

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Análise Ultraestrutural do Nervo Óptico de Ratos Wistar Hígidos ou com Anemia Ferropriva Neonatal

Denise Lachat

Médica Veterinária

Jaboticabal – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

Análise Ultraestrutural do Nervo Óptico de Ratos Wistar Hígidos ou com Anemia Ferropriva Neonatal

Denise Lachat

Orientadora: Prof. Dr. Márcia Rita Fernandes Machado

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – SP

2010

L135a Lachat, Denise
Análise ultraestrutural do nervo óptico de ratos Wistar hípidos ou com anemia ferropriva neonatal / Denise Lachat. -- Jaboticabal, 2010
viii, 66 f. ; il ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Márcia Rita Fernandes Machado
Banca examinadora: José Antonio Thomazini, Luiza da Silva Lopes, Aureo Evangelista Santana, Marcos Lania de Araujo
Bibliografia

1. Anemia ferropriva. 2. Células gliais. 3. Nervo óptico. 4. Rato Wistar I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.617:636.932.4

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Denise Lachat, natural de Ribeirão Preto (São Paulo), nascida em 24 de Outubro de 1976, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Júlio de Mesquita Filho - UNESP - *Campus* de Jaboticabal, em Dezembro de 2001, tendo iniciado seus estudos em Março de 1997. Durante a graduação desenvolveu trabalhos de pesquisa junto ao Laboratório de Anatomia desta instituição em sua iniciação científica, de 1998 a 2001. Seu estágio de graduação foi feito no segundo semestre de 2001 em duas instituições de pesquisa: na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, tendo realizado suas atividades no Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Cirurgia e Anatomia; e na *École National Vétérinaire d'Alfort* (Paris). Em Agosto de 2005 recebeu o título de Mestre em Patologia Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Campus* de Jaboticabal e em 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, da mesma instituição de ensino. Desde o Mestrado até a presente data, está envolvida com a Pós-Graduação, participando da Diretoria da Associação dos Pós-Graduandos (APG), da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal e atualmente, também é representante discente do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária.

Aos meus pais, **João-José e Akie**,

de quem recebo até hoje

todo o amor que uma filha poderia desejar.

A riqueza interior que vocês possuem é maravilhosa!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Márcia Rita Fernandes Machado, pela grande oportunidade e credibilidade na realização deste projeto. Sua dedicação foi imprescindível para que tudo pudesse ser concretizado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, de importância fundamental ao desenvolvimento do meu doutorado.

Aos professores Aureo Evangelista Santana, Gilson Toniollo, José Antonio Thomazini, Luiza da Silva Lopes, Marcos Lania de Araujo, Paola Castro de Moraes e Rosemeri de Oliveira Vasconcelos pelas ricas sugestões no momento da qualificação e da defesa.

À Renata Picinato, secretária do Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, sempre doce, enérgica e disposta a ajudar.

À técnica Teresa Maglia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP-USP pelo excelente apoio técnico.

Aos amigos e pós-graduandas do laboratório: Alessandra, Ana 'Colombina', Andréa, Leandro, Sérgio e Zé, pelo apoio e pela amizade, sempre necessários.

À querida e grande amiga Mariah, presente em todos os momentos e transformando-os sempre em bons momentos com seu apoio e carinho.

Ao meu querido Mario, que surgiu em minha vida pela mais bela das coincidências, dando-me tanta energia nessa fase final.

À "Fer", minha querida irmã por sua amizade e força, que me acompanham por todos estes anos.

À minha querida mãe pelo amor, companheirismo, estímulo e conselhos, sempre presentes.

Ao meu querido pai, de forma muito especial, pelo misto de amor e experiência profissional, que eu tenho a sorte de poder compartilhar.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

L'essentiel est invisible; on ne voit qu'avec le coeur.

Antoine de Saint-Exupéry

A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Introdução	01
Revisão da literatura	03
Objetivo	07
Materiais e Métodos	09
Animais	10
Delineamento Experimental e Administração da Dieta	10
Avaliação do Peso Corporal dos Filhotes	12
Avaliação Hematológica das Ratas-Mãe e dos Filhotes	12
Manutenção e Limpeza dos Materiais	13
Coleta e processamento histológico do Nervo Óptico	13
Análise Ultraestrutural do Nervo Óptico	14
Análise Estatística	15
Resultados	16
Peso Corpóreo	17
Avaliação Hematológica das Ratas-Mãe e dos Filhotes	18
Avaliação da Hemoglobina e do Hematócrito das Ratas-Mãe	18
Avaliação da Hemoglobina e do Hematócrito dos Filhotes	19
Análise Morfológica	20
Aspectos Gerais	20
Aspectos Ultraestruturais	23
Grupo Controle	26
Grupo Anêmico	34
Avaliação do Desenvolvimento das Fibras Nervosas	42
Discussão	47
Conclusão	53
Referências	55
Anexos	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta basal utilizada para os grupos controle e anêmico durante os períodos de lactação e pós-lactação, de acordo com a AOAC (CUNNIF, 1995).....	11
Tabela 2 - Delineamento experimental indicando o período de análise, as dietas utilizadas e os grupos experimentais.....	12
Tabela 3 - Peso corpóreo, em gramas (g), dos animais controle e anêmicos entre zero e 32 dias de idade.....	17
Tabela 4 - Dados hematológicos das ratas-mãe controle e anêmicas, aos 18 e 21 dias do período de lactação, mostrando os valores de Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%).(B).....	18
Tabela 5 - Dados hematológicos dos filhotes controle e anêmicos, mostrando os valores de Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%) (B) aos 18, 22 e 32 dias de idade.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Crânio de rato Wistar com encéfalo <i>in situ</i> . Os ossos do assoalho craniano foram removidos mostrando a base do encéfalo dissecado. As linhas paralelas delimitam o segmento do nervo óptico coletado para análise.....	14
Figura 2 – Peso corpóreo, em gramas (g), dos animais do grupo anêmico e controle com zero, 7, 14, 18, 21, 22, 28 e 32 dias de idade.	17
Figura 3 – Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%) (B) das ratas-mãe controle e anêmicas, aos 18 e 21 dias pós-parto.	18
Figura 4 – Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%) (B) dos filhotes aos 18, 22 e 32 dias de idade.....	19
Figura 5 – Fotomicrografias representativas de secções transversais do nervo óptico de rato controle (A) e anêmico (B) aos 32 dias, coradas com azul de toluidina.....	20
Figura 6 – Fotomicrografia de uma secção transversal do nervo óptico de rato controle com 32 dias de idade, corada com azul de toluidina.....	22
Figura 7 - Eletronmicrografia de uma secção transversa do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle com 32 dias de idade, mostrando um oligodendrócito. Coloração: acetato de uranila e citrato de chumbo.....	23
Figura 8 - Eletronmicrografia de uma secção transversal do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle com 18 dias de idade, mostrando um astrócito fibroso. Coloração: acetato de uranila e citrato de chumbo.....	24
Figura 9 - Eletronmicrografia de uma secção transversal do nervo óptico de ratos Wistar do grupo anêmico com 18 dias de idade, mostrando uma micróglia. Coloração: acetato de uranila e citrato de chumbo.....	25
Figura 10 - Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle aos 22 (A) e 32 (B) dias de idade. Coloração: acetato de uranila e citrato de chumbo.....	26
Figura 11 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 18 dias de idade.....	29
Figura 12 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 22 dias de idade.....	31
Figura 13 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 32 dias de idade.....	33
Figura 14 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 18 dias de idade.....	37

Figura 15 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 22 dias de idade.....	39
Figura 16 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 32 dias de idade.....	41
Figura 17 – Eletronmicrografias, em pequeno e médio aumentos, de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar dos grupos controle (C) e anêmico (A) aos 18, 22 e 32 dias de idade.....	44
Figura 18 – Eletronmicrografias, com grande aumento, de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar dos animais controle (C) e anêmico (A) aos 18, 22 e 32 dias de idade.....	46

Resumo

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ÓPTICO DE RATOS WISTAR HÍGIDOS OU COM ANEMIA FERROPRIVA NEONATAL

RESUMO - Diversos estudos mostraram que a ingestão de dieta com níveis inadequados de ferro pode causar, no sistema nervoso central (SNC) de ratos, alterações morfológicas, bioquímicas e comportamentais no animal. Esses estudos têm ainda indicado que animais deficientes em ferro apresentam redução no número de lamelas de mielina e prejuízos na aprendizagem. A deficiência de ferro é uma das mais comuns desordens nutricionais em pacientes pediátricos e adultos e atinge cerca de 2,5 a 5 bilhões de pessoas em todo mundo. A consequência mais explícita da deficiência de ferro é a anemia. O ferro está relacionado ao desenvolvimento de fibras nervosas mielínicas, as quais constituem mais de 80% do nervo óptico. Objetivou-se, na presente investigação, avaliar com o auxílio de microscopia eletrônica de transmissão, os possíveis efeitos da anemia ferropriva na estrutura do nervo óptico de ratos Wistar durante os períodos de lactação e pós-lactação. Os animais foram divididos em 2 grupos: Controle e Anêmico. Os anêmicos receberam uma dieta com 4 mg de ferro/Kg, e os controle, uma dieta com 35 mg de ferro/Kg. Avaliações do peso corpóreo, hemoglobina e hematócrito foram feitas para checar os efeitos da deficiência de ferro. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina IM (22 mg/Kg) e então sacrificados por perfusão transcardíaca com PBS 0,05M, pH 7,4, seguido da mistura fixadora paraformaldeído 2% e glutaraldeído 1% diluída em tampão fosfato. Um segmento do nervo óptico foi retirado e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas a 4°C, desidratado em acetona e incluído em araldite. Cortes ultra-finos com 60 nanômetros de espessura foram montados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão para detalhada análise ultraestrutural das fibras nervosas, vasos sanguíneos e células gliais. Tanto os valores hematológicos quanto o peso corporal estavam diminuídos no grupo anêmico. A análise ultraestrutural mostrou nítidas lesões nas fibras mielínicas, amielínicas e nas células gliais dos animais anêmicos quando comparados com os seus controle pareados. Portanto, os resultados deste estudo permitem concluir que o ferro é necessário para a manutenção da estrutura dos componentes celulares do nervo óptico.

Palavras-chave: Nervo óptico, anemia ferropriva, morfologia, células gliais, rato Wistar

Abstract

OPTIC NERVE ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS IN NORMAL OR IRON DEFICIENCY ANEMIA IN NEONATAL PERIOD WISTAR RATS

ABSTRACT - Several studies showed that ingestion of diets with inadequate iron levels can cause morphological, biochemical and behavioral changes in the central nervous system (CNS) of rats. These studies have also shown that iron-deficient animals have reduced number of myelin lamellae and prejudice on learning. Iron deficiency is one of the most common nutritional disorders in pediatric patients and adults and affects about 2.5-5 billion people around the world. The most explicit result of iron deficiency is anemia. The iron is related to the development of myelinated nerve fibers, which constitute more than 80% of the optic nerve. The aim of this research is to evaluate, with transmission electronic microscopy, the possible effects of iron deficiency anemia in Wistar rats optic nerve structure during lactation and pos-lactation period. The animals were divided into 2 groups: Control and Anemic. The anemic group received 4 mg iron/Kg, the control group received 35 mg iron/Kg. Evaluation of body weight, hemoglobin and hematocrit were made to check the iron deficiency effects. The animals were anesthetized with ketamine 22 mg/Kg and then sacrificed by transcardiac perfusion with PBS 0.05 M, pH 7.4, followed by paraformaldehyde fixative mixture 2% and 1% glutaraldehyde. An optic nerve segment was removed and post-fixed in a solution of osmium tetroxide for two hours at 4°C, dehydrated in acetone and embedded in Araldite. Ultrathin sections with 60 nanometers thick were mounted on copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, observed and photographed by transmission electronic microscope for detailed ultrastructural analysis of nerve fibers, blood vessels and glial cells. Both hematological and body weight were smaller in the anemic group. The ultrastructural analysis showed damaged myelinated and unmyelinated fibers, and glial cells of the anemic animals when compared with their matched controls. Thus, iron is necessary for maintenance of the optic nerve cell structure.

Keywords: Optic nerve, iron deficiency, anemia, morphology, glial cells, Wistar rat

Introdução

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

Embriologicamente o nervo óptico e a retina originam-se do diencéfalo e, portanto, seus axônios relacionam-se com células gliais centrais, os oligodendrócitos e os astrócitos.

Em todos os vertebrados o nervo óptico possui o mesmo aspecto microscópico, apenas com pequenas variações, sendo formado por fibras nervosas classificadas como sensoriais especiais que se originam da retina.

Vários estudos têm relatado os efeitos prejudiciais da deficiência de ferro com relação aos aspectos morfológicos, bioquímicos e comportamentais em animais e no ser humano (CONRADI et al, 1985; DEWAY et al, 2002; LOZOFF et al, 2003; DEMAMAN et al, 2008).

A deficiência de ferro na alimentação causa uma das desordens nutricionais mais comuns no mundo. O ferro é, portanto, um microelemento essencial em uma dieta balanceada e sua carência está relacionada a numerosos processos bioquímicos importantes para o desenvolvimento e manutenção da função neurológica normal, como síntese de dopamina, serotonina e ácido gama aminobutírico (GABA) (BEARD & CONNOR, 2003).

O nervo óptico sofre alterações estruturais decorrentes da deficiência de nutrientes, gerando consequências sobre a visão e o desenvolvimento do sistema nervoso (GONG & AMEMIYA, 1999). Neste contexto, na presente investigação foi realizado um detalhado estudo ultraestrutural do nervo óptico de ratos alimentados com uma dieta deficiente em ferro, durante todo o período de lactação e pós-lactação, a fim de avaliar as mudanças morfológicas do tecido nervoso.

REVISÃO DE LITERATURA

A deficiência de ferro é uma das mais comuns desordens nutricionais em pacientes pediátricos e adultos (YAGER & HARTFIELD, 2002; LIEU et al, 2001) e atinge cerca de 2,5 a 5 bilhões de pessoas em todo mundo (BEARD, 2001; STOLTZFUS, 2001; YIP, 2002). Aproximadamente 70% do ferro total presente no corpo está contido nas moléculas de hemoglobina dos eritrócitos circulantes; 10% está na mioglobina, citocromos ou enzimas que contêm ferro e os 20% restantes é armazenado como ferritina e hemossiderina nos hepatócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial (CONRAD et al, 1999). A consequência mais óbvia da deficiência de ferro é a anemia, afetando um número estimado de 1 a 2 bilhões de pessoas em todo o planeta (VITERI, 1994; STOLTZFUS, 2001; YAGER & HARTFIELD, 2002).

A deficiência de ferro durante a infância é um problema de saúde pública mundial (DEWEY et al, 2002). Ela pode ser desencadeada a partir de um grande número de defeitos hereditários relacionados à produção ou estabilidade dos eritrócitos ou a partir de distúrbios nutricionais, tais como deficiência em ferro, ácido fólico ou vitamina B12. Além disso, a absorção do ferro também se torna reduzida durante a existência de processos inflamatórios do organismo (BEARD & CONNOR, 2003; HANDELMAN & LEVIN, 2008). Nos países em desenvolvimento, os indivíduos mais afetados são as crianças, devido ao maior requerimento determinado pelo crescimento e as mulheres em idade fértil, pela perda de ferro devido ao sangramento menstrual e as maiores necessidades deste mineral requeridas pela gravidez (OLIVARES & WALTER, 2004).

No Brasil, não existem informações seguras e atualizadas sobre a extensão e a distribuição geográfica e populacional da prevalência da anemia nutricional (OLIVEIRA et al, 2002).

A suplementação do ferro, no primeiro ano de vida, é normalmente aconselhada para prevenir a deficiência deste oligoelemento, mesmo em populações com uma prevalência relativamente baixa de anemia por deficiência de ferro (DEWEY et al, 2002).

A anemia ferropriva pode ser atribuída a algumas formas inadequadas de absorção de ferro, como a baixa disponibilidade na dieta, pH gástrico anormalmente elevado, perda ou disfunção da absorção pelos enterócitos ou pelo aumento de sua perda através do sangue em doenças inflamatórias e malignas (LIEU et al, 2001).

O ferro é essencial para a sobrevivência dos organismos vivos, sendo requerido em uma variedade de funções biológicas incluindo o transporte de oxigênio, transporte de elétrons e síntese de DNA (CONRAD et al, 1999).

O papel do ferro na funcionalidade do sistema nervoso central e periférico tem sido investigado em modelos animais e em estudos clínicos. A nível celular o ferro está envolvido em uma variedade de processos e sua deficiência afeta virtualmente todos os sistemas orgânicos, inclusive o sistema nervoso (YAGER & HARTFIELD, 2001).

As alterações cognitivas, motoras, dopaminérgicas e mielínicas são as mais frequentemente relatadas na deficiência de ferro no sistema nervoso central (CONNOR et al, 2001). É importante ressaltar que cerca de 80% do ferro no cérebro de ratos está na fração de mielina e o restante encontra-se dividido entre as frações mitocondriais e sinaptossomais (RAJAN et al, 1976). O papel do ferro na mielinização e na biologia do oligodendrócito tem sido investigado há bastante tempo (YU et al, 1986; BEARD & CONNOR, 2003; ORTIZ et al, 2004).

A relação entre a integridade do sistema visual e a anemia ferropriva tem sido estudada em seres humanos através de potenciais visuais evocados. O aumento na latência do potencial evocado visual de crianças em idade pré-escolar, com anemia ferropriva, em comparação com os sujeitos controle, foi relacionado a alterações no processo de mielinização do nervo óptico, decorrentes da deficiência de ferro (ALGARÍN et al, 2003).

A necessidade de uma quantidade suficiente de ferro para o desenvolvimento de neurotransmissores e das vias neurais (principalmente o nervo óptico) foi relacionada à melhora na acuidade visual, de crianças saudáveis e amamentadas, que receberam suplemento preventivo de ferro (FRIEL et al, 2003; LOZOFF et al, 2003).

Os estudos experimentais relacionados ao nervo óptico são frequentemente realizados em ratos. Este nervo se origina do divertículo óptico no diencéfalo e, portanto, sua mielina é formada por oligodendrócitos (SKOFF et al, 1980), que desempenham a função correspondente àquela das células de Schwann no sistema nervoso periférico. Em termos microanatômicos, o nervo óptico de ratos Wistar apresenta um formato cilíndrico, levemente achatado na direção súpero-inferior, medindo aproximadamente 11 mm de comprimento, desde o pólo posterior do globo ocular até o quiasma óptico (DEMAMAN et al, 2008). Ele se inicia no pólo posterior do globo ocular, segue posteriormente como uma estrutura cilíndrica de 0,2 a 0,3 mm de

diâmetro até o ápice da órbita, e chega ao interior da caixa craniana através do canal óptico. O nervo em sua porção intra-orbital 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 (que são prolongamentos das membranas meníngeas ao redor do nervo óptico) estão fundidas dorsomedialmente e ventralmente com a dura-máter (CAVALLOTTI et al, 2003).

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

A análise morfológica do nervo óptico de ratos, ao nível de microscopia de luz, mostrou que sua estrutura foi alterada pela anemia ferropriva, sendo que esta provocou uma série de efeitos deletérios no nervo, dentre eles a desorganização trabecular, a diminuição no número de vasos sanguíneos, o aumento do espaço intersticial entre as fibras nervosas e a diminuição da densidade destas fibras (HOMEM, 2004; RIBEIRO et al, 2005). O tratamento dos animais anêmicos com reposição de ferro no período de pós-lactação não reverteu satisfatoriamente os parâmetros morfométricos alterados pela anemia (DEMAMAN et al, 2008).

Dentro deste contexto alguns estudos estruturais foram realizados para verificar as alterações do nervo óptico de ratos, em condições como desnutrição (WIGGINS et al, 1984), privação protéica (CONRADI et al, 1985) e deficiência de manganês (GONG & AMEMIYA, 1999), zinco (GONG & AMEMIYA, 2001) e magnésio (GONG & AMEMIYA, 2003).

Estudos através de microscopia de luz e eletrônica mostraram que a desnutrição protéica desencadeia um aumento precoce na quantidade de fibras amielínicas em relação às mielinizadas e uma diminuição no número de lamelas da bainha de mielina. Além disso, ocorreu diminuição de 18% no número de axônios nos ratos desnutridos, no 21º dia pós-natal (WIGGINS et al, 1984).

A análise morfométrica do nervo óptico de ratos, alimentados com dieta deficiente em proteína, revelou uma marcante diminuição da área de secção transversa do nervo óptico em comparação com o grupo controle. O número de axônios por nervo foi quase idêntico nos dois grupos e o número de axônios com calibre maior que um

micrômetro foi bastante reduzido nos ratos com privação protéica (CONRADI et al, 1985).

Os achados ultraestruturais de nervos ópticos de ratos com deficiência em manganês mostraram significativa diminuição no número de axônios mielinizados, bem como no diâmetro das fibras nervosas mielinizadas e na espessura da bainha de mielina (GONG & AMEMIYA, 1999).

A diminuição no número de fibras nervosas mielinizadas e a diminuição da espessura da bainha de mielina foram também verificadas no nervo óptico de ratos com deficiência de zinco (GONG & AMEMIYA, 2001).

O estudo ultraestrutural do nervo óptico de ratos Wistar Kyoto, submetidos à deficiência de magnésio, revelou a presença de poucas fibras mielinizadas, bainhas de mielina mais finas, numerosos axônios desmielinizados e áreas multifocais de destruição e necrose do nervo óptico (GONG & AMEMIYA, 2003).

A importância da integridade do sistema visual na sociedade moderna e globalizada é indiscutível. A existência de evidências clínicas que sugerem a relação entre a anemia ferropriva e o desenvolvimento do sistema visual (principalmente do nervo óptico) deve ser mais profundamente estudada.

Sendo a anemia ferropriva um problema de saúde pública mundial e estando a mesma relacionada ao desenvolvimento e comportamento na infância e adolescência (LOZOFF et al, 2001; LOZOFF et al, 2003), seria importante verificar como a deficiência de ferro afeta o nervo óptico. Desta forma esta deficiência poderia potencializar os déficits do desenvolvimento e comportamento.

Dentro deste contexto, justifica-se a realização de um estudo mais aprofundado do nervo óptico de ratos com deficiência de ferro, para serem investigadas as possíveis alterações estruturais das fibras mielínicas, amielínicas e das células gliais que integram esta estrutura.

Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar, com o uso de microscopia eletrônica de transmissão, os possíveis efeitos da anemia ferropriva sobre o nervo óptico de ratos Wistar durante a lactação e pós-lactação. Durante esse período pós-natal precoce, serão analisadas as possíveis alterações estruturais das fibras nervosas mielínicas, amielínicas e das células gliais que integram o nervo óptico.

Materiais e Métodos

Animais

Durante todo o desenvolvimento do experimento, foram seguidos os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, bem como pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP – *Campus* de Jaboticabal. (protocolos em anexos)

Foram utilizadas seis ninhadas de ratos albinos, variedade Wistar provenientes do Biotério Central do *Campus* da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. A formação das ninhadas foi realizada previamente neste biotério, cada uma sendo composta por uma rata-mãe e seis filhotes machos.

Posteriormente, as ninhadas foram transportadas para o Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no dia do nascimento dos filhotes, denominado dia pós-natal zero (DPN0) e colocadas em caixas de polietileno (41 x 40 x 17 cm) com tampa de aço inoxidável e o assoalho recoberto por maravalhas. O ambiente foi mantido a uma temperatura entre 23-25°C, condições padronizadas de umidade em torno de 60% e luz artificial em um ciclo alternado de claro-escuro a cada 12 horas. Os animais receberam dieta *ad libitum* em comedouro de aço inoxidável e água deionizada, servida em bebedouro de vidro.

Delineamento experimental e administração da dieta

Três ninhadas foram utilizadas para cada grupo experimental (controle e anêmico), totalizando seis ninhadas para o experimento completo. Os animais de todos os grupos receberam dietas isocalóricas *ad libitum*, preparadas no laboratório de nutrição do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo segundo a AOAC-95 (CUNIFF, 1995). A única diferença entre as dietas de cada grupo experimental foi a quantidade de ferro presente na mistura mineral da ração. A composição das dietas, mistura de vitaminas e mistura de sais minerais podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da dieta basal utilizada para os grupos controle¹ e anêmico² durante os períodos de lactação e pós-lactação, de acordo com a AOAC (CUNNIF, 1995).

Composição da dieta			
Componentes	%		
Caseína	20	Composição da mistura vitamínica	
Colina	0.15	Componentes	Quantidade (g/100g)
Mistura salina *	0.27	Ácido fólico	0.10
Mistura vitamínica	0.10	α - Tocoferol acetato	5.00
Amido de milho (maizena)	20	Menadiona	0.04
Óleo de milho	5	Niacina	0.10
DL-Metionina	0.10	Pantotenato de cálcio	1.00
Glicose-H ₂ O	49.38	Piridoxina HCL	1.00
Composição da mistura de sais minerais **		Riboflavina	0.30
Componentes	Quantidade (g/100g)	Sucrose	85.51
MgSO ₄ , anidro	73.816	Tiamina HCL	0.30
ZnSO ₄ 7H ₂ O	19.657	Vitamina A 500.000 UI/g	1.0
MnSO ₄ H ₂ O	5.733	Vitamina B ₁₂ 0.1%	2.0 em gelatina
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.7315	Vitamina D ₃ 200.00 UI/g	0.75
KIO ₃	0.0625		

1- Grupo Controle recebeu dieta basal acrescida de 35 mg de Fe/Kg de dieta

2- Grupo Anêmico recebeu dieta basal acrescida de 4 mg de Fe/Kg de dieta

* Mistura mineral deficiente em ferro

** Mistura de sais minerais deficiente em Ferro

Durante todo o período experimental, que envolveu a lactação (0 a 21 dias) e a pós-lactação (22 a 32 dias), o grupo controle foi mantido com uma dieta contendo 35 mg de ferro/Kg e o grupo anêmico, com uma dieta contendo 4 mg de ferro/Kg. 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. A tabela 2 mostra os grupos experimentais formados durante os períodos de lactação e pós-lactação, considerando a variável dieta: controle (C) e anêmico (A).

Tabela 2 - Delineamento experimental indicando o período de análise, as dietas utilizadas e os grupos experimentais.

Período	Dieta	Grupo
Lactação	35 mg de ferro/Kg	Controle
	4 mg de ferro/Kg	Anêmico
Pós-lactação	35 mg de ferro/Kg	Controle
	4 mg de ferro/Kg	Anêmico

Avaliação do peso corporal dos filhotes

Os pesos corporais dos filhotes foram registrados individualmente durante a lactação com zero, 7, 14 e 21 dias de idade e na pós-lactação aos 28 e 32 dias de idade para investigar o ganho de peso semanal desses animais. Os filhotes também foram pesados nos dias das avaliações hematológica e morfológica aos 18, 22 e 32 dias de idade, para a realização dos cálculos da quantidade de fármacos administrados para a anestesia e perfusão.

Avaliação hematológica das ratas-mãe e dos filhotes

Foi coletada, sob anestesia (cloridrato de quetamina, IM - 22 mg/Kg), uma amostra de 1 mL de sangue de cada rata-mãe aos 18 e 21 dias do período de lactação e 1 mL de sangue de cada filhote aos 18, 22 e 32 dias de idade, através de punção

cardíaca, sendo este volume anticoagulado com uma solução aquosa de etilenodiaminotetracetato dipotássio (EDTA) a 10%. O sangue coletado destinou-se às análises hematológicas realizadas sempre no mesmo dia da coleta, sendo avaliadas a concentração de hemoglobina pelo método de cianometaemoglobina e a porcentagem de hematócrito pelo método do microematócrito.

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

Manutenção e limpeza dos materiais

Todos os materiais utilizados para o alojamento e manuseio dos animais, incluindo vidrarias, material de aço inoxidável e material plástico, foram previamente lavados com uma solução de ácido nítrico a 30% (v/v) e enxaguados em água deionizada, prevenindo a contaminação pelo ferro existente no meio ambiente.

Coleta e Processamento Histológico do Nervo Óptico

Aos 18, 22 e 32 dias de idade, seis animais de cada grupo experimental foram profundamente anestesiados com cloridrato de quetamina IM (22 mg/Kg), perfundidos por via transcardíaca com uma solução salina tamponada (PBS) 0,05M, pH 7,4; seguida por uma mistura fixadora de paraformaldeído 2% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Foi estabelecida uma relação de 1mL/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®). A dissecação foi feita com a utilização de instrumentos de microcirurgia, removendo-se toda a parte óssea periférica do palato e expondo-se o local de inserção do nervo no encéfalo e todo o seu percurso até a parte posterior do globo ocular. Foi utilizada apenas a porção do nervo óptico, entre o quiasma óptico e a deflexão para o globo ocular (figura 1).



Figura 1. Crânio de rato Wistar com encéfalo *in situ*. Os ossos do assoalho craniano foram removidos mostrando a base do encéfalo dissecado. As linhas paralelas delimitam o segmento do nervo óptico coletado para análise. Ampliação 3X.

Após sua retirada, o nervo foi colocado em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, lavado repetidas vezes, refixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4, por um período de 2 horas a 4°C, desidratados em concentrações crescentes de acetona de 30% a 100% e então incluídos em araldite 502, tomando-se o cuidado em orientá-lo para permitir que suas fibras fossem seccionadas sempre 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 em lâminas histológicas, corados com azul de Toluidina a 1% e então analisados ao nível de microscopia de luz, para a seleção das áreas a serem observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Cortes ultrafinos com 60 nanômetros de espessura foram obtidos com o mesmo ultramicrotomo, utilizando-se navalha de diamante Pelco®, modelo 122-SU-35 (Ted Pella, USA), montados em grades de cobre de malha 200, contrastados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (VENABLE & COGGESHALL, 1965) e então observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão para detalhada análise ultraestrutural das fibras nervosas, vasos sanguíneos e células gliais.

Análise ultraestrutural do nervo óptico

O estudo do nervo óptico dos ratos controle e anêmicos foi feito utilizando-se um microscópio eletrônico de transmissão Jeol® 100 CX II (Tokyo, Japão), equipado com uma câmera digital ORCA-HR (Hamamatsu Photomics, Japan) de 10,1 megapixels. Foram capturadas imagens de fibras nervosas (mielínicas e amielínicas), células gliais

(astrócitos, oligodendrócitos e micróglias) e vasos sanguíneos nos diferentes períodos do experimento (18, 22 e 32 dias), das secções transversais ultrafinas do nervo, com aumentos que variaram de 2.700 a 40.000 vezes, a fim de detectar as possíveis lesões estruturais do nervo, bem como alterações no seu padrão de mielinização nos animais alimentados com a dieta deficiente em ferro.

Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações hematológicas e de peso corporal dos grupos controle e anêmico foram analisados utilizando estatística descritiva básica e análise de variância (ANOVA), de uma entrada. Quando necessária a análise *post-hoc*, foi utilizado o teste de Tukey. Para avaliar se os dados obtidos eram provenientes de uma população com uma distribuição normal, foi usado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O nível de significância escolhido foi menor ou igual a 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio de um programa estatístico da Jandel Scientific Corporation Software (SigmaStat 32, versão 2.0, 1995).

Resultados

Peso Corpóreo

O peso corpóreo dos filhotes nos grupos controle e anêmico não foi estatisticamente diferente até o 14º dia de idade. A partir do 18º dia de idade a análise estatística mostrou efeito da dieta sobre o referido peso nesses animais. Os filhotes do grupo anêmico apresentaram pesos corpóreos estatisticamente menores ($p \leq 0,05$) que aqueles do grupo controle aos 18, 21, 22, 28 e 32 dias de idade (tabela 3 e Figura 2).

Tabela 3 – Média do peso corpóreo, em gramas (g), dos animais controle e anêmicos entre zero e 32 dias de idade. Os valores representam médias $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Idade (dias)	0	7	14	18	21	22	28	32
Controle - Peso (g)	6,75 $\pm 0,03$	17,81 $\pm 0,24$	32,01 $\pm 0,51$	41,27 $\pm 0,74$	51,06 $\pm 1,37$	53,66 $\pm 1,51$	85,47 $\pm 1,36$	108,94 $\pm 2,11$
Anêmico - Peso (g)	6,81 $\pm 0,06$	17,55 $\pm 0,26$	30,76 $\pm 0,50$	37,54 $\pm 0,89$	42,55 $\pm 1,02$	46,50 $\pm 0,82$	61,91 $\pm 1,57$	72,00 $\pm 2,13$

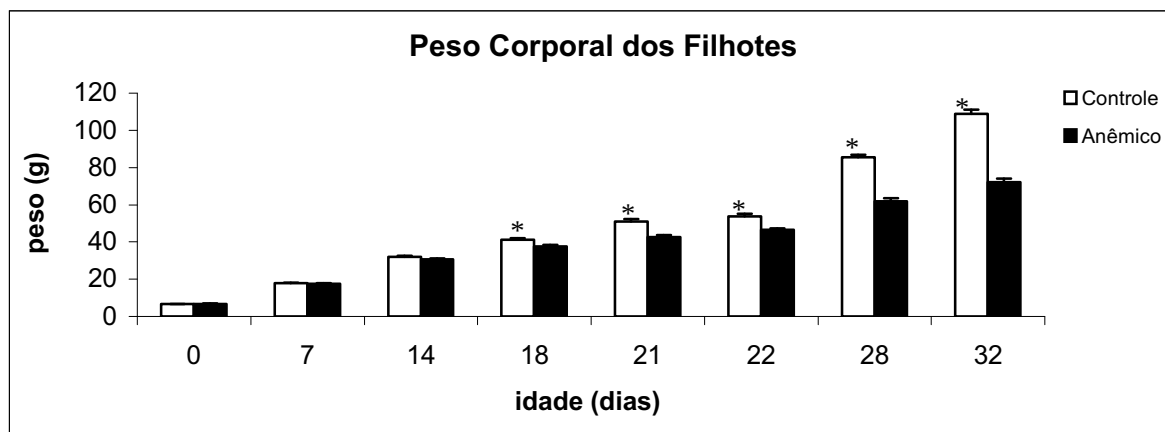


Figura 2 – Gráfico da média do peso corpóreo, em gramas (g), dos filhotes do grupo anêmico e controle com zero, 7, 14, 18, 21, 22, 28 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão das médias. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

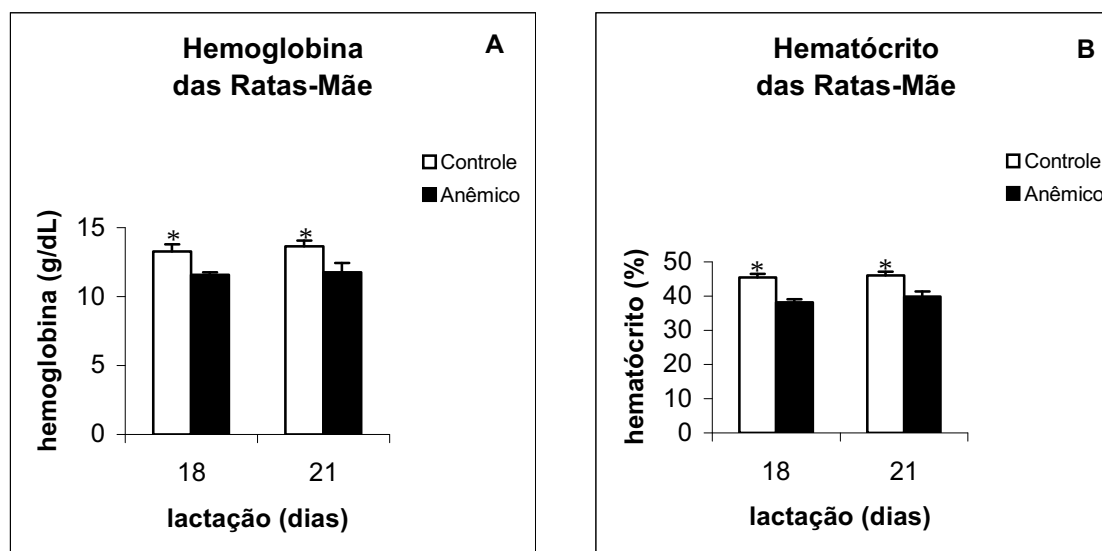
Avaliação Hematológica das Ratas-Mãe e Filhotes

Avaliação da Hemoglobina (Hb) e do Hematócrito (Ht) das Ratas-Mãe

A análise estatística mostrou efeito da dieta na concentração de hemoglobina e na porcentagem do hematócrito das ratas-mãe no 18º e 21º dia do período de lactação. Estes valores de **Hb** e **Ht** foram estatisticamente maiores ($p \leq 0,05$) nas ratas-mãe do grupo controle nestes dois períodos (tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4 – Dados hematológicos das ratas-mãe controle e anêmicas, aos 18 e 21 dias do período de lactação, mostrando os valores de Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%). Os valores representam médias $\pm$ EPM.

Lactação (dias)	18	21	Lactação (dias)	18	21
Controle	13,27	13,66	Controle	45,50	46,00
Hemoglobina (g/dL)	$\pm 0,54$	$\pm 0,40$	Hematócrito (%)	$\pm 0,95$	$\pm 1,14$
Anêmico	11,57	11,78	Anêmico	38,25	39,80
Hemoglobina (g/dL)	$\pm 0,20$	$\pm 0,65$	Hematócrito (%)	$\pm 0,85$	$\pm 1,56$



Avaliação da Hemoglobina (Hb) e do Hematócrito (Ht) dos Filhotes

A avaliação da concentração de **Hb** e do **Ht** dos filhotes, dos grupos controle e anêmico aos 18, 22 e 32 dias mostrou diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) entre estes grupos nos três períodos estudados.

A análise estatística revelou que nestes períodos, os valores de **Hb** e **Ht** foram estatisticamente menores ($p \leq 0,05$) nos filhotes do grupo anêmico (tabela 5 e Figura 4).

Tabela 5 – Dados hematológicos dos filhotes controle e anêmicos, mostrando os valores de Hemoglobina (g/dL) (A) e Hematócrito (%) (B) aos 18, 22 e 32 dias de idade. Os valores representam médias $\pm$ EPM.

Idade (dias)	18	22	32	Idade (dias)	18	22	32
Controle Hemoglobina (g/dL)	8,07 $\pm 0,40$	7,65 $\pm 0,40$	11,53 $\pm 0,66$	Controle Hematócrito (%)	25,75 $\pm 1,17$	24,30 $\pm 1,21$	38,25 $\pm 1,78$
Anêmico Hemoglobina (g/dL)	5,43 $\pm 0,18$	5,32 $\pm 0,23$	4,13 $\pm 0,20$	Anêmico Hematócrito (%)	17,87 $\pm 0,35$	17,25 $\pm 0,97$	13,83 $\pm 0,40$

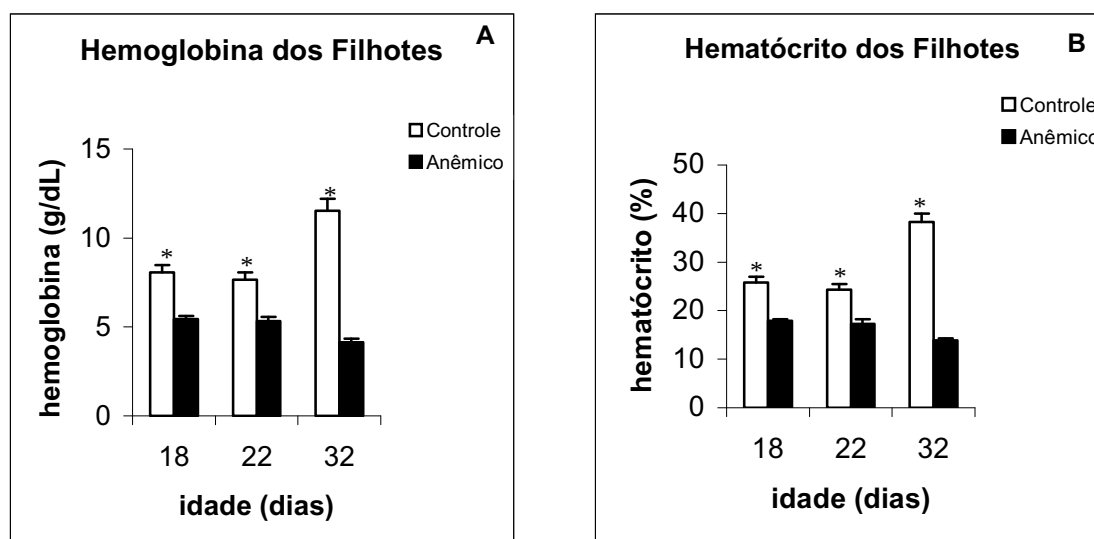


Figura 4 – Gráfico da Hemoglobina (g/dL) (A) e do Hematócrito (%) (B) dos filhotes aos 18, 22 e 32 dias de idade. As linhas verticais representam o erro padrão das médias. *As diferenças entre os grupos foram estatisticamente significantes em todas as idades ($p \leq 0,05$).

Análise Morfológica

Aspectos Gerais

O nervo óptico de todos os animais controle e anêmicos mostrou ser monofasciculado com um formato cilíndrico, levemente achatado horizontalmente, medindo aproximadamente 11 mm de comprimento, desde o globo ocular até o quiasma óptico (Figura 1).

A observação das secções transversais semifinas do nervo óptico à microscopia de luz revelou, a uma ampliação final de 125X, um formato ovalado com as meninges visíveis ao seu redor, com fibras nervosas densamente agrupadas e numerosos vasos sanguíneos (Figura 5).

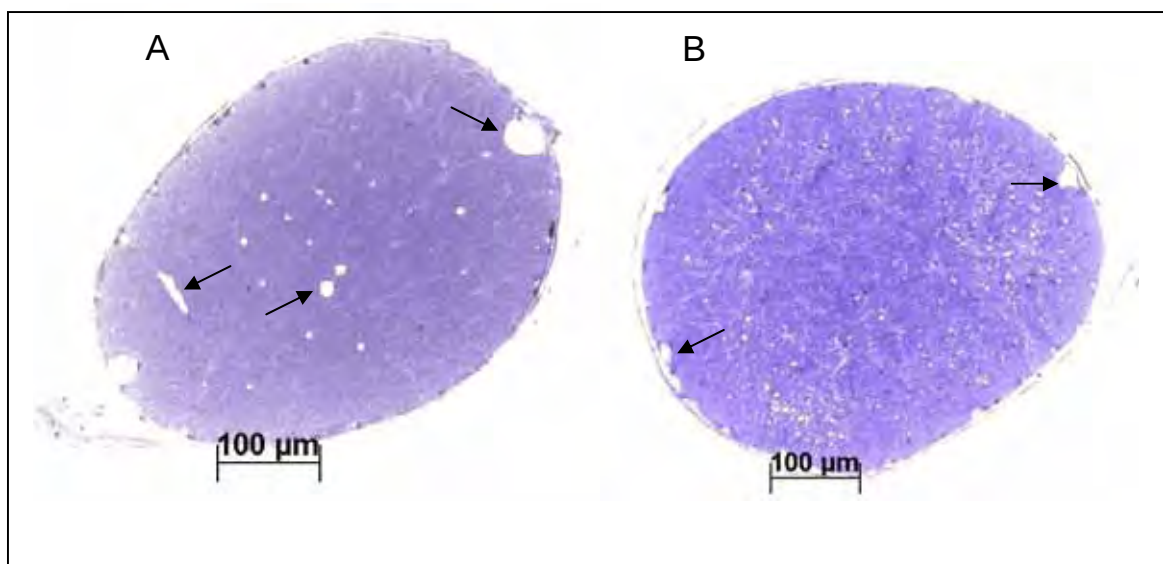


Figura 5 - Fotomicrografias representativas de secções transversais semifinas do nervo óptico de rato controle (A) e anêmico (B) aos 32 dias, coradas com azul de toluidina. As setas indicam vasos sanguíneos. Ampliação ao microscópio de 125X.

As secções transversais semifinas do nervo óptico, dos animais controle e anêmicos, mostraram ainda, um aspecto homogêneo de axônios mielínicos de diâmetros variados, distribuídos de forma relativamente uniforme através de todo o nervo. As fibras nervosas estavam densamente comprimidas e parcialmente separadas em feixes por trabéculas de tecido conjuntivo, contendo vasos sanguíneos responsáveis pelo suprimento de oxigênio e nutrientes ao nervo (figura 6). Entre as fibras nervosas estão os corpos celulares de duas categorias de células que dão suporte ao sistema

nervoso central: a neurógli e a micrógli. A neurógli compreende os astrócitos e os oligodendróctos (figura 6). Já a micrógli, como o nome sugere, é menor que o astrócito e que o oligodendróctito e foram mais frequentemente encontradas nos animais anêmicos (figura 6B).

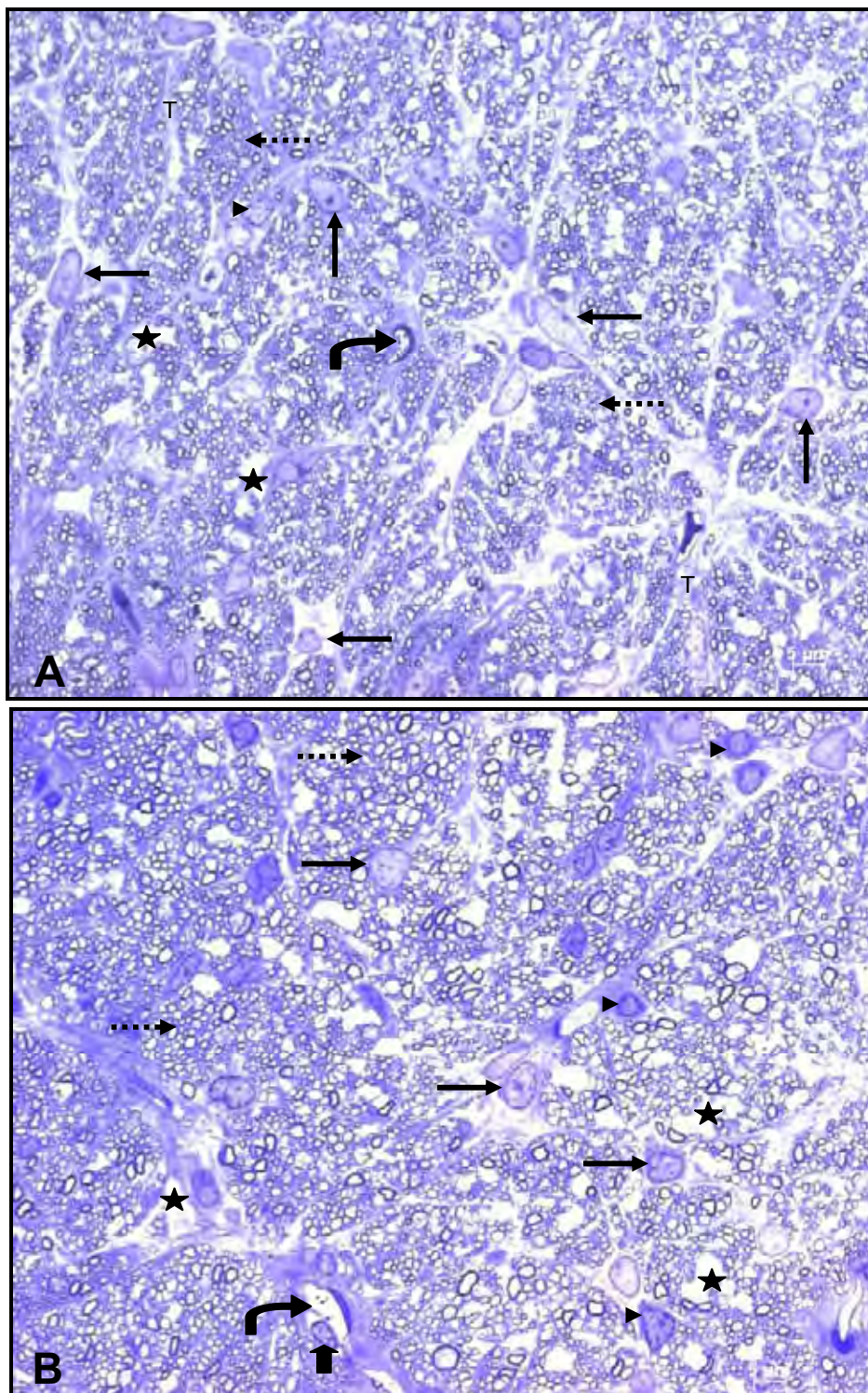


Figura 6 - Fotomicrografias de secções transversais semifinas do nervo óptico de rato controle (A) e anêmico (B) com 32 dias de idade, coradas com azul de toluidina. Astrócito (**seta**), oligodendrócito (**cabeça da seta**), micróglia (**seta larga**), fibras nervosas mielínicas (**seta tracejada**), vaso sanguíneo com célula endotelial (**seta curva**), espaço intersticial (**estrela**), e trabéculas conjuntivas (T). Ampliação ao microscópio de 400X.

Aspectos Ultraestruturais

A observação das secções transversais ultrafinas do nervo óptico mostrou que os oligodendrócitos são células gliais que possuem núcleos em posição excêntrica, grandes, redondos, ovalados ou irregulares, com a cromatina nuclear tendendo a formar grumos. A membrana nuclear é revestida interiormente por esses grumos de cromatina, que a torna bem evidente. No citoplasma pode ser observada uma grande quantidade de ribosomas livres, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso (figura 7).

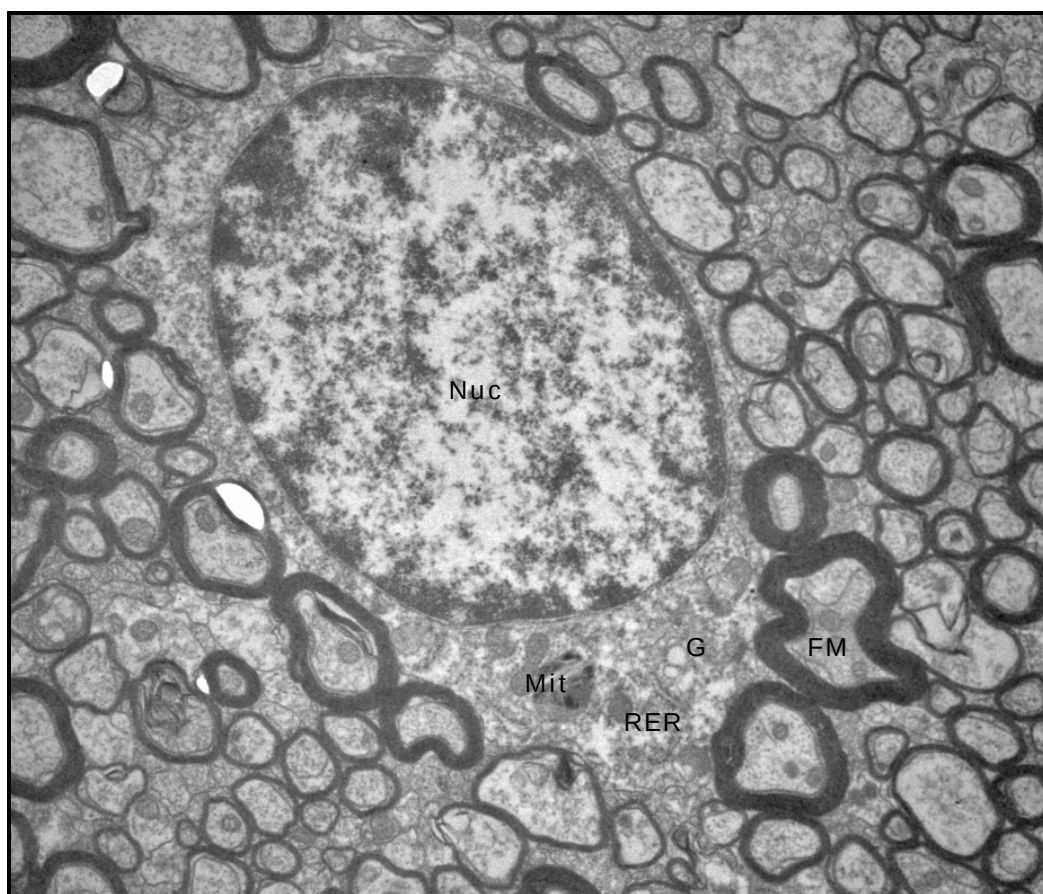


Figura 7 - Eletronmicrografia de uma secção transversa do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle com 32 dias de idade, mostrando um oligodendrócito. Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Fibras miélinicas (**FM**), complexo de Golgi (**G**), mitocôndrias (**Mit**), núcleo (**Nuc**), retículo endoplasmático rugoso (**RER**). Ampliação ao microscópio de 10.000X.

Já os astrócitos foram identificados através de suas duas principais características morfológicas ultraestruturais, que são a ocorrência de fibrilas citoplasmáticas e de processos astrocíticos terminais que circundam a parede dos vasos sanguíneos. Os núcleos podem ser irregulares com incisuras no envelope

nuclear e cromatina com densidade homogênea, apresentando alguns grumos adjacentes à membrana nuclear interna. Ocasionalmente o nucléolo é visível. As organelas citoplasmáticas comuns ocorrem no astrócito, mas elas são esparsas em comparação com outros tipos de células e suas mitocôndrias são geralmente alongadas (figura 8).

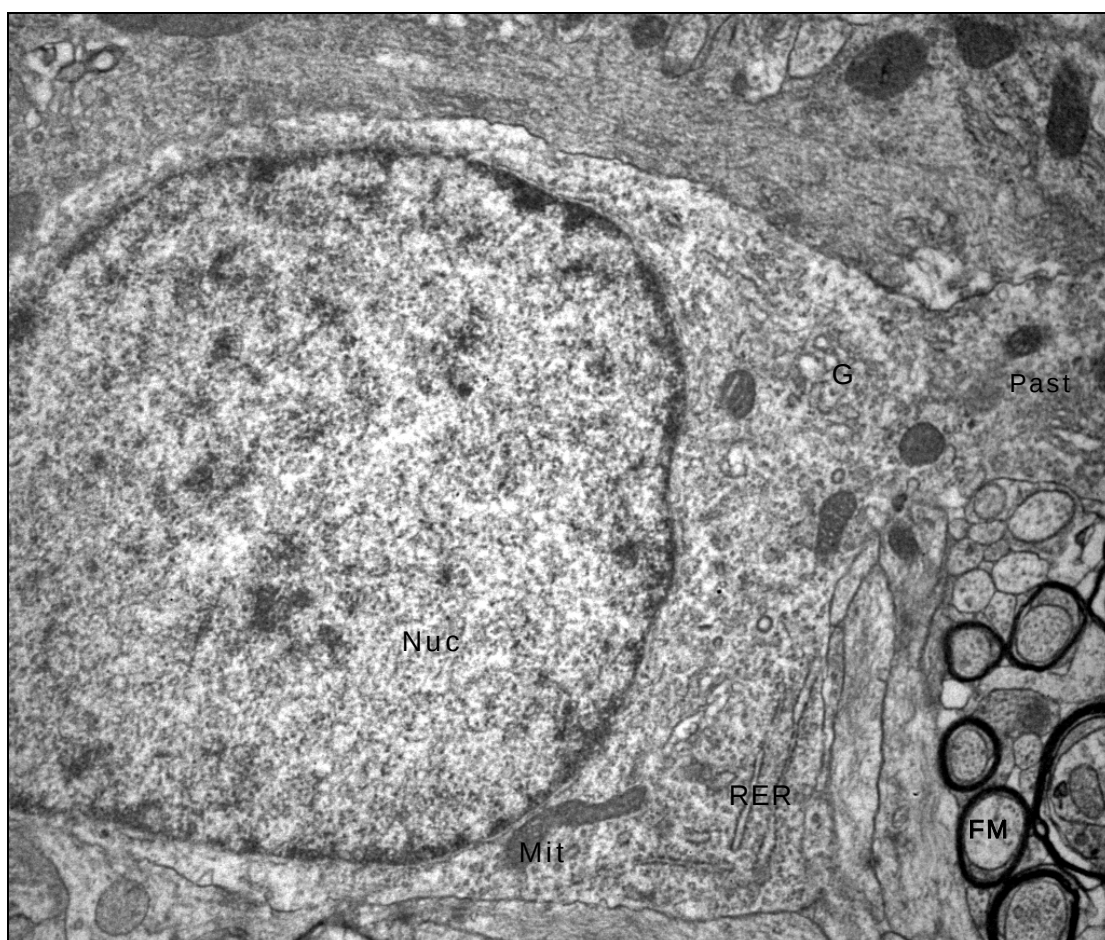


Figura 8 - Eletronmicrografia de uma secção transversal do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle com 18 dias de idade, mostrando um astrócito fibroso. Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Fibras miélinicas (**FM**), complexo de Golgi (**G**), mitocôndrias (**Mit**), núcleo (**Nuc**), processo astrocítico (**Past**), retículo endoplasmático rugoso (**RER**). Ampliação ao microscópio de 14.000X.

A micróglia, encontrada com mais frequência nos animais anêmicos, apresentou núcleo alongado ou ovóide embora também possa apresentar núcleos de forma irregular com sulcos profundos. A cromatina forma grumos adjacentes à membrana nuclear interna e uma área com densidade média, produzindo uma zona central no núcleo. O citoplasma pode ser escasso, formando em alguns casos uma borda estreita

em torno do núcleo, onde podem ser observadas organelas, tais como mitocôndrias, longas e características cisternas de retículo endoplasmático rugoso e inclusões escuras que parecem ser de lipofucsina (figura 9).

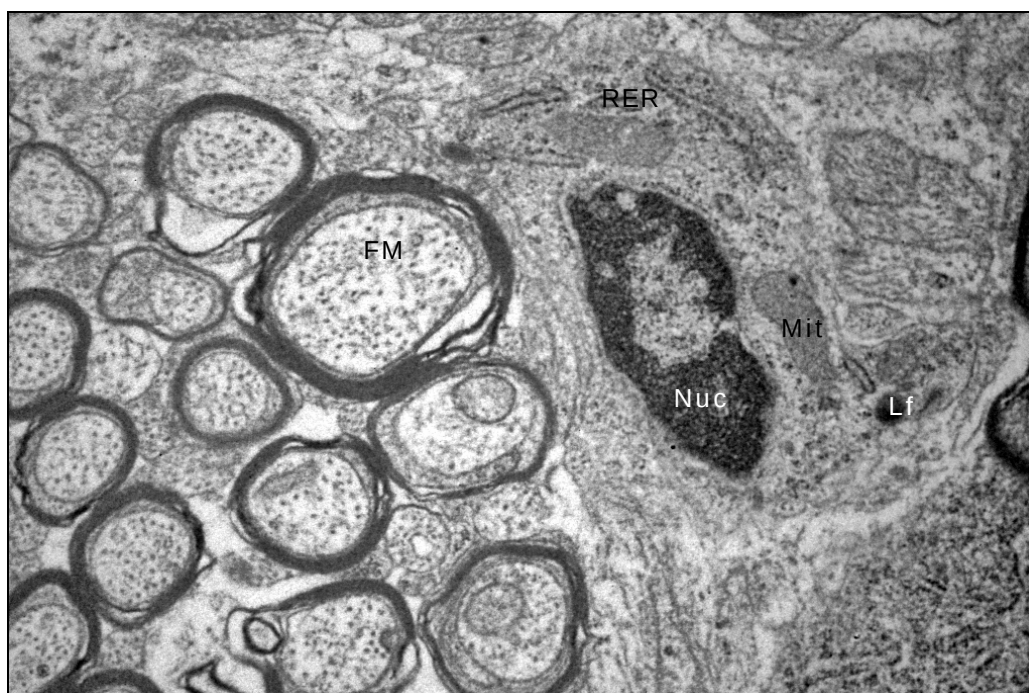


Figura 9 - Eletronmicrografia de uma secção transversal do nervo óptico de ratos Wistar do grupo anêmico com 18 dias de idade, mostrando uma micróglia. Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Fibras mielínicas (**FM**), lipofucsina (**Lf**), mitocôndrias (**Mit**), núcleo (**Nuc**), retículo endoplasmático rugoso (**RER**). Ampliação ao microscópio de 20.000X.

As fibras nervosas observadas em ambos os grupos experimentais, eram constituídas por um axônio e suas bainhas envoltórias que podiam ser mielínicas ou amielínicas. O citoplasma dos axônios era claro e continha mitocôndrias circundadas por uma matriz constituída de microtúbulos e neurofilamentos uniformemente espaçados. As fibras mielínicas possuíam uma bainha de mielina que as circundavam. O estudo das eletronmicrografias mostrou ainda que a organização da mielina consistia em camadas de lipídios que se dispunham concentricamente, alternando com camadas delgadas de material protéico e enrolando-se em espiral em torno do axônio. Em grande aumento, a mielina mostrou uma série de linhas escuras e claras em um padrão de repetição (figura 10).

Os diferentes sistemas de fibras do encéfalo adquirem bainha de mielina em tempos diferentes, sendo que o processo de mielinização aparece relativamente tarde e termina algum tempo após o nascimento. As fibras amielínicas observadas em ambos os grupos estudados possuíam um diâmetro menor e podiam formar pequenos grupos, sendo que cada axônio do grupo era envolvido por uma única membrana, porém sem ocorrer o enrolamento em espiral (figura 10A).

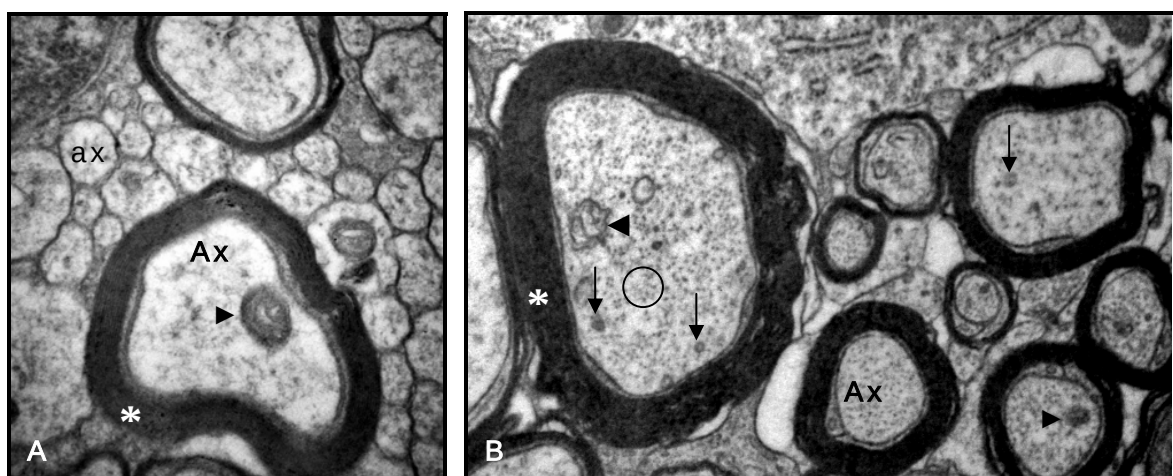


Figura 10 - Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de ratos Wistar do grupo controle aos 22 (A) e 32 (B) dias de idade. Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Axônios mielínicos (**Ax**), axônios amielínicos (**ax**), lamelas de mielina (*), microtúbulos (**seta**), neurofilamentos (**círculo**), mitocôndrias (**cabeça de seta**). Ampliação ao microscópio de 40.000X.

Grupo Controle

18 dias

Nesta idade o nervo óptico apresentou grande quantidade de células gliais, como astrócitos, oligodendrócitos e um discreto número de micróglias.

As fibras nervosas não estavam ainda tão densamente agrupadas, existindo entre elas um maior espaço intersticial. As fibras mielínicas estavam pouco mielinizadas, mostrando bainhas bem delgadas. Foi possível distinguir uma grande quantidade de fibras amielínicas. A separação parcial das fibras nervosas em feixes pelas trabéculas conjuntivas era ainda pouco evidente (figura 11).

22 dias

As observações são similares àquelas já descritas nos animais com 18 dias de idade. Entretanto, as fibras nervosas se mostram mais densamente agrupadas, com pouco espaço entre elas. Nesta idade já era possível distinguir a separação parcial das fibras nervosas em feixes pelas trabéculas conjuntivas, agora mais evidentes.

Os astrócitos foram encontrados com bastante facilidade, sugerindo aumento deste tipo celular neste período. As fibras mielinizadas possuíam uma bainha de mielina mais espessa e, aquelas com maior diâmetro, eram nitidamente mais frequentes que nos animais com 18 dias de idade. A quantidade de fibras amielínicas mostrou-se expressivamente menor em todos os animais deste grupo (figura 12).

32 dias

Nesta idade, os aspectos do nervo, descritos para os animais com 22 dias eram mais marcantes. As fibras estavam densamente comprimidas, quase sem mostrar espaço entre elas. As trabéculas conjuntivas eram muito evidentes. A quantidade de fibras mielinizadas com espessas bainhas de mielina estava visivelmente aumentada e as fibras amielínicas não eram facilmente encontradas, indicando que nesta idade estavam mais reduzidas (Figura 13).

Uma característica que chamou a atenção nas eletronicografias obtidas neste período foi a presença de um pequeno, mas consistente, número de fibras mielínicas com discretas lesões ou mesmo em estado avançado de degeneração (figura 13F).

Figura 11 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 18 dias de idade.

Notar que as fibras nervosas não estão ainda tão densamente agrupadas, com um espaço maior entre elas (A). As fibras mielínicas (FM) apresentam diâmetros variados, distribuídos de forma homogênea, porém estão pouco mielinizadas, mostrando bainhas bem delgadas (A-D). É possível distinguir uma grande quantidade de fibras amielínicas (asterisco), facilmente visíveis nos maiores aumentos (E-F). A separação parcial das fibras nervosas em feixes pelas trabéculas conjuntivas (T) é ainda pouco evidente. Entre as fibras nervosas podem-se ver diversos astrócitos (★). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-2.700X; B,C-8.000X; D-14.000X; E-20.000X; F-40.000X

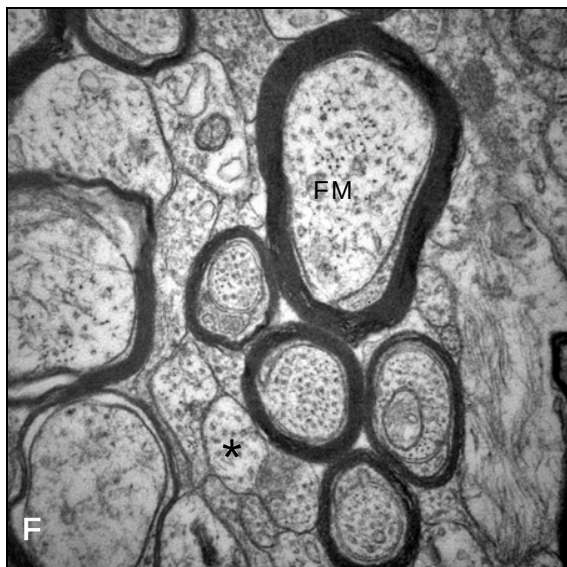
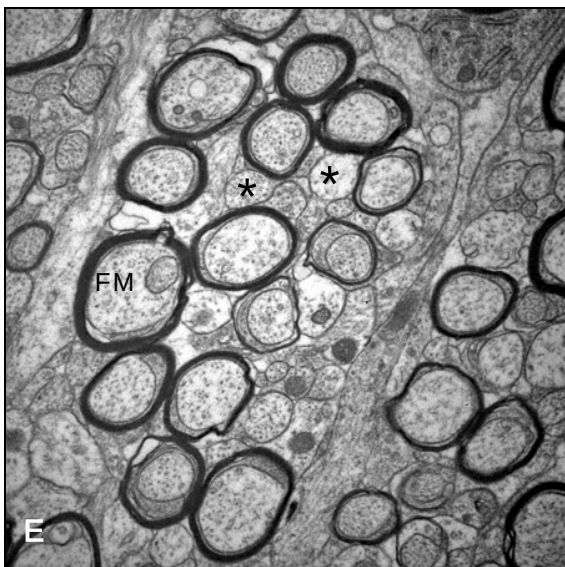
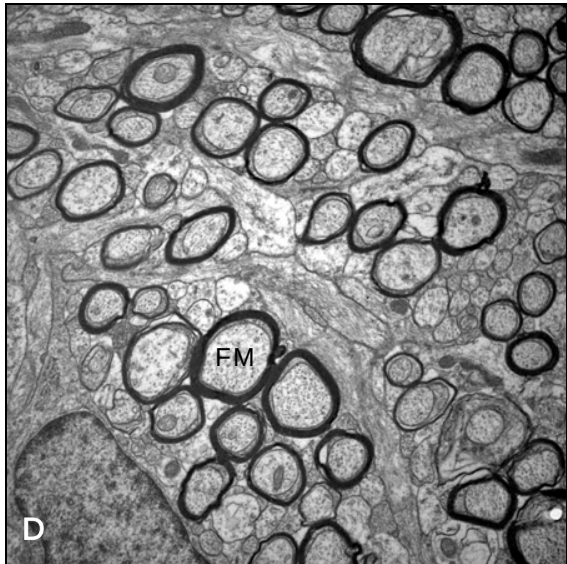
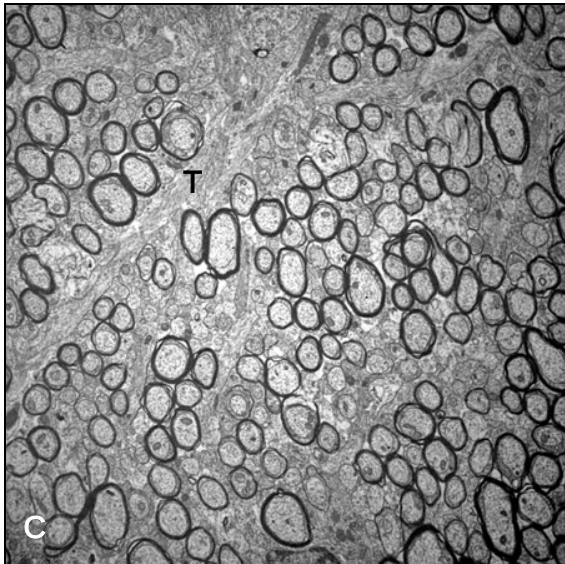
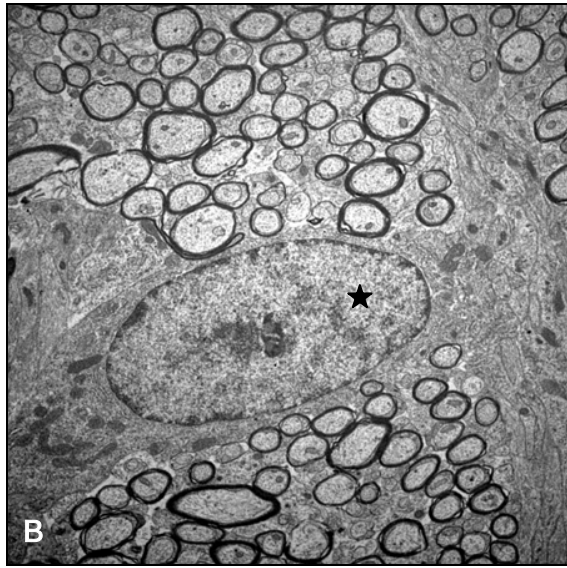
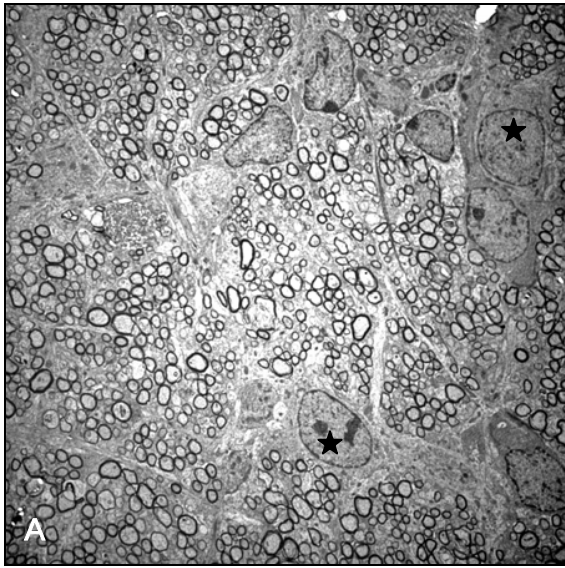


Figura 12 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 22 dias de idade.

As fibras nervosas estão mais densamente agrupadas, com pouco espaço entre elas (A-C). As fibras mielínicas estão bem mais mielinizadas, mostrando bainhas mais espessas (B-F). As fibras amielínicas são vistas em menor quantidade (E-F). A separação parcial das fibras nervosas em feixes pelas trabéculas conjuntivas (**T**) é bastante evidente. Entre as fibras nervosas podem-se ver astrócitos (**As**) com suas organelas citoplasmáticas, como complexo de Golgi (**G**) e retículo endoplasmático rugoso (**RER**). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-2.700X; B-4.000X; C-8.000X; D,E,F-14.000X

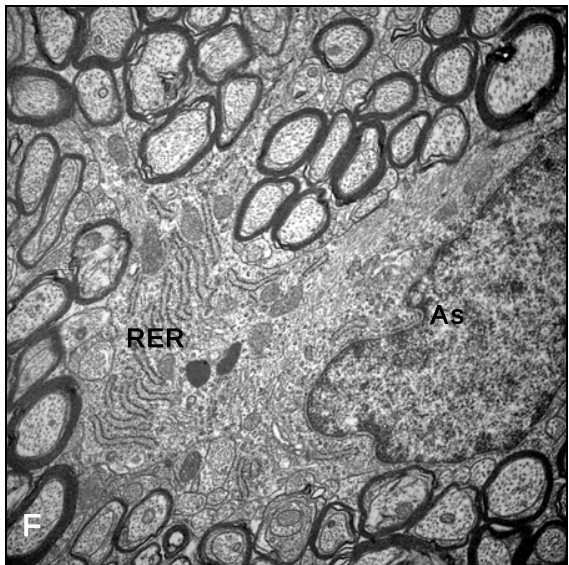
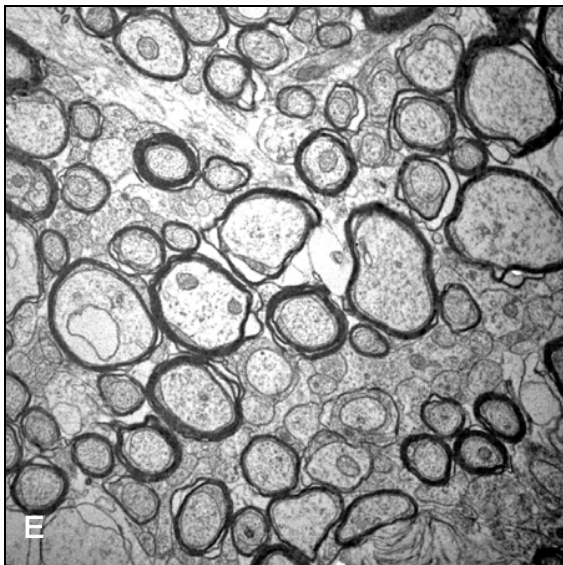
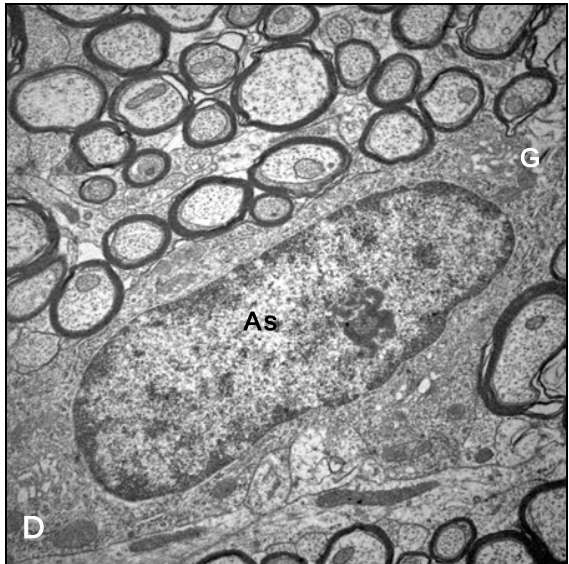
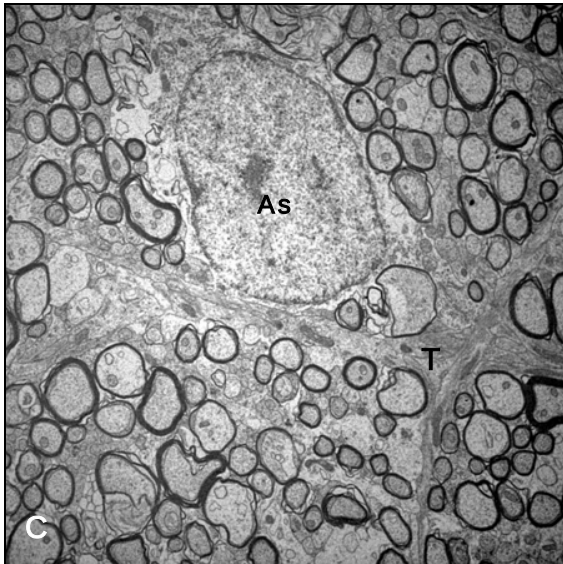
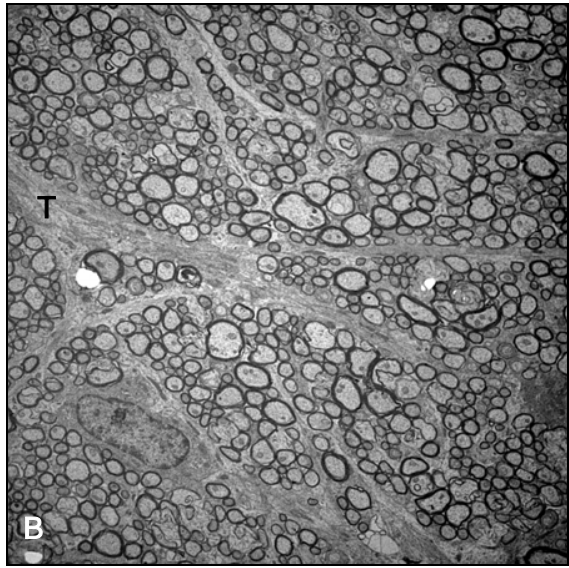
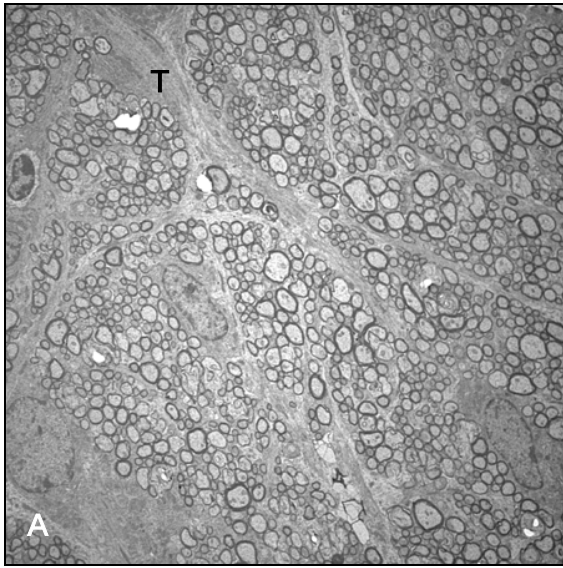
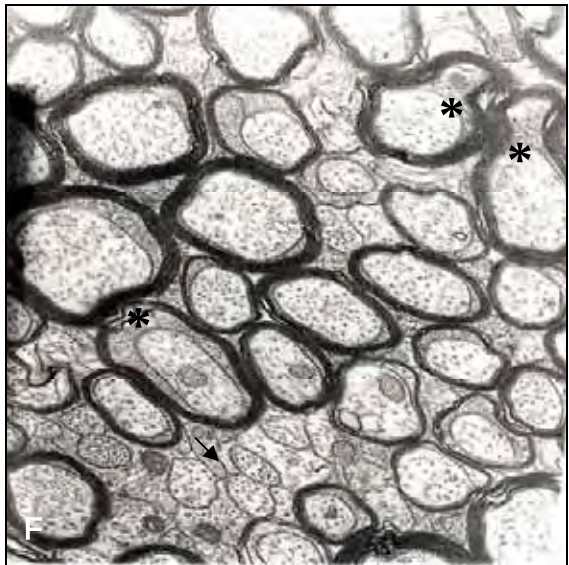
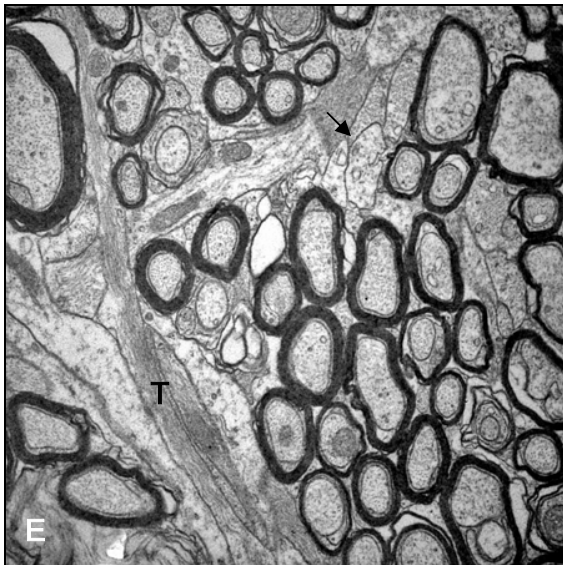
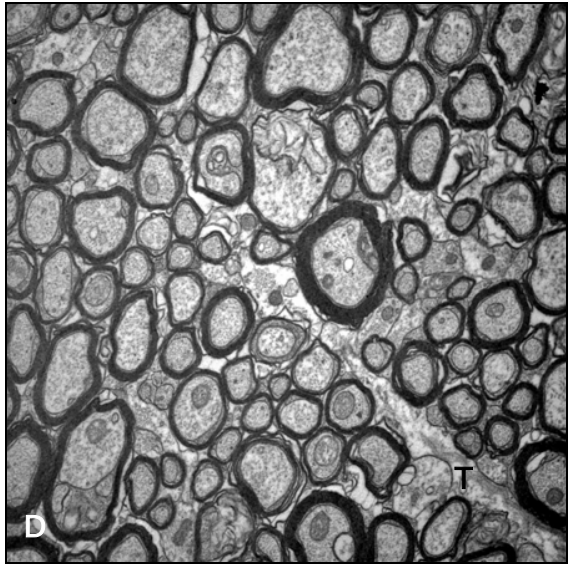
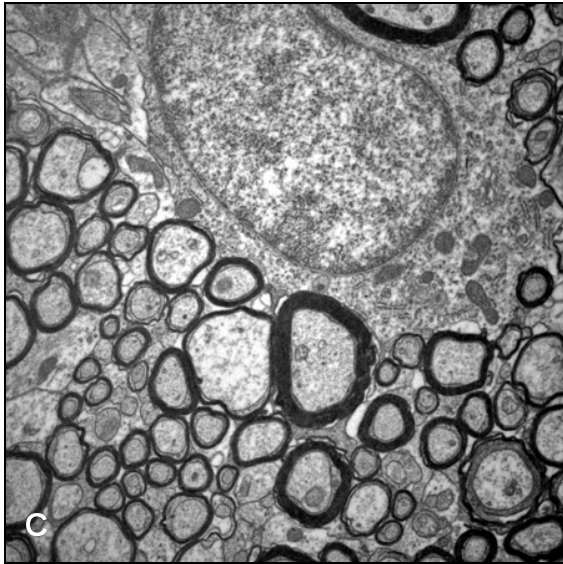
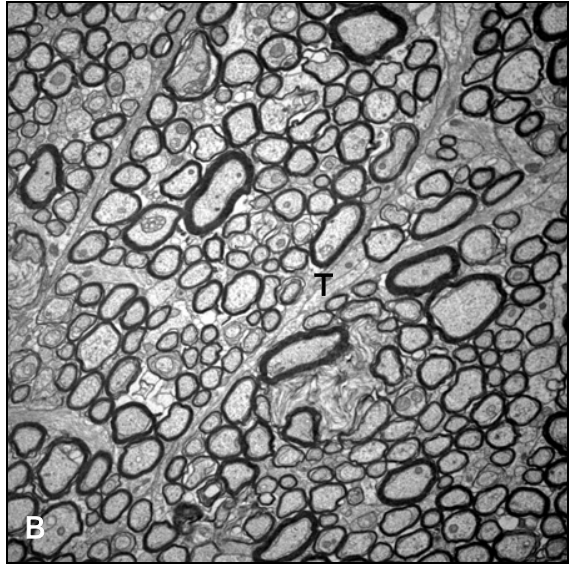
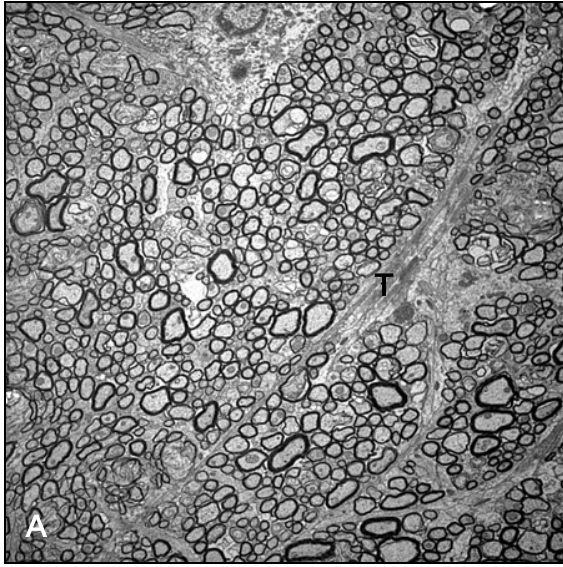


Figura 13 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo controle aos 32 dias de idade.

As fibras nervosas estão densamente agrupadas, muito condensadas (A-F) e separadas parcialmente em feixes pelas trabéculas conjuntivas (**T**). As bainhas de mielina das fibras mielínicas são mais espessas e visíveis em grande quantidade (A-F). As fibras amielínicas (**seta**) podem também ser vistas principalmente nos grandes aumentos (E-F), mas estão em menor quantidade. Fibras mielínicas com discretas lesões (*). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-4.000X; B-8.000X; C,D-14.000X; E-20.000X; F-40.000X



Grupo Anêmico

18 dias

Nesta idade, a observação das secções transversais do nervo óptico mostrou um aspecto geral semelhante àquele visto nos animais controle, também com 18 dias. Entretanto, o espaço entre as fibras nervosas era maior e, com alguma frequência, eram encontrados vacúolos nessa região. Oligodendrócitos e micróglias eram vistos mais frequentemente, sugerindo um aumento dessas células gliais neste período. Fibras nervosas mielínicas e amielínicas eram facilmente identificadas. As primeiras mostraram que a bainha de mielina que envolvia o axônio era mais delgada que aquela observada nos animais controle de mesma idade. Uma quantidade apreciável dessas fibras mostrou um desarranjo estrutural de suas bainhas de mielina, com separação de suas lamelas, levando algumas delas a uma degeneração quase completa tanto da bainha de mielina quanto do axônio. As fibras amielínicas mostraram-se um pouco dilatadas, porém sem comprometer sua integridade.

Outro achado nestes animais foi uma importante diferença em relação aos seus controles pareados. Os animais com carência de ferro na dieta mostraram, com frequência, oligodendrócitos com rarefação e formação de vacúolos, ambas no citoplasma, bem como comprometimento de organelas e mesmo do envelope nuclear (figura 14).

22 dias

As alterações morfológicas neste período foram similares às aquelas encontradas nos animais com 18 dias de idade, porém mais frequentes e mais pronunciadas. O espaço entre as fibras nervosas era ainda maior e, portanto, estavam menos condensadas. Observou-se também que não estavam parcialmente separadas em feixes por trabéculas conjuntivas como descrito para os seus controles pareados.

As fibras amielínicas foram ainda bastante frequentes e os oligodendrócitos mostraram lesões mais intensas, inclusive com a dilatação das cisternas do complexo de Golgi. Quando comparados aos seus controles pareados notou-se um nítido atraso no desenvolvimento do nervo óptico destes animais (figura 15).

32 dias

As observações das secções transversais ultrafinas do nervo óptico destes animais mostraram que as fibras estavam mais densamente condensadas e, finalmente, foi possível visualizar o aparecimento de algumas trabéculas conjuntivas que começavam a separar parcialmente as fibras em feixes. Entretanto, observou-se a formação de diversos e amplos vacúolos no interstício do nervo.

Estes animais mostraram também fibras mielínicas com bainha de mielina mais delgada e fibras amielínicas em maior quantidade que aquelas descritas para seus controles pareados.

As lesões anteriormente descritas para os animais com 18 e 22 dias eram bem mais intensas nesta idade, principalmente no que tange às fibras mielínicas (figura 16).

Figura 14 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 18 dias de idade.

As fibras nervosas estão bastante afastadas umas das outras (A-B). Notar a presença de vacúolos (**v**) no interstício do nervo. As fibras mielínicas estão pouco mielinizadas, mostrando bainhas bem delgadas (A-D). É possível distinguir facilmente as fibras amielínicas (**cabeça de seta**), visíveis nos maiores aumentos (E-F). Entre as fibras nervosas podem-se ver diversos astrócitos (**As**) e Oligodendrócitos (**O**), estes com importantes lesões no seu citoplasma (**seta**). Notar ainda a existência de diversos axônios mielinizados com lesões de graus variados (**asterisco**). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-2.700X; B-4.000X; C-8.000X; D-10.000X; E-14.000X; F-20.000X

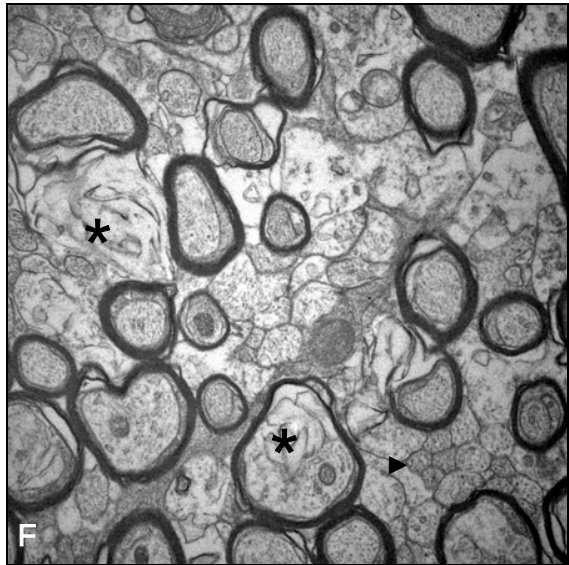
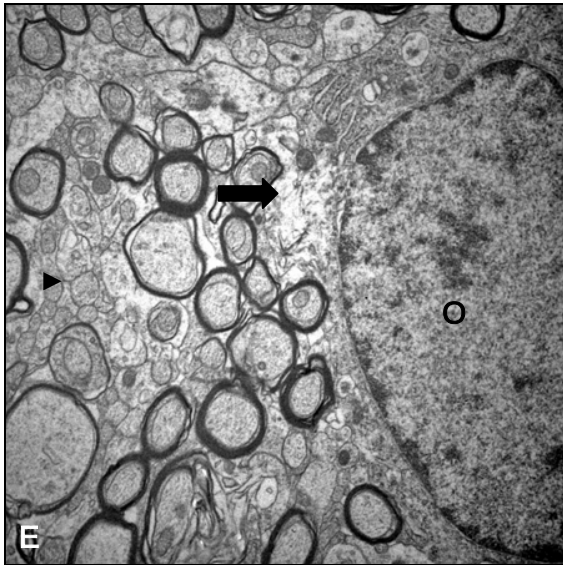
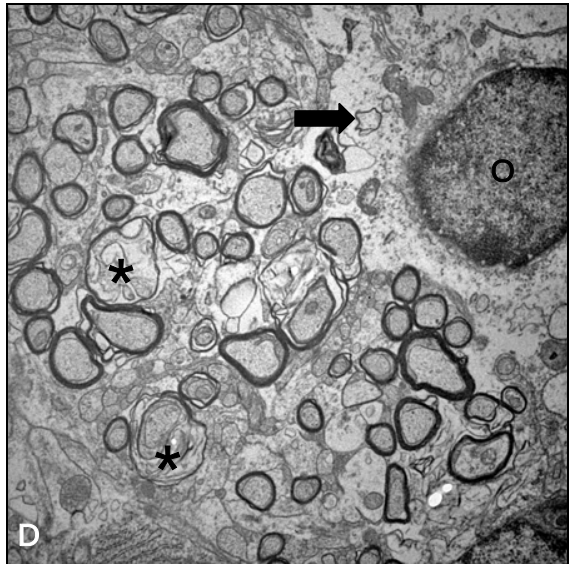
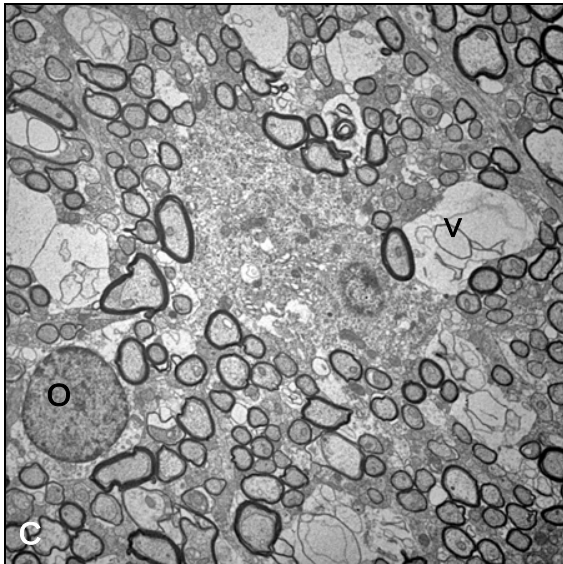
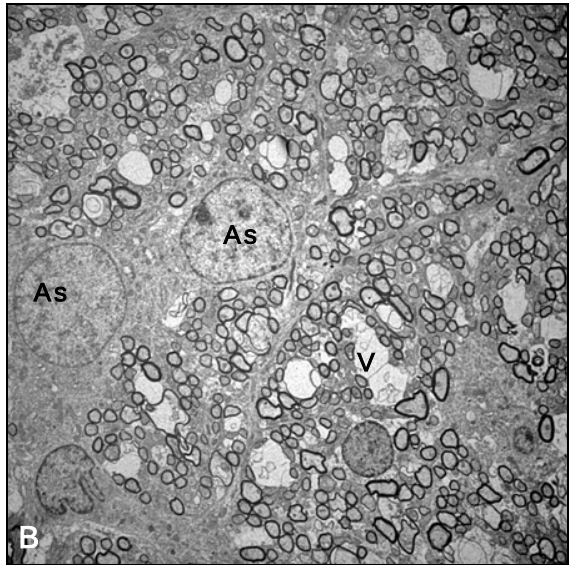
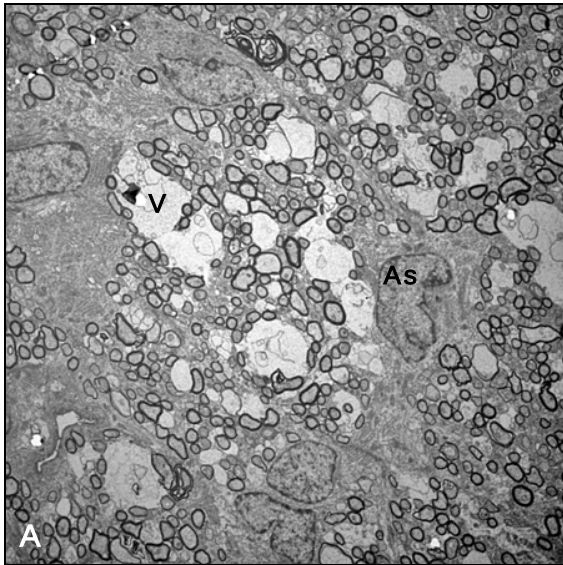


Figura 15 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 22 dias de idade.

As fibras nervosas estão bastante afastadas umas das outras (A-B). Notar a presença de vacúolos (**v**) devido à degeneração de fibras nervosas. As fibras mielínicas estão pouco mielinizadas, mostrando bainhas bem delgadas (A-C). É possível também distinguir as fibras amielínicas (**cabeça de seta**), visíveis mais facilmente nos maiores aumentos (E-F). Entre as fibras nervosas podem-se ver diversas células gliais: astrócitos (**As**), oligodendrócitos (**O**) e mesmo micróglia (**seta longa**). Notar ainda a existência de fibras mielinizadas com lesões tanto na bainha de mielina (**seta curta**), quanto no axônio, em graus variados (**asterisco**). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-2.700X; B-4.000X; C-8.000X; D-10.000X; E-14.000X; F-20.000X

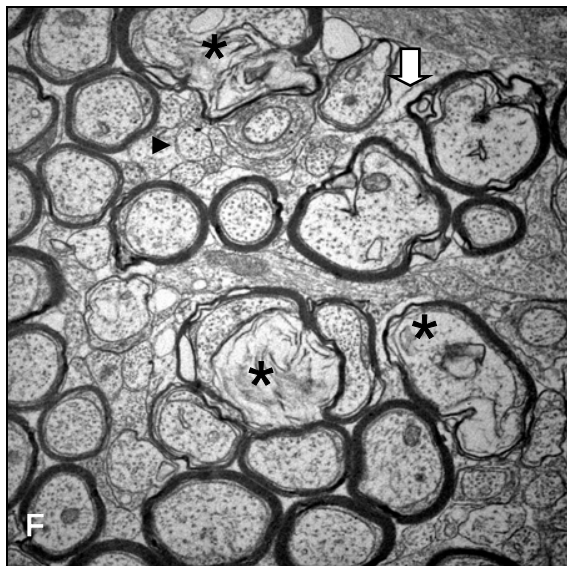
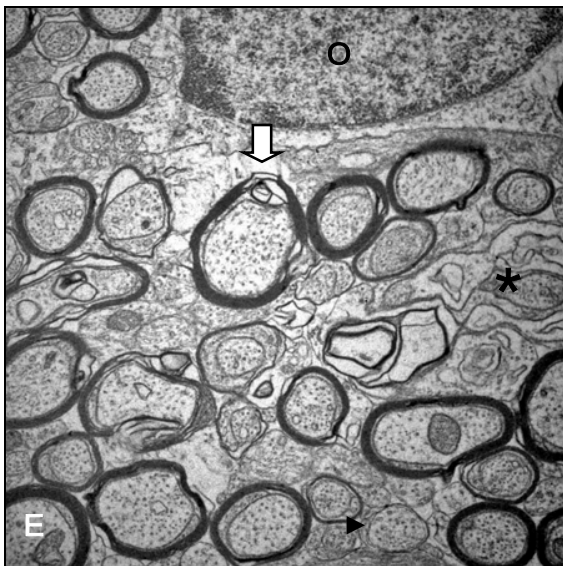
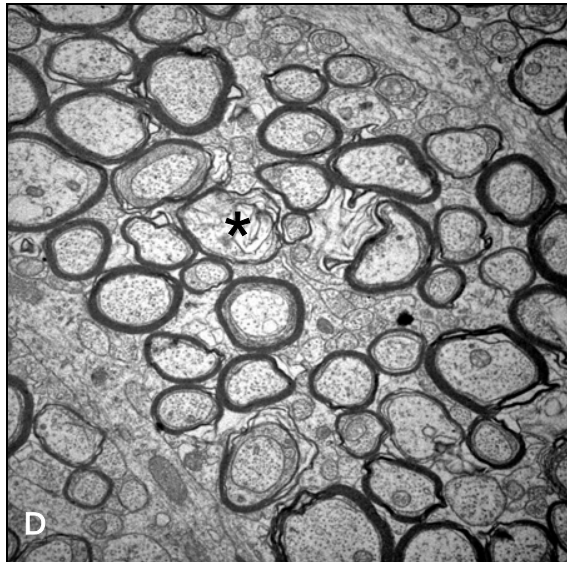
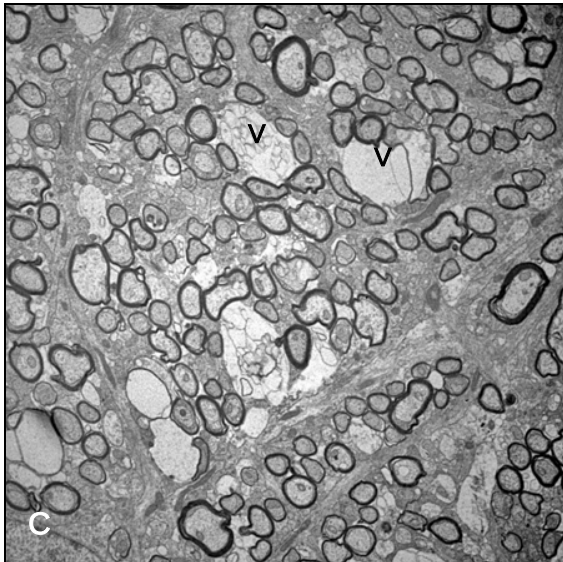
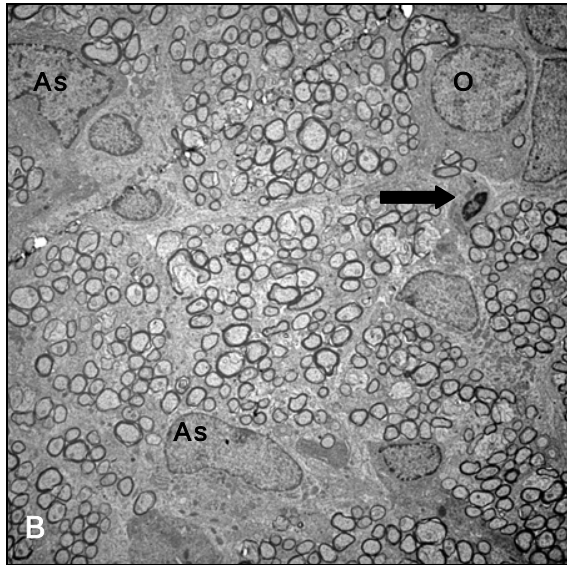
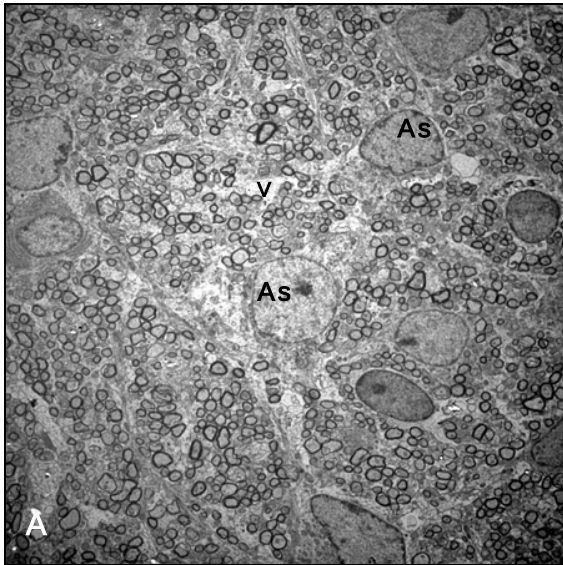
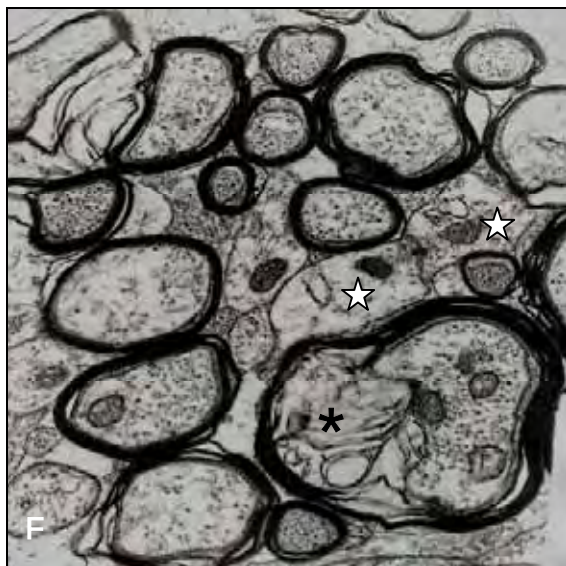
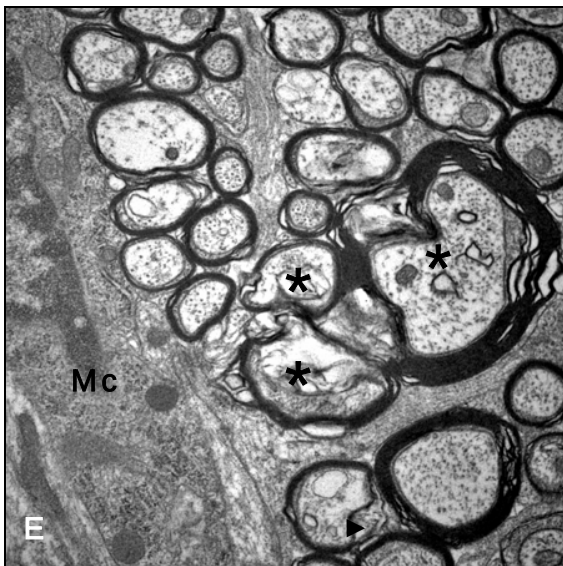
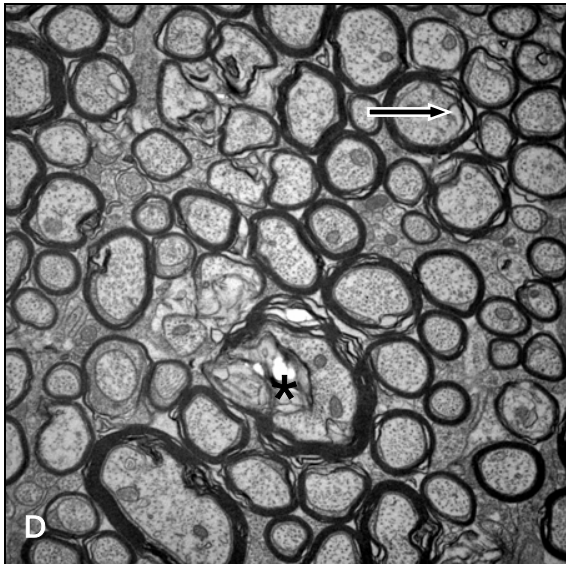
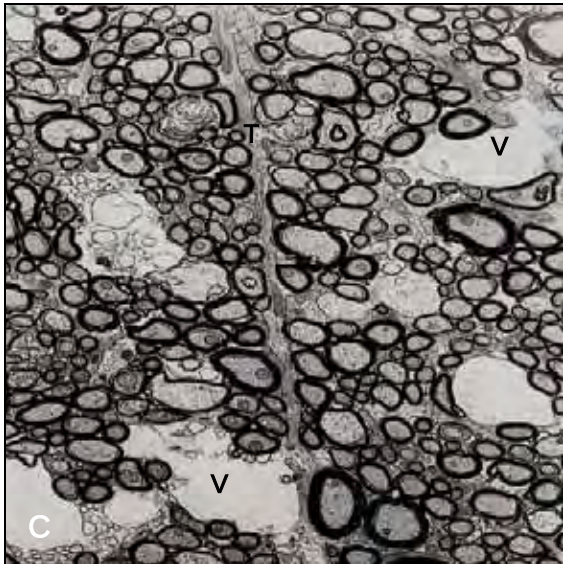
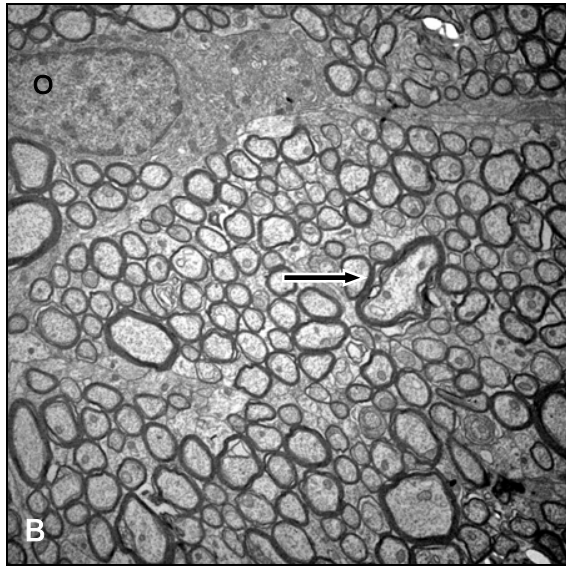
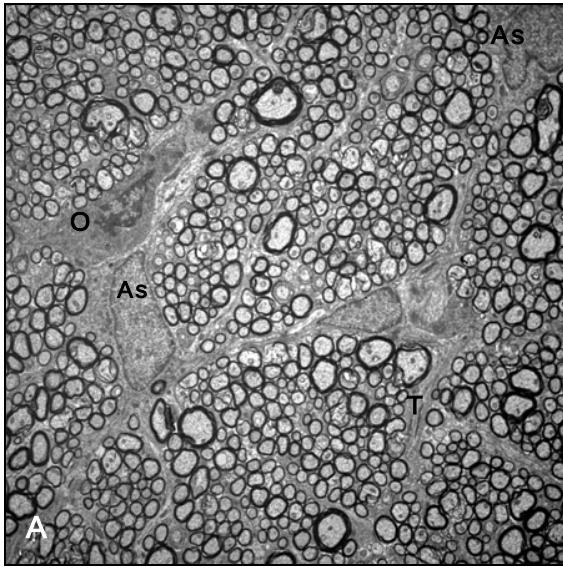


Figura 16 – Eletronmicrografias de secções transversais do nervo óptico de rato Wistar do grupo anêmico aos 32 dias de idade.

As fibras nervosas estão densamente agrupadas, bastante condensadas e separadas parcialmente em feixes pelas trabéculas conjuntivas (**T**). Notar ainda a presença de áreas do nervo com vacúolos (**v**) devido à degeneração de fibras nervosas. As fibras mielínicas estão bastante mielinizadas, mostrando, entretanto, bainhas não muito espessas e, muitas delas com lesões tanto na bainha (**seta longa**), quanto no axônio (**asterisco**). É possível também distinguir, nos maiores aumentos (E–F), fibras amielínicas íntegras e com lesão axonal (**estrela**). Entre as fibras nervosas podem-se ver astrócitos (**As**), oligodendrócitos (**O**) e micróglia (**Mc**). Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: A-4.000X; B-8.000X; C-10.000X; D-14.000X; E-20.000X; F-40.000X



Avaliação do desenvolvimento das fibras nervosas

Como a análise morfológica ultraestrutural dos animais controle e anêmicos, nos diversos tempos estudados, envolveu a apresentação de um grande número de eletronicografias para mostrar adequadamente todas as alterações estruturais do nervo óptico observadas nos animais submetidos a uma dieta deficiente em ferro e em seus controles pareados adequadamente alimentados, considerou-se interessante dispor neste capítulo de resultados, duas figuras adicionais, que darão ao leitor deste trabalho uma visão comparativa do desenvolvimento das fibras nervosas ao longo de todo o período pós-natal estudado, tanto dentro de cada grupo experimental, como entre eles.

A observação, das figuras 17 e 18, mostrou que as fibras mielínicas nos animais controle vão, dos 18 aos 32 dias de idade, tornando-se paulatinamente mais densamente agrupadas, com axônios maiores e com bainhas de mielina mais espessas e finalmente desenvolvendo as trabéculas conjuntivas (T), que farão a separação parcial das fibras do nervo. Nos animais anêmicos, além dos vacúolos (V) que são visíveis entre as fibras, nota-se, quando são comparados com seus controles pareados, que há um atraso no desenvolvimento e na mielinização das fibras nervosas, bem como grande quantidade de fibras mielínicas com graus variados de lesão tanto no axônio como em suas bainhas de mielina (figuras 17 e 18).

Figura 17 – Eletronmicrografias, em pequenos e médios aumentos, de secções transversais ultrafinas do nervo óptico de rato Wistar dos grupos controle (**C**) e anêmico (**A**) aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Observar que as fibras mielínicas nos animais controle vão paulatinamente se tornando mais densamente agrupadas, com axônios de maior diâmetro e com bainhas de mielina mais espessas e finalmente desenvolvendo as trabéculas (**T**) que farão a separação das fibras do nervo. Nos animais anêmicos, além dos vacúolos (**V**) que são visíveis entre as fibras, nota-se que há um atraso no desenvolvimento e na mielinização das fibras nervosas. **As**- astrócito, **O**-oligodendrócito.

Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: C18, A18, C22 e A22-2.700X; C32 e A32-4.000X

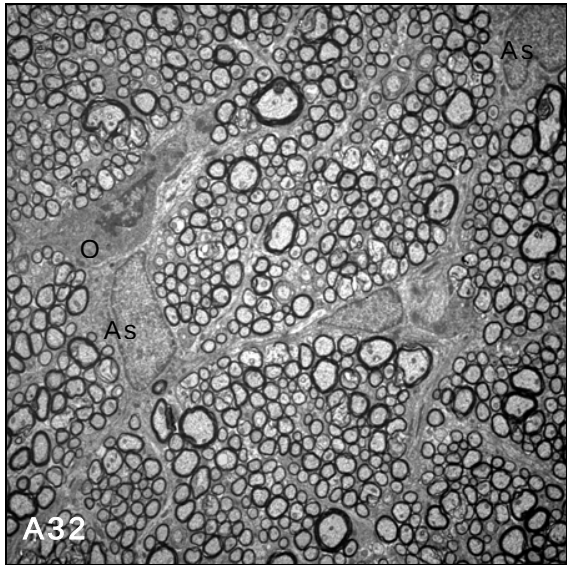
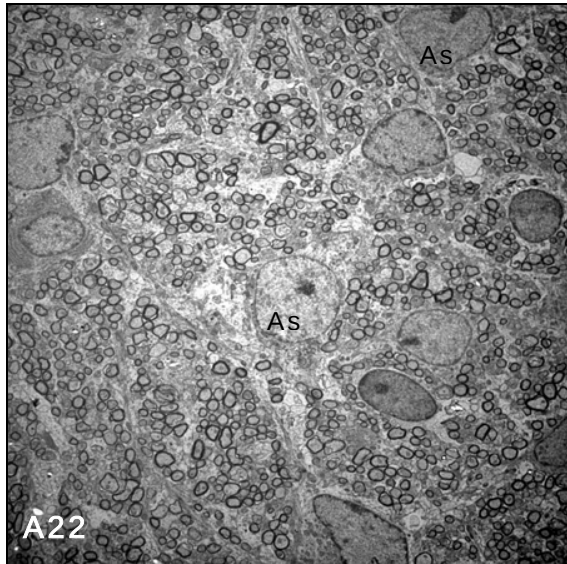
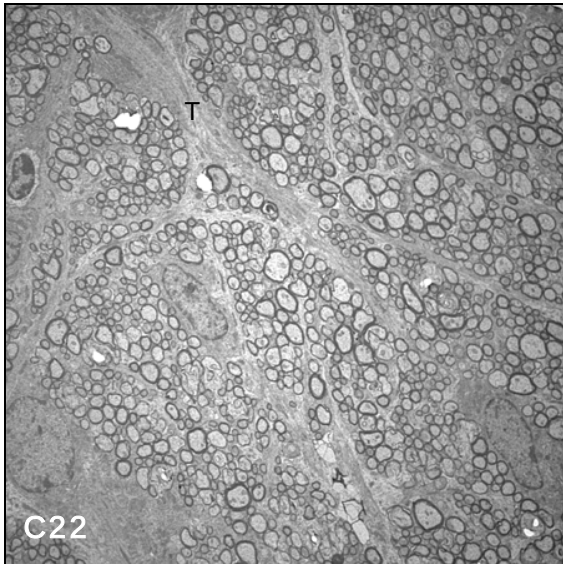
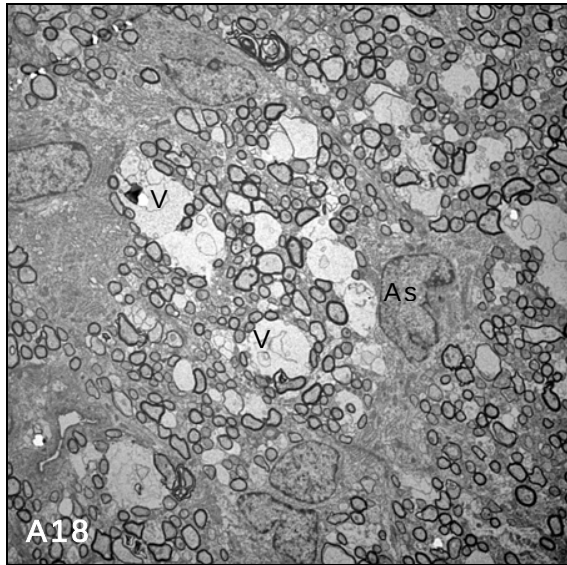
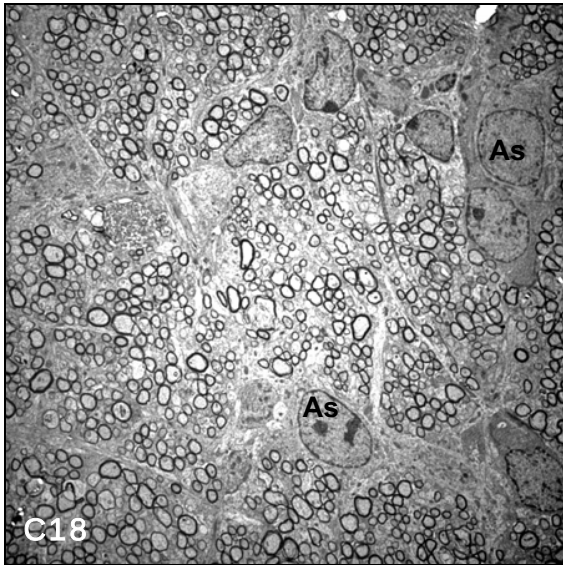
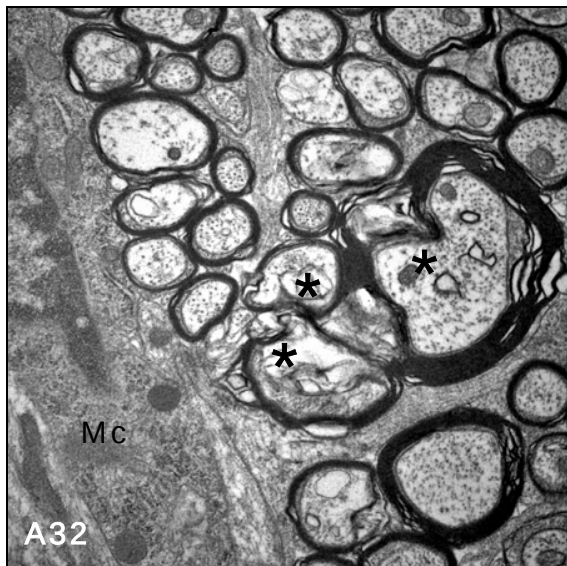
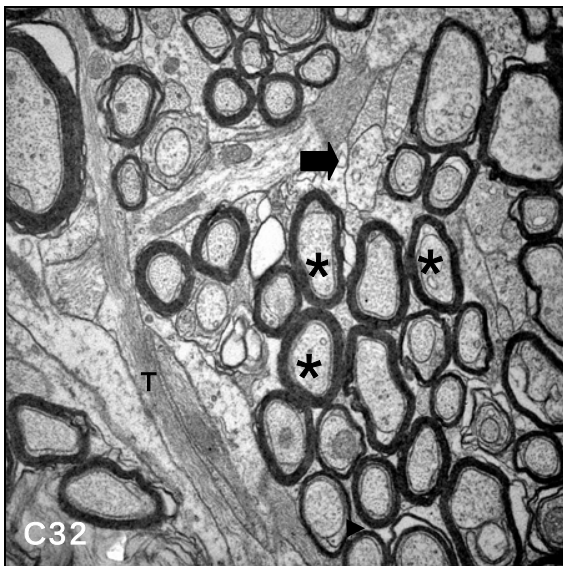
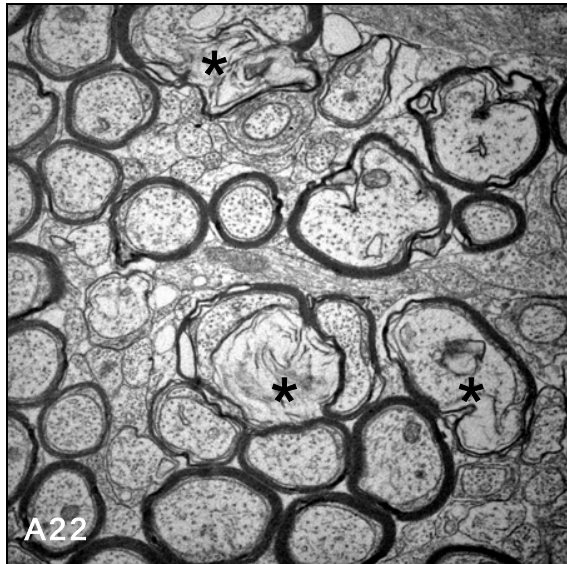
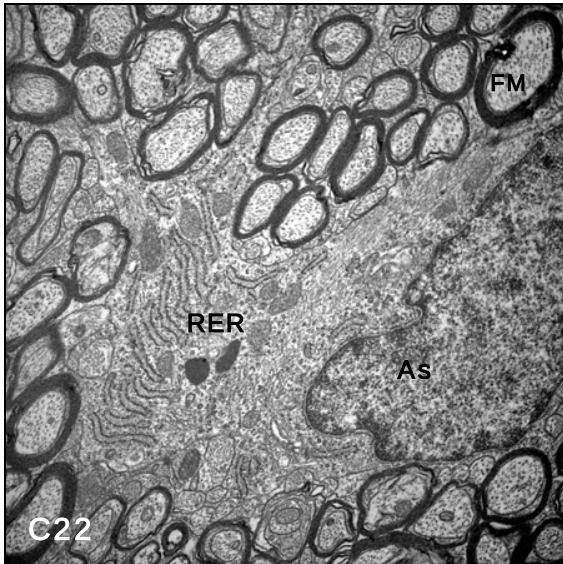
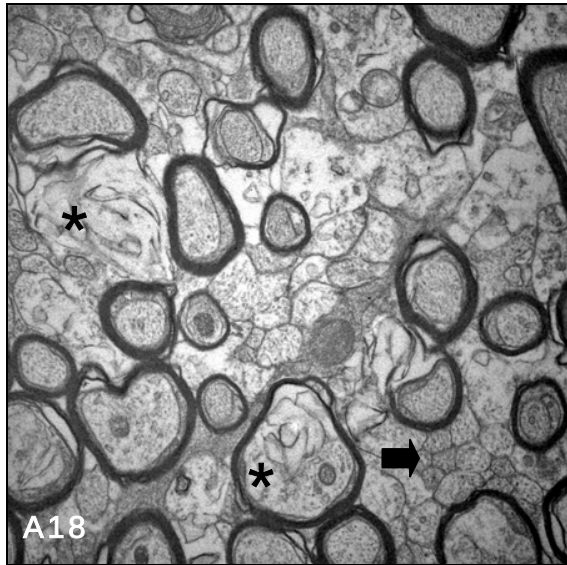
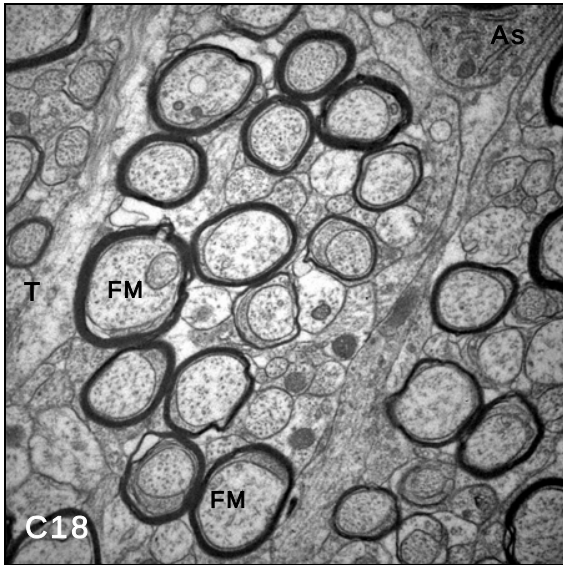


Figura 18 – Eletronmicrografias, com grande aumento, de secções transversais ultrafinas do nervo óptico de rato Wistar dos animais controle (**C**) e anêmico (**A**) aos 18, 22 e 32 dias de idade.

Observar que nos animais controle, repete-se o padrão já descrito na figura anterior. Entretanto, nos animais anêmicos pode-se ver grande quantidade de fibras mielínicas com graus variados de lesão tanto no axônio como em suas bainhas de mielina (asteriscos). **T**- trabécula conjuntiva, **As**- astrócito, **Seta**-fibras amielínicas, **FM**- fibra mielínica **RER**- retículo endoplasmático rugoso, **Mc**- núcleo de uma micróglia.

Contrastação: acetato de uranila e citrato de chumbo. Aumento ao microscópio: 20.000X



Discussão

O presente estudo foi desenhado com a finalidade de se obterem informações dos efeitos da anemia ferropriva sobre o nervo óptico de ratos albinos Wistar, no período neonatal. O modelo experimental utilizado, similar ao descrito por BEARD et al (2003), empregando uma dieta pobre em ferro para alimentar as ratas-mãe no período de lactação e os filhotes no período de pós-lactação, levou à deficiência de ferro nas ratas-mãe e à anemia pós-natal nos filhotes.

O primeiro resultado observado foi relacionado ao peso corpóreo dos filhotes do grupo anêmico, que mostraram um ganho de peso similar àqueles do grupo controle até o 14º dia, porém a partir do 18º dia, o ganho de peso dos filhotes controle foi proporcionalmente maior. Esta associação, entre o tempo de exposição a uma dieta pobre em ferro e um menor peso corpóreo em ratos anêmicos, já foi relatada por outros pesquisadores, como TANAKA et al (1995), BEARD et al (2003) e DEMAMAN et al (2008). Uma possível explicação para esse fato é que o leite secretado pela rata-mãe, alimentada com uma dieta deficiente em ferro, possui menor quantidade de gordura, calorias e ferro (O'CONNOR et al, 1988). Por outro lado, DE LOS MONTEROS et al (2000), utilizando um procedimento de alimentação artificial com leite preparado em laboratório, induziram uma deficiência específica de ferro durante o período de lactação, e não encontraram diferenças significantes entre os pesos corpóreos dos ratos controle e anêmicos. Entretanto, DE DEUNGRIA et al (2000), mostraram que a deficiência em ferro pode ser induzida desde a vida fetal ou a partir do período de lactação até o desmame.

Em ratos, a anemia ferropriva é considerada presente quando a concentração de hemoglobina atinge níveis inferiores a 6 g/dL e o percentual de hematócrito estiver abaixo de 24% (SCHALM et al, 1972; TANAKA et al, 1995; BEARD et al, 2003). No presente trabalho, os filhotes do grupo anêmico apresentaram concentração de hemoglobina entre 4,13 e 5,43 g/dL e percentual de hematócrito entre 13,83 e 17,87%.

Com relação aos valores hematológicos, a dieta utilizada determinou uma diminuição da concentração de hemoglobina e do percentual de hematócrito das ratas-mãe aos 18 e 21 dias de experimento. Este fator foi responsável pelo desencadeamento de anemia nos filhotes do grupo anêmico, aos 18 dias de idade (período de lactação). As avaliações do período de pós-lactação (aos 22 e 32 dias de idade) demonstraram que os valores de hemoglobina e hematócrito foram ainda menores nos animais do grupo anêmico, e que aumentaram progressivamente no grupo

controle. Desta forma foi possível comprovar que o modelo experimental empregado, no presente trabalho, alcançou os objetivos propostos, causando anemia nos períodos de lactação e pós-lactação. Os parâmetros hematológicos encontrados aos 32 dias, nos dois grupos estudados, são similares aos encontrados por TANAKA et al (1995) e BEARD et al (2006), que também investigaram os efeitos da anemia ocasionada por deficiência crônica de ferro no período neonatal.

De todos os oligoelementos, o ferro é o que apresenta a mais alta concentração no encéfalo (MCCANN & AMES, 2007). As consequências da deficiência de ferro encefálica, sobre o funcionamento neural e sobre o comportamento, não se limitam apenas à infância (BEARD, 2003). Os altos níveis de transferrina e de ferro no período pós-natal sugerem que este elemento é realmente importante para a mielinização e desenvolvimento do sistema nervoso. Na produção da mielina, o ferro e o seu tempo de liberação aos oligodendrócitos, durante o desenvolvimento do encéfalo, são aspectos importantes, como demonstrado por trabalhos que relatam que a redução da disponibilidade de ferro na dieta está diretamente associada à hipomielinização das fibras nervosas (TODORICH et al, 2009).

A presença da transferrina no sistema nervoso central é essencial para a mielinização e, sua disponibilidade é de fundamental importância para a maturação e função dos oligodendrócitos (DE LOS MONTEROS et al, 1999).

No rato a mielinização das fibras nervosas do nervo óptico se inicia sete dias após o nascimento e, entre 14 e 21 dias do período pós-natal ocorre um rápido e significativo aumento do processo de mielinização (DANGATA & KAUFMAN, 1997). Portanto, assim como as demais regiões do sistema nervoso, o nervo óptico do rato ainda está em desenvolvimento e em maturação durante as primeiras cinco semanas de vida pós-natal (DANGATA et al, 1996). O período que inclui o último trimestre de vida fetal humana até ao 16º mês pós-natal, corresponde aos primeiros trinta dias de vida pós-natal em ratos (DUBBING, 1992). Apesar do tempo de desenvolvimento no rato ser mais compactado que em humanos, em ambas as espécies há a mesma sequência de eventos como: migração celular, mielinização, diferenciação celular e expressão de neuropeptídeos (BEARD, 2001). Aos sete dias de idade poucos axônios do nervo óptico de ratos estão mielinizados, mas aos 30 dias de idade, mais de 90% dos axônios já estão mielinizados (SCOTT & FOOTE, 1984; LOZOFF et al, 2006). Estes dados apóiam

a metodologia usada neste estudo, na qual o grupo anêmico foi submetido a uma dieta deficiente em ferro desde o nascimento até aos 32 dias de idade.

A nutrição das ratas-mãe com uma dieta deficiente em ferro durante as fases de gestação e lactação reduz a quantidade de ferro necessária ao adequado desenvolvimento do sistema nervoso central dos filhotes (LOZOFF et al, 2006).

A mielina que envolve as fibras nervosas do sistema nervoso central é produzida pelos oligodendrócitos. Diversos estudos existentes na literatura relatam que tanto os oligodendrócitos como os astrócitos do nervo óptico de ratos são influenciados pela deficiência em ferro durante as fases de lactação e pós-lactação (DEMAMAN et al, 2008; TODORICH et al, 2009). Os mecanismos envolvidos na hipomielinização induzida pela deficiência em ferro não são claramente conhecidos, mas sabe-se que, no encéfalo, os oligodendrócitos compõem o grupo celular que contém maior acúmulo de ferro ao início da mielinogênese (TODORICH et al, 2009).

No presente estudo as características morfológicas do nervo óptico mostraram importantes alterações causadas pela anemia ferropriva. O grupo anêmico exibiu uma vacuolização intersticial difusa, que aumentou gradativamente até aos 32 dias de idade; provavelmente como consequência de uma degeneração de fibras mielínicas e amielínicas. Nesses animais, a bainha de mielina que envolvia o axônio era mais delgada que aquela observada nos animais controle de mesma idade. Uma quantidade apreciável dessas fibras mostrou um desarranjo estrutural de suas bainhas de mielina, com separação de suas lamelas e, com frequência, mostravam uma degeneração quase completa tanto da bainha de mielina quanto do axônio. As fibras amielínicas estavam um pouco dilatadas, aparentemente, sem comprometer muito sua integridade. Estes animais mostraram ainda, com frequência, oligodendrócitos com rarefação e formação de vacúolos, ambos no citoplasma, bem como comprometimento de suas organelas e até mesmo lesões do envelope nuclear.

Estes resultados são similares àqueles descritos para os nervos ópticos de ratos mantidos com dietas deficientes em proteína (WIGGINS et al, 1984; CONRADI et al, 1985), cobre (DAKE & AMEMIYA, 1991), manganês (GONG & AMEMIYA, 1999), zinco (GONG & AMEMIYA, 2001), magnésio (GONG & AMEMIYA, 2003) e até mesmo com o uso crônico de drogas de abuso como o álcool (PHILLIPS et al, 1991; PINAZO-DURAN et al, 1993; SHIGUEMATSU et al, 2003), cocaína e anfetaminas (SILVA-ARAUJO et

al,1991), mostrando que agressões de naturezas diferentes podem produzir lesões ultraestruturais bastante semelhantes, quando a mesma estrutura é estudada.

Com base na análise ultraestrutural do presente estudo, ficou demonstrado que as fibras mielínicas, nos animais controle, dos 18 aos 32 dias de idade, vão tornando-se paulatinamente mais densamente agrupadas, com axônios maiores e com bainhas de mielina mais espessas e finalmente desenvolvendo as trabéculas conjuntivas, responsáveis pela separação parcial das fibras do nervo. Nos animais anêmicos, além dos vacúolos visíveis entre as fibras, nota-se, quando são comparados com seus controles pareados, um atraso no desenvolvimento e na mielinização das fibras nervosas e no aparecimento das trabéculas conjuntivas.

Este atraso no desenvolvimento do nervo e consequentemente, no processo de mielinização de suas fibras nervosas durante todo o período experimental estudado, estão de acordo com aqueles relatados por LIMA (1992), que observou diminuição de oligodendrócitos e menor quantidade de fibras nervosas mielinizadas, afetando a mielinização no corpo caloso de ratos com desnutrição protéica no período pós-natal; por WIGGINS (1982) e WIGGINS et al (1985) que mostraram que a proporção de fibras mielinizadas não aumentou tão rapidamente em animais com esse tipo de desnutrição, como ocorrem nos animais controle e por WIGGINS & FULLER (1978), que observaram efeitos a longo prazo no sistema nervoso quando a desnutrição ocorria no período de 0 a 14 dias e, portanto, correspondente ao período de proliferação e maturação de oligodendrócitos. Apóiam ainda estes resultados encontrados na presente investigação os trabalhos de PHILLIPS et al (1991), PINAZO-DURAN et al (1993), ALMEIDA et al (2005), MELO et al (2006, 2008), que mostraram como intoxicações tanto por álcool quanto por metanfetaminas causaram anormalidades no processo de mielinização, bem como importantes atrasos no desenvolvimento do nervo óptico. Até mesmo em decorrência da deficiência em manganês, foi observada por GONG & AMEMIYA, (1999), uma redução do número de axônios mielínicos e na espessura da bainha de mielina no nervo óptico de ratos.

Um resultado adicional encontrado refere-se aos animais do grupo controle com 32 dias de idade, que apresentaram discretas lesões da bainha de mielina. Esses resultados são compatíveis com aqueles que ocorrem no processo de envelhecimento relatados por SANDELL & PETERS (2001) e PETERS (2002a), que estudaram os efeitos do envelhecimento no nervo óptico de macacos e ratos hígidos,

respectivamente. Esses resultados encontram ainda respaldo nos trabalhos realizados por STURROCK (1976, 1987) que mostrou que o processo de envelhecimento afeta as células gliais e as fibras nervosas mielínicas na comissura anterior do camundongo e por PETERS (2002b, 2009), que demonstrou alterações estruturais e morfológicas na bainha de mielina, nas fibras nervosas e nas células gliais do sistema nervoso central de primatas hípidos em diferentes períodos de desenvolvimento pós-natal.

O presente estudo mostra, portanto, que o ferro é de fundamental importância para o desenvolvimento normal e a manutenção da ultraestrutura do nervo ótico e que uma dieta deficiente em ferro resulta em uma diversidade de danos em seus componentes estruturais.

Esses resultados fornecem ainda evidências de que uma dieta deficiente em ferro, durante o período de desenvolvimento pós-natal precoce, gera lesões no nervo óptico, que certamente influenciam o funcionamento normal do sistema visual e reforçam a necessidade e a importância de uma alimentação adequadamente rica em ferro durante as fases iniciais do desenvolvimento do indivíduo.

Conclusões

A análise deste trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. O modelo experimental utilizado mostrou-se eficiente, promovendo a anemia ferropriva nos filhotes de rato albino Wistar.
2. Os filhotes anêmicos apresentaram peso corporal significativamente menor a partir dos 18 dias de idade.
3. A análise morfológica ultraestrutural mostrou que o nervo óptico do rato albino Wistar é constituído de células gliais, predominantemente oligodendrócitos e astrócitos, vasos sanguíneos, fibras nervosas mielínicas e amielínicas.
4. A anemia ferropriva causou alterações estruturais no nervo óptico em todas as idades estudadas, tais como lesões no citoplasma e organelas das células gliais, desorganização estrutural das fibras mielínicas com desintegração de suas bainhas de mielina e axônios, dilatação de fibras nervosas amielínicas e formação de vacúolos intersticiais.
5. Os animais anêmicos mostraram um nítido atraso na mielinização do nervo óptico durante todo o período experimental analisado.
6. Os animais controle com 32 dias de idade apresentaram discretas lesões em certo número de fibras nervosas mielínicas, compatíveis com o processo de envelhecimento descrito na literatura para esse tipo de estrutura, em mamíferos.
7. Uma dieta deficiente em ferro durante o desenvolvimento pós-natal precoce gera lesões no nervo óptico, provavelmente implicando no mau funcionamento do sistema visual, o que reforça a importância de uma alimentação com níveis adequados de ferro nas fases iniciais do desenvolvimento.

Referências*

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 6023.

ALGARÍN, C.; PEIRANO, P.; GARRIDO, M.; PIZARRO, F.; LOZOFF, B. Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. **Pediatr Res** v. 53, p. 217-23, 2003.

ALMEIDA, M.F.; SILVEIRA, A.C.; GUEDES, R.C.; HOKOÇ, J.N.; MARTINEZ, A.M. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. **Nutr Neurosci** v. 8, p. 91-99, 2005.

BEARD, J.L. Iron biology in immune function, muscle metabolism, and neuronal functioning. **J Nutr** v. 131, p. 568S-579S, 2001.

BEARD, J.L. Iron deficiency alters brain development and functioning. **J Nutr** v. 133, Suppl 1, p. 1468S-1472S, 2003.

BEARD, J.L.; CONNOR, J. R. Iron status and neural functioning. **Annu Rev Nutr** v. 23, p. 41-58, 2003.

BEARD, J.L.; FELT, B.; SCHALLERT, T.; BURHANS, M.; CONNOR, J.R.; GEORGIEFF, M.K. Moderate iron deficiency in infancy: biology and behaviour in young rats. **Behav Brain Res** v. 170, p.24-232, 2006.

CAVALLOTTI, C.; CAVALLOTTI, D.; PESCOSOLIDO, N.; PACELLA, E. Age-related changes in rat optic nerve: morphological studies. **Anat Histol Embryol** v. 32, p. 12-16, 2003.

CONNOR, J.R.; MENZIES, S.L.; BURDO J.R.; BOYER, P.J. Iron and iron management proteins in neurobiology. **Pediatr Neurol** v. 25, p. 118-129, 2001.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. Iron absorption and transport. **Am J Med Sci** v. 318, p. 213-219, 1999.

CONRADI, G.N.; SJOSTROM, A.; KARLSSON, B.; SOURANDER, P. Functional development of the visual system in normal and protein deprived rats II. Morphometric and biochemical studies on adult optic nerve. **Acta Physiol Scand** v. 125, p. 277-283, 1985.

CUNIFF, P. Official methods of analysis of AOAC International. **In: Association of Official Analytical Chemists International**, 16th ed., Washington, DC, p. 58-63, 1995.

DANGATA, Y.Y.; FINDLATER, G.S.; KAUFMAN, M.H. Postnatal development of the optic nerve in (C57BL x CBA)F1 hybrid mice: general changes in morphometric parameters. **J Anat** v. 189, p. 117-125, 1996.

DANGATA, Y.Y.; KAUFMAN, M.H. Myelinogenesis in the optic nerve of (C57BL x CBA) F1 hybrid mice: a morphometric analysis. **Eur J Morphol** v. 35, p. 3-17, 1997.

DAKE, Y.; AMEMIYA, T. Electron microscopic study of the optic nerve in copper deficient rats. **Exp Eye Res** v. 52, p. 277-81, 1991.

DE DEUNGRIA, M.; RAO, R.; WOBKEN, J.D.; LUCIANA, M.; NELSON, C.A.; GEORGIEFF, M.K. Perinatal iron deficiency decreases cytochrome c oxidase (CytOx) activity in selected regions of neonatal rat brain. **Pediatr Res** v. 48, p. 169-176, 2000.

DE LOS MONTEROS, A.E.; KUMAR, A.; ZHAO, P.; HUANG, C.J.; NAZARIAN, R.; PAN, T.; SCULLY, S.; CHANG, R.; DE VELLIS, J. Transferrin is an essential factor for myelination. **Neurochem Res** v. 24, p. 235-248, 1999.

DE LOS MONTEROS, A.E.; KORSACK, R.A.; TRAN, T.; VU, D.; DE VELLIS, J.; EDMOND, J.. Dietary iron and the integrity of the developing rat brain: a study with the artificially-reared rat pup. **Cell Mol Biol** v. 46, p. 501-515, 2000.

DEMAMAN, A. S.; HOMEM JM, LACHAT JJ. Early iron deficiency produces persistent damage to visual tracts in Wistar rats. **Nutr Neurosci** v. 11: p. 283-289, 2008.

DEWEY, K.G.; DOMELLOF, M.; COHEN, R.J.; RIVERA, L.L.; HERNELL, O.; LÖNNERDAL, B. Iron supplementation affects growth and morbidity of breast-fed infants: results of a randomised trial in Sweden and Honduras. **J Nutr** v. 132, p. 3249-3255, 2002.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing bra. The relevance of animal models to the human problem. **Biblio Nutr Diet** v. 17, p. 15-36, 1992.

FRIEL, J.K.; AZIZ, K.; ANDREWS, W.L.; HARDING, S.V.; COURAGE, M.L.; ADAMS, R.J. A doubled-masked, randomized control trial of iron supplementation in early infancy in healthy term breast-fed infants. **J Pediatr** v. 143, p. 582-586, 2003.

GONG, H.; AMEMYA, T. Optic nerve changes in manganese-deficient rats. **Exp Eye Res** v. 68, p. 313-20, 1999.

GONG, H.; AMEMYA, T. Optic nerve changes in zinc-deficient rats. **Exp Eye Res** v. 72, p. 363-369, 2001.

GONG, H.; TAKAMI, Y.; AMEMYA, T. Ultrastructure of the optic nerve in magnesium-deficiente rats. **Ophthalmic Res** v. 35, p. 84-92, 2003.

HANDELMAN, G.J.; LEVIN, N.W. Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. **Heart Fail Rev** v. 13, p. 393-404, 2008.

HOMEM, J.M. **Efeitos da anemia ferropriva e da estimulação tátil sobre a morfologia do nervo óptico em ratos**. Ribeirão Preto, 2004. 66p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

KIERNAN, J.A. Axonal and vascular changes following injury to the rat's optic nerve. **J Anat** v. 141, p. 139-154, 1985.

LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Mol Aspects Med** v. 22, p. 1-87, 2001.

LIMA JG. Estudo morfológico e morfométrico do corpo caloso de ratos submetidos a diferentes tipos de dieta e à estimulação sensorial e ambiental. Ribeirão Preto, 1992. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

LOZOFF, B.; De ANDRACA, I.; CASTILLO, M.; SMITH, J.B.; WALTER, T.; PINO, P. Behavioral and developmental effects of preventing iron-deficiency anemia in healthy full-term infants. **Pediatrics** v. 112, p. 846-854, 2003.

LOZOFF, B.; GEORGIEFF, M. K. Iron deficiency and brain development. **Semin Pediatr Neurol** v. 13, p. 158-65, 2006.

LOZOFF, B.; JIMENEZ, E.; HAGEN, J.; MOLLEN, E.; WOLF, A.W. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. **Pediatrics** v. 105, p. 1-11, 2001.

MCCANN, J.C.; AMES, B.N. An overview of evidence for a causal relation between iron deficiency during development and deficits in cognitive or behavioral function. **Am J Clin Nutr** v. 85, p. 931-945, 2007.

MELO, P.; MORENO, V.Z.; VASQUEZ, S.P.; PINAZO-DURAN, M.D.; TAVARES, M.A. Myelination changes in the rat optic nerve after prenatal exposure to methamphetamine. **Brain Res** v. 1106, 21-29, 2006.

MELO, P.; PINAZO-DURAM, M.D.; SALGADO-BORGES. J.; TAVARES, M.A. Correlation of axon size and myelin occupancy in rats prenatally exposed to methamphetamine. **Brain Res** v. 1222, p. 61-68, 2008.

O'CONNOR, D.L.; PICCIANO, M.F.; SHERMAN, A.R. Impact of maternal iron deficiency on quality and quantity of milk ingested by neonatal rats. **Br J Nutr** v. 60, p. 477-485, 1988.

OLIVARES, M.; WALTER, L. Causas y consecuencias de la deficiencia del hierro. **Nutrition** v. 20, p. 205-212, 2004.

OLIVEIRA, R.S.; DINIZ, A.S.; BENIGNA, M.J.C.; MIRANDA-SILVA, S.M.; LOLA, M.M.; GONÇALVES, M.C.; ASCIUTTI-MOURA, L.; RIVERA, M.A.; SANTOS, L.M.P. Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. **Rev Saúde Pública** v. 36, p. 26-32, 2002.

ORTIZ, E.; PASQUINI, J.M.; THOMPSON, K.; FELT, B.; BUTKUS, G.; BEARD, J.; CONNOR, J.R.; Effect of manipulation of iron storage, transport, or availability on myelin composition and brain iron content in three different animal models. **J Neurosci Res** v. 77, p. 681-689, 2004.

PETERS, A. Structural changes in the normally aging cerebral cortex of primates. **Prog Brain Res** v. 136: 455-465, 2002a.

PETERS, A. The effects of normal aging on myelin and nerve fibers: a review. **J Neurocytol** v. 31: 581-593, 2002b.

PETERS, A. The effects of normal aging on myelinated nerve fibers in monkey central nervous system. **Frontiers Neuroanatomy** v. 3: 2-10, 2009.

PHILLIPS, D.E.; KRUEGER, S.K.; RYDQUIST, J.E. 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. **Int J Develop Neurosci** v. 9, p. 631-647, 1991.

PINAZO-DURAN, M. D.; RENAU-PIQUERAS, J.; GUERRI, C. Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. **Teratology** v. 48, p. 305-22, 1993.

RAJAN, K.S.; COLBURN, R. W.; DAVIES, J.M. Distribution of metal ions in the subcellular sections of several rat brains areas. **Life Science** v. 18, p. 423-432, 1976.

RIBEIRO, G.; DE MAMAN, A.S.; HOMEM, J.M.; LACHAT, JJ. Structural and morphometric aspects on the optic nerve of the Wistar rats with iron deficiency. **Braz J Morphol Sci** suppl, p.143, 2005.

SANDEL, J.H.; PETERS, A. Effects of age on nerve fibers in the rhesus monkey optic nerve. **J Comp Neurol** v. 429, p. 541-553, 2001.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. Veterinary hematology, 3rd edition. Lea & Febiger, Philadelphia, 1972, pp. 219-283.

SCOTT, T.M.; FOOTE, J. The postnatal development of blood vessels in the optic nerve of normotensive and hypertensive rats. **J Anat** v. 138, p. 635-642, 1984.

SHIGUEMATSU, A.I.; SCHELLINI, S.A.; GREGÓRIO, E.A.; PELLIZZON, C.H.; MULLER, S.S.; PADOVANI, C.R. Análise morfométrica e ultra-estrutural do nervo óptico de ratos induzidos a ingestão de álcool. **Arq Bras Oftalmol** v. 66, p. 321-324, 2003.

SILVA-ARAUJO, A.; SALGADO-BORGES, J.; TAVARES, M.A. Morphological changes in the optic nerve after chronic exposure of neonatal rats to cocaine and amphetamine. **Ophthalmic Res** v. 23, p. 295-302, 1991.

SKOFF, R.P.; TOLAND, D.; NAST, E. Pattern of myelination and distribution of neuroglial cells along the developing optic system of the rat and rabbit. **J Comp Neurol** v.191, p. 237-253, 1980.

STOLTZFUS R. Defining iron-deficiency anemia in public health terms: a time for reflection. **J Nutr** v. 131, p. 565S-567S, 2001.

STURROCK, R.R. Changes in neuroglia and myelination in the white matter of aging mice. **J Gerontol** v. 31: p. 513-522, 1976.

STURROCK, R.R. Age-related changes in the number of myelinated axons and glial cells in the anterior and posterior limbs of the mouse anterior commissure. **J Anat** v. 150: p. 111-127, 1987.

TANAKA, M.; KARYIA, F.; KAIHATSU, K.; NAKAMURA, K.; ASAKURA, T.; KURODA, Y.; OHIRA, Y. Effects of chronic iron deficiency anemia on brain metabolism. **Jpn J Physiol** v. 45, p. 257-63, 1995.

TODORICH, B.; PASQUINI, J.M.; GARCIA, C.I.; PAEZ, P.M.; CONNOR, J.R. Oligodendrocytes and myelination: the role of iron. **Glia** v. 57, p. 467-478, 2009.

VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R. A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy. **J Cell Biol** v. 25, p. 407-8, 1965.

VITERI, F.E. The consequences of iron deficiency and anaemia in pregnancy on maternal health, the foetus and the infant. **SCN News** v. 11, p. 14-18, 1994.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J Biophys Biochem Cytol** v. 4, p. 475-477, 1958.

WIGGINS, R.C. Myelin development and nutritional insufficiency. **Brain Res Rev** v. 4: p. 51-175, 1982.

WIGGINS, R.C.; BISSEL, A.C.; DURHAM, L.; SAMORAJSKI, R. The corpus callosum during postnatal undernourishment and recovery: A morphometric analysis of myelin and axon relationships. **Brain Res** v. 328: p. 51-57, 1985.

WIGGINS, R.C.; FULLER, G.N. Early postnatal starvation causes lasting brain hypomyelination. **J Neurochem** v. 30: p. 1231-1237, 1978.

WIGGINS, R.C.; FULLER, G.N.; BRIZZEE, L.; BISSEL, A.C.; SAMORAJSKI, T. Myelination of the rat optic nerve during postnatal undernourishment and recovery: a morphometric analysis. **Brain Res** v. 308, p. 263-272, 1984.

YAGER, J.Y.; HARTFIELD, D.S. Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. **Pediatr Neurol** v. 27, p. 85-92, 2002.

YIP, R. Prevention and control of iron deficiency: policy and strategy issues. **J Nutr** v. 132, p. 802S-805S, 2002.

YU, G.S.; STEINKIRCHNER, T.M.; RAO, G.A.; LARKIN, E.C. Effect of prenatal iron deficiency on myelination in rat pups. **Am J Pathol** v.125, p. 620–624,1986.