvimento cerebral (Schanberg & Field, 1987; Vickers, Ohlsson, Lacy & Horsley, 2004; Guzzetta et al., 2009).

As estruturas do sistema visual, em especial a retina e o nervo óptico, têm se mostrado como modelos exemplares para o estudo da neuroplasticidade sob a influência de estímulos ambientais e sob os efeitos da deficiência de ferro. (Landi, Cenni, Maffei & Berardi, 2007;

Landi et al., 2007; Sale et al., 2004; Cancedda et al., 2004; DeMaman et al., 2008; 2010). Em virtude de suas importantes propriedades anatômicas e fisiológicas, o nervo óptico se distingue de todos os outros nervos cranianos. Embriologicamente, essa estrutura surge do divertículo óptico no diencéfalo e, com isso, seu processo de mielinização é realizado pelos oligodendrócitos (Skoff, Toland & Nast, 1980), enquanto que no sistema nervoso periférico, quem desempenha esta função são as células de Schwann, desta forma, o nervo óptico está propenso a doenças e insultos que atingem o sistema nervoso central. O nervo óptico é de fato um trato de substância branca e, portanto, uma extensão do sistema nervoso central (Martin, 1998; Aminoff & Daroff, 2003).

Os axônios que trafegam pelo nervo óptico são de neurônios que se projetam da retina neural, chamados de células ganglionares da retina, os axônios destas células se reúnem ao longo da superfície da retina e saem pelo pólo posterior do bulbo do olho, através do disco óptico (Martin, 1998).

Em termos microanatômicos, o nervo óptico apresenta uma forma elipsoide, levemente achatado no eixo súpero-inferior, medindo aproximadamente 11 mm de comprimento no rato Wistar (DeMaman et al., 2008) e 51 mm em humanos, desde sua emergência no polo posterior do bulbo ocular até o quiasma óptico (Aminoff & Daroff, 2003). Ainda em ratos, o nervo óptico a partir de sua emergência no globo ocular segue posteriormente como uma estrutura cilindroide de 0,2 a 0,3 mm de diâmetro até o teto da órbita, e chega ao interior da caixa craniana através do canal óptico. Em sua porção intra-orbital, o nervo óptico tem cerca de 3 mm de comprimento e está fixado à lâmina crivosa da esclera e à porção orbital apical, onde as camadas externas e internas estão fundidas dorsomedialmente e ventralmente com a dura-máter. O nervo tem seu alinhamento interrompido por uma deflexão lateral onde se encontra mergulhado entre os músculos do bulbo ocular e das pálpebras (Aminoff & Daroff, 2003; Cavallotti, Cavallotti, Pescosolido & Pacella, 2003).

Após seu curso intra-orbital o nervo óptico entra no canal óptico, que tem cerca de 0,5 mm de extensão. A porção intracraniana do nervo óptico é achatada horizontalmente apresentando um formato oval, com comprimento de aproximadamente 5 mm e termina no quiasma óptico (Cavallotti, Cavallotti, Pescosolido & Pacella, 2003).

O estudo histológico, em corte transversal, do nervo óptico revela um aspecto homogêneo de axônios mielínicos de diâmetros variados, densamente empacotados e distribuídos de forma relativamente uniforme através de todo o nervo. As fibras são separadas em feixes por trabéculas, contendo grande quantidade de vasos sanguíneos responsáveis pelo suprimento de oxigênio e nutrientes, além disso, são encontrados astrócitos, oligodendrócitos e micróglia,

distribuídos por todo o nervo (Homem, 2004; DeMaman et al., 2008; 2010; D. Lachat, 2010). Estudos morfométricos do nervo óptico mostram que em humanos, cerca de 4 milhões de fibras foram contabilizadas na sétima semana gestacional, e aproximadamente na 16^o semana gestacional grande parte dessas fibras sofrem apoptose reduzindo o número de fibras ao encontrado na maturidade, que se aproxima de 1.2 milhões (Aminoff & Daroff, 2003). No rato, no sétimo dia de vida, o número de fibras no nervo óptico se aproxima a 240 mil. Uma semana mais tarde, há um aparamento das fibras, levando a uma redução de 30 mil fibras do total. Aos 25 dias de idade, apresentam cerca de 103 mil fibras. Mais de 99,5% dos axônios apresentam-se sem mielina aos 7 dias de idade. No 25^o dia de idade, cerca de 90% das fibras remanescentes estão mielinizadas. Além disso, a distribuição de fibras não varia entre as porções central e periférica de nervo óptico dos ratos. (Lam, 1982; Hunter & Bedi, 1986).

Desta forma, diante da deficiência de ferro que afeta bilhões de pessoas no mundo, da estimulação tátil neonatal como uma estratégia para minimizar os possíveis efeitos desse insulto nutricional e do fato do nervo óptico ser considerado um excelente modelo para o estudo das alterações estruturais das fibras mielínicas e das células gliais que fazem parte de sua constituição, o objetivo deste trabalho é avaliar através de técnicas morfológicas e morfométricas, em nível de microscopia de luz, o nervo óptico de ratos Wistar alimentados com uma dieta adequada ou deficiente em ferro durante o período de lactação e pós-lactação, de zero ao 32^o dia de vida pós-natal, associadas ou não a estimulação tátil neonatal.

2.1. Composição das Ninhadas e dos Grupos Experimentais

O estudo seguiu todas as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, o COBEA, e todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, o CETEA, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, segundo protocolo nº 136/2011.

No presente estudo foram utilizadas 12 ninhadas, totalizando 12 ratas-mãe e 72 ratos filhotes machos, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Cada ninhada foi composta de 1 rata-mãe e 6 filhotes machos. Os animais foram transportados 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 permaneceram durante todo o experimento.

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 caixa de polietileno 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.

Ainda no dia zero, as ninhadas foram divididas, de acordo com a dieta recebida, em grupo controle (C) e grupo anêmico (A), sendo que o grupo C recebeu dieta contendo quantidade adequada de ferro e o grupo A, dieta deficiente em ferro. Cada grupo foi composto por seis ninhadas, perfazendo um total de 6 ratas-mãe e 36 filhotes, que foram novamente divididos de acordo com a condição de estimulação, sendo que a metade das ninhadas de cada grupo foi submetida à estimulação tátil neonatal (E) e a outra metade não recebeu nenhuma forma de estímulo (N), determinando um total de 3 ratas-mãe e 18 filhotes por grupo. Deste modo, estabeleceu-se um conjunto final de quatro grupos: grupo controle não estimulado (CN), grupo controle estimulado (CE), grupo anêmico não estimulado (AN), e grupo anêmico estimulado (AE). A **Tabela 1** mostra a formação dos grupos durante o período de lactação e pós-lactação, considerando os fatores: idade x dieta x estimulação.

Tabela 1- Grupos experimentais conforme a condição de idade, de dieta e de estimulação. Dieta adequada (C) e dieta deficiente em ferro (A). Animais estimulados (E) e animais não estimulados (N). Totalizando quatro grupos experimentais: Controle não estimulado (CN), controle estimulado (CE), anêmico não estimulado (AN) e anêmico estimulado (AE).

Grupos	Idade (Período)	Dieta	Estimulação
CN	Lactação (0-21 dias)	Dieta adequada	Não-estimulado
CE			Estimulado
AN		Dieta deficiente	Não-estimulado
AE			Estimulado
CN	Pós-lactação (22-32 dias)	Dieta adequada	Não-estimulado
CE			Estimulado
AN		Dieta deficiente	Não-estimulado
AE			Estimulado

2.2. Manutenção dos Animais

Durante o período de lactação cada ninhada foi alojada em caixa individual de polietileno (41 x 40 x 17 cm) com tampa de aço inoxidável e a partir do 22º dia, os filhotes passaram a ocupar caixas individuais de polietileno e as ratas-mãe foram descartadas. Os animais foram mantidos em biotério totalmente adaptado às condições ambientais com temperatura controlada em torno de 22º C, luz artificial com um ciclo de luz claro-escuro de 12 h, além de 60% de umidade, em média.

Durante todo o período experimental, que envolveu o período de lactação (0 a 21 dias) e o período pós-lactação (22 a 32), os animais tiveram livre acesso à dieta em comedouro de aço inoxidável e à água deionizada em bebedouro de vidro. Todos os animais dos diversos grupos estudados receberam dietas isocalóricas formuladas segundo AOC-95 (Cunnif, 1995). Entretanto, a dieta dos animais do grupo CN e CE apresentavam conteúdo de 35 mg de ferro/Kg e a dieta dos animais do grupo AN e AE continham 4 mg de ferro/Kg de dieta. A

composição das dietas, mistura de sais e mistura de vitaminas são apresentadas na **Tabela 2, 3 e 4**, respectivamente.

Em todos os grupos a dieta foi ingerida pelas ratas-mãe durante o período de lactação e passou a ser ingerida diretamente pelos filhotes após o desmame.

Tabela 2 - Composição da dieta basal utilizada para os grupos Controle e Anêmico durante todo o período experimental, segundo a AOAC (Cunnif, 1995). *Mistura Salina deficiente em Ferro.

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%

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 em gelatina
Vitamina D3 200.000 UI/g	0.75

2.3. Manutenção dos Materiais

Todo material, incluindo aquele utilizado para confecção das dietas, foi lavado previamente com uma solução de ácido nítrico a 30% (v/v) e água deionizada, no caso das vidrarias, e uma solução de EDTA 5% (p/v) e água deionizada, no caso de material plástico, evitando assim, a contaminação com o ferro existente no meio ambiente.

2.4. Estimulação Tátil Neonatal

OS filhotes do grupo **CE** e **AE** foram individualmente submetidos à Estimulação Tátil Neonatal, cinco dias por semana, durante 3 minutos. Por consequência da estimulação tátil, as ratas-mãe dos filhotes dos grupos estimulados eram separadas de seus filhotes durante o processo. As ratas-mãe dos filhotes dos grupos não estimulados, **CN** e **AN**, foram também retiradas de suas caixas de lactação, pelo mesmo período de tempo, a fim de evitar possíveis variáveis.

A Estimulação Tátil consistiu em segurar o animal com umas das mãos, enquanto que os dedos da outra mão do experimentador deslizavam no dorso do animal no sentido crânio-caudal. Até o 21º dia de lactação, ao final da estimulação os filhotes foram reagrupados em suas caixas e a rata-mãe recolocada à caixa de lactação. A partir do 22º dia, ao final da estimulação, os filhotes foram alocados em caixas individuais (Lima, 1992; Rocinholi, Lachat & Oliveira, 2008).

2.5. Dados Ponderais

Os pesos corporais das ratas-mãe (**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 28º dia de idade, desta forma possibilitando a investigação do ganho de peso semanal dos animais.

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 dos mesmos.

2.6. Dados Hematológicos (exames laboratoriais)

As coletas de sangue das ratas-mãe ocorreram no 18° e 21° dia de lactação, por punção cardíaca, sob anestesia e as dos filhotes foram realizadas aos 18, 22 e 32 dias de idade, antes da perfusão transcardíaca. Foram coletadas amostras individuais de 1 mL de sangue, e este volume anticoagulado com uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato de potássio (EDTA) a 10%. O material coletado passou por análises hematológicas, realizadas sempre no mesmo dia da coleta. Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina e porcentagem de hematócrito pelo método do microhematócrito.

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

2.7. Sacrifício, Coleta do Material e Processamento Histológico

Aos 18, 22 e 32 dias de idade, seis animais de cada grupo experimental foram profundamente anestesiados com cloridrato de quetamina (22 mg/Kg), perfundidos por via transcardíaca com uma solução de salina tamponada (PBS) 0,05M, pH 7,3; seguida por 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 empregadas na perfusão de cada animal.

Após a perfusão os animais foram decapitados e suas cabeças colocadas imediatamente na mesma solução fixadora por 24 horas a 4°C. Em seguida os nervos ópticos foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi DRC, Carl Zeiss). Foi utilizada apenas a porção do nervo entre o quiasma óptico e o início de sua deflexão para o globo ocular (**Figura 1**).

Em seguida, os 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 então processados para inclusão em araldite, tomando-se o cuidado em orientar os fragmentos para que as fibras do nervo fossem cortadas transversalmente.

Com um ultramicrotomo (Dupont Sorval modelo Porter Blum MT-2B), utilizando navalha de vidro, foram obtidos cortes de 0,5 micrômetros de espessura, montados sobre lâminas histológicas, corados com azul de Toluidina a 1% e então utilizados para as análises ao nível de microscopia de luz.

Figura 1 – Fotomicrografia da 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 para análise está marcada com o asterisco (*). Barra de escala = 0,5 cm.

2.8. Documentação, Avaliação Morfológica e Morfométrica das Amostras.

A aquisição das imagens foi realizada usando uma câmera (AxioCam MR5, Carl Zeiss) acoplada a um Fotomicroscópio (Axiophot 2 plus, Carl Zeiss), conectados a um computador equipado com o software AxioVision 4.8.1, 2009, no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

As fotomicrografias foram capturadas com objetivas de 100X em imersão, com ampliação final ao microscópio de 720X. Essas fotomicrografias foram usadas para as análises morfológicas e avaliações morfométricas.

Foram considerados, na avaliação morfológica, aspectos estruturais do nervo óptico, como a forma do nervo e suas membranas envoltórias, além disso, observou-se os componentes celulares, como células gliais, vasos sanguíneos e fibras nervosas mielínicas.

Na avaliação morfométrica considerou-se medidas de área total e diâmetro mínimo da secção transversal do nervo, número total de vasos sanguíneos, número total e percentual de astrócitos, número total e percentual de oligodendrócitos e número total de fibras nervosas mielínicas lesadas.

Para a quantificação dos aspectos do nervo óptico utilizou-se o software ImageJ 1.46. A área total e o diâmetro mínimo do nervo foram realizados através do contorno da secção transversal do nervo óptico, excluindo suas membranas envoltórias. A partir dos resultados da área total do nervo óptico, utilizou-se de 20% a 23% da área total para a quantificação de astrócitos, oligodendrócitos e de fibras nervosas mielínicas lesadas através da identificação e contagem manual. Para isso, foram utilizadas 11 áreas de 0,0057 mm² cada, resultando em uma área total de 0,0627 mm². As escolhas das 11 áreas foram realizadas de forma aleatória com o intuito de contemplar tanto as partes periféricas como as partes centrais do nervo óptico, como apresentado na **Figura 2**.

Figura 2 – Fotomicrografia da secção transversal total do nervo óptico de rato do grupo CN, em destaque, 11 retângulos amostrais de 0,0057mm², totalizando 0,0627 mm², valor representativo de 20% da área total da secção transversal do nervo. Coloração: Azul de Toluidina.

Após a quantificação das 11 áreas (20-23%), foi realizada a estimativa total de astrócitos, oligodendrócitos e de fibras mielínicas lesadas para 100% do nervo óptico, através da seguinte equação:

$$\frac{n^{\circ} \text{ quantificado na área amostral} \times 100}{\text{área amostral do nervo}} = \text{Estimativa total}$$

Após a realização da estimativa total de astrócitos e oligodendrócitos de forma individual, foi realizada a soma desses valores, resultando no número total de células gliais e a partir desse valor, foi realizada a taxa percentual de células gliais, através da seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de astrócito} + n^{\circ} \text{ de oligodendrócitos} = n^{\circ} \text{ total de células gliais}$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ de astrócito} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de células gliais}} = \text{taxa percentual de astrócitos}$$

$$\frac{n^{\circ} \text{ de oligodendrócitos} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de células gliais}} = \text{taxa percentual de oligodendrócitos}$$

Considerando a heterogeneidade da distribuição e calibre dos vasos sanguíneos, a quantificação foi realizada em 100% da área total do nervo. Dispensando a necessidade de estimativas e equações.

As fibras nervosas mielínicas foram consideradas lesadas, quando apresentavam características específicas, como desarranjo do contorno da bainha de mielina e axônios bastante dilatados, e a partir da identificação dessas características, foram quantificadas.

2.9. Avaliação Estatística

Todos os dados utilizados na avaliação estatística foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, a fim de verificar a curva de distribuição normal.

As avaliações estatísticas do peso corporal e dados hematológicos (hemoglobina e hematócrito) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de fator único. Os dados morfométricos (densidade de vasos sanguíneos, células gliais e fibras nervosas mielínicas lesadas) também foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de fator único. O nível de confiança considerado foi igual ou superior a 95% ($p \leq 0,05$). O teste *post-hoc* empregado foi o teste de Tukey, para as comparações múltiplas que se fizeram necessárias e o mesmo nível de confiança foi considerado.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico, o SigmaStat 3.5.

3.1. Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos das Ratas-mãe

3.1.1. Peso Corporal das Ratas-mãe

A **Tabela 5** e o **Gráfico 1** exibem os resultados do peso corporal médio das ratas-mãe dos animais dos grupos controle não-estimulado (**MCN**), controle estimulado (**MCE**), anêmico não-estimulado (**MAN**) e anêmico estimulado (**MAE**) durante o período de lactação dos filhotes, do zero ao 21º dia. No dia zero, os grupos **MCN** e **MCE** apresentaram peso médio de 318,66g ($\pm 3,75$) e 315,66g ($\pm 6,11$) e os grupos **MAN** e **MAE** apresentaram peso médio de 320,33g ($\pm 7,62$) e 315g ($\pm 4,58$) respectivamente. No ultimo dia do período de lactação o grupo **MCN** apresentou peso médio de 288,33g ($\pm 7,83$), o grupo **MCE** apresentou 288,66g ($\pm 2,33$) e os grupos **MAN** e **MAE** apresentaram 282,66g ($\pm 7,79$) e 285,33g ($\pm 2,40$) respectivamente.

A análise de variância não revelou diferença estatisticamente significativa no que se refere ao fator dieta ou ao fator estimulação dos filhotes, ou seja, não há diferença entre o grupo que se alimentou com dieta adequada ou dieta deficiente em ferro, ou mesmo não há diferença entre o grupo de mães de filhotes estimulados ou não estimulados. Entretanto, diante do fator idade, a análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos, quando comparados o peso inicial e o peso final ($p \leq 0,05$), deste modo, houve diferença referente à diminuição progressiva de peso corporal ao longo do período de lactação dos filhotes.

Tabela 5 - Valores médios ($\pm$ EPM) em gramas do peso corporal das ratas-mãe ao longo do calendário experimental, no período de lactação (0 a 21 dias), $n = 3$, $p \leq 0,05$.

Peso Corporal das Ratas-mãe				
	MCN	MCE	MAN	MAE
0	325,00 $\pm$ 3,46	322,67 $\pm$ 4,33	323,33 $\pm$ 2,08	323,33 $\pm$ 2,64
7	311,33 $\pm$ 5,78	310,00 $\pm$ 3,22	313,67 $\pm$ 2,64	309,33 $\pm$ 6,12
14	305,33 $\pm$ 2,33	303,00 $\pm$ 5,69	306,33 $\pm$ 2,73	300,00 $\pm$ 6,00
18	300,70 $\pm$ 2,60	298,70 $\pm$ 5,66	299,30 $\pm$ 5,36	298,00 $\pm$ 3,51
21	285,00 $\pm$ 4,50*	288,67 $\pm$ 2,33*	287,00 $\pm$ 2,64*	285,33 $\pm$ 2,40*

* Resultado estatisticamente superior quando comparado com as respectivas ratas-mãe no P0.

Gráfico 1 - Peso corporal médio das ratas-mãe dos grupos MCN, MCE, MAN e MAE aos 0, 7, 14 e 21 dias do período de lactação dos filhotes. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 3$, $*(p \leq 0,05)$.

3.1.2. Hemoglobina e Hematócrito das Ratas-Mãe

Os valores de hemoglobina (g/dl) e de hematócrito (%) das ratas-mãe estão representados no **Gráfico 2** e **Gráfico 3**, respectivamente. Além disso, a **Tabela 6** exibe todos os valores médios e o erro padrão das médias da avaliação hematológica das ratas-mãe.

Os resultados da taxa de hemoglobina das ratas-mãe mostram que não há diferenças estatisticamente significantes diante do fator idade e fator estimulação dos filhotes. Entretanto, diante do fator dieta, a diferença passa a ser estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), sendo que no 18º dia as ratas-mãe alimentadas com dieta deficiente em ferro, grupo **MAN** e **MAE** (11,66g/dl e 11,60g/dl) apresentam menor taxa de hemoglobina que as ratas-mãe alimentadas com dieta adequada em ferro, grupo **MCN** e **MCE** (13,76g/dl e 13,40g/dl respectivamente). No 21º dia, a taxa de hemoglobina dos grupos **MAN** e **MAE** (10,96g/dl e 10,93g/dl respectivamente) ainda apresentavam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), quando comparadas a taxa de hemoglobina dos grupos **MCN** e **MCE** (14,10g/dl e 13,63g/dl respectivamente).

Gráfico 2 – Taxa de hemoglobina das ratas-mãe dos grupos MCN, MCE, MAN e MAE aos 18 e 21 dias do período de lactação. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 3$, # ($p \leq 0,05$).

Os resultados da porcentagem de hematócrito das ratas-mãe mostraram que também não há diferenças estatisticamente significantes diante do fator idade e fator estimulação dos filhotes. Contudo, no 18º dia, o fator dieta diminuiu de forma estatisticamente significativa a porcentagem de hematócrito dos grupos **MAN** e **MAE** (39 e 38,66%, respectivamente), quando comparados aos grupos **MCN** e **MCE** (45% e 43,33%, respectivamente). No 21º dia, o resultado da porcentagem de hematócrito do grupo **MAN** e **MAE** ainda possuem diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), quando comparados com os grupos **MCN** e **MCE**.

Gráfico 3 – Porcentagem de hematócrito das ratas-mãe dos grupos MCN, MCE, MAN e MAE aos 18 e 21 dias do período de lactação. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 3$, # ($p \leq 0,05$).

Tabela 6 - Valores médios ($\pm$ EPM) em g/dL para os valores de hemoglobina e em % para os valores de hematócrito das ratas-mãe ao longo do calendário experimental, no período de lactação (0 a 21 dias), n = 3, $p \leq 0,05$.

Avaliação Hematológica das Ratas-mãe				
	MCN	MCE	MAN	MAE
Hemoglobina (g/dL)				
18	13,77 $\pm$ 0,34	13,40 $\pm$ 0,34	11,67 $\pm$ 0,18 [#]	11,60 $\pm$ 0,50
21	14,10 $\pm$ 0,30	13,63 $\pm$ 1,20	10,97 $\pm$ 0,61 [#]	10,93 $\pm$ 0,98
Hematócrito (%)				
18	45,00 $\pm$ 1,15	43,33 $\pm$ 0,33	39,00 $\pm$ 0,57 [#]	38,67 $\pm$ 1,15
21	47,33 $\pm$ 0,88	46,00 $\pm$ 1,00	39,00 $\pm$ 2,08 [#]	38,67 $\pm$ 1,15
# Resultado estatisticamente inferior quando comparado com as ratas-mãe do grupo MCN.				

3.2. Avaliação Ponderal e Exames Hematológicos dos Filhotes

3.2.1. Peso Corporal dos Filhotes

A **Tabela 7** exibe os valores médios e o erro padrão das médias do peso corporal semanal dos filhotes durante o período de lactação (zero a 21 dias) e período pós-lactação (22 a 32 dias). O **Gráfico 4** e **Gráfico 5** mostram os resultados de peso corporal médio dos filhotes dos grupos **CN**, **CE**, **AN** e **AE** durante o período de lactação e período pós-lactação, respectivamente.

Diante do fator idade, a análise de variância revelou que houve aumento de peso ao longo das quatro semanas de amamentação em todos os grupos e essa progressão foi estatisticamente significativa em todos os momentos ($p \leq 0,05$).

Também é possível observar no **Gráfico 4**, que no 21º dia, peso corporal médio dos animais dos grupos **CN** e **CE** se destacam e passam a ser estatisticamente superior aos outros grupos **AN** e **AE** ($p \leq 0,05$), indicando efeito da dieta nessa data.

Tabela 7 - Valores médios ($\pm$ EPM) em gramas do peso corporal dos filhotes ao longo do calendário experimental, no período de lactação (0 a 21 dias) e período pós-lactação (22 a 32 dias), n = 6, $p \leq 0,05$.

Peso Corporal dos Filhotes				
	CN	CE	AN	AE
0*	6,64 $\pm$ 0,12	6,61 $\pm$ 0,13	6,57 $\pm$ 0,12	6,60 $\pm$ 0,05
7*	19,05 $\pm$ 0,38	19,17 $\pm$ 0,65	19,05 $\pm$ 0,75	19,31 $\pm$ 0,43
14*	33,86 $\pm$ 3,26	33,22 $\pm$ 0,61	30,73 $\pm$ 0,72	32,03 $\pm$ 0,87
18*	40,50 $\pm$ 3,39	41,50 $\pm$ 0,80	39,00 $\pm$ 1,32	39,00 $\pm$ 1,13
21*	54,83 $\pm$ 3,18	53,67 $\pm$ 1,33	46,00 $\pm$ 2,86 [#]	46,00 $\pm$ 3,04
22*	56,00 $\pm$ 0,68	56,83 $\pm$ 1,14	48,50 $\pm$ 2,17 [#]	48,50 $\pm$ 2,53
28*	85,17 $\pm$ 0,98	87,17 $\pm$ 0,98	64,00 $\pm$ 2,94 [#]	66,67 $\pm$ 3,03
32*	109,83 $\pm$ 2,37	113,00 $\pm$ 1,88	72,83 $\pm$ 2,02 [#]	74,83 $\pm$ 2,75

* Progressão do peso corporal estatisticamente significativa em todas as idades e em todos os grupos.

Resultado estatisticamente inferior quando comparado com as animais do grupo CN.

Gráfico 4 - Peso corporal médio dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 0, 7, 14 e 21 dias do período de lactação. As linhas verticais representam o erro padrão da média, n = 6, * e # ($p \leq 0,05$).

A partir do 22° até o 32° dia, os filhotes foram alimentados com o mesmo tipo de dieta de suas respectivas ratas-mãe. O **Gráfico 5** mostra que houve progressão do peso corporal médio dos filhotes durante as duas semanas do período pós-lactação e em todos os grupos ($p \leq 0,05$), indicando efeito do fator idade.

Neste período os resultados também exibem diferenças entre grupos, sendo que os animais do grupo **CN** e **CE** tem peso corporal médio superior ao dos grupos **AN** e **AE** durante todo o período de pós-lactação ($p \leq 0,05$), apontando que o fator dieta tem maior relevância para o peso corporal neste período, como apresentado no **Gráfico 5**.

Gráfico 5 - Peso corporal médio dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 22, 28 e 32 dias do período de lactação. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, * e # ($p \leq 0,05$).

No período de lactação e pós-lactação, a análise de variância não revelou diferença estatisticamente significativa no que se refere ao fator estimulação, ou seja, a estimulação tátil neonatal não interferiu no ganho de peso dos animais estimulados ou não estimulados.

3.2.2. Hemoglobina e Hematócrito dos Filhotes

Os valores de hemoglobina (g/dL) e de hematócrito (%) dos filhotes estão representados no **Gráfico 6** e **Gráfico 7**, respectivamente. Além disso, a **Tabela 8** exibe todos os valores médios e o erro padrão das médias da avaliação hematológica dos filhotes.

Diante do fator estimulação, os resultados não mostraram diferenças entre os grupos. No que diz respeito ao fator idade, os resultados da taxa de hemoglobina mostraram que não há diferenças nos grupos **AN** e **AE**, ou seja, os valores são contínuos durante todo o período experimental, no entanto, nos grupos **CN** e **CE** os resultados indicam que há um aumento estatisticamente significativo a partir do dia 21 ($p \leq 0,05$).

Gráfico 6 – Taxa de hemoglobina dos filhotes dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, * e # ($p \leq 0,05$).

Em relação ao fator dieta, no dia 18, os animais do grupo **CN** e **CE** mostraram-se com taxas de hemoglobina superiores do que as dos animais do grupo **AN**, mas não dos animais do grupo **AE** ($p \leq 0,05$). No dia 21 e dia 32, o fator dieta continuou resultando em diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), incluindo agora o grupo **AE**, como apresentado no **Gráfico 6**.

Segundo os resultados da porcentagem de hematócrito, em relação ao fator idade, os grupos **CN** e **CE** apresentam aumento estatisticamente significativo a partir do dia 21 ($p \leq 0,05$).

Gráfico 7 – Porcentagem de hematócrito dos filhotes dos grupos **CN**, **CE**, **AN** e **AE** aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, * e # ($p \leq 0,05$).

Quanto ao fator dieta, no dia 18 e 21, os animais do grupo **CN** e **CE** apresentaram porcentagem de hematócrito com diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao grupo **AN**, mas não quando comparadas ao grupo **AE** ($p \leq 0,05$). No dia 32, o fator dieta continuou resultando em diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), incluindo agora o grupo **AE**, como exibido no **Gráfico 7**.

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				
	CN	CE	AN	AE
Hemoglobina (g/dL)				
18	7,03 $\pm$ 0,35	7,02 $\pm$ 0,34	5,40 $\pm$ 0,27 [#]	5,35 $\pm$ 0,22
22	6,88 $\pm$ 0,29	7,11 $\pm$ 0,28	4,95 $\pm$ 0,17 [#]	4,93 $\pm$ 0,18
32	11,28 $\pm$ 0,19*	11,65 $\pm$ 0,37*	4,63 $\pm$ 0,12* [#]	4,77 $\pm$ 0,12*
Hematócrito (%)				
18	23,16 $\pm$ 1,40	24,00 $\pm$ 1,08	17,16 $\pm$ 0,47 [#]	16,50 $\pm$ 0,84
22	22,16 $\pm$ 1,07	25,00 $\pm$ 1,39	16,83 $\pm$ 1,42 [#]	16,50 $\pm$ 0,92
32	37,66 $\pm$ 0,42*	38,00 $\pm$ 1,29*	14,33 $\pm$ 0,33* [#]	14,33 $\pm$ 0,49*

* Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais de 22 dias de idade.
Resultado estatisticamente inferior quando comparado com as animais do grupo CN.

3.3. Análise Morfológica: Aspecto Geral do Nervo Óptico

Os nervos ópticos dos ratos se mostram, de forma geral e a todos os grupos, um formato elipsoide levemente achatada no eixo supero-inferior nas secções transversais e estão envolvidas por suas membranas, as meninges. Em pequeno aumento, podem ser visualizadas fibras nervosas mielínicas agrupadas, com axônios e bainhas de mielina de diversos diâmetros, e estão separadas por trabéculas de tecido conjuntivo. Células gliais também são de fácil visualização, entretanto, não são de fácil discriminação. Nota-se também grande número de vasos sanguíneos tanto na periferia quanto na parte central do nervo óptico (**Figura 4A**).

Figura 4 – Fotomicrografias da secção transversal do nervo óptico de rato do grupo CN. Na parte superior o nervo óptico é apresentado em pequeno aumento destacando grande quantidade de vasos sanguíneos e suas membranas envoltórias, as meninges (A). Na parte inferior, os detalhes celulares, e em destaque dois astrócitos e seus formatos heterogêneos (B), nota-se também um astrócito e seus prolongamentos envolvendo um vaso sanguíneo, com os pés vasculares (seta). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina.

Em grande aumento, as células gliais podem ser distinguidas em astrócitos e oligodendrócitos, e também fica evidente e com mais detalhes as fibras mielínicas.

A célula que se destaca pelo tamanho é o astrócito, possui formato irregular, caracterizado pela riqueza e dimensão de seus prolongamentos citoplasmáticos, lançados em diversas direções. Esta célula tem formato incomum, e isso confere à célula o nome de astrócito, do grego *astron*: “estrela”, “astro”. Muito embora, alguns astrócitos não tenha aspecto parecido com uma estrela, pois, a morfologia dos astrócitos é altamente heterogênea.

O azul de toluidina concede ao astrócito coloração suave e clara, possui núcleo oval e seus nucléolos ocasionalmente evidentes, e a cromatina condensada margeia a membrana nuclear. Seus prolongamentos são longos e formam, por vezes, os pés terminais (ou pés vasculares), do qual, se expandem sobre os capilares sanguíneos (**Figura 4B**), também é possível encontrar expansões que vão em direção ao revestimento de pia-máter do nervo, na superfície pial, e por isso recebem o nome de processos subpiais, como representado na **Figura 5**.

Figura 5 – Fotomicrografia da secção transversal da periferia do nervo óptico de rato do grupo CN, corada com azul de toluidina. Em destaque um astrócito com (seta contínua) prolongamentos em direção à vasos sanguíneos (pés terminais ou pés vasculares) e (seta tracejada) prolongamento em direção à superfície pial (prolongamento subpial). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina.

O oligodendrócito se apresenta menor que o astrócito e a coloração, o azul de toluidina, confere a esta célula tom mais intenso. Possui núcleo oval, cromatina dispersa e geralmente revestindo internamente a membrana nuclear. Estas células se apresentam, com frequência, em sequências e muito próximas umas das outras, esta característica recebe o nome de oligodendrócitos em corrente, um exemplo de cinco oligodendrócitos em corrente e um oligodendrócito isolado estão destacados na **Figura 6**.

As fibras nervosas observadas em todos os grupos experimentais eram constituídas por axônio com citoplasma claro (axoplasma). A grande maioria dos axônios era mielínica, mesmo nos animais de 18 dias de vida e independente das condições ambientais.

Figura 6 - Fotomicrografias da secção transversal do nervo óptico de rato do grupo CN, em destaque, a apresentação de cinco oligodendrócitos em corrente (setas), característica organizacional que ocorre com bastante frequência, apresentação de um oligodendrócito isolado (O). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina.

3.3.1. Análise Morfológica aos 18 Dias de Idade

Nessa idade todos os nervos ópticos de todos os grupos apresentaram grande número de células gliais e de vasos sanguíneos.

Os nervos dos animais dos grupos alimentados com dieta adequada em ferro e que não passaram por estimulação (CN) apresentaram trabéculas bem definidas, mas delicadas, e não foram encontradas células em sofrimento. Essas mesmas características morfológicas foram encontradas nos animais alimentados com dieta adequada em ferro e que passaram por estimulação tátil neonatal (CE), entretanto foi observado nos animais estimulados que as trabéculas eram mais robustas e também se observou maior quantidade de fibras mielínicas e consequentemente melhor preenchimento do espaço intersticial, caracterizando um melhor processo de desenvolvimento (**Figura 7**).

Em relação aos animais alimentados com dieta deficiente em ferro e que não passaram por estimulação (AN), evidenciam-se diversas alterações deletérias e sofrimento celular, caracterizado pelo desarranjo estrutural da membrana nuclear das células gliais, observou-se também discreta desorganização trabecular, aumento do espaço intersticial entre as fibras nervosas e formação de vacúolos intersticiais. Também foram observadas diversas fibras nervosas mielínicas com diâmetro aumentado, característico de axônios dilatados, ademais, suas bainhas de mielina apresentaram alteração de seus contornos, indicando possível desintegração lamelar. Os nervos ópticos dos animais do grupo que passaram por estimulação tátil neonatal (AE), apresentaram lesões habituais da deficiência de ferro, entretanto, há maior organização trabecular que a observada nos animais do grupo que não passaram por estimulação (AN), mas ainda assim, os prolongamentos celulares dos astrócitos se mostram curtos e frágeis (**Figura 8**).

Figura 7 – Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo controle não-estimulado (A1 e A2) e controle estimulado (B1 e B2) aos 18 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS) e Fibras Mielínicas Lesadas (setas). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

Figura 8 - Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo anêmico não-estimulado (A1 e A2) e anêmico estimulado (B1 e B2) aos 18 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS), Fibras Mielínicas Lesadas (setas) e Vacuolização (Vc). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

3.3.2. Análise Morfológica aos 22 Dias de Idade

As observações dos nervos ópticos ao 22º dia são similares às observações já descritas no 18º dia de idade. Os nervos ópticos dos animais alimentados com dieta adequada e que foram estimulados (**CE**) ainda se mostraram com melhor organização trabecular e trabéculas mais robustas, quando comparados aos animais alimentados com dieta adequada e não estimulados (**CN**), confirmando efeito da estimulação tátil neonatal durante o desenvolvimento, como apresentado na **figura 9**.

Outra vez, os nervos ópticos dos animais do grupo **AE**, apresentaram lesões características da deficiência de ferro, porém, de forma mais branda quando comparadas as lesões encontradas no grupo **AN**, comprovando os achados nos animais sacrificados aos 18 dias de vida e apontando efeito protetor, minimizando as alterações decorrentes da deficiência de ferro.

Ainda em relação aos animais do grupo **AN**, o nervo óptico apresentava grande quantidade de vacúolos no espaço intersticiais e também grande quantidade de células gliais com invaginações nucleares e algumas com fragmentação nuclear. Também eram encontradas, sem dificuldade, fibras nervosas dilatadas e/ou com grande desarranjo estrutural da bainha de mielina. (**Figura 10**).

Figura 9 – Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo controle não-estimulado (A1 e A2) e controle estimulado (B1 e B2) aos 22 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS) e Fibras Mielínicas Lesadas (setas). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

Figura 10 - Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo anêmico não-estimulado (A1 e A2) e anêmico estimulado (B1 e B2) aos 22 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS), Fibras Mielínicas Lesadas (setas) e Vacuolização (Vc). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

3.3.3. Análise Morfológica aos 32 Dias de Idade

Nesta idade, as características estruturais tanto das fibras como das células gliais são similares às já descritas no 22º dia de idade. Entretanto, as características observadas nessa idade apresentavam-se mais marcantes.

Os nervos dos animais dos grupos alimentados com dieta adequada em ferro (**CN** e **CE**), as fibras se apresentavam densamente agrupadas, e quase não apresentava espaço intersticial entre elas, no grupo de animais que passou por estimulação essa característica era mais evidente. A quantidade de fibras mielínicas se mostrou, aparentemente, superior nesta idade em relação às outras idades, outra vez, nos animais estimulados a quantidade de fibras mielínicas era maior. Poucas fibras amielínicas eram encontradas nos grupos de animais controle, tão pouco no grupo que passou por estimulação. Outra característica que se fez notória nessa idade, foi a grande quantidade de vasos sanguíneos e que aparentemente era maior nos animais do grupo **CE** em relação aos animais do grupo **CN** (**Figura 11**). Fato importante, foi que em ambos os grupos controle, encontrou-se fibras com discretas lesões.

Em relação aos animais alimentados com dieta deficiente em ferro e que não passaram por estimulação (**AN**), apresentaram lesões intersticiais difusas, tanto na periferia quanto na parte central do nervo, e com isso as fibras nervosas mielínicas se mostravam menos comprimidas ou agrupadas. As lesões de fibras foram encontradas com frequência, como o desarranjo do contorno da bainha de mielina e axônios dilatados. Lesões das células gliais também foram observadas com frequência. Embora os animais do grupo **AE** também apresentassem lesões características da deficiência de ferro, todos os tipos de lesões eram mais brandas ou em menor quantidade, confirmando os achados nos animais sacrificados aos 22 dias de vida, outra vez apontando efeito protetor da estimulação tátil neonatal e, por conseguinte minimizando as alterações decorrentes da deficiência de ferro, como mostra a **Figura 12**.

Figura 11 – Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo controle não-estimulado (A1 e A2) e controle estimulado (B1 e B2) aos 32 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS) e Fibras Mielínicas Lesadas (setas). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

Figura 12 - Fotomicrografia do nervo óptico de animais do grupo anêmico não-estimulado (A1 e A2) e anêmico estimulado (B1 e B2) aos 32 dias de idade. A parte superior mostra a secção transversal do nervo e a parte inferior mostra, com detalhe, os componentes celulares do nervo: Astrócitos (A), Oligodendrócitos (O), Vasos Sanguíneos (VS), Fibras Mielínicas Lesadas (setas) e Vacuolização (Vc). Ampliação ao microscópio: 720X. Coloração: Azul de Toluidina

3.4. Análise Morfométrica

3.4.1. Área Total e Diâmetro Mínimo da Secção Transversal do Nervo

A **Tabela 9** exibe os valores médios da área total da secção transversal do nervo dos animais dos grupos controle não-estimulado (**CN**), controle estimulado (**CE**), anêmico não-estimulado (**AN**) e anêmico estimulado (**AE**), de acordo com as idades estudadas.

A análise de variância não revelou diferença estatisticamente significativa em nenhuma das variáveis utilizadas, ou seja, referente ao fator idade, fator dieta e fator estimulação, o que significa que não há diferença entre idades estudadas, entre grupos alimentados com dieta adequada ou dieta deficiente em ferro, ou mesmo não há diferença entre os grupos de animais estimulados ou não estimulados. O mesmo resultado é encontrado referente ao diâmetro mínimo da secção transversal do nervo e, os valores médios estão distribuídos na **Tabela 10**.

Tabela 9 - Valores médios ($\pm$ EPM) em mm² da área total da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, n = 6.

Área total da secção transversal do nervo (mm ²)				
	CN	CE	AN	AE
18	0.290 $\pm$ 0.009	0.292 $\pm$ 0.004	0.288 $\pm$ 0.007	0.289 $\pm$ 0.008
22	0.296 $\pm$ 0.004	0.298 $\pm$ 0.005	0.295 $\pm$ 0.005	0.296 $\pm$ 0.010
32	0.301 $\pm$ 0.006	0.300 $\pm$ 0.006	0.302 $\pm$ 0.007	0.304 $\pm$ 0.011

Tabela 10 - Valores médios ($\pm$ EPM) em mm do diâmetro mínimo da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, n = 6.

Diâmetro mínimo da secção transversal do nervo (mm)				
	CN	CE	AN	AE
18	0.050 $\pm$ 0.009	0.051 $\pm$ 0.004	0.050 $\pm$ 0.005	0.051 $\pm$ 0.007
22	0.051 $\pm$ 0.004	0.051 $\pm$ 0.004	0.051 $\pm$ 0.005	0.051 $\pm$ 0.008
32	0.051 $\pm$ 0.006	0.051 $\pm$ 0.005	0.050 $\pm$ 0.005	0.052 $\pm$ 0.009

3.4.2. Número Total de Vasos Sanguíneos

Os resultados da quantificação de vasos sanguíneos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais do grupo controle não-estimulado (**CN**), controle estimulado (**CE**), anêmico não-estimulado (**AN**) e anêmico estimulado (**AE**) estão expostos na **Tabela 11** e no **Gráfico 8**.

Tabela 11 - Valores médios ($\pm$ EPM) em número da quantidade de vasos sanguíneos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, n = 6, $p \leq 0,05$.

Número total de Vasos Sanguíneos				
	CN	CE	AN	AE
18	62,2 $\pm$ 3,33	73,2 $\pm$ 2,00 ^{Δ}	63,7 $\pm$ 1,34	73,4 $\pm$ 1,20 ^{Δ}
22	60,5 $\pm$ 1,48	71,5 $\pm$ 1,51 ^{Δ}	61,3 $\pm$ 1,60	72,5 $\pm$ 1,74 ^{Δ}
32	76,0 $\pm$ 1,45*	86,5 $\pm$ 1,87* ^{Δ}	77,7 $\pm$ 1,30*	85,8 $\pm$ 2,10* ^{Δ}

* Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais de 22 dias de idade.

^{Δ} Resultado estatisticamente superior quando comparado com as animais do grupo não-estimulado.

Gráfico 8 – Número total de vasos sanguíneos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$ * e Δ ($p \leq 0,05$).

A análise de variância mostrou que em relação ao fator dieta não houve alteração na quantidade de vasos, indicando que tanto os animais alimentados com dieta adequada em ferro como os animais alimentados com dieta deficiente em ferro possuem a mesma quantidade de vasos. Entretanto houve aumento estatisticamente significativo do número de vasos sanguíneos a partir do dia 22, apontando efeito do fator idade ($p \leq 0,05$).

Em todas as idades estudadas, os animais dos grupos que passaram por estimulação (CE e AE) apresentaram maior quantidade de vasos sanguíneos em relação aos animais dos grupos que não passaram por estimulação (CN e AN), apontando efeito do fator estimulação ($p \leq 0,05$).

3.4.3. Número Total de Astrócitos

A **Tabela 12** e o **Gráfico 9** exibe o número total de astrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos controle não-estimulado (CN), controle estimulado (CE), anêmico não-estimulado (AN) e anêmico estimulado (AE).

Tabela 12 - Valores médios ($\pm$ EPM) em número da quantidade de astrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, $n = 6$, $p \leq 0,05$.

Número Total de Astrócitos				
	CN	CE	AN	AE
18	242,6 $\pm$ 10,41	241,0 $\pm$ 5,22	272,2 $\pm$ 4,81 [#]	275,6 $\pm$ 6,57
22	231,0 $\pm$ 8,13	231,5 $\pm$ 5,88	273,1 $\pm$ 4,64 [#]	273,5 $\pm$ 5,67
32	226,5 $\pm$ 10,99	233,2 $\pm$ 7,47	271,5 $\pm$ 8,42 [#]	272,4 $\pm$ 6,18

Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais do grupo CN.

Gráfico 9 - Número total de astrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, # ($p \leq 0,05$).

De acordo com o resultado de quantificação de astrócitos, constata-se que os animais alimentados com dieta deficiente em ferro apresentaram maior quantidade de astrócitos em todas as idades estudadas ($p \leq 0,05$).

Diante do fator idade, os resultados não apresentaram alterações estatisticamente significativas, ou seja, os valores são contínuos durante todo o período experimental. O fator estimulação também não alterou a quantidade de astrócitos, indicando que a estimulação tátil neonatal não interferiu na quantidade de astrócitos.

3.4.4. Número Total de Oligodendrócitos

Como apresentado na **Tabela 13** e no **Gráfico 10**, o número total de oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais do grupo controle não-estimulado (**CN**), controle estimulado (**CE**), anêmico não-estimulado (**AN**) e anêmico estimulado (**AE**).

Tabela 13 - Valores médios ($\pm$ EPM) em número da quantidade de oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, $n = 6$, $p \leq 0,05$.

Número Total de Oligodendrócitos				
	CN	CE	AN	AE
18	126,6 $\pm$ 5,19	136,9 $\pm$ 3,18	108,1 $\pm$ 3,60 [#]	115,2 $\pm$ 6,81
22	122,7 $\pm$ 4,70	138,0 $\pm$ 3,31	103,5 $\pm$ 3,88 [#]	109,6 $\pm$ 5,68
32	112,6 $\pm$ 4,31	133,4 $\pm$ 3,60 ^{Δ}	99,7 $\pm$ 3,32	104,0 $\pm$ 4,99

Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais do grupo CN.
 Δ Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais do grupo não-estimulado.

Gráfico 10 - Número total de oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, # e Δ ($p \leq 0,05$).

Diante do fator idade, a análise de variância não revelou qualquer resultado estatisticamente significativo, ou seja, os valores são contínuos durante todo o período experimental e em todos os grupos.

No dia 18 e 22, a análise de variância não revelou qualquer efeito da estimulação tátil neonatal sobre a quantidade de oligodendróцитos. Entretanto, no que se refere ao fator dieta, a análise de variância mostrou que os animais alimentados com dieta deficiente em ferro apresentam menor quantidade de oligodendróцитos quando comparada à quantidade de oligodendróцитos dos animais alimentados com dieta adequada em ferro ($p \leq 0,05$).

Resultados incomuns surgiram no dia 32, curiosamente, a análise de variância revelou efeito da estimulação tátil neonatal ($p \leq 0,05$), entretanto, somente para o grupo controle (CN→CE). Por outro lado, o efeito do fator dieta encontrado no dia 18 e 22 se perde nesta idade, igualando o número de oligodendróцитos nos grupos controle e anêmico não-estimulados.

3.4.5. Percentual de Astrócitos e Oligodendróцитos

Como apresentado no **Gráfico 11**, os valores do percentual total dos astrócitos e oligodendróцитos da secção transversal dos nervos dos animais do grupo controle não-estimulado (CN), controle estimulado (CE), anêmico não-estimulado (AN) e anêmico estimulado (AE). Os valores do percentual individual dos astrócitos e oligodendróцитos estão expostos no **Gráfico 12 e 13**, respectivamente.

Os resultados do percentual de células gliais acompanham seus respectivos resultados em quantidade numérica. Tais resultados mostram que a porcentagem de astrócitos aumenta e a porcentagem de oligodendróцитos diminui nos animais alimentados com dieta deficiente em ferro, apontando efeito da dieta ($p \leq 0,05$). Por outro lado, diante dos fatores estimulação e idade, a análise de variância não revelou qualquer efeito na porcentagem das células gliais.

Gráfico 11 – Percentual total de astrócitos e oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade.

Gráfico 12 - Percentual individual de astrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, # ($p \leq 0,05$).

Gráfico 13 - Percentual individual de oligodendrócitos da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, # ($p \leq 0,05$).

3.4.6. Número Total de Fibras Nervosas Mielínicas Lesadas

A **Tabela 14**, o **Gráfico 14** e o **Gráfico 15** exibem o número de fibras nervosas mielínicas lesadas da secção transversal dos nervos dos animais não-estimulado (**CN**), controle estimulado (**CE**), anêmico não-estimulado (**AN**) e anêmico estimulado (**AE**), de acordo com as idades estudadas.

No referente ao fator idade (**Gráfico 14**), houve aumento das fibras lesadas nos grupos **CN**, **CE** e **AN** ($p \leq 0,05$), contudo, nos animais do grupo anêmico estimulado (**AE**), mesmo existindo aumento das fibras lesadas ao longo do estudo, não foi suficiente para que a análise de variância revelasse aumento estatisticamente significativo.

Tabela 14 - Valores médios ($\pm$ EPM) em número da quantidade de fibras nervosas mielínicas lesadas da secção transversal dos nervos ópticos dos animais dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade, $n = 6$, $p \leq 0,05$.

Número Total de Fibras Nervosas Mielínicas Lesadas				
	CN	CE	AN	AE
18*	142,2 $\pm$ 17,05	58,8 $\pm$ 4,39	1059,1 $\pm$ 90,65 #	753,6 $\pm$ 69,84 Δ
22*	196,5 $\pm$ 22,43	128,8 $\pm$ 10,68	1374,8 $\pm$ 58,08 #	827,6 $\pm$ 140,81 Δ
32*	302,2 $\pm$ 19,66	193,8 $\pm$ 4,25 Δ	1951,5 $\pm$ 34,32 #	1101,8 $\pm$ 83,06 Δ

* Progressão da quantidade de fibras estatisticamente significativa em todas as idades e em todos os grupos.
Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais do grupo CN.
 Δ Resultado estatisticamente superior quando comparado com os animais do grupo não-estimulado.

Gráfico 14 - Número de fibras nervosas mielínicas lesadas da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, * ($p \leq 0,05$).

Diante do fator dieta e em todas as idades estudadas, a análise de variância revelou grande aumento das fibras nervosas mielínicas lesadas nos animais alimentados com dieta deficiente em ferro quando comparados aos animais alimentados com dieta adequada em ferro ($p \leq 0,05$). A análise de variância também revelou efeito da estimulação tátil neonatal, entretanto somente para o grupo que se alimentou com dieta deficiente em ferro (AN $\rightarrow$ AE), deste modo o resultado exibido revela que os animais anêmicos e que passaram por estimulação tátil neonatal apresentam menor quantidade de fibras nervosas mielínicas lesadas em todas as idades estudadas ($p \leq 0,05$), resultados estes apresentados no **Gráfico 15**.

Gráfico 15 - Número de fibras nervosas mielínicas lesadas da secção transversal dos nervos ópticos dos grupos CN, CE, AN e AE aos 18, 21 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão da média, $n = 6$, # e Δ ($p \leq 0,05$).

No presente estudo elegeu-se como modelo de deficiência de ferro dos filhotes no período de lactação, a carência férrica materna experimental, seguida da carência férrica individual no período pós-lactação. Foi utilizada a restrição férrica de 4mg/kg para provocar a deficiência de ferro, 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). A estimulação tátil neonatal utilizada neste estudo é amplamente aplicada na literatura, inclusive em estudo realizado no nosso laboratório (Rocinho et al., 2008). Tais metodologias foram utilizadas com intuito de avaliar os efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar alimentados com uma dieta adequada ou deficiente em ferro durante o período de lactação e pós-lactação, de zero ao 32º dia de vida pós-natal.

Durante o período de lactação constatou-se que o peso das ratas-mãe alimentadas com ração deficiente em ferro não mostrou diferenças quando comparado à ratas-mãe alimentadas com ração adequada em ferro, o mesmo resultado é encontrado em outros estudos (Homem 2004; Beard, et al., 2006; DeMaman et al., 2008; 2010; Lachat, 2010). Contudo, houve perda progressiva de peso ao longo do período de lactação em todos os grupos, que pode ser explicada pela produção e oferta de leite para os filhotes, além disso, a prole carece de cuidados e requer atenção, o que exige maior gasto energético da rata-mãe e consequente perda de peso.

Em ratos hígdios, a taxa de referência de hemoglobina se aproxima de 14 g/dL e o percentual de hematócrito de 45 % (Matsuzawa & Sakazume, 1994; Suckow, Weisbroth & Franklin, 2005), o que indica que a dieta deficiente em ferro utilizada foi capaz de induzir anemia leve nas ratas-mãe dos grupos **MAN** e **MAE**, já que a taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito estão abaixo da normalidade tanto ao 18º quanto ao 21º dia.

Com relação ao peso corporal dos filhotes no período de lactação, os resultados mostraram que a progressão semanal de peso ocorreu tanto nos filhotes amamentados por ratas-mãe que se alimentavam com ração deficiente quanto nos filhotes de ratas-mãe que se alimentavam com ração adequada em ferro, no entanto, somente no ultimo dia de lactação, no 21º dia, o peso dos animais do grupo controle (**CN**) se mostram significativamente maiores quando comparados ao peso dos animais do grupo anêmico (**AN**), o que indica que a deficiência de ferro imposta nas ratas-mãe no período de lactação influencia no ganho de peso corporal do filhote somente ao final desse período e a mesma data de alteração de peso foi encontrada no estudo de DeMaman et al. (2008). Resultados similares foram constatados por De Los Monteros et al. (2000), que através de um procedimento de amamentação artificial com leite deficiente em ferro e preparado em laboratório, não obteve efeito no peso corporal dos

filhotes amamentados com leite deficiente em ferro, nem mesmo ao final do período de lactação, como encontrados em nossos resultados. O'Connor, Picciano e Sherman (1988) analisando o leite produzido por ratas-mãe que se alimentavam com dieta deficiente em ferro (8mg/kg de ferro), concluíram que o leite de ratas-mãe anêmicas possui baixa concentração de ferro e quantidade de gordura diminuída quando comparado com o leite das ratas-mãe não anêmicas, todavia, a quantidade de proteína se apresentava similar entre os leites estudados. Além disso, observou-se que a ingestão diária de leite é maior nos filhotes de ninhadas com ratas-mãe anêmicas. Deste modo, mesmo o leite produzido pelas ratas-mãe anêmicas sendo de baixa qualidade, seus filhotes anêmicos compensam aumentando a ingestão diária, o que pode explicar a similaridade dos pesos entre os nossos animais do grupo controle (CN) e anêmico (AN) no período de lactação.

Ainda no período de lactação, os animais dos grupos estimulados (CE e AE) não apresentaram peso médio superior em relação aos animais dos grupos não estimulados (CN e CE), da mesma forma, também existem pesquisas que não apontam diferenças no peso corporal em ratos estimulados no período neonatal (Silveira et al., 2004; 2006; Soares et al., 2012) no entanto, outros autores também relataram o aumento de peso em animais que passaram pela estimulação tátil (Panagiotaropoulos et al., 2004). O peso corporal entre animais que se alimentam com dietas diferentes e que passam por estimulação no período neonatal é uma questão ainda mal resolvida, pois o resultado pode ser afetado por variáveis simples, tais como o sabor da ração usada.

Com o início do período de pós-lactação o peso corporal dos filhotes foi influenciado pelo fator idade, já que todos os grupos apresentaram aumento progressivo de peso. O fator dieta também foi importante nesse período, já que os animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro se mostram com peso inferior quando comparado com o grupo controle, o mesmo dado é observado em outros estudos (DeMaman et al., 2008, Beard, et al., 2006). O peso corporal dos filhotes no período de pós-lactação não foi influenciado pelo fator estimulação, esse resultado está de acordo com outro achado da literatura, onde filhotes que passavam por estimulação tátil neonatal não apresentavam maior ganho de peso em comparação com filhotes que não passavam por estimulação. (Imanaka et al., 2008).

No presente trabalho, os animais dos grupos AN e AE apresentaram concentrações de hemoglobina e porcentagem de hematócrito muito abaixo dos níveis do grupo CN e CE, 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, Jain & Carroll, 1975; Tanaka et al., 1995; Beard, Wiesinger & Connor, 2003). Dados similares foram relatados por pesquisadores que lançaram mão da mesma dieta deficiente em ferro, ou seja, com 4 mg de ferro/Kg de dieta. (Beard, et al, 2006; DeMaman et al, 2008; 2010).

A carência nutricional, seja de macroelementos como a proteína ou, como utilizado neste estudo, de microelementos como o ferro, podem afetar o desenvolvimento do sistema nervoso central, alterando o padrão de normalidade dos processos celulares que ocorrem nesse período. O nervo óptico, têm se mostrado um modelo exemplar para o estudo de um processo celular específico do período de desenvolvimento, como a mielinização, já apresentado em vários outros trabalhos da literatura (Lam, Sefton & Bennett, 1982; Phillips, Krueger & Rydquist, 1991; Leung, Nathaniel & Nathaniel, 1992; Dangata & Kaufman, 1997; Melo, Moreno, Vázquez, Pinazo-Durán & Tavares, 2006; Melo, Pinazo-Durán, Salgado-Borges & Tavares, 2008), inclusive em trabalhos do nosso laboratório (DeMaman et al., 2008, 2010; Lachat, 2010). Além disso, recentemente as estruturas do sistema visual têm sido usadas para demonstrar os efeitos da estimulação ambiental (Sale et al., 2004; Cancedda et al., 2004; Landi, Cenni, Maffei & Berardi, 2007; Landi et al., 2007).

Diante do fator dieta e em todas as idades, houve grandes diferenças nas características morfológicas do nervo óptico dos animais que se alimentaram com dieta adequada e que não passaram por estimulação (CN) em comparação com os animais que se alimentaram com dieta deficiente e que não passaram por estimulação (AN). As diferenças encontradas na avaliação qualitativa estão de acordo com as características descritas na literatura, inclusive em investigações realizadas em nosso laboratório (Homem, 2004; DeMaman et al., 2008; 2010; Lachat, 2010). Nos animais do grupo AN foram encontradas, em todas as idades, fibras nervosas lesadas caracterizadas pelo aumento dos diâmetros axônais indicando aumento de líquido intracelular e, por conseguinte edema axônal. Ainda observando as fibras e suas bainhas envoltórias, foi possível encontrar bainhas de mielina desconfiguradas, caracterizando frouxidão lamelar ou desprendimento da bainha de mielina de seu axônio, além do mais, foi observado aumento de espaços entre as fibras. Alterações estruturais muito semelhantes foram encontradas em nervos ópticos de ratos que passaram por carência nutricional de metais, tais como animais que se alimentavam com dieta pobre em cobre (Dake & Amemiya, 1991), zinco (Gong & Amemiya, 2001), magnésio (Gong, Takami & Amemiya, 2003) e manganês (Gong & Amemiya, 1999). E isso comprova a importância desses microelementos para a formação da bainha de mielina. Ademais, estudo mostra que mudanças morfológicas

relacionadas à idade, em nervos ópticos de ratos também apresenta lesões muito parecidas (Cavallotti, Cavallotti, Pescosolido & Pacella, 2003).

Ainda em relação às observações qualitativas, analisando o fator dieta, verificou-se no grupo que se alimentou de dieta deficiente em ferro, que os astrócitos e os oligodendrócitos também demonstravam sinais claros de sofrimento celular, apresentando deformidades da membrana nuclear, como invaginação e fragmentação nuclear. Não foi encontrado nenhum outro trabalho que demonstre essas alterações morfológicas em ratos com carência férrica, para possíveis comparações.

Em adição, os aspectos morfológicos dos componentes celulares do nervo óptico dos animais que se alimentaram com dieta adequada em ferro e que passaram por estimulação (CE), se mostraram em todas as idades, com melhor organização estrutural, caracterizada pelos prolongamentos astrocitários e trabéculas mais robustas, formando feixes de fibras mais compactos, também apresentavam visível aceleração do desenvolvimento do nervo óptico, onde fibras mielínicas se mostravam, aparentemente, maiores e em maior quantidade quando comparadas aos animais do grupo CN. Estas características observadas podem estar associadas ao aumento da liberação de fatores de crescimento como BDNF, IGF e o NGF, que a estimulação tátil neonatal causa, como já comprovado por pesquisadores (Weaver et al., 2004; Liu et al., 1997; Pham et al., 1997; Sale et al., 2009). Além disso, a aparente maior quantidade de fibras pode ser explicada por um mecanismo adicional ao aumento dos fatores de crescimentos já citados, pois, estudo indica que o ambiente enriquecido na fase neonatal pode diminuir o processo de apoptose celular programada, ou seja, resultando no aumento da quantidade final de fibras por consequência de um menor aporamento celular (Young, Lawlor, Leone, Dragunow & During, 1999), deste modo, a minimização das lesões encontradas nos animais AE, quando comparadas aos animais do grupo AN, também pode estar relacionada ao aumento da liberação de fatores de crescimento, entretanto, não existem trabalhos que mostram o nível de apoptose em ratos que foram submetidos à estimulação tátil neonatal.

As análises morfométricas mostraram resultados interessantes em todos os pontos avaliados. As medidas de área e diâmetro mínimo do nervo óptico não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos fatores analisados (idade, dieta e estimulação). Os mesmos resultados foram encontrados em pesquisas com deficiência de ferro realizadas em nosso laboratório (DeMaman et al., 2008, 2010), o que indica que a carência nutricional de ferro não induz alterações macroscópicas do nervo óptico, isso pode ser explicado pelo tipo do nutriente deficiente na dieta, pois se trata de um micronutriente. Essa explicação se reforça por pesquisas que utilizam deficiência de macronutrientes, como a

deficiência proteica, e que mostraram alterações na área total do nervo óptico, da qual se aproxima a uma redução de 15% quando comparada a área total do nervo óptico de animais controle (Conradi, Sjöström, Karlsson, & Sourander, 1985).

Com relação à quantificação de vasos sanguíneos, a análise de variância revelou, em todos os grupos, que diante do fator idade não há diferenças entre animais com 18 e 22 dias de idade, contudo, há diferença na quantidade de vasos entre animais de 22 e 32 dias de idade, isso pode ser explicado pelo aumento das necessidades nutricionais e de oxigênio nesta idade, pois, segundo Skoff et al. (1980) a vascularização do nervo óptico influencia o desenvolvimento de células gliais locais. Os resultados na quantidade de vasos entre animais que se alimentaram com dieta adequada ou deficiente em ferro mostraram que não há diferenças, sugerindo que o fator dieta não tem influência nesse parâmetro, entretanto pesquisas relacionadas à angiogênese tumoral apontam que a deficiência de ferro aumenta a quantidade de mediadores pró-angiogênicos como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator induzido por hipóxia (HIF) e consequentemente aumentando a proliferação de vasos sanguíneos. Outro ponto importante a se destacar é que estas pesquisas estão relacionadas a tumores de mama (Eckard et al., 2010) e pele (Nicolae, Nicolae, Schipor & Caragheorgheopol, 2013), não foram encontrados artigos que relacionam a deficiência de ferro e o aumento de mediadores pró-angiogênicos em tumores cerebrais.

No tocante ao fator estimulação, houve aumento na quantidade de vasos sanguíneos no nervo óptico dos animais que passaram por estimulação e independente da condição de dieta, mostrando que a estimulação tátil neonatal foi importante na neovascularização, entretanto não foram encontrados artigos que comprovam esse dado, por outro lado, pesquisas já demonstraram que o enriquecimento ambiental aumenta a ramificação vascular cortical (Sirevaag, Black, Shafron & Greenough, 1988) e síntese de fatores pró-angiogênicos (Bengoetxea, Argandoña & Lafuentes 2008), outros estudos que corroboram com essas informações, apontam que ratos mantidos em ambiente empobrecido (criados no escuro) apresentaram diminuição da densidade vascular (Argandoña & Lafuentes, 1996).

De acordo com os resultados de quantificação de astrócitos a análise de variância revelou que diante do fator idade e em todos os grupos não há diferenças entre o número de astrócitos no nervo óptico, ou seja, os valores são contínuos durante todo o período experimental, também não foram encontradas diferenças entre animais que passaram ou não por estimulação tátil neonatal, o que significa que a quantidade de astrócito não sofre influência diante do fator estimulação, entretanto, outros estudos já mostraram que o ambiente enriquecido aumenta a densidade (hiperplasia) e o tamanho (hipertrofia) de astrócitos (Diamond, Krech &

Rosenzweig, 1964; Sirevaag & Greenough, 1987; 1991). Neste contexto, o único resultado estatisticamente significativo encontrado foi em relação ao fator dieta, do qual, os animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro apresentaram aumento do número de astrócitos, esta mesma característica é encontrada em algumas doenças neurodegenerativas ou em lesões que induzem a astrogliose e formação de cicatrizes gliais. O aumento dessa célula glial é considerado prejudicial, liberando citocinas e provocando inflamação, assim, inibindo a regeneração axonal (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010). Outro fato importante a se destacar é que resultados similares foram relatados como consequência do envelhecimento (Cavallotti, Cavallotti, Pescosolido, Iannetti & Pacella, 2001).

Com respeito ao número de oligodendrócitos, a análise de variância não revelou resultados significativos diante do fator idade, mostrando que a quantidade desse tipo de célula glial não se altera durante o período experimental, entretanto, diante do fator dieta, a análise de variância revelou que animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro apresentaram diminuição da quantidade de oligodendrócitos aos 18 e 22 dias de idade. A explicação para esse fenômeno pode estar relacionada ao desenvolvimento desse tipo de célula glial que ocorre a partir da diferenciação de células precursoras que migram e se proliferam dentro do nervo óptico, deste modo, o número final de oligodendrócitos é influenciado, em primeira instância, pelo número de células precursoras e pelo número de vezes que essas células precursoras realizam mitose, e em segunda instância, o número final de oligodendrócitos é influenciado pela morte celular programada e segundo Barres et al. (1992) pelo menos metade dessas células sofrem apoptose após a diferenciação. O desenvolvimento desse tipo de célula glial ocorre principalmente a partir do nascimento, o que significa, que nossa metodologia de dieta deficiente em ferro pode ter influenciado o número final de oligodendrócitos, resultando em alteração de suas funções, e isso está relacionado com os achados de Yu et al. (1986) e Beard, et al (2003) que verificaram alteração do processo de mielinização em ratos que foram alimentados com dieta deficiente em ferro. Aos 18 e 22 dias de idade, a estimulação tátil neonatal não alterou o número de oligodendrócitos.

Aos 32 dias de idade, o resultado se mostra curioso, e diante do fator dieta, os resultados encontrados anteriormente não se mostraram mais significantes, entretanto ainda existe uma tendência de 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. Por outro lado, nesta idade, a estimulação se mostrou importante no aumento de oligodendrócitos, apesar de que não existem pesquisas que mostram a influência da estimulação tátil neonatal no número de oligodendrócitos, mas, Sirevaag e Greenough em

1987, já mostravam aumento no número final de oligodendrócitos no córtex visual de ratos que eram criados em ambiente enriquecido.

De acordo com os achados da quantificação de fibras nervosas mielínicas lesadas do nervo óptico, a análise de variância revelou que diante do fator idade houve aumento da quantidade de fibras lesadas em todos os grupos, com exceção do grupo **AE** com 22 dias de idade. Com relação ao fator dieta, os animais que se alimentaram com dieta deficiente em ferro mostraram maior quantidade de fibras lesadas quando comparados aos animais que se alimentaram com dieta adequada, e dados similares foram encontrados em pesquisas recentes (DeMaman et al., 2008, 2010). A explicação para esse achado pode estar relacionada à importância do íon ferro na síntese de um lipídio importante na formação e manutenção da estrutura da bainha de mielina (Yu et al., 1986) e possivelmente também está ligada à diminuição da taxa de hemoglobina e, por conseguinte, diminuição do aporte de oxigênio, levando a hipóxia.

Com respeito ao fator estimulação, a análise de variância mostrou que os animais que passaram por estimulação tátil neonatal apresentaram menor quantidade de fibras lesadas quando comparadas aos animais que não passaram por estimulação, a explicação para esse fato pode estar relacionada a outro dos nossos resultados, do qual, a estimulação tátil neonatal também aumentou a quantidade de vasos sanguíneos. Pesquisas demonstram que a maior densidade de vasos sanguíneos age como fator neuroprotetor, preservando a integridade do sistema nervoso através de um apurado intercâmbio de substâncias entre o parênquima cerebral e o sangue (Ortuzar, Argandoña, Bengoetxea & Lafuente, 2011; Argandoña et al., 2012).

A análise deste trabalho permitiu 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-mãe durante o período de lactação dos filhotes, quando comparada as ratas-mãe que se alimentaram com dieta adequada em ferro com 35mg de ferro/kg de ração. Entretanto, essa dieta deficiente em ferro, foi eficiente na indução de anemia ferropriva leve nas ratas-mãe, e esses dados foram comprovados através da interação entre os resultados obtidos nos exames laboratoriais de concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito.

Os filhotes amamentados por ratas-mãe anêmicas apresentaram deficiência do desenvolvimento ponderal, constatado pelo menor peso corporal em relação aos filhotes amamentados por ratas-mãe não anêmicas. Ademais, os filhotes das ratas-mãe anêmicas apresentaram anemia do tipo severa, confirmada através da interação entre os 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.

Como esperado, a anemia gerou alterações estruturais das fibras nervosas mielínicas e células gliais do nervo óptico em todas as idades analisadas, tais como desorganização estrutural das fibras mielínicas, dilatação axonal, e em relação às células gliais foram observadas alterações nucleares como invaginação e fragmentação nuclear.

A estimulação tátil neonatal foi eficaz na minimização das alterações morfológicas causadas pela deficiência de ferro, observadas em todas as idades estudadas. Além disso, os animais controle estimulados apresentaram aceleração da mielinogênese, comprovado pela aparente maior densidade de fibras mielínicas em relação aos animais controle não estimulados. A estimulação tátil neonatal também aumentou a densidade vascular, em todas as idades.

A quantidade de células gliais foi altamente modificada pelo modelo experimental de dieta utilizado, resultando em aumento da quantidade de astrócitos e diminuição da quantidade de oligodendrócitos. Em relação à quantidade de fibras lesadas, a dieta deficiente em ferro mostrou ser agressiva, lesando grande quantidade de fibras em todas as idades estudadas, por outro lado a estimulação tátil neonatal foi eficaz na proteção das fibras, através do aumento da densidade vascular.

6 _____ *R*EFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS*

*De acordo com as normas da APA – American Psychological Association

- Aminoff, M. J., & Daroff, R. B. (2003). *Encyclopedia of the Neurological Sciences: M-Ph* (Vol. 3). Academic Press.
- Andrews, N. C., & Schmidt, P. J. (2007). Iron homeostasis. *Annual Reviews of Physiology*, 69, 69-85.
- Argandona, E. G., Bengoetxea, H., Ortuzar, N., Bulnes, S., Rico-Barrio, I., & Vicente Lafuente, J. (2012). Vascular endothelial growth factor: adaptive changes in the neuroglialvascular unit. *Current Neurovascular Research*, 9(1), 72-81.
- Argandoña, E. G., & Lafuente, J. V. (1996). Effects of dark-rearing on the vascularization of the developmental rat visual cortex. *Brain research*, 732(1), 43-51.
- 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.
- Batista-Nascimento, L., Pimentel, C., Andrade Menezes, R., & Rodrigues-Pousada, C. (2012). Iron and neurodegeneration: from cellular homeostasis to disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Beard, J. L. (2003). Iron deficiency alters brain development and functioning. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1468S-1472S.
- 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.
- 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(7), 1630-1639.
- Berardi, N., Pizzorusso, T., & Maffei, L. (2000). Critical periods during sensory development. *Current opinion in neurobiology*, 10(1), 138-145.
- 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., Viegi, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2004). Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *The Journal of neuroscience*, 24(20), 4840-4848.
- Cavallotti, C., Cavallotti, D., Pescosolido, N., & Pacella, E. (2003). Age-Related Changes in Rat Optic Nerve: Morphological Studies. *Anatomia, histologia, embryologia*, 32(1), 12-16.
- 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(5), 366-371.
- 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.
- Connor, J. R., & Fine, R. E. (1987). Development of transferrin-positive oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Journal of neuroscience research*, 17(1), 51-59.
- 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.
- Conrad, M. E., & Umbreit, J. N. (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 29(3), 336-355.
- Conrad, M. E., Umbreit, J. N., & Moore, E. G. (1999). Iron absorption and transport. *The American journal of the medical sciences*, 318(4), 213.
- 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.
- Cunnif, P. Official methods of analysis of AOAC Internacional. In: Association of Official Analytical Chemists Internacional, 16th ed., Washington, DC, 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.
- Dangata, Y. Y., & Kaufman, M. H. (1997). Morphometric analysis of the postnatal mouse optic nerve following prenatal exposure to alcohol. *Journal of anatomy*, 191(1), 49-56.
- 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. *Revista de Saúde Pública*, 36(1), 26-32.
- 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.
- Denenberg, V. H. (1964). Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: A theory of infantile stimulation. *Psychological Review*, 71, 335.

- Dewey, K. G., Domellöf, M., Cohen, R. J., Rivera, L. L., Hernell, O., & Lönnerdal, B. (2002). Iron supplementation affects growth and morbidity of breast-fed infants: results of a randomized trial in Sweden and Honduras. *The Journal of nutrition*, 132(11), 3249-3255.
- 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(1), 111-119.
- Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early human development*, 3(1), 79-83.
- Donovan, A., Roy, C. N., & Andrews, N. C. (2006). The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology*, 21(2), 115-123.
- Eckard, J., Dai, J., Wu, J., Jian, J., Yang, Q., Chen, H., ... & Huang, X. (2010). Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Cancer cell international*, 10(1), 28.
- 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.
- Francois, C., Nguyen-Legros, J., & Percheron, G. (1981). Topographical and cytological localization of iron in rat and monkey brains. *Brain research*, 215(1), 317-322.
- Friedman, A. J., Chen, Z., Ford, P., Johnson, C. A., Lopez, A. M., Shander, A., ... & van Wyck, D. (2012). Iron Deficiency Anemia in Women Across the Life Span. *Journal of Women's Health*, 21(12), 1282-1289.
- Glover, J., & Jacobs, A. (1972). Activity pattern of iron-deficient rats. *British medical journal*, 2(5814), 627.
- 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.
- 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.
- Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 549-579.
- Hensch, T. K. (2005). Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Current topics in developmental biology*, 69, 215-237.
- Hill, J. M., & Switzer III, R. C. (1984). The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience*, 11(3), 595-603.
- 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.
- Hunt, J. R., Zito, C., Erjavec, J., & Johnson, L. K. (1994). Severe or marginal iron deficiency affects spontaneous physical activity in rats. *The American journal of clinical nutrition*, 59(2), 413-418.
- Hunter, A., & Bedi, K. S. (1986). A quantitative morphological study of interstrain variation in the developing rat optic nerve. *Journal of Comparative Neurology*, 245(2), 160-166.
- 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.
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C., & Mason, D. Y. (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, 312, 162-163.
- Jorgenson, L. A., Sun, M., O'Connor, M., & Georgieff, M. K. (2005). Fetal iron deficiency disrupts the maturation of synaptic function and efficacy in area CA1 of the developing rat hippocampus. *Hippocampus*, 15(8), 1094-1102.

- Lachat, D. (2010). Análise ultraestrutural 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.
- Lam, K., Sefton, A. J., & Bennett, M. R. (1982). Loss of axons from the optic nerve of the rat during early postnatal development. *Developmental Brain Research*, 3(3), 487-491.
- 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.
- Leung, W. M., Nathaniel, V. E., & Nathaniel, E. J. H. (1992). A morphological and morphometric analysis of the optic nerve in the hypothyroid rat. *Experimental neurology*, 117(1), 51-58.
- Levine, S. (1962). Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*.
- Li, Y., Kim, J., Buckett, P. D., Böhlke, M., Maher, T. J., & Wessling-Resnick, M. (2011). Severe Postnatal Iron Deficiency Alters Emotional Behavior and Dopamine Levels in the Prefrontal Cortex of Young Male Rats. *The Journal of nutrition*, 141(12), 2133-2138.
- Lima, J.G. (1992). Estudo morfológico e morfométrico do corpo caloso de ratos submetidos a diferente tipos de dieta e à estimulação sensorial e ambiental. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- 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: the journal of the American Medical Association*, 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. (1989). Nutrition and behavior. *American Psychologist*, 44(2), 231-236.
- 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.
- Martin, J. H. (1998). O Sistema Visual. In J. H. Martin, *Neuroanatomia: texto e atlas* (pp. 161-197). Porto Alegre: Artes Médicas.
- Matsuzawa, T., & Sakazume, M. (1994). Effects of fasting on haematology and clinical chemistry values in the rat and dog. *Comparative Haematology International*, 4(3), 152-156.
- Meerlo, P., Horvath, K. M., Nagy, G. M., Bohus, B., & Koolhaas, J. M. (1999). The influence of postnatal handling on adult neuroendocrine and behavioural stress reactivity. *Journal of neuroendocrinology*, 11(12), 925-934.
- Melo, P., Moreno, V. Z., Vázquez, S. P., Pinazo-Durán, M. D., & Tavares, M. A. (2006). Myelination changes in the rat optic nerve after prenatal exposure to methamphetamine. *Brain research*, 1106 (1), 21-29.
- 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.
- 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). Estudos das condições de saúde das crianças no município de São Paulo, SP (Brasil), 1984-1985. *Revista de Saúde Pública*, 21(3), 225-60.
- 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), 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., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(4), 471-483.
- Morris, C. M., Keith, A. B., Edwardson, J. A., & Pullen, R. G. L. (1992). Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain. *Journal of neurochemistry*, 59(1), 300-306.
- Nicolae, I., Nicolae, C. D., Schipor, S., & Caragheorgheopol, A. (2013). Influence of iron deficiency on angiogenesis in melanoma patients. In 15th European Congress of Endocrinology (p. 547) Copenhagen, Denmark.
- Núñez, J. F., Ferré, P., García, E., Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., & Tobeña, A. (1995). Postnatal handling reduces emotionality ratings and accelerates two-way active avoidance in female rats. *Physiology & behavior*, 57(5), 831-835.
- 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.
- Ortuzar, N., Argandoña, E. G., Bengoetxea, H., & Lafuente, J. V. (2011). Combination of intracortically administered VEGF and environmental enrichment enhances brain protection in developing rats. *Journal of neural transmission*, 118(1), 135-144.
- 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.
- 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.

- Phillips, D. E., Krueger, S. K., & Rydquist, J. E. (1991). Short-and long-term effects of combined pre-and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on the development of myelin and axons in rat optic nerve. *International journal of developmental neuroscience*, 9(6), 631-647.
- 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.
- Rajan, K. S., Colburn, R. W., & Davis, J. M. (1976). Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas. *Life sciences*, 18(4), 423-431.
- 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.
- Rocinho, 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.
- 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.
- Sanyal, B., Polak, P. E., & Szuchet, S. (1996). Differential expression of the heavy-chain ferritin gene in non-adhered and adhered oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research*, 46(2), 187-197.
- Schalm, O. W., Jain, N. C., & Carroll, E. J. (1975). *Veterinary hematology* (No. 3rd edition). Lea & Febiger.
- Schanberg, S. M., & Field, T. M. (1987). Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child development*, 1431-1447.
- 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), 168-78.

- 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.
- 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(2), 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(2), 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(1), 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(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., 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.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12), 638-647.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7-35.

- 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.
- 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.
- Unger, E. L., Paul, T., Murray-Kolb, L. E., Felt, B., Jones, B. C., & Beard, J. L. (2007). Early iron deficiency alters sensorimotor development and brain monoamines in rats. *The Journal of nutrition*, 137(1), 118-124.
- Unger, E. L., Paul, T., Murray-Kolb, L. E., Felt, B., Jones, B. C., & Beard, J. L. (2007). Early iron deficiency alters sensorimotor development and brain monoamines in rats. *The Journal of nutrition*, 137(1), 118-124.
- Vallée, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., & Maccari, S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *The Journal of neuroscience*, 17(7), 2626-2636.
- Van-Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191-198.
- Vickers, A., Ohlsson, A., Lacy, J. B., & Horsley, A. (2004). Massage for promoting growth and development of preterm and/or low birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2.
- 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.
- Weinberg, J., Dallman, P. R., & Levine, S. (1980). Iron deficiency during early development in the rat: behavioral and physiological consequences. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12(4), 493-502.

- Wiggins, R. C. (1982). Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Research Reviews*, 4(2), 151-175.
- 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*.
- Yager, J. Y., & Hartfield, D. S. (2002). Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. *Pediatric neurology*, 27(2), 85-92.
- 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), 448-453.
- Youdim, M. B., Yehuda, S., & Ben-Uriah, Y. (1981). Iron deficiency-induced circadian rhythm reversal of dopaminergic-mediated behaviours and thermoregulation in rats. *European journal of pharmacology*, 74(4), 295-301.
- 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.