



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

***AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICA DO SISTEMA
VISUAL EM CAMUNDONGOS COM ANEMIA A PARTIR DE UM MODELO DE
COLITE AGUDA.***

LUANA APARECIDA SILVA GOMES

Belém

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

***AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICA DO SISTEMA
VISUAL EM CAMUNDONGOS COM ANEMIA A PARTIR DE UM MODELO DE
COLITE AGUDA.***

LUANA APARECIDA SILVA GOMES

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências e comportamento, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha e Coorientação do Prof. Dr. Paulo Roney Killp Goulart.

Janeiro

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central – UFPA

Gomes, Luana Aparecida Silva, 1984 -

Avaliação comportamental e eletrofisiológica do sistema visual em camundongos com anemia a partir de um modelo de colite aguda. Luana Aparecida Silva Gomes – 2017. 84p

Orientador: Fernando Allan de Farias Rocha.

Co-Orientador: Paulo Roney Killp Goulart

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, Belém, 2017.

1. Anemia. 2. Diagnóstico de laboratório. 3. Camundongo – Comportamento. 4. Retina – doenças. 5. Eletroretinografia. I. Título

CDD - 23. ed. 615.152

DADOS DA DEFESA E BANCA

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROFISIOLÓGICA DO SISTEMA VISUAL EM CAMUNDONGOS COM ANEMIA A PARTIR DE UM MODELO DE COLITE AGUDA.

Candidata: Luana Aparecida Silva Gomes

Data da defesa: 31/01/2017

Resultado:

Banca examinadora:

Prof. Dr Fernando Allan de Farias Rocha
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará Orientador

Prof. Dr. Paulo Roney Killp Goulart
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará Coorientador:

Prof. Dr. Givago da Silva Souza (Titular)
Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Paulo Elias Gotardelo Audebert Delage (Titular)
Universidade do Estado do Pará

Prof. Dra. Mellina Monteiro Jacob (suplente)
Faculdade de Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

Ao meu príncipe Lucas Antônio Silva Gomes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da Vida;

Agradeço a minha mãe, por acreditar em mim e pelo incentivo a sempre buscar a ir mais longe;

A minha irmã Nazaré, pelos conselhos e pela mão estendida, que permitiu que eu estudasse e pudesse dar mais esse passo, cuidando do meu pequeno Lucas;

Ao Thyago e Luiz Costa Júnior, pelo apoio e a incansável companheirismo com minha irmã,

Ao meu príncipe Lucas Antônio, que embora não saiba, sempre será minha maior motivação para eu lutar sob as adversidades, superar obstáculos e ser resiliente nos momentos de dificuldades. Seu sorriso e sua alegria me dão forças para continuar essa caminhada ao seu lado;

Ao professor José Ribamar Souza, que me despertou para a docência e fez com que há alguns anos me motivasse a aperfeiçoar, sendo ele um exemplo de grande mestre;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Rocha, que com sua sabedoria e simplicidade sempre mostrou o que há de mais fascinante na eletrofisiologia visual;

Ao meu co-orientador prof. Dr. Paulo Goulart, pelos seus ensinamentos e paciência comigo ao tentar compreender a Análise do comportamento;

Aos professores Paulo Delage, Givago Souza e Mellina Jacob pelas importantes contribuições neste trabalho;

Aos colegas do LNEOC: Sibele Trindade, Edwiges Oliveira, Matheus Rosa, Hanna Katarine e Tamara Maués pela contribuição nas etapas desse trabalho, companheirismo, apoio e pela amizade que levarei para a minha vida;

Ao amigo Antônio Carlos Bastos, pelas conversas, parceria desde as primeiras aulas do mestrado e mão estendida nas horas difíceis;

Aos amigos Bruno Ribeiro, Patrícia Seixas e Rodrigo Canto, obrigada por essa trajetória ter sido mais leve ao lado de vocês, sempre os levarei comigo;

A CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro.

RESUMO

GOMES, L.A.S. Avaliação comportamental e eletrofisiológica do sistema visual em camundongos com anemia a partir de um modelo de colite aguda. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Neurociências e comportamento. Universidade Federal do Pará. 2017. 82 páginas

As doenças inflamatórias do intestino (DII) correspondem às principais causas da anemia e deficiência de ferro e tendem a afetar tecidos metabolicamente ativos e distantes das áreas de inflamação, como a retina. A partir deste contexto, é interessante investigar o comportamento responsivo do sistema visual através de testes psicofísicos e eletrofisiológico em animais com DII. O presente trabalho objetivou avaliar as alterações no comportamento e na fisiologia do sistema visual em camundongos com anemia induzida, a partir de um modelo de colite aguda. Para tanto, utilizou-se 18 camundongos, divididos em três grupos: controle; anemia (induzida por Dextran Sulfato de Sódio – DSS); e anemia mãe (animais filhos de mães com colite induzida. A indução com DSS foi realizada durante 6 dias antecessores ao teste, que ocorreram no período entre 60 e 90 dias de vida dos animais. Após a indução, as respostas eletrofisiológicas foram coletadas utilizando-se o eletrorretinograma de campo total como medida eletrofisiológica e foram medidas as respostas escotópicas (bastonetes, mista 1 e mista 2) e fotópicas (de cones 1Hz, cone S e Flicker em 12, 18, 24 e 30 Hz). Além disso, foram realizados testes comportamentais, com treino ao bebedouro e avaliação da percepção de contraste, por meio de estímulo de grades senoidais, disposto em diferentes frequências. A análise estatística foi feita com o teste ANOVA uma via, com pós-teste *Tukey*, considerando $p < 0,05$, como significativo. Foram encontrados redução das amplitudes das respostas em microvolts (μV) aos 60 dias nas seguintes respostas: onda-b de mista 1 (anemia: $28,12 \pm 7,96$; anemia-mãe: $42,180 \pm 8,525$), onda-a de cone 1 Hz (anemia $39,85 \pm 12,74$); cones S (anemia $36,64 \pm 9,09 \mu V$); Flicker de 18 Hz (anemia: $25,12 \pm 5,62$; anemia mãe: $38,37 \pm 7,1$); 24 Hz (anemia: $22,46 \pm 8,38$; anemia mãe: $29,41 \pm 9,676$) e 30 Hz (anemia: $14,4 \pm 3,25$; anemia mãe: $27,13 \pm 5,51$). Aos 90 dias, redução na onda b de bastonetes (anemia: $57,06 \pm 6,7$), mista 1 (anemia: $45,69 \pm 7,86$ e anemia mãe: $56,03 \pm 17,130$), onda a de respostas fotópica de cone 1 Hz (anemia $25,99 \pm 5,11$) e cones S (anemia $31,04 \pm 4,83$), Flicker 18 Hz (anemia $29,1 \pm 9,01$) e Flicker 30 Hz (anemia: $41,8 \pm 5,09$; anemia mãe: $32,72 \pm 11,4$). Houve elevação no tempo implícito em milissegundos (ms) em bastonetes (anemia $24,68 \pm 3,48$ ms) e resposta Flicker de 12 Hz (anemia: $21,69 \pm 4,65$; anemia mãe $22,14 \pm 4,42$) aos 60 dias. Cone S (anemia $13,35 \pm 1,18$) e Flicker de 24 Hz (anemia mãe $28,4 \pm 3,87$) aos 90 dias. Os testes comportamentais evidenciaram diminuição das respostas dos grupos anemia e atraso na aprendizagem de resposta de pressão a barra, em comparação ao controle. Portanto, a anemia prejudica a função visual tanto escotópica quanto fotópica, acometendo as células da retina de roedores com anemia e com anemia de origem materna, bem como acarreta na dificuldade de execução de tarefa de aprendizagem comportamental no treino realizado na caixa de condicionamento operante.

Palavras chaves: Anemia, Retina, Eletrorretinograma de campo total, Comportamento de camundongos.

ABSTRACT

GOMES, L.A.S. Behavioral and electrophysiological evaluation of the visual system in mice with anemia from an acute colitis model. Master's Dissertation presented to the Graduate Program in Neurosciences and Behavior. Federal University of Pará, 2017. 82 pages

Inflammatory bowel diseases (IBD) are the main causes of anemia and iron deficiency and tend to affect metabolically active tissues distant from the inflammation areas, such as the retina. From this context, it is interesting to investigate the responsive behavior of the visual system through psychophysical and electrophysiological tests in animals with IBD. The main objective of the present work was to evaluate the behavioral and physiological changes of the visual system in mice with induced anemia, from an acute colitis model. For this purpose, 18 mice were used, divided into three groups: control; Colitis (induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS), and colitis mother (animals born from mothers with induced colitis). Induction with DSS was performed 6 days before the tests, which occurred in the period between 60 and 90 days of life of the subjects. After induction, the electrophysiological responses were collected using the full field electroretinogram as an electrophysiological measure. Scotopic responses (rods, mixed 1 and mixed 2) and photopic responses (from cones 1 Hz, S cones and flicker at 12, 18, 24 and 30 Hz) were measured. In addition, behavioral tests were performed by training with drinking fountain and evaluation of the perception of contrast, through stimulation with sinusoidal grids, arranged in different frequencies. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA test, using Tukey post-test, considering ($P < 0.05$) as significant. It was found a reduction in the response amplitudes in microvolts (μV) at 60 days in the following responses: b-wave of mixed 1 (colitis: 28.12 ± 7.96 , mother colitis 42.180 ± 8.525), cone wave 1 Hz (colitis 39.85 ± 12.74); Cones S (colitis $36.64 \pm 9.09 \mu\text{V}$); 18 Hz Flicker (colitis: 25.12 ± 5.62 , mother colitis: 38.37 ± 7.1); 24 hr (colitis: 22.46 ± 8.38 , mother colitis: 29.41 ± 9.676) and 30 Hz (colitis: 14.4 ± 3.25 , mother colitis: 27.13 ± 5.51). At 90 days, reduction in the b wave of rods (colitis: 57.06 ± 6.7), mixed 1 (colitis: 45.69 ± 7.86 and mother colitis: 56.03 ± 17.130), wave 'a' of photopic responses (Colitis, 25.1 ± 5.11) and cones S (colitis 31.04 ± 4.83), Flicker 18 Hz (colitis 29.1 ± 9.01) and Flicker 30 Hz (colitis: $41, 8 \pm 5.09$, mother colitis: 32.72 ± 11.4). There was an increase in implicit time in milliseconds (ms) in rods (colitis 24.68 ± 3.48 ms) and Flicker response of 12 Hz (colitis: 21.69 ± 4.65 , mother colitis 22.14 ± 4.42) At 60 days. E cone S (colitis 13.35 ± 1.18) and Flicker 24Hz (mother colitis 28.4 ± 3.87) at 90 days. The behavioral tests showed a decrease in the responses of the colitis group and a delay in the learning on bar pressure response in comparison to the control group. Therefore, anemia impairs scotopic and photopic visual function, affecting rodent retinal cells with anemia and maternal anemia, as well entails in difficulties performing a behavioral learning task in the training performed at the operant conditioning box.

Key words: Anemia, Retina, Full field electroretinogram, Mice Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura laminar e composição celular da retina	19
Figura 2: Subtipo de morfológicas de células bipolares em ratos e camundongos	22
Figura 3: Representação esquemática do grupo anemia-mãe	31
Figura 4: Representação esquemática do grupo anemia	31
Figura 5: Eletrodos utilizados no eletrorretinograma.	33
Figura 6: Animal anestesiado com eletrodos posicionados para início do teste	34
Figura 7: Representação esquemática do posicionamento do animal para testes e equipamento	34
Figura 8: Padrões de respostas esperadas no eletrorretinograma.	35
Figura 9: Parâmetros do ERG mensurados no eletrorretinograma	37
Figura 10: Caixa de condicionamento operante adaptada para o experimento psicofísico	39
Figura 11: Detalhe da adaptação da barra da caixa de condicionamento operante	39
Figura 12: Amplitude da onda-b em resposta escotópica de bastonete aos 60 e 90 dias de teste.	46
Figura 13: Tempo implícito em respostas escotópicas de bastonete aos 60 e 90 dias de teste.	46
Figura 14: Amplitude da onda-b em resposta escotópica mista 1 aos 60 e 90 dias de teste	48
Figura 15: Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica mista 1 aos 60 e 90 dias de teste.	48
Figura 16: Amplitude da onda-b em resposta escotópica mista 2 aos 60 e 90 dias de teste.	50
Figura 17: Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica mista 2 aos 60 e 90 dias de teste.	50
Figura 18: Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cones aos 60 e 90 dias de teste.	52
Figura 19: Tempo implícito da resposta de cone aos 60 e 90 dias de teste	52
Figura 20: Amplitude da onda-a em resposta fotópica cone UV aos 60 e 90 dias de teste.	54
Figura 21: Tempo implícito da onda-a em resposta fotópica de cone UV 1 Hz aos 60 e 90 dias de teste.	54
Figura 22: Amplitudes da onda-b em resposta fotópica de Flicker de 12, 18, 24 e 30 Hz, aos 60 dias e 90 dias de teste.	56
Figura 23: Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de Flicker de 12, 18, 24 e 30 Hz aos 60 dias e 90 dias de teste.	58
Figura 24: Registro de resposta escotópica de bastonetes e Mista 1	60
Figura 25: Registro de resposta fotópica de cones 1 Hz.	61
Figura 26: Registro de resposta fotópica de cone UV	62
Figura 27: Registro de resposta de Flicker 18Hz	63
Figura 28: Registro de resposta de Flicker 24 e 30 Hz	64
Figura 29: Relação da massa corporal dos animais nos grupos comportamentais	66
Figura 30: Número de sessões necessárias para transição da fase de treino de resposta ao bebedouro para intermitente 2 e grupos experimentais.	67
Figura 31: Taxas de respostas de pressão a barra e grupos experimentais	68
Figura 32: Taxas de respostas ingestão de água pelos animais e grupos experimentais.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipo de respostas obtidas com o <i>ffERG</i>	37
Tabela 2: Média da massa corporal dos grupos do estudo	43
Tabela 3: Variação da massa corporal durante o período de indução pelo DSS 5%	43
Tabela 4: Valores de hemograma e hematócrito	44
Tabela 5: Médias e desvio padrão das amplitudes da onda B em resposta escotópica de bastonetes	45
Tabela 6: Médias e desvio padrão do tempo implícito da onda B em resposta escotópica de bastonetes	45
Tabela 7: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta escotópica mista 1	47
Tabela 8: Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda B em resposta escotópica mista 1	47
Tabela 9: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta escotópica mista 2	49
Tabela 10: Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda B em resposta escotópica mista 2	49
Tabela 11: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda A em resposta fotópica de cones	51
Tabela 12: Médias e desvio padrão de tempo implícito de onda A em resposta fotópica de cones	51
Tabela 13: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda A em resposta fotópica de cones UV	53
Tabela 14: Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda A em resposta fotópica de cones UV	53
Tabela 15: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta fotópica de flicker 12, 18, 24 e 30 Hz	55
Tabela 16: Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda B em resposta fotópica de Flicker 12, 18, 24 e 30 Hz	56
Tabela 17: Relação do grau significância e respostas do ERG <i>full-field</i>	59
Tabela 18: Médias e desvio padrão de taxas de pressão a barra, ingestão de água, peso e sessões experimentais.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA Análise de Variância

CCG Camada de células ganglionares

CFT Camada de fotorreceptores

CNE Camada nuclear externa

CNI Camada nuclear interna

CPE Camada plexiforme externa

CPI Camada plexiforme interna

CRF Reforço contínuo de cada resposta

DII Doenças inflamatórias do intestino

DP Desvio padrão

DSS sulfato de sódio dextrano

EPR Epitélio pigmentar retiniano

ERG Eletrorretinograma de campo total

EXT extinção

FI Intervalo Fixo

FSC Função de sensibilidade ao contraste

ISCEV Sociedade Internacional Eletrofisiologia Clínica da Visão

OMS Organização Mundial de Saúde

PNDS Pesquisa Nacional Demográfica de Saúde da criança e da mulher

RPB Resposta de pressão à barra

SVH Sistema visual humano

LISTA DE SIMBOLOS

cpg ciclos por grau ângulo visual

g Gramas

Hz Hertz

mg/dl Miligrama por decilitro

mg/Kg Miligrama por kilograma

mg Miligrama

milhões/mm³ Milhões por milímetro cubico

ms Milissegundo

μV Microvolt

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Neurofisiologia visual	17
1.2 Neurofisiologia visual e o ferro	23
1.3 Eletrorretinograma de campo total – ERG	25
1.4 Treino discriminativo por reforço diferencial	26
2. OBJETIVO	29
3. MÉTODO	30
3.1 Ambiente.....	30
3.2 Sujeitos.....	30
3.3 Indução e mensuração da colite aguda.....	30
3.4 Eletrorretinograma (ERG)	32
3.4.1 Procedimentos	32
3.4.2 Análise das respostas do eletrorretinograma.....	36
3.4.3 Protocolos.....	38
3.5.1 Grupos e preparo do animal.....	40
Procedimento geral.....	40
3.6 Análise de dados e estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Parâmetros clínicos para a caracterização do modelo experimental.....	43
4.1.1 Avaliação da massa corporal dos camundongos.....	44
4.1.2 Hemograma.....	44
4.2 Respostas do eletrorretinograma.....	45
4.2.1 Resposta escotópica de bastonete.....	45

4.2.2 Resposta escotópica (Mista 1).....	47
4.2.3 Resposta escotópica (Mista 2).....	49
4.3 Respostas Fotópicas.....	51
4.3.1 Resposta fotópica de cones.....	51
4.3.2 Resposta fotópica de cones UV.....	53
4.3.3 Resposta fotópica de Flicker 12, 18, 24 e 30 Hz.....	55
4.4 Resultados dos testes comportamentais.....	65
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERENCIAS.....	78
APENDICE.....	84

O ferro é um elemento essencial para o metabolismo humano e integra vários processos metabólicos (Song & Dunaief, 2012; Cançado & Langhi Junior, 2012). O ferro participa na formação de enzimas, compondo o ciclo do ácido cítrico e a cadeia de transporte de elétrons, tornando-se fundamental para a produção de trifosfato de adenosina (ATP) (Ugarte, Osborne, Brown, & Bishop, 2013). No sistema nervoso central (SNC), os oligodendrócitos requerem ferro para síntese e manutenção da mielina, que é responsável por funções cerebrais (Song & Dunaief, 2012). Trata-se de um cofator essencial para a síntese de neurotransmissores, a exemplo da dopamina, noradrenalina, serotonina e de várias reações enzimáticas, incluindo heme síntese. (Singh *et al.*, 2014).

Escott-Stump (2011) ressalta que o ferro é componente nutricional básico da proteína heme do sangue. Já a hemoglobina, contém ferro existente nos eritrócitos e atua no transporte de oxigênio para todas as células do corpo e a transferrina transporta o ferro (Fe^{3+}) proveniente dos intestinos. A absorção de ferro ocorre em sua forma ferrosa (Fe^{2+})¹, sendo este armazenado no fígado, baço e medula óssea.

A deficiência de ferro consiste numa das principais deficiências nutricionais encontradas no mundo (DeMamman, Homem, & Lachat, 2008) e sua ocorrência é gradual e progressiva (Paiva, Rondo, Latorre, Cardoso, & Gondim, 2007; De Camargo, Espinosa, Pereira, & Schirmer, 2013). Pode ser caracterizada como uma diminuição na concentração de ferro na corrente sanguínea, sendo considerada como principal fator de risco para o desenvolvimento de anemias nutricionais (World Health Organization and Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

As anemias constituem no conjunto de distúrbios hematológicos em que há a redução do número de eritrócitos, quantidade de hemoglobina ou volume globular (hematócrito). O

¹ Por ser um metal de transição, o ferro possui dois números de oxidação (Nox), +2 e +3. O ferro com Nox +2 é denominado ferro (II) ou ferroso; com o Nox +3, ferro (III) ou férrico. Quando o ferro ganha elétrons (sofrendo redução) se estabiliza no estado ferroso e quando perde (sofrendo oxidação), se encontra no estado férrico. Dependendo da substância que vai interagir com o ferro, um redutor ou um oxidante, o ferro pode assumir um Nox diferente através de reações redox distintas. (Guyton & Hall, 2011)

principal distúrbio associado é a hipóxia e diminuição de transporte de oxigênio. Escott-Stump (2011) refere que a principal forma de anemia encontrada é a ferropriva, desencadeada por uma ingestão inadequada de ferro, comprometendo a eritropoiese² e a absorção de ferro.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a anemia afeta cerca de um quarto da população mundial (World Health Organization, 2008). No Brasil, não há consenso sobre a prevalência de anemia no país como um todo, pois os estudos realizados por levantamento retêm uma amostra de uma determinada localidade ou serviço de saúde (Dani, Rossetto, Castro, & Wagner, 2008). Goodhand, *et al.*, (2012) afirma que a anemia prevalece em cerca de 70% dos casos em crianças e 40% em adultos. A anemia e a deficiência de ferro são provenientes das baixas concentrações de ferro, perda sanguínea e diminuição da absorção ou ingestão de ferro (Bager, 2015).

Em 2006, o Ministério da Saúde realizou a Pesquisa Nacional Demográfica de Saúde da criança e da mulher (PNDS), que apontou uma prevalência de anemia em crianças de 20,9% e de 29,4% em mulheres. (Brasil, 2009). No entanto, há divergência desses valores comparados com estudos locais. Silla *et al.*, (2013) estimam que os valores sejam maiores que os apontados pelo Ministério da Saúde, correspondendo a um índice de 53% de crianças afetadas com anemia com idade de 0 a 5 anos.

Neves, Silva e Morais (2005) realizaram um estudo transversal, no qual foram selecionados 365 lactentes, atendidos em um centro de saúde-escola, em Belém (PA), tendo sido detectada anemia ferropriva (parâmetros de hemoglobina < 11g/dl e ferritina < 12µg/l) em 55,1% dos lactentes. A falta de dados consistentes sobre um índice de prevalência real da anemia encontra-se exatamente na amostra, uma vez que são crianças selecionadas de um

²A eritropoiese é o processo que corresponde à formação dos eritrócitos. Este processo é dinâmico e envolve os processos de mitose, síntese de DNA e hemoglobina, incorporação do ferro, perda de núcleo, organelas e resulta na produção de glóbulo vermelho sem núcleo e com reservas energéticas. (Escott-Stump, 2011)

determinado serviço de saúde ou uma amostra da comunidade, não abrangendo um contingente expressivo.

A anemia pode resultar em prejuízos funcionais ao organismo, como retardo do desenvolvimento infantil, comprometimento da imunidade celular e diminuição da capacidade intelectual (Assunção, Santos, Barros, Gigante, & Victória, 2007; Santos, *et al.*, 2004). O período neonatal, pós-natal e adolescência são cruciais de modo que, quando há deficiência de ferro, pode ocorrer em cada fase uma alteração diferenciada. Nos períodos neonatal e pós-natal, a carência de ferro desencadeia alterações no desempenho do cérebro de maneira irreversível, com consequências neurocomportamentais significativas. Georgieff (2011) assinala que as alterações do período neonatal incluem modificações que acarretam em condução neural lenta, alta prevalência dos reflexos neuronais anormais e pobre capacidade de discriminação, dificuldades na memória, no temperamento e na interação mãe-bebê.

Na etapa pós-natal (seis primeiros meses de vida), estudos de Georgieff (2008, 2011) destacam o efeito precoce da deficiência de ferro, que funcionalmente pode acarretar em diminuição das habilidades sócio emocionais, motoras, diminuição da função eletrofisiológica do cérebro, e também sugerem que essas crianças possuem processamento neurocomportamental deficitário no período de *follow-up*, que consiste no acompanhamento do bebê nos 6 primeiros meses de vida.

Callahan, Thibert, Wobken e Georgieff, (2013) relatam que na deficiência de ferro durante a infância, é comum observar anormalidades motoras (espasmos, tremores) durante o sono. Já no domínio cognitivo, é observada uma pobreza nas habilidades matemáticas e na escrita, com alterações em longo prazo no hipocampo e nas funções corticais superiores. Congdon *et al.*, (2012) observou deficiência na memória imediata, atraso na memória tardia e de trabalho.

Em adolescentes, a deficiência de ferro pode ser reversível. As consequências a longo prazo ocorrem principalmente no metabolismo da dopamina, mielinização e estruturação do hipocampo (Lozzoff, *et al.*, 2006; Georgieff, 2011). Na faixa etária de 11 a 14 anos, foram descritos sintomas de ansiedade-depressão, sendo esses achados condizentes com alterações nos circuitos dopaminérgicos, estriatal-nigral, e no estriatal-frontal. Outras funções cognitivas mediadas pelo lobo frontal também se encontram alteradas, como problemas de atenção, déficit na habilidade de planejamento de ações e falta de controle inibitório.

Georgieff (2011) descreveu que, em ratos, os efeitos comportamentais a longo prazo incluem menos exploração e medo de novas situações, resultados que mapeiam comportamento semelhante em humanos. Existem áreas cerebrais que possuem metabolismo diferenciado, com a demanda maior de energia, como o hipocampo, córtex frontal e córtex cingulado. Esse alto metabolismo ocorre em períodos de grande diferenciação celular.

Nesse cenário, as principais causas da anemia e deficiência de ferro estão doenças inflamatórias do intestino (DII) (Guagnozzi & Lucendo, 2014).

As DII, principais causadoras da anemia e deficiência de ferro, tendem a afetar tecidos metabolicamente ativos e distantes das suas áreas de inflamação. Em estudos realizados por Felekis *et al.* (2009), 31% dos pacientes com DII apresentaram disfunção ocular posterior. Esses autores sugerem que as manifestações oculares posteriores, decorrentes de DII incluem casos de coroidite, neurite óptica, distúrbios do epitélio pigmentado da retina, e descolamento de retina, sendo a retinite conhecida por ser uma condição potencialmente perigosa, que não deve ser ignorada.

1.1 Neurofisiologia visual

A retina é considerada um dos tecidos mais metabolicamente ativos do corpo, pois os fotorreceptores consomem oxigênio em taxas mais elevadas que os neurônios no cérebro. A fonte para o metabolismo da retina vascular é proveniente da circulação coroidal posterior e

da artéria central da retina, que basicamente alimenta o epitélio pigmentar retiniano (EPR) e os fotorreceptores da retina, enquanto a circulação proveniente da artéria central da retina fornece oxigênio e nutrientes para o interior desta (Garcia–Castañeiras, 2010).

Schwartz (2010) descreve que a retina possui duas diferentes camadas: uma camada pigmentada, externamente, e outra camada neural, internamente. Lateralmente ao disco óptico, uma área é denominada mácula, com sua depressão central, a fóvea central, que se encontra presente em alguns mamíferos.

A retina neural é uma estrutura que dispõem em oito camadas (Figura 1). Em sentido pósterio-anterior é composta por: (I) Camada pigmentar, constituída por uma camada de epitélio pigmentar retiniano (EPR), cujo pigmento das células epiteliais absorve luz visível, promovendo nutrição dessas células e contínua renovação dos segmentos externos e reduz o reflexo indesejado da luz que entra no olho; (II) Camada de fotorreceptores (CFT), constituída por bastonetes e cones; (III) Camada nuclear externa (CNE), que contém os corpos celulares dos bastonetes e cones; (IV) Camada plexiforme externa (CPE), que é uma camada sináptica, contendo elementos pré-sinápticos e pós-sinápticos dos fotorreceptores e interneurônios da retina (células horizontais e amacrinas); (V) Camada nuclear interna (CNI), que contém corpos celulares de interneurônios retinianos, incluindo células bipolares, células horizontais e células amácrinas; (VI) Camada plexiforme interna (CPI), que constitui a segunda camada sináptica, realizando a conexão de células horizontais e amacrinas com ganglionares ; (VII) camada de células ganglionares (CCG), que contém os corpos celulares das células ganglionares, que são as células eferentes dos sinais da retina; (VIII) camada de fibras do nervo óptico, formada pelos axônios das células ganglionares, que passam pela retina, entram no disco do nervo óptico e deixam o olho por esse nervo (Schwartz, 2010).

A retina é composta por fotorreceptores ou células fotossensíveis como os cones, responsáveis pela visão fotóptica (visão em ambientes iluminados, com muitos fótons

disponíveis), e os bastonetes, responsáveis pela visão escotópica (visão em ambientes de baixa luminosidade e poucos fótons disponíveis). Quando estas células são ativadas, os sinais primeiramente são transmitidos a sucessivas camadas de neurônios da própria retina e, posteriormente, são repassados para o nervo óptico e córtex cerebral.

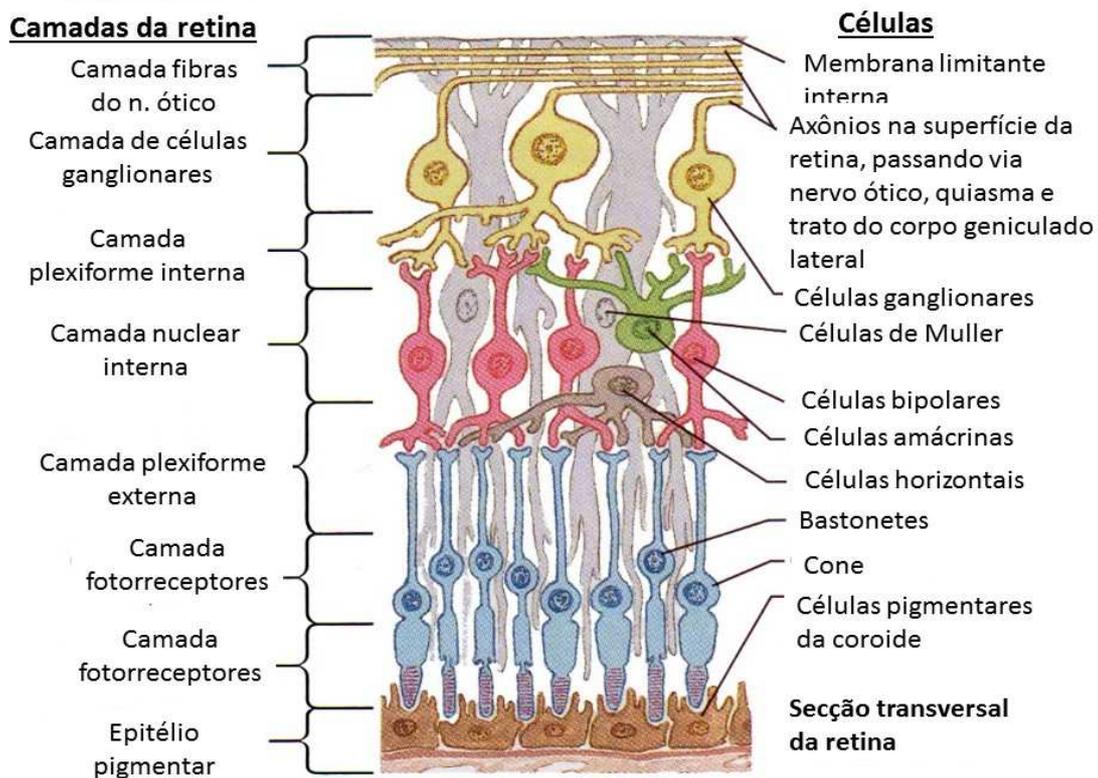


Figura 1

Representação esquemática da estrutura laminar e composição celular da retina.

Fonte: Hansen, J. (2011). *Netter Atlas de Fisiologia Humana*. Elsevier Brasil.

Nos cones há moléculas fotossensíveis denominadas de opsinas visuais, e são classificadas de acordo com a sensibilidade a diferentes comprimentos de ondas em: opsina S (sensível ao comprimento de onda curto – na faixa azul³), opsina M (sensível ao comprimento de onda médio – na faixa verde) e a opsina L (sensível ao comprimento de onda longo – na faixa vermelha). Essas moléculas possuem pico de absorção quando as ondas luminosas

³ Matiz de referência para a faixa de comprimentos de onda a qual a opsina é sensível, baseado na percepção de matiz de um observador tricromata.

possuem comprimento de 445 nanômetros (nm) para a opsinina S, 535 nm para a opsinina M e 570 nm para a opsinina L. Nos bastonetes, a opsinina encontrada é a rodopsina, a qual tem um pico de absorção na faixa de 500 nm (Schwartz, 2010).

O sistema de transdução do sinal na célula fotossensível obedece a três princípios: detecção do sinal, amplificação e transmissão do estímulo ao sistema nervoso (Kandel, 2003). No sistema visual, quando a luz incide na retina, o processo de transdução se desencadeia por uma cascata de reações físico-químicas que se inicia com a estimulação de fotopigmentos. A fototransdução em cones ainda é pouco compreendida, no entanto, eles possuem proteínas de transdução semelhantes às dos bastonetes (Hisatomi, *et al.* 2002).

Nos bastonetes, o fotopigmento é denominado rodopsina, que é sintetizada a partir de uma opsinina e o retinal, que é derivado da vitamina. Na falta do estímulo luminoso, o retinal da rodopsina está na posição 11-cis e na presença de luz, a opsinina e o retinal se separam. Dessa forma, a luz é responsável por alterar a conformação da rodopsina 11-cis em 11-trans. A decomposição causa modificação na condução iônica na membrana do fotorreceptor e provoca um potencial receptor e como consequência reajusta a liberação de neurotransmissor glutamato do fotorreceptor. Esse mecanismo ocorre quando não há luz que incida nos fotorreceptores, pois a membrana dos discos tem a sua permeabilidade alta para os íons sódio (Na^+) e há uma corrente de despolarização.

Conforme Guyton e Hall (2011), esses canais de Na^+ são monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) dependentes. Na presença de luz o fotorreceptor reage fotoquimicamente: a rodopsina muda de configuração e ativa a proteína G, (conhecida como transducina), que por sua vez, excita a atividade da enzima efetora, uma fosfodiesterase (que converte o cGMP em GMP). A redução de cGMP inativa os canais de Na causando uma corrente de hiperpolarização na membrana do fotorreceptor e por conseguinte, há redução de liberação de NT em seu terminal. A luz, causa ainda simultaneamente, a redução de cálcio (Ca)

intracelular, evento que estimula a guanilil-ciclase, enzima que sintetiza o cGMP antecipando-se para nova situação de ausência de luz.

No caso da estimulação das células ganglionares somente estas geram potenciais de ação, sendo esta atividade não observada em células bipolares. Para Guyton & Hall (2011), no momento em que o fotorreceptor gera potencial receptor hiperpolarizante, ocorre redução na liberação dos neurotransmissores e como consequência, as células bipolares aumentam o nível de despolarização e excitam as células ganglionares a dispararem mais potencial de ação pelas suas fibras aferentes pelo nervo ótico (II par craniano).

Em relação à fototransdução dos cones, o pigmento deste é composto por dois elementos: um retinal 11-cis e uma opsina semelhante à rodopsina e são responsáveis pela visão detalhada do ambiente, favorecendo a nitidez. A visão de cores permitiu vantagem aos ancestrais primatas com a habilidade de distinguir os frutos maduros dos verdes e a diferenciar animais camuflados no ambiente. Com relação aos mecanismos de transdução, os cones também respondem com potencial hiperpolarizante. Os bastonetes possuem apenas um tipo de fopigmento e um limiar mais baixo de fotossensibilidade e são adaptados para o ambiente com baixa luminosidade (visão escotópica), ou seja, esse fato não possibilita nitidez e definição dos objetos. Portanto, em ambiente pouco iluminado, no qual primatas humanos enxergam utilizando a região extra-foveal da retina.

Fisiologia visual de roedores

Existem diferenças significativas entre a retina de humanos e de roedores. No que concerne ao quantitativo de células, a quantidade bastonetes prepondera de cones, abrangendo cerca de 99% da área da retina de ratos e camundongos e tendo em vista que os mesmos são um animais noturnos. Essa maior densidade de bastonetes advém, da necessidade de sobrevivência em seu habitat composto de pouca luminosidade. A distribuição de cones e

bastonetes não é uniforme ao longo da retina, e não contem uma região delimitada com mais cones, como no caso da fóvea, em humanos (Szel & Rolich, 2000).

Em relação ao desenvolvimento dos fotorreceptores da retina do rato, os estudos iniciaram a partir de investigações em camundongo, animal filogeneticamente próximo ao rato. No primeiro momento, surgem os bastonetes que emergem centralmente na retina no primeiro ou segundo dia pós natal e posteriormente, surge na periferia. Os primeiros cones que aparecem são do tipo UV no quarto ou quinto dia, os últimos a aparecer são os cones do tipo M (Szel, 1993).

Nesse sentido, observa-se semelhança entre a retina do rato e maioria dos mamíferos, pois ambas possuem baixas densidade de cones S ou UV nas primeiras semanas. E após as outras duas, atinge o pico de desenvolvimento e diminuem o quantitativo. Os cones M aparecem um pouco mais tarde, mostrando um aumento na densidade, no entanto, eles atingem um patamar e permanecem elevados ao longo da vida desse roedor (Jacobs, 2009).

As outras diferenças são relativas ao numero e a morfologia das células, por exemplo, as células horizontais em humanos há dois tipos morfologicamente bem distintos, em ratos, há apenas um tipo, chamado de células horizontais do tipo B conforme Wu, S. M., Baehr, W., & Crair, M. (2004). Na retina de ratos, há nove tipos morfologicamente diferentes de células bipolares de cones, e um tipo de célula bipolar no bastonete (Figura 2) classificados como base padrão das ramificações e no nível da estratificação das terminações dos axônios na camada plexiforme interna.

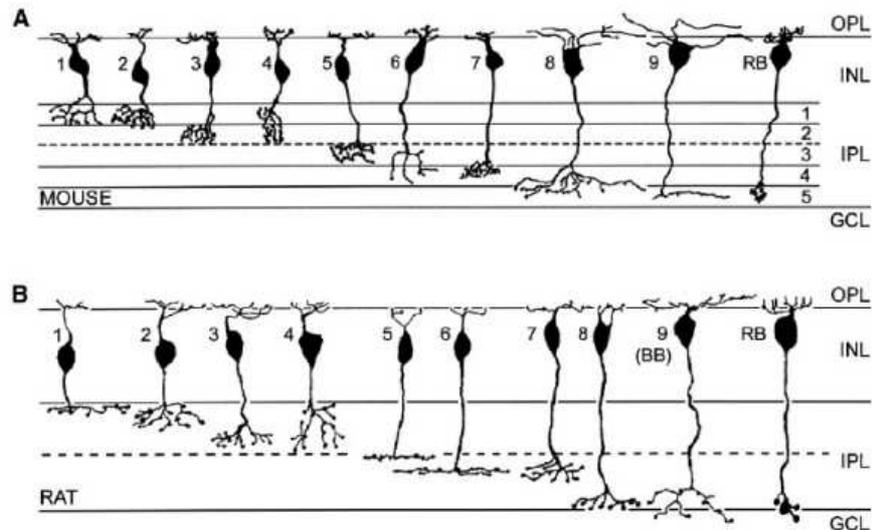


Figura 2

Subtipo de células morfológicas de células bipolares em ratos e camundongos, no qual são apresentados desenhos de células bipolares após injeção com corantes intracelulares. As células bipolares estão numeradas de 1 a 9. As camadas da retina são a camada plexiforme externa (OPL), a camada nuclear interna (INL), a camada plexiforme interna (IPL) e a camada de células ganglionares (GCL). A linha tracejada a meio do IPL representa a divisão acima da qual os axônios de OFF-bipolares se estendem e abaixo dos quais os axônios de ON-bipolares são encontrados.

Fonte: Morrow, E. M., Chen, C. A., & Cepko, C. L. (2008).

A respeito da diferença entre a retina de roedores e humanos, conforme Andrade, Pinto & Oliveira (2002), a utilização de ratos como modelos biológicos é eficaz, tendo em vista a ampla utilização desses animais no meio científico, e pela aproximação da fisiologia visual, principalmente os humanos. É também possível o fácil manejo e reprodução, sendo esse modelo de grande auxílio para compreensão da fisiopatologia de algumas doenças.

1.2 Neurofisiologia visual e o ferro

Para Ugarte *et al.* (2013), o ferro desempenha um papel importante na retina, atuando como elemento catalítico, estruturador e regulador de enzimas no metabolismo celular de maneira geral, a exemplo das funções mitocondriais, expressão gênica e defesa antioxidante. Os íons de ferro participam na angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), na mielinização nervosa, na ação de endorfinas e na transmissão sináptica. O ferro participa

também no processo de fototransdução (formação de rodopsinas, fosfodiesterase, recapturação), ciclo visual, neurotransmissão e produção de glutamato (Ye & Roualt, 2010).

Sigh *et al.*, (2014), Ugarte *et al.*, (2013); Song e Dunaief (2012) e Garcia-Castañeiras (2010) falam da importância da participação do ferro na retina e como sua carência afeta os processos metabólicos retinianos. Os trabalhos de DeMamam, *et al.*, (2008, 2010) revelaram que as consequências da restrição de ferro incorrem principalmente na baixa mielinização do nervo ótico e conseqüentemente, numa deficiência do sinal visual.

Estudos realizados por Monga, Walia, Gandhi, Chandra e Sharma, (2010) revelaram que, em crianças, a deficiência de ferro está associada a disfunção das vias visuais. Em um estudo realizado com vinte e cinco crianças com deficiência de ferro, de idade entre seis e 24 meses, os autores identificaram atraso no tempo implícito das respostas do potencial visual evocado (VEP) em comparação ao grupo controle. A deficiência de ferro pode ter dificultado a função de oligodendrócitos e a mielinização das vias visuais. O atraso do tempo implícito pode ter sido resultante de anemia por deficiência de ferro e da hipóxia.

Watts e Harris (2014) referem que o fluxo sanguíneo da retina diminuiu significativamente no modelo de rato com colite aguda, induzida por ingestão de sulfato de sódio dextrano (DSS), que causa diminuição substancial de 45% no fluxo sanguíneo da retina e aproximadamente 35% de queda no nível de hematócritos, devido à anemia por deficiência de ferro. Esses eventos podem ser responsáveis pela diminuição das amplitudes das ondas a e b, potenciais oscilatórios e aumento do tempo implícito das ondas a e b do eletrorretinograma. Em estudos realizados com pelo mesmo autor, com humanos, pacientes com anemia apresentaram alterações na camada de fibras do nervo ótico, tortuosidade venosa, hemorragias, microneurismas e neovascularização.

Uma forma de realizar a avaliação funcional da retina é através do eletrorretinograma de campo total, pois nele, a atividade das células da retina é mensurada.

1.3 Eletrorretinograma de campo total – ERG

Uma forma de realizar o estudo da retina é através da técnica do eletrorretinograma de campo total ou *full-field*, que é um registro elétrico da retina em resposta a um estímulo luminoso, que gera estimulação simultânea em todo o campo visual, permitindo uma avaliação em massa das células de toda a retina. Esse teste é amplamente utilizado para avaliar doenças oculares na retina, em humanos e também em animais, enquanto modelos experimentais para estas patologias (Holmgren, Marmor, & Jacobs, 2009).

Nesse teste, o estímulo luminoso pode ser gerado por um equipamento chamado *Ganzfeld*, que em alemão significa campo total (formado por uma cúpula com interior constituído de uma superfície difusora de luz branca de alta pureza) ou por fotoestimulador móvel. A estimulação é realizada através da modulação de fonte luminosa podendo alterar características de estímulos como intensidade, frequência temporal e cromaticidade. (Heckenlively & Arden, 2006)

Os potenciais elétricos são captados por diferentes tipos de eletrodos ativos, que podem ser posicionados em diferentes regiões: na córnea (com os eletrodos em forma de lente de contato do tipo Burian –Alen ou ERG - jet), na conjuntiva com as fibras condutoras do tipo DTL (Downson, Trick & Litzkow) ou eletrodos em forma de folhas de ouro e na superfície cutânea com os eletrodos de superfície) (Marmor *et al.*, 2009; Heckenlively & Arden, 2006).

O registro da resposta elétrica da retina é obtido através da diferença de voltagem medida entre o eletrodo ativo e eletrodo de referência. O eletrodo terra serve de zero, ou seja, a polaridade de voltagem é positiva (eletrodo ativo) ou negativa (eletrodo referência) em relação ao eletrodo terra. Os eletrodos de referência e terra são geralmente eletrodos cutâneos e pode ser do tipo agulha (intradérmicos) ou de superfície (epidérmicos), feitos de metal como platina, prata, ouro, níquel, aço inoxidável. O eletrodo ativo detecta corrente extracelular gerada em resposta a um estímulo luminoso (Heckenlively & Arden, 2006).

1.4 Treino discriminativo por reforço diferencial

Para investigar efeitos comportamentais da anemia, foi escolhida a tarefa de discriminação de frequências espaciais (grades senoidais), após treino operante da resposta de pressão à barra (RPB) em uma caixa de Skinner adaptada para camundongos, Conforme Moreira e Medeiros (2007), o comportamento operante é aquele que produz mudanças no ambiente e que é afetado por elas. Assim, quando é inserida uma nova variável (o contexto), conceitua-se sobre os comportamentos *operantes discriminados*, ou seja, aqueles que se emitidos em um determinado contexto, produzirão consequências reforçadoras. Por conseguinte, os estímulos consequentes, cuja apresentação eleva a probabilidade de um comportamento, são denominados de reforço. Porém, aqueles estímulos que são apresentados antecedentes ao comportamento e controlam sua ocorrência são considerados estímulos discriminativos “S^d”. Ao introduzir os Estímulos Discriminativos nas contingências, apresentamos a fundamentação de análise do comportamento operante, no qual Skinner denominou esse processo de Tríplice Contingência. A Tríplice contingência é usualmente ilustrada pela expressão “S^d – R – C” ou “S^Δ – R – C”.

Os estímulos discriminativos “S^{dS}” sinalizam que uma dada resposta será reforçada caso de ocorrência de um comportamento, evidenciando que o S^d possui um encadeamento com as consequências. Os S^{Δs} sinalizam que uma resposta não será reforçada, ou seja, indicam a indisponibilidade do reforço ou sua extinção. Segundo o autor, a discriminação se estabelece pelo fato de um comportamento ser reforçado na presença de uma situação estimuladora e não ser na presença de outra situação estimuladora, processo esse chamado de “reforçamento diferencial”.

Partindo desses pressupostos, afirma-se que o controle discriminativo de estímulos estabeleceu-se quando certo comportamento tem alta probabilidade de ocorrer na presença do S^d e baixa probabilidade de ocorrer na presença do S^Δ. Nesse sentido, o sujeito aprende a

discriminar os estímulos devido ao processo denominado treino discriminativo, no qual possui como objetivo reforçar um comportamento na presença de um S^d e extinguir na presença de um S^A . Embora o S^d assuma um papel importante na tríplice contingência, ele não tem a função de eliciar uma determinada resposta, apenas estabelecer um contexto, dando possibilidades para que as respostas ocorram.

Conforme Silva Souza e Abreu-Rodrigues (2012), para estabelecer controle discriminativo torna-se necessário que haja reforçamento diferencial, ou seja, sob uma condição de estímulos (S^D) uma maior taxa ou amplitude de reforços deve ser delineada, comparada com outra condição de estímulos (S^A). Frequentemente, o treino discriminativo incide na exposição de um esquema de reforçamento intermitente e de extinção como componentes de um esquema múltiplo. Na falta de estímulos antecedentes, períodos de extinção também podem assumir funções discriminativas.

Nos estudos de Weissman (1960) (apud Silva Souza & Abreu-Rodrigues, 2012) houve a exposição de ratos a um dentre três pares de esquemas mistos: (a) FR Extinção; (b) reforçamento diferencial de baixas taxas (DRL) Extinção; ou (c) FI Extinção. Nesse caso, foi observado que os períodos de extinção eram acompanhados por uma pausa na resposta até o final do componente de extinção, no qual o término era sinalizado. Dessa forma, como não existiam estímulos antecedentes sinalizando o esquema em presente, a pausa durante o componente de extinção foi atribuída ao controle discriminativo exercido pela falta de reforço.

Conforme del Prette (2011), o reforçamento diferencial - DR⁴ consiste na apresentação de consequências reforçadoras, a depender de qual resposta é emitida pelo sujeito. Nos estudos de Catania (1999), o autor refere que o DR seria a combinação do reforçamento das respostas que se pretende aumentar de frequência, associado ao não reforçamento (extinção)

⁴ Do inglês, *differential reinforcement*.

das respostas que se pretende diminuir. De forma que eles não acontecem de forma dicotomizada, no qual uma interação natural, de modo que se torna difícil não haver nenhum tipo de reforço para uma resposta.

Segundo o mesmo autor, em relação a modelagem de animais, pode-se dizer que ela envolve um reforçamento diferencial de respostas, no entanto, esse procedimento é realizado ao longo de um *continuum* a partir das respostas que o indivíduo já emite, gradualmente se aproximando da resposta final.

No presente estudo, uma vez que o responder discriminado entre fundo neutro e grade senoidal estivesse estável, os animais seriam submetidos a sessões de teste, nas quais a frequência espacial das grades seria manipulada. A perda de precisão no teste seria interpretada como indicativo de que o animal não é capaz de diferenciar o estímulo de teste do neutro.

OBJETIVO

Geral

Avaliar as alterações no comportamento e na fisiologia do sistema visual em camundongos *Mus musculus* induzidos à anemia, a partir de um modelo de colite aguda.

Específico

- Reproduzir um modelo de colite aguda em camundongo utilizando Dextran Sulfato de Sódio (DSS);
- Avaliar, através do ERG de campo total, as alterações funcionais da retina provocadas pela anemia induzida pela colite aguda em camundongos jovens, medindo as seguintes respostas: escotópica de bastonetes, escotópica mista (bastonetes e cones), fotópica de cones e fotópica de Flicker;
- Avaliar se há repercussões comportamentais da anemia induzida por colite aguda, por meio responder discriminado a grades senoidais. (Por motivos que serão descritos na discussão dos resultados, esse objetivo não foi alcançado).

MÉTODO

Ambiente

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurofisiologia Dr. Eduardo Oswaldo Cruz, situado no Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Pará-UFPA. A sala de procedimentos era ampla, com iluminação artificial, bem como natural, durante o dia. Nesta, constavam os equipamentos necessários (fotoestimulador, amplificador, computadores, caixa de condicionamento operante) para a realização de todos os experimentos propostos nesse estudo.

Sujeitos

Este estudo seguiu as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e teve início a partir do da liberação do protocolo (CEPAE-UFPA: BIO 033.2015), que está de acordo com os princípios éticos em testes em animais adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará.

Utilizou-se 18 camundongos *Mus musculus*, da linhagem albino suíço, experimentalmente ingênuos (machos e fêmeas) provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiro (45 x 28 x 13 cm) de polietileno e mantidos em um ciclo claro-escuro de 12 horas (com a fase clara de 7:00 às 19:00h) a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, com água e ração *ad libitum*.

Indução e mensuração da colite aguda

Realizou-se a indução de colite aguda nos animais através da ingestão de água potável com de 5% de DSS (dextran sulfato de sódio, 40 kD; ICN Biomedicals, Aurora, OH)

durante seis dias. A água contendo DSS foi fornecida aos ratos pareados por idade. Os pesos corporais foram registrados nos dias iniciais e finais do protocolo.

O grupo controle – (GC) era composto por 6 sujeitos que não receberam solução com DSS e submetidos ao ERG entre o 60º e 90º dias de vida. No primeiro grupo experimental (Anemia-mãe), duas fêmeas reprodutoras em acasalamento receberam água com solução de DSS, aproximadamente no 60º dia de vida ou que possuíam o peso entre 23 a 45g, durante seis dias. Desta ninhada, nasceram 8 animais e foram submetidos ao ERG a partir do 60º dia de vida, conforme esquema da figura 3:



Figura 3

Representação esquemática do grupo anemia-mãe

No segundo grupo experimental (anemia-camundongos), 6 animais com 60 dias de vida ou com peso entre 23 a 45g receberam a solução com DSS por seis dias, uma única vez e realizou-se ERG a partir do 67º dia de vida, conforme esquema da figura 4

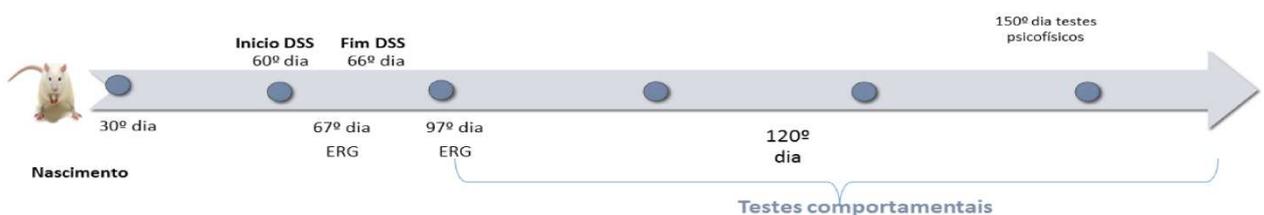


Figura 4

Representação esquemática do grupo anemia

Durante os primeiros 120 dias de vida, todos os animais obtiveram livre acesso a água e comida, exceto o grupo que recebeu a indução de DSS, em que a água foi trocada pela solução. Durante o período de teste comportamental, os animais foram mantidos em provação hídrica, por aproximadamente 24 h para a realização dos testes, sendo fornecida água diariamente por 10 minutos.

Houve a preferência em selecionar camundongos machos para a composição dos grupos, devido os mesmos apresentar massa corporal superior das fêmeas, garantindo maior sobrevivência durante o experimento. Neste estudo, a distribuição foi de 65% de machos e 35% de fêmeas.

Em relação à aferição da anemia dos animais, foram coletadas amostras de sangue, através do método de punção cardíaca, a quantidade correspondente cerca de 6 a 8% do seu peso corporal, ou seja, de aproximadamente 1 a 2 ml por 30 g de peso ao término do tratamento com a solução de DSS (dia 6). Os animais pertencentes ao grupo anemia mãe tiveram suas amostras coletadas entre os 60 e 90 dias de teste, assim como os animais controles. As amostras foram analisadas por laboratório particular de Belém e teve como valores de referência para anemia, hemoglobina $< 11\text{g/dl}$ e o número de hemácias < 13 milhões/ mm^3 .

O monitoramento da anemia também foi investigado pela pesagem do animal, no primeiro e o sexto dia que animais que receberam solução com DSS.

Eletrorretinograma (ERG)

Procedimentos

Inicialmente, os animais foram anestesiados através de uma injeção intraperitoneal, utilizando a associação Ketamina 10% (50mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg) 2%, numa proporção de 3:1. Verificada a ausência de reflexos, o animal foi posicionado na gaiola de Faraday e

colocado para anestesia monocular, utilizando cloridrato de proximetacaína 0,5% (anestesia local); tropicamida 1 % (dilatação pupilar) e metil-celulose 2 %. Estes procedimentos foram realizados pela experimentadora, previamente treinada para a execução destes.

Após esse procedimento, um eletrodo terra (com formato de um disco) (Figura 5-A), foi instalado na região interna do lóbulo da orelha do animal, após escarificação (esfoliação) local para retirada de pelos presentes, resíduos de fluidos corporais, diminuindo possíveis interferências. Primeiramente foi utilizada pasta escarificadora (NuPrep, D.O.WEAVER) e para fixação foi utilizada pasta eletrolítica (Tem 20 D.O. Weaver), que auxilia na captação dos sinais elétricos.

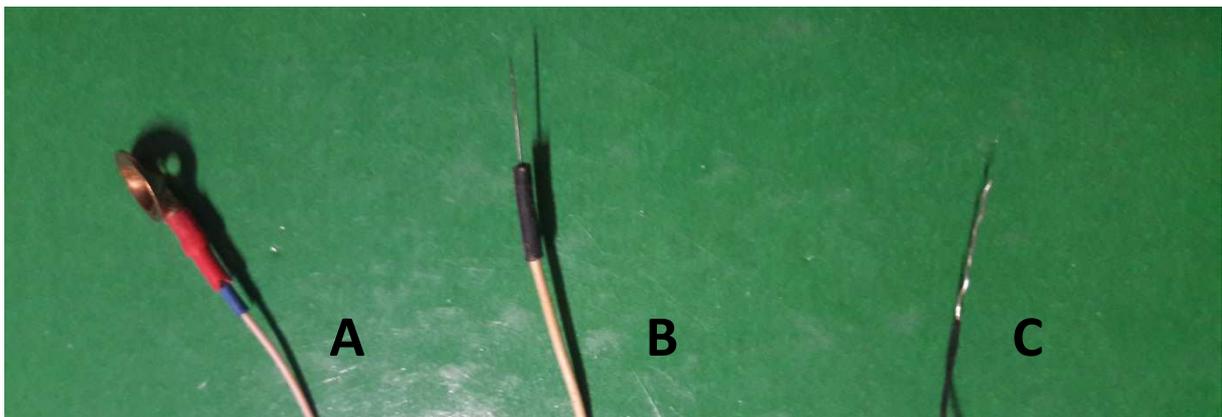


Figura 5

Eletrodos utilizados no eletrorretinograma. A) Eletrodo terra; B) eletrodo ativo e C) Eletrodo referência. Fonte: arquivo pessoal

Paralelamente, foi afixado um eletrodo referência (Figura 5-B), em forma de agulha, instalado na região subpalpebral, onde sua extremidade foi posicionada adjacente à córnea e um eletrodo registro (Figura 5-C), que consiste num fio de prata, que situado sobre a retina é capaz de captar os sinais provenientes desta. A figura 6 mostra o animal com os eletrodos instalados, pronto para início do teste.



Figura 6

Animal anestesiado com eletrodos posicionados para início do teste

Fonte: Rodrigues, 2013.

Os animais foram colocados no interior da gaiola de Faraday (46,5 x 40,3 x 30), a 30 cm do fotoestimulador (Figura 7). O registro do ERG foi realizado em diferentes condições de adaptação, sendo possível isolar células (cones ou bastonetes) para obter respostas, por meio da manipulação da intensidade da luz e o nível de adaptação do animal (adaptado ao claro ou escuro), para fins de registros fotópicos e escotópicos. Os padrões esperados para estas repostas podem ser visualizados na figura 8.

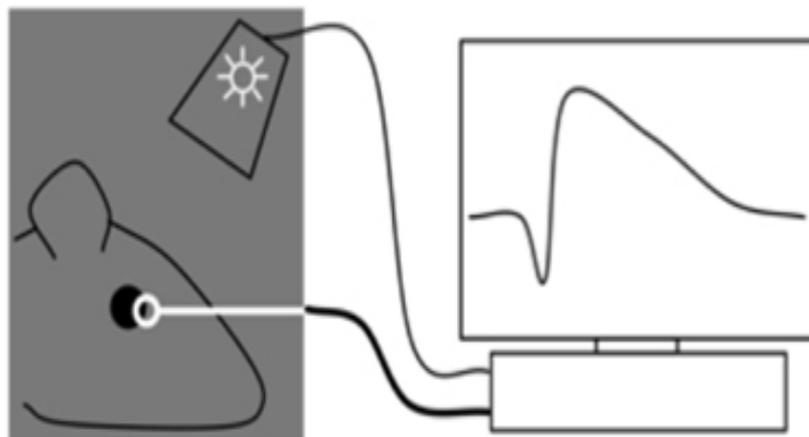


Figura 7

Representação esquemática do posicionamento do animal para testes e equipamento

Fonte: MATA *et al*, 2013 (modificado) <http://www.retinalphysician.com/articleviewer.aspx?articleID=108861>

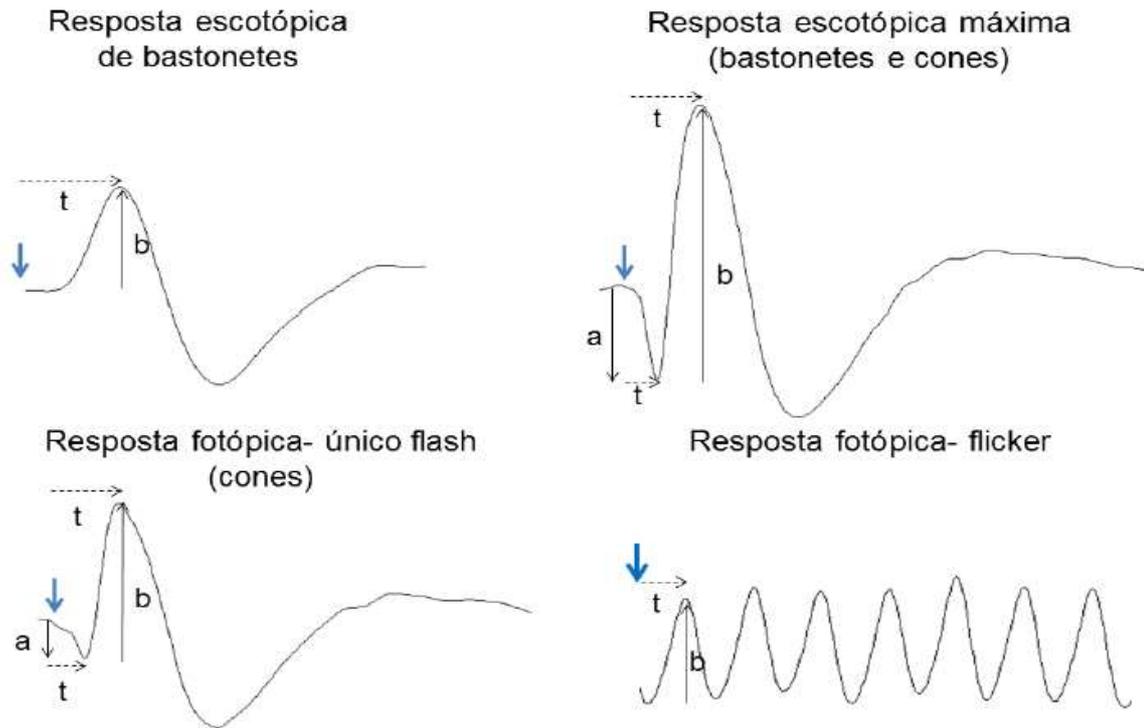


Figura 8

Padrões de respostas esperadas no eletrorretinograma. As setas indicam o início do estímulo, as setas pretas indicam a amplitude das ondas a e b e a seta tracejada indica o valor de tempo implícito. Fonte: Costa (2013).

Para as medições escotópicas, os animais permaneceram por pelo menos 14h, em ambiente sem nenhum tipo de iluminação (overnight). Após esse período, foram fornecidos estímulos luminosos (flashes) com a intensidade de 0,09; 0,378; 10, 215 cd/m^2 , utilizando-se filtros para obtenção de resposta escotópica máxima. Na condição fotópica, o animal foi adaptado durante 10 minutos em ambiente com boa luminosidade, utilizando-se flashes com intensidade de 30 cd/m^2 , sendo mantida uma luz de fundo.

Equipamentos

Os estímulos luminosos foram apresentados por um fotoestimulador modelo PS33-PLUS, posicionado a 30 cm do animal. Realizou-se a captação do registro por meio de um amplificador diferencial de alta impedância de entrada AC (Grass Technologies modelo P511), ajustado com filtragem de 0,3 Hz (passa alta) e 300 Hz (passa baixa), com amplificação de 20000 x. Os registros foram monitorados por um osciloscópio (Protek,

modelo 6510) e continuamente digitalizados numa faixa de 1 KHz, por um computador com uma placa de aquisição de dados A/D (National Instruments, Austin, TX). O software utilizado para os registros das respostas do ERG foi o Labview 3.0 (National Instruments, Austin, TX).

Análise das respostas do eletrorretinograma

Os parâmetros do ERG mensurados, em geral, são o tempo implícito e a amplitude das *ondas a* e *onda b*, descritas da seguinte forma e ilustradas na figura 9:

- Tempo implícito da *onda a*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô de resposta da *onda a*, expressa em milissegundos (ms);
- Tempo implícito da *onda b*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô de resposta da *onda b*, expressa em milissegundos (ms);
- Amplitude da *onda a*: é mensurada a partir da linha de base até o primeiro pico (componente negativo), expressa em microvolts (μv);
- Amplitude da *onda b*: é medida pico a pico, corresponde à distância entre o pico da *onda a* (negativa) e o pico da *onda b* (positiva), expressa em microvolts (μv);
- Respostas de Flicker:
 - Tempo implícito da *onda b*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô de resposta da *onda b*, expressa em milissegundos (ms);
 - Amplitude da *onda b*: é medida a partir da linha de base até o primeiro pico (componente positivo), expressa em microvolts (μv)

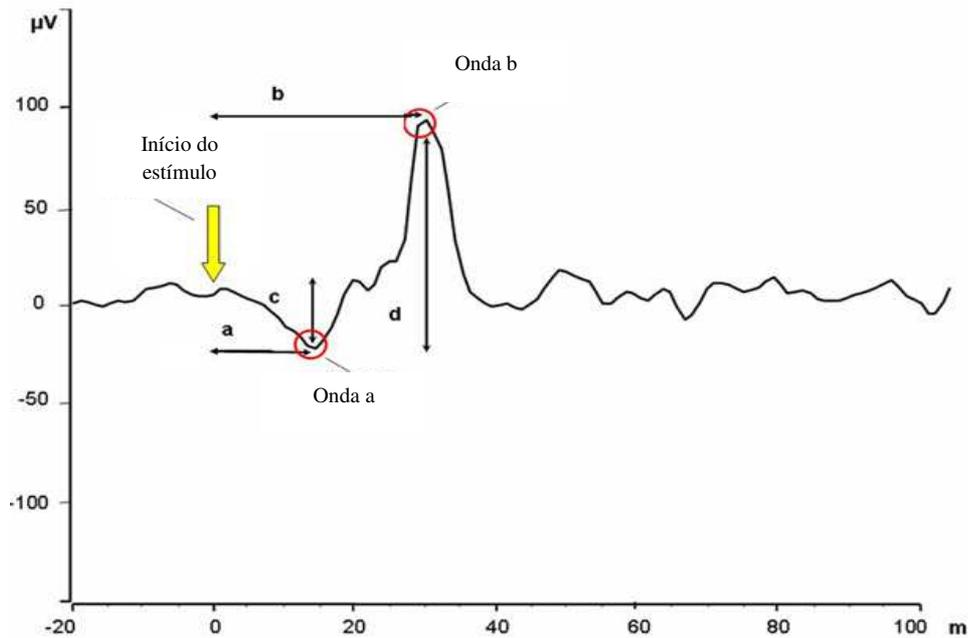


Figura 9

Parâmetros do ERG mensurados no eletrorretinograma, onde: a) tempo implícito da onda a; b) tempo implícito da onda B; c) amplitude da onda a e d) amplitude da onda b .

Fonte: http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24200/24200_26.png

Tabela 1

Tipo de respostas obtidas com o ffERG

Tipo de resposta	Escotópica de bastonetes	Escotópica mista 1	Escotópica mista 2	Fotópica de cones	Fotópica de Flicker (12, 18, 24 e 30 Hz)
Adaptação	Escotópica (≥ 14 h)	Escotópica (≥ 14 h)	Escotópica (≥ 14 h)	Fotópica (10 min)	Fotópica (10 min)
Intensidade do estímulo	<0,09 cd.s/m ²	0,378 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²	10, 215 cd.s/m ²
Duração do estímulo	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms
Intervalo entre estímulos	15 s	15 s	15 s	4 s	5 a 30 s
Resposta	Bastonetes	Cones + Bastonetes	Cones + Bastonetes	Cones	Cones

Protocolos

O protocolo utilizado foi uma ampliação do protocolo proposto pela *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV)*, baseado em pesquisas anteriores realizadas com animais que também se utilizaram desse protocolo de experimento, sintetizados na tabela 1 e constou das seguintes etapas:

- Estímulo com flash único com duração de 10 ms por um período de um minuto;

Em seguida, foi avaliada a resposta fotópica, realizando-se a adaptação do animal por aproximadamente 10 minutos, de acordo com as seguintes etapas:

- Estímulo com flash único com duração de 10 ms por um período de um minuto;
- Estímulo com flash único com duração de 10 ms por um período de um minuto, com a utilização de filtros de luz (vermelho, verde e azul);
- Estímulos luminosos intermitentes com 12, 15, 18 e 30 Hz de flashes com duração de 10 ms, por um período de 15s.

Resposta de pressão a barra e reforço diferenciado em camundongos com anemia

A preparação para os testes psicofísicos consistiu em treino discriminativo numa câmara de condicionamento operante (figura 10 e 11), onde a resposta de pressão à barra (RPB) foi reforçada diferencialmente com intervalos de razão fixa 2 e 3 .

A caixa de condicionamento operante foi modificada para trabalhos realizados com camundongos, tendo sua barra de acionamento rebaixada em 03 cm (figura 9), por uma placa de alumínio vazada. Realizou-se a redução pela metade da cúpula para água, que possuía a capacidade de 12 µl para 6 µl. A câmara interna também foi reduzida a metade, de 35 cm para aproximadamente 16 cm. A diminuição foi motivada pela grande dispersão do animal pelo interior da câmara e a redução favoreceu para uma maior concentração do animal próximo a barra de acionamento.



Figura 10

Caixa de condicionamento operante adaptada para o experimento psicofísico. Fonte: arquivo pessoal



Figura 11

Detalhe da adaptação da barra da caixa de condicionamento operante Fonte: arquivo pessoal

Grupos e preparo do animal

Para o experimento, foi proposto o arranjo em quatro grupos: grupo controle (GC), com 2 animais, anemia aprendizagem (GCA), com 4 animais, subdividido em: dois que receberam a indução e iniciaram os testes comportamentais e dois que começaram o treino comportamental e receberam a solução com DSS e anemia mãe (GCM), com 2 animais. Como procedimento para as etapas de modelagem, resposta a pressão a barra e avaliação do desempenho visual dos camundongos através do teste psicofísico, os animais foram privados da ingestão de água por 24 horas antecedentes as sessões, sendo esta o fator de reforçamento.

Procedimento geral

As sessões experimentais foram realizadas diariamente, cinco dias por semana, de modo que cada sessão de coleta de dados teve duração máxima de 10 minutos. Os registros foram registrados em protocolo próprio, criado pela pesquisadora. (APENDICE 1). Como protocolo de preparação para os testes, os animais seriam submetidos à seguinte sequência de procedimentos: modelagem da resposta de pressão à barra (Fase 1), treino em esquema de reforçamento intermitente (Fase 2) e treino discriminativo com estímulos em grades senoidais (Fases 3 e 4). Quando o desempenho apresentasse estável, os sujeitos seriam submetidos aos testes com novas variações das grades senoidais (Fase 5). Entretanto, por motivos que serão descritos em Resultados e Discussão, foram executadas somente as fases 1^a e 2^a. Ainda assim, o procedimento originalmente previsto será apresentado na íntegra, a seguir.

Fase 1 – Modelagem de Pressão à Barra e Reforçamento Contínuo (CRF)

Os sujeitos passaram por um treino preliminar, que consistiu de uma sessão de modelagem, na qual a resposta de pressionar a barra (RPB) foi reforçada diferencialmente por aproximações sucessivas com a liberação de uma gotícula de água para o animal. Instalada a

resposta, os sujeitos foram expostos a três sessões de CRF, com 60 reforçadores cada, objetivando fortalecer a resposta anteriormente modelada.

Fase 2 – Treino do Responder sob Esquema de Intervalo Fixo (FI)

Nessa segunda fase, foi realizada de 2 a 3 sessões de 10 minutos em esquema FI razão 2, duas a 3 sessões de 10 min de FI razão 3 e, finalmente, duas sessões de 10 min cada de FI Razão 4. A apresentação do estímulo em grades diante da caixa de comportamento operante pelo monitor permanecerá presente no decorrer de todas as sessões dessa fase.

Fase 3 – Treino Discriminativo em Esquema Múltiplo

Na terceira fase, para colocar as respostas de pressão à barra sob controle discriminativo, os animais seriam expostos a um esquema múltiplo FI Razão 3 por 10 segundos e extinção (EXT) com componentes de 10 segundos.

Durante o componente de FI razão 3, o estímulo de grades senoidais (S+) seria apresentado e, durante o componente de extinção, o fundo acromático seria exibido (S-). Cada um dos componentes seria apresentado 25 vezes por sessão, constituindo sessões de 10 min de duração. A ordem de apresentação dos componentes seria semi-randômica, com repetição de cada componente em, no máximo, duas vezes consecutivas (ou seja, 2 minutos no mesmo componente).

Essa fase seria encerrada quando o sujeito atingisse três sessões consecutivas em que o Índice Discriminativo ($ID = \text{razão entre a taxa de respostas em S+ e a taxa total de respostas}$) fosse maior ou igual a 80% em cada sessão.

Análise de dados e estatística

Para o processamento dos dados obtidos a partir dos registros eletrofisiológicos, utilizou-se o programa Signal 3.0 (Cambridge Eletronic Designer), que avaliou e mensurou as ondas a e b produzidas em respostas das células retinianas ao estímulo luminoso. Em seguida, os dados foram calculados pelo programa Calc (Apache OpenOffice Calc).

Para os testes comportamentais, a análise dos desempenhos individuais seria baseada na porcentagem de acerto para cada valor do estímulo de teste e a taxa de respostas, tomando cada sujeito como seu próprio controle. O limiar de sensibilidade ao contraste seria definido no valor, em cpg, do estímulo para o qual o desempenho do sujeito caísse para próximo do nível do acaso. Uma aproximação da curva de sensibilidade ao contraste seria obtida pela plotagem da porcentagem de acerto para cada frequência espacial apresentada no teste.

Para a análise no nível populacional, os dados obtidos passaram por análise estatística, na qual foi utilizado o programa GraphPad5, onde foram atribuídos a média e desvio padrão dos grupos experimentais. Posteriormente, os resultados foram comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), uma via, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Parâmetros clínicos para a caracterização do modelo experimental

A partir da análise do peso corporal e hemograma, podemos delinear a caracterização de cada grupo experimental que constituiu este estudo.

Avaliação da massa corporal dos camundongos

O peso corporal dos animais foi mensurado anteriormente a realização dos testes de eletrorretinograma, bem como anteriormente a indução pelo DSS 5%, conforme tabela 2 e a variação registrada na tabela 3:

Tabela 2

Média da massa corporal dos grupos do estudo

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	26 ± 1,35	20 ± 3,78	21 ± 1,41
90 dias	32 ± 2,94	27 ± 1,99	28 ± 2,05

Tabela 3

Variação da massa corporal durante o período de indução pelo DSS 5%

	Anemia
1° dia	~20g
3° dia	~21g
6° dia	~23g

Este dado evidenciou um dos efeitos colaterais da colite no camundongo, uma vez que há o ganho de aproximadamente 15% de a massa corporal devido o animal ser acometido pela inflamação no colón, característica da colite aguda.

Hemograma

Neste estudo, foi realizada análise dos níveis de hemácias e hemoglobina, conforme protocolo descrito na metodologia. Realizou-se a amostragem em dois animais por grupo, escolhidos aleatoriamente e os achados da pesquisa encontram-se sumarizados na tabela 4.

Tabela 4

Valores de hemograma e hematócrito

	Controle		Anemia		Anemia mãe	
	CTL1	CTL2	C1	C2	CM1	CM2
Hemácias	13,8	11,5	6,54	7,72	8,34	8,44
	milhões	milhões	milhões/	milhões/	milhões	milhões
	/mm ³	/mm ³	mm ³	mm ³	/mm ³	/mm ³
Hemoglobina			11,0 g/dl	12,3 g/dl	14 g/dl	13,9 g/dl
Aniosocitose				+		+
Policromasia			+	+		+

Este dado caracteriza a baixa concentração de hemácias e hemoglobina circulante nos animais, o que ratifica a efetivação do uso de DSS 5%, caracterizando o quadro de anemia. Foi também notificado no exame dos animais C1, C2 e CM2 a presença de policromasia e aniosocitose. A condição tende a ser mais um sintoma da anemia comum, como pode ser devido anemia por deficiência de ácido fólico, anemia hemolítica, anemia ferropriva, anemia perniciosa, anemia falciforme ou por substâncias químicas conhecidas por eritropoietina.

Respostas do eletrorretinograma

As respostas eletrofisiológicas dos grupos experimentais foram calculadas, seguindo os padrões da Sociedade Internacional Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV- *International Society of Electrophysiology of Vision*). Os dados a seguir serão descritos em tabelas e gráficos contendo média por grupo e desvio padrão

Resposta escotópica de bastonete

Em relação a *onda B*, foram encontradas diferenças significativas nesse grupo em relação a amplitude, aos 90 dias entre os grupos controle e anemia. Em relação ao tempo implícito, a diferença foi encontrada apenas no grupo anemia no 60º dia de teste (tabelas 5 e 6, figuras 12 e 13)

Tabela 5

Médias e desvio padrão das amplitudes da onda B em resposta escotópica de bastonetes

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	105,10 ± 36,36	45,73 ± 9,73	128,70 ± 40,12
90 dias	83,39 ± 5,44	57,00 ± 6,77	65,21 ± 5,56

Tabela 6

Médias e desvio padrão do tempo implícito da onda B em resposta escotópica de bastonetes

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	19,15 ± 0,05	24,68 ± 3,48	36,46 ± 3,12
90 dias	14,78 ± 0,22	18,5 ± 2,01	26,69 ± 4,73

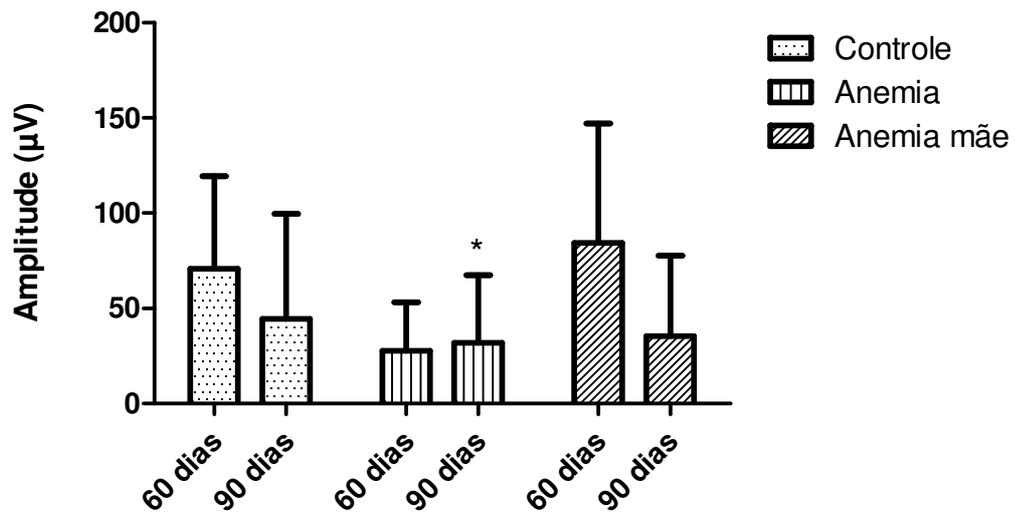


Figura 12

Amplitude da onda-b em resposta escotópica de bastonete aos 60 e 90 dias de teste.

Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*,

* < 0.05 em relação ao grupo controle

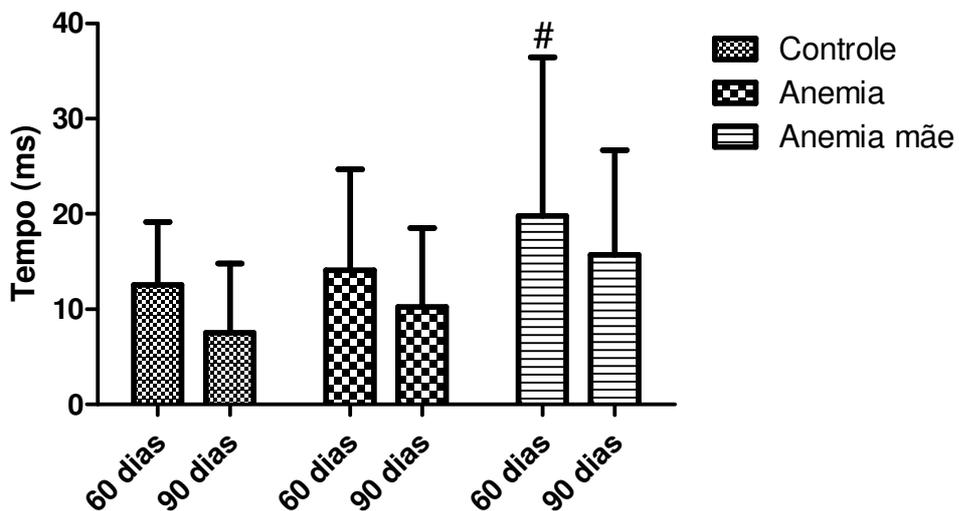


Figura 13

Tempo implícito em resposta escotópicas de bastonete aos 60 e 90 dias de teste. Resultados

expresso em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, * < 0.05 em

relação ao grupo controle.

Resposta escotópica (Mista 1)

Os dados a seguir são referentes a amplitude da onda B da resposta mista 1 (cones e bastonetes), na qual é utilizado estímulo com intensidade de 0,378 cd.s/m². Em relação a amplitude, houve diferenças significativas aos 60 e 90 dias de experimento nos grupos anemia e anemia mãe em relação ao grupo controle.

Em relação ao tempo implícito, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados aos 60 e 90 dias. (tabelas 7 e 8, figuras 14 e 15)

Tabela 7

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta escotópica mista 1

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	104,60 ± 19,18	28,12 ± 7,96	42,18 ± 8,52
90 dias	102,06 ± 12,30	45,69 ± 7,86	56,03 ± 17,13

Tabela 8

Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda B em resposta escotópica mista 1

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	18,95 ± 0,006	26,94 ± 3,62	30,62 ± 4,30
90 dias	15,31 ± 0,39	16,08 ± 0,88	30,940 ± 8,45

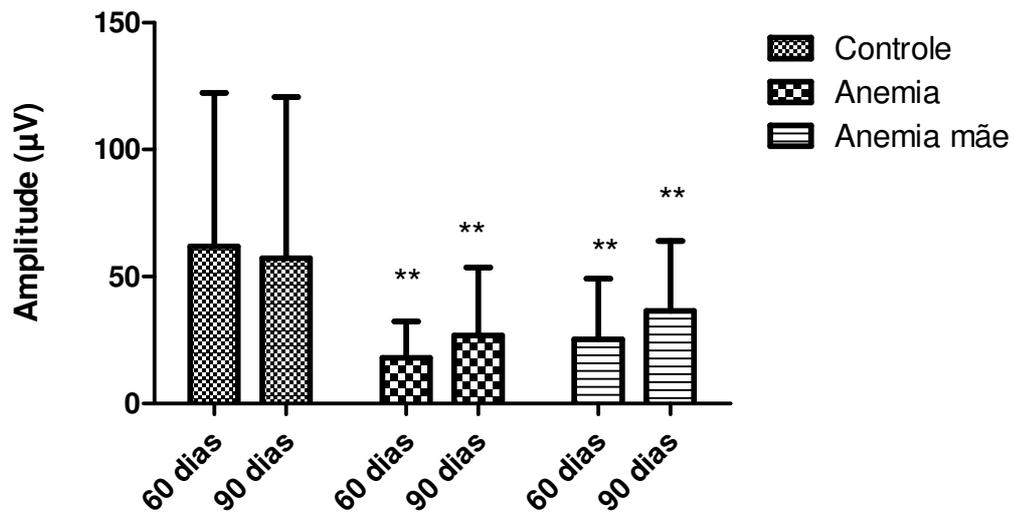


Figura 14

Figura amplitude da onda-b em resposta escotópicas mista 1 aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via com pós teste de *Tukey*, $* < 0.05$ em relação ao grupo controle, os resultados foram significativos nos grupos anemia e anemia mãe em ambos períodos.

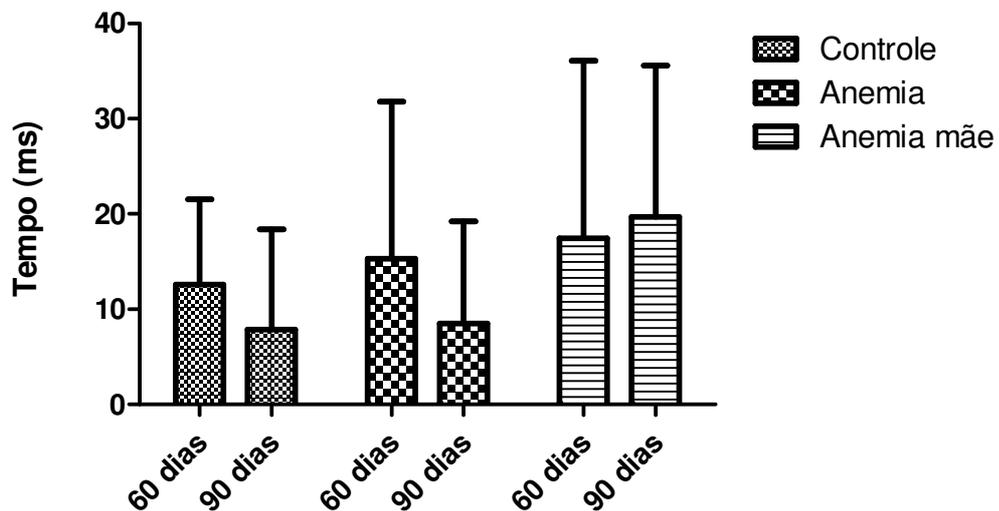


Figura 15

Tempo implícito da onda-b em resposta escotópicas mista 1 aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$ em relação. Não foram apresentadas diferenças significativas

Resposta escotópica (Mista 2)

Os dados a seguir são referentes a amplitude da onda B da resposta mista 2 (cones e bastonetes), na qual é utilizado estímulo com intensidade de 10, 215 cd.s/m². Em relação a amplitude, não houveram diferenças significativas aos 60 e 90 dias de experimento nos grupos estudados (tabelas 9 e 10, figuras 16 e 17)

Em relação ao tempo implícito, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados aos 60 e 90 dias.

Tabela 9

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta escotópica mista 2

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	105,70 ± 23,70	105,50 ± 26,31	107,80 ± 40,10
90 dias	99,64 ± 16,70	63,74 ± 8,18	127,40 ± 40,64

Tabela 10

Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda B em resposta escotópica mista 2

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	18,66 ± 5,49	27,140 ± 3,12	36,920 ± 1,11
90 dias	14,18 ± 0,77	15,440 ± 0,39	21,950 ± 3,931

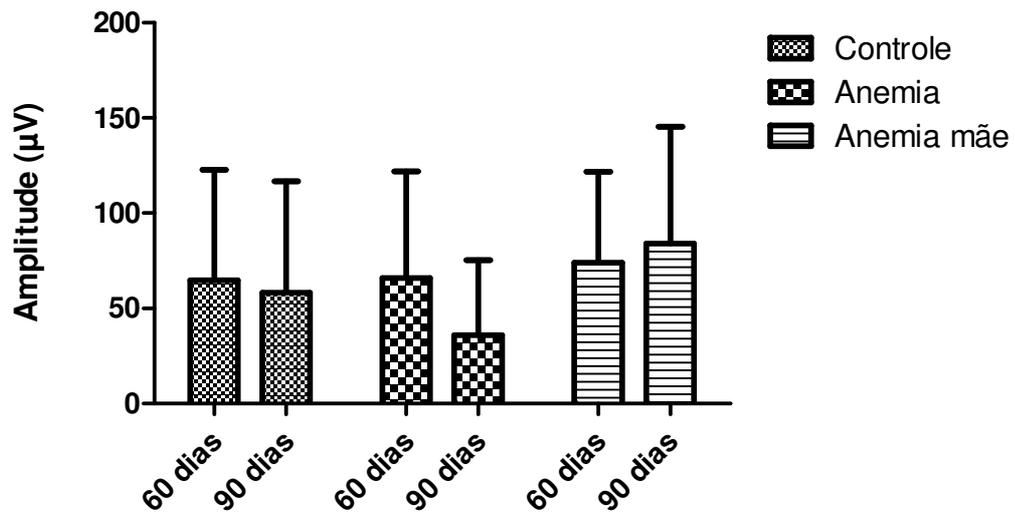


Figura 16

Amplitude da onda-b em resposta escotópica mista 2 aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $< 0,05$. Não foram apresentadas diferenças significativas.

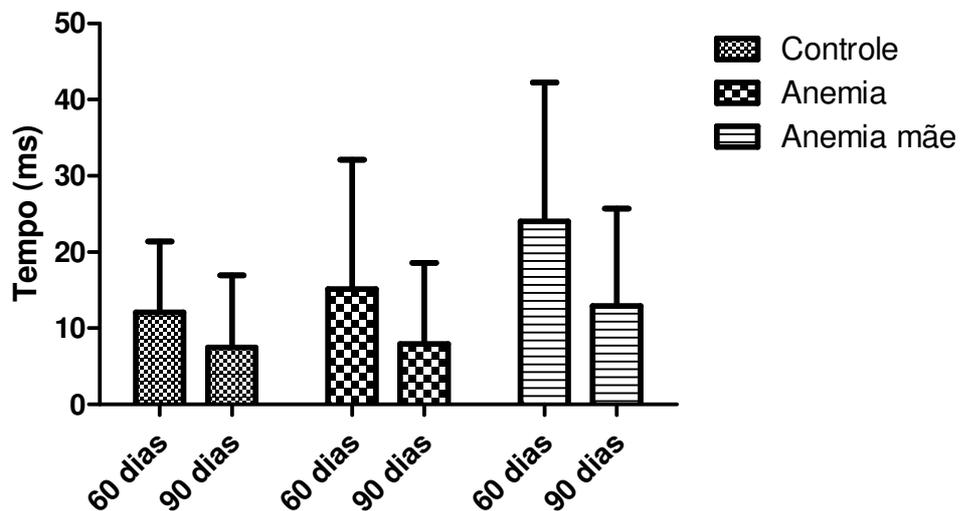


Figura 17

Tempo implícito da onda-b em resposta escotópicas mista 2 aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram apresentadas diferenças significativas.

Resposta Fotópicas

Resposta fotópica de cones

Em relação as respostas de cone, foram encontradas diferenças significativas em ambos os períodos de 60 e 90 dias e o as diferenças relacionaram-se aos grupos controle e anemia. Em relação ao tempo implícito, não houve diferença significativa entre os grupos nos testes realizados nos períodos de 60 e 90 dias. (tabelas 11 e 12, figuras 18 e 19)

Tabela 11

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda A em resposta fotópica de cones

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	118,20 ± 32,11	39,85 ± 12,74	53,74 ± 16,4
90 dias	122,50 ± 39,89	25,99 ± 5,11	67,80 ± 15,8

Tabela 12

Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda A em resposta fotópica de cones 1 Hz

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	18,16 ± 3,53	13,61 ± 1,62	18,76 ± 0,73
90 dias	28,29 ± 1,30	30,85 ± 1,11	81,30 ± 4,21

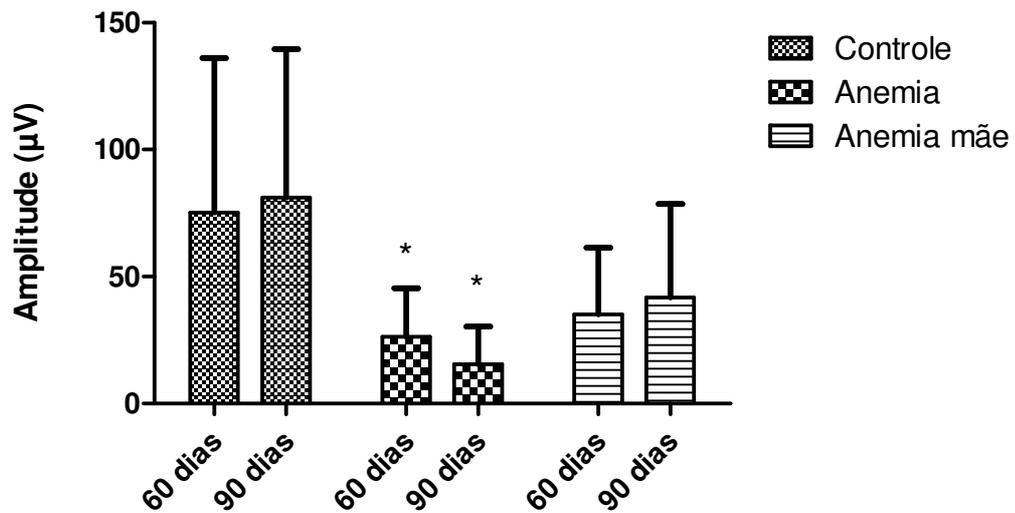


Figura 18

Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cones 1 Hz aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Foi observada diferença significativa do grupo anemia em relação ao grupo controle

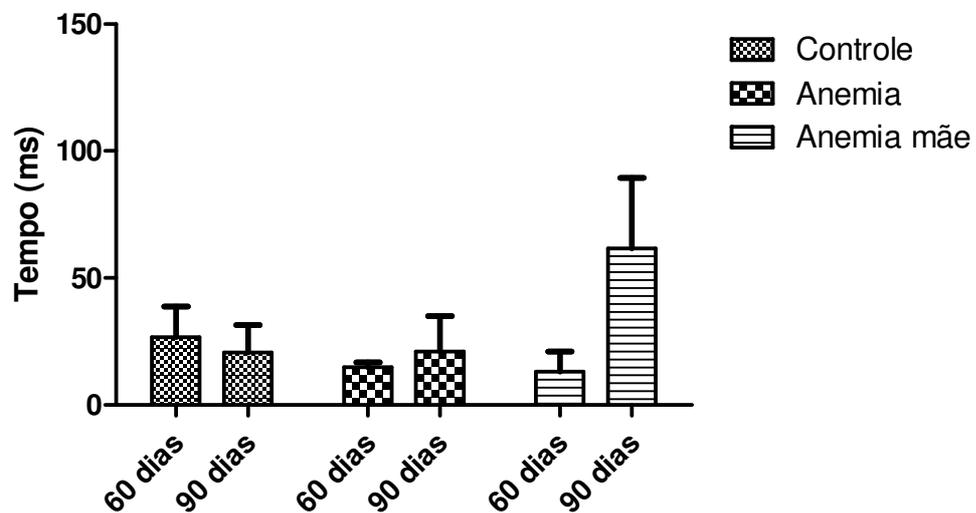


Figura19

Tempo implícito da resposta de cone 1 Hz aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram apresentadas diferenças significativas.

Resposta fotópica de cones UV

Em relação as respostas de cone UV, foram encontradas diferenças significativas em ambos os períodos de 60 e 90 dias e o as diferenças pautaram-se no experimento aos 60 dias, onde a houve significância nos grupos anemia e anemia mãe, comparados ao grupo controle e aos 90 dias, as diferenças mostraram-se relacionadas aos grupos controle e anemia. (tabelas 13 e 14, figuras 20 e 21)

Tabela 13

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda A em resposta fotópica de cones UV

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	108,20 ± 21,82	36,64 ± 9,09	33,86 ± 16,64
90 dias	131,70 ± 36,93	31,04 ± 4,83	71,12 ± 16,77

Em relação ao tempo implícito, houve diferença significativa aos 90 dias entre os grupos anemia e anemia mãe.

Tabela 14

Médias e desvio padrão do tempo implícito de onda A em resposta fotópica de cones UV

	Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	18,46 ± 4,76	15,44 ± 1,638	19,19 ± 1,929
90 dias	14,84 ± 0,98	13,35 ± 1,189	18,73 ± 1,807

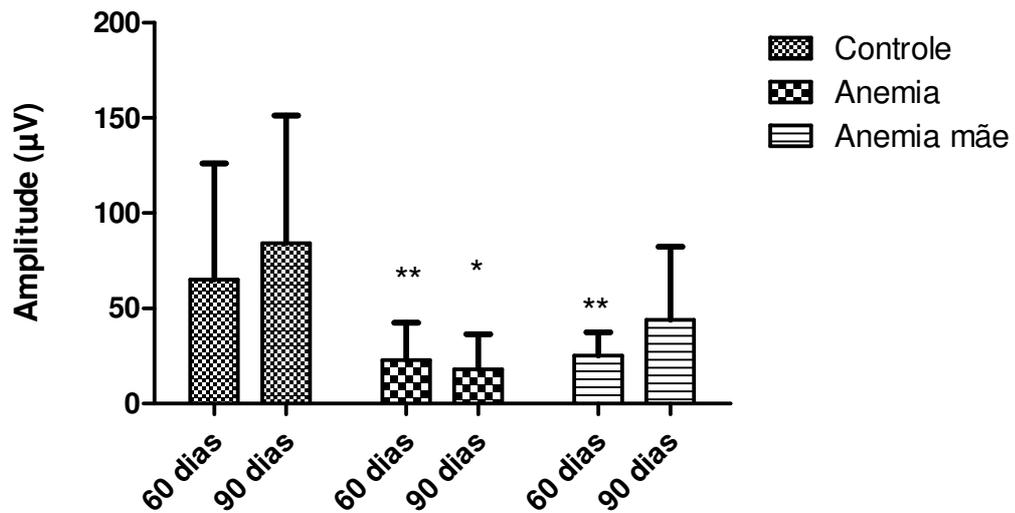


Figura 20

Amplitude da onda-a em resposta fotópicas de cone UV aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via com pós-teste de *Tukey*, $* < 0.05$.

Foram encontradas diferenças nos grupos controle e anemia, em relação ao grupo controle aos 60 dias do teste e aos 90 dias, houve diferenças entre os grupos anemia e controle aos 90 dias.

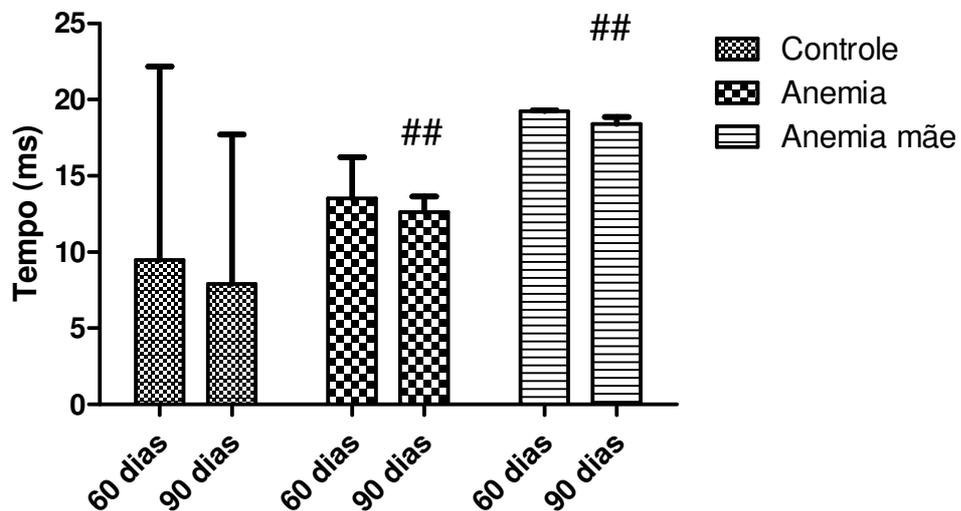


Figura 21

Tempo implícito da onda-a em resposta fotópica de cone UV aos 60 e 90 dias de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0,05$. Foram encontradas diferenças significativas aos 90 dias nos grupos anemia e anemia mãe, comparadas entre os mesmos.

Resposta fotópica de Flicker 12, 18, 24 e 30 Hz

As respostas fotópicas de Flicker evidenciaram diferenças significativas nos testes para 18, 24 e 30 Hz. Não foi observado grau de significância nos testes com 12 Hz no 60° e 90° dias de teste. No entanto, os testes com frequência para 18, 24 e 30 Hz mostraram diferenças nos grupos anemia e anemia mãe comparados ao grupo controle, quando os testes foram realizados no 60° dia de vida do animal. (tabelas 15 e 16, figuras 22 e 23)

Tabela 15

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta fotópica de Flicker 12, 18, 24 e 30 Hz

		Controle	Anemia	Anemia mãe
	12 Hz	80,50 ± 15,43	50,75 ± 12,64	44,69 ± 10,67
60	18 Hz	99,60 ± 23,70	25,12 ± 5,62	38,37 ± 7,10
dias	24 Hz	83,43 ± 17,29	22,46 ± 8,387	29,41 ± 9,67
	30 Hz	124,20 ± 13,26	14,44 ± 3,25	27,13 ± 5,51
	12 Hz	166,90 ± 30,39	38,02 ± 6,38	97,44 ± 32,54
90	18 Hz	132,30 ± 4,90	29,10 ± 9,01	80,88 ± 24,05
dias	24 Hz	143,30 ± 45,65	61,36 ± 13,20	55,59 ± 29,46
	30 Hz	121,70 ± 38,17	41,80 ± 5,90	32,72 ± 11,400

Foram encontradas alterações pertinentes aos 60 dias nos grupos anemia e anemia mãe e aos e 90° dia de teste somente para o grupo anemia para a frequência de 18 Hz. Na frequência de 24 Hz, foram encontradas alterações nos grupos anemia e anemia mãe no 60°

dia de teste e diferença entre os grupos anemia e anemia mãe no 60° e 90° dia de teste para a frequência de 30 Hz. Foram atribuídos graus de significância para $p < 0,05$.

Em relação ao tempo implícito, houve diferenças significativas nos testes de 12 Hz aos 60 dias de teste, no qual aparecem diferenças entre o grupo controle e anemia e entre os grupos anemia e anemia mãe. Aos 90 dias de teste, a frequência de 24 Hz evidenciou alteração significativa entre os grupos controle e anemia mãe

Tabela 16

Médias e desvio padrão do tempo implícito (ms) de onda B em resposta fotópica de Flicker 12, 18, 24 e 30 Hz

		Controle	Anemia	Anemia mãe
60 dias	12 Hz	14,25±0,92	30,75 ± 3,30	18,47 ± 0,54
	18 Hz	36,23 ± 0,021	32,08 ± 4,31	20,06 ± 1,75
	24 Hz	30,02 ± 0,01	29,70 ± 3,49	17,97 ± 1,36
	30 Hz	16,08 ± 0,83	17,36 ± 3,13	17,96 ± 0,52
90 dias	12 Hz	18,50±0,17	21,69 ± 4,65	22,14 ± 4, 53
	18 Hz	24,88 ± 0,23	19,55 ± 3,02	28,06 ± 6,70
	24 Hz	15,99 ± 0,37	20,16 ± 2,58	28,40 ± 3,87
	30 Hz	33,57 ± 0,01	27,11 ± 9,57	29,52 ± 6,54

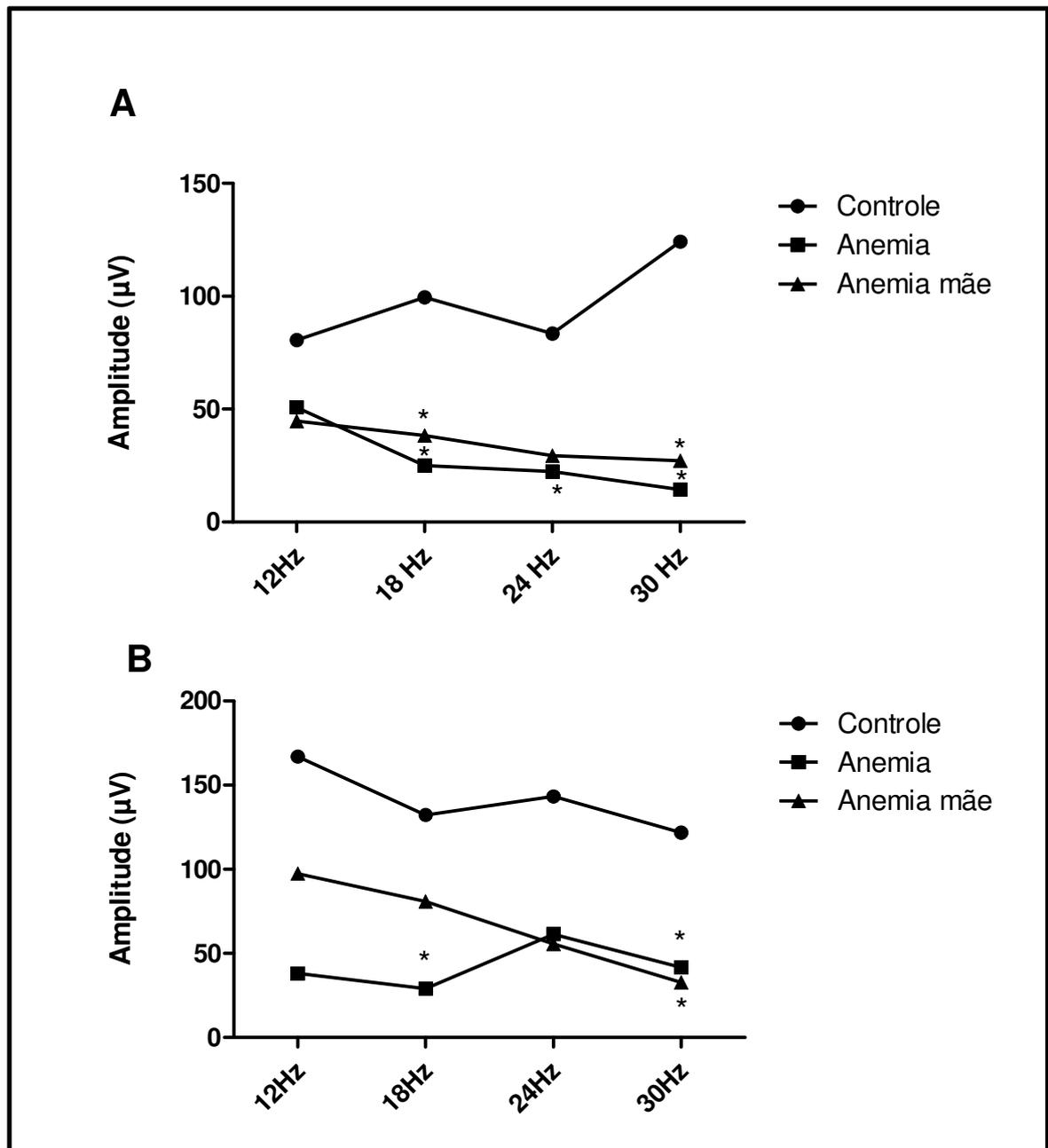


Figura 22

Amplitudes da onda-b em resposta fotópicas de Flicker de 12, 18, 24 e 30 Hz, aos 60 dias (A) e 90 dias(B) de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Foram apresentados resultados significativos aos 60 dias (A), para respostas de Flicker, 18, 24 e 30 Hz nos grupos anemia e anemia mãe, comparados ao controle e em (B), os grupos anemia e anemia mãe apresentaram diferenças comparadas ao grupo controle em respostas de Flicker de 18 e 30 Hz.

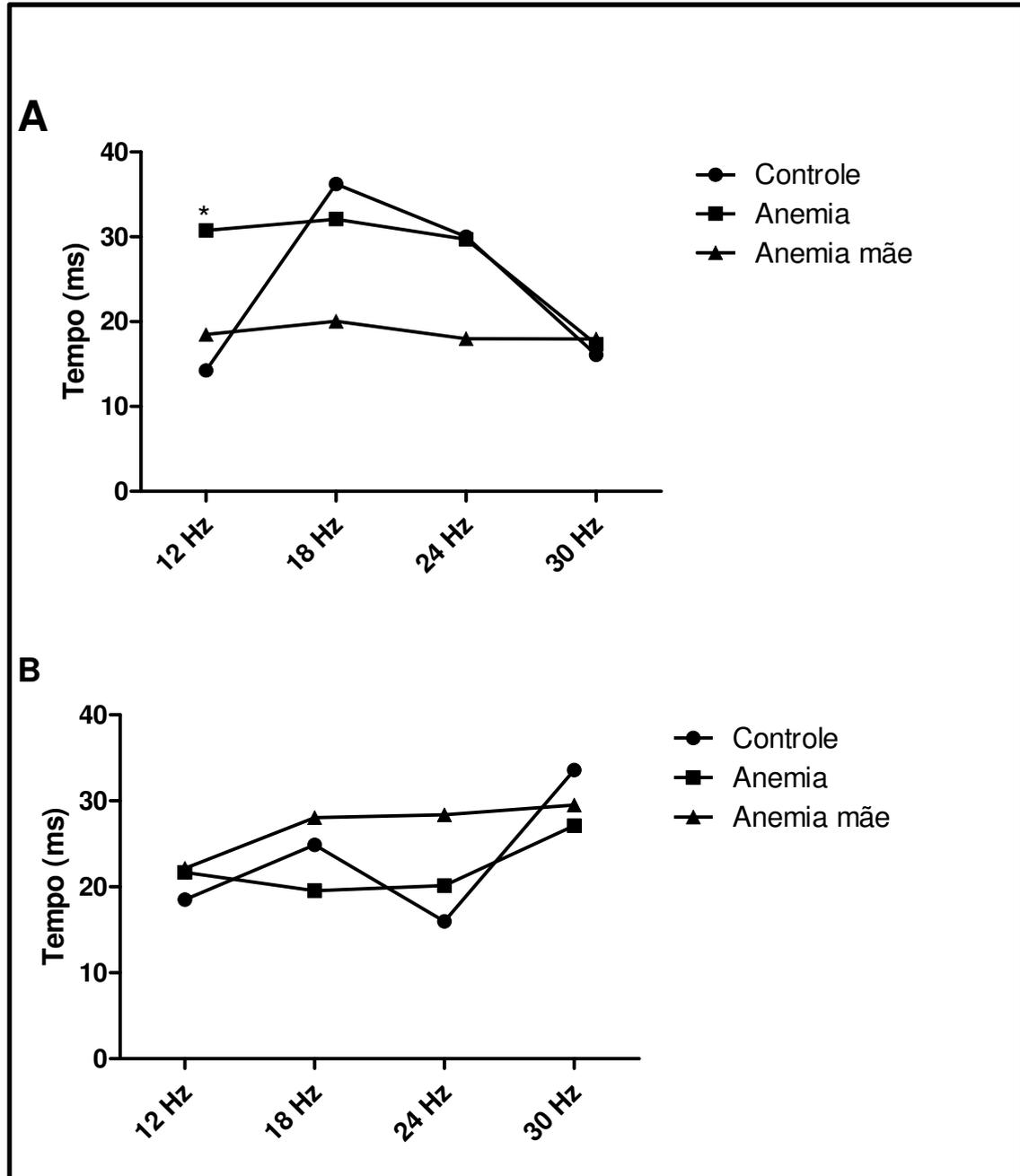


Figura 23

Tempo implícito da onda-b em resposta fotópicas de Flicker de 12, 18, 24 e 30 Hz, aos 60 dias (A) e 90 dias(B) de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Foi encontrada significância na resposta de 24 Hz aos 90 dias (B), em que houve diferença entre o grupo controle e anemia mãe.

Padrão dos registros dos animais do estudo

Nos padrões de registros, foram detectados principalmente redução da amplitude reduzido aos 60 e 90 dias de experimento, sendo encontrado tanto em respostas escotópicas e fotópticas. Tal diferença pode ser atribuída ao percurso da anemia nos grupos de animais estudados. Os graus de significância nos experimentos podem ser sintetizados na tabela 17 e os registros de respostas encontram-se exemplificados nas figuras 22, 23, 24, 25 e 26.

Tabela 17

Relação do grau significância e respostas do ERG full-field

	Amplitude		Tempo implícito	
	60 dias	90 dias	60 dias	90 dias
Bastonete	Não	Sim*	Sim#	Não
Mista 1 onda B	Sim **	Sim**	Não	Não
Mista 2 onda B	Não	Não	Não	Não
Cone 1 Hz	Sim *	Sim*	Não	Não
Cone azul 1Hz	Sim **	Sim*	Não	Sim ##
Flicker 12 Hz	Não	Não	Sim */##	Não
Flicker 18 Hz	Sim **	Sim*	Não	Não
Flicker 24 Hz	Sim**	Não	Não	Sim #
Flicker 30 Hz	Sim **	Sim**	Não	Não

*Diferenças encontradas entre os grupos controle e anemia

** Diferenças encontradas nos grupos anemia e anemia mãe comparadas ao controle

#Diferença encontrada entre os grupos controle e anemia mãe

#Diferença entre os grupos anemia e anemia mãe

Resposta escotópica

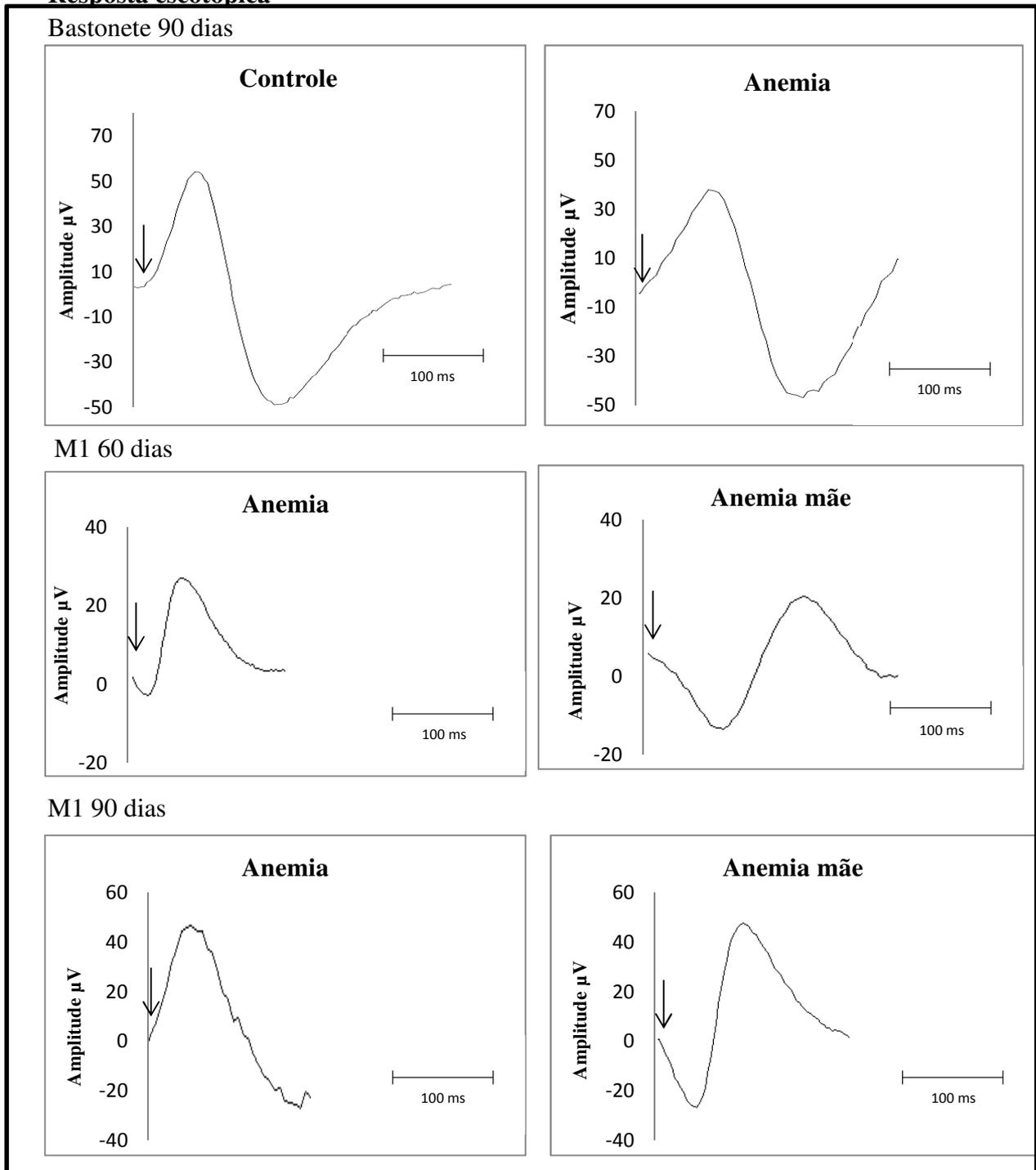
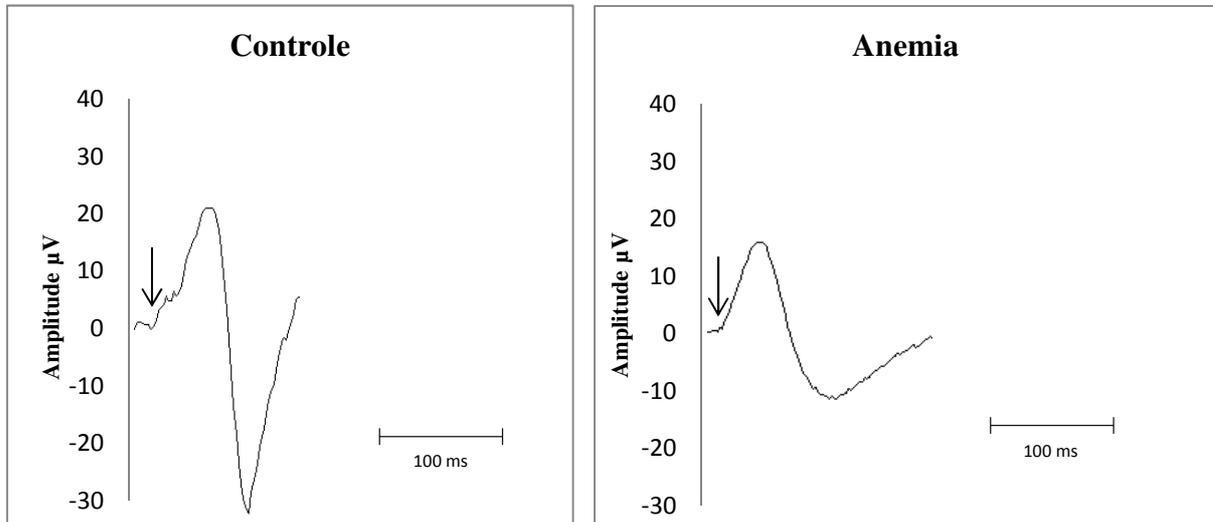


Figura 24

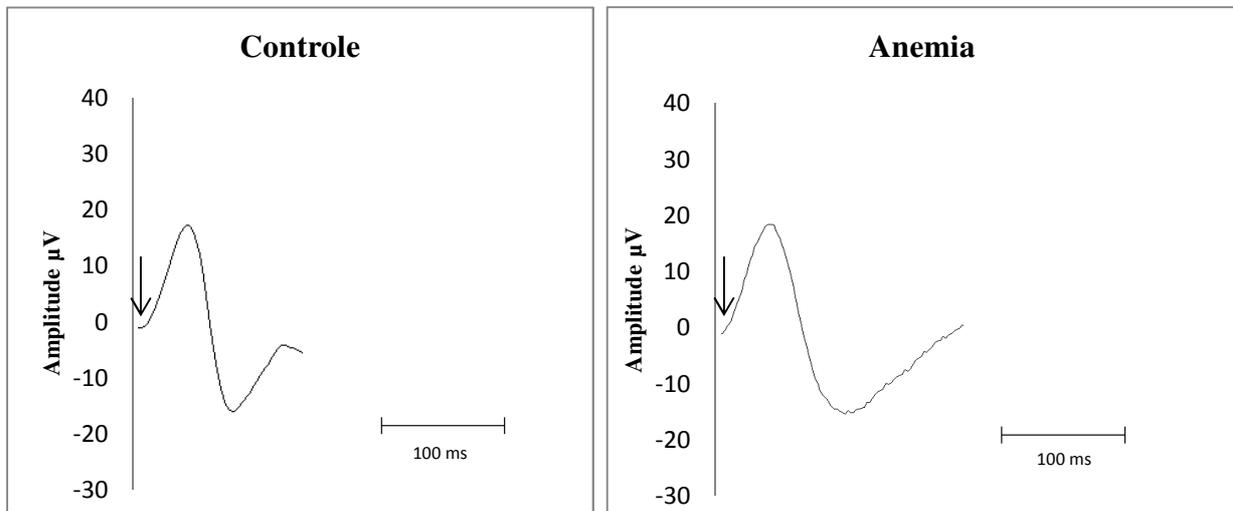
Registro de resposta escotópica de bastonetes e Mista 1. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início da resposta

Respostas fotópica – cones 1 Hz

Cones 1 Hz 60 dias



Cones 1Hz 90 dias

*Figura 25.*

Registro de resposta fotópica de cones 1 Hz. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início da resposta

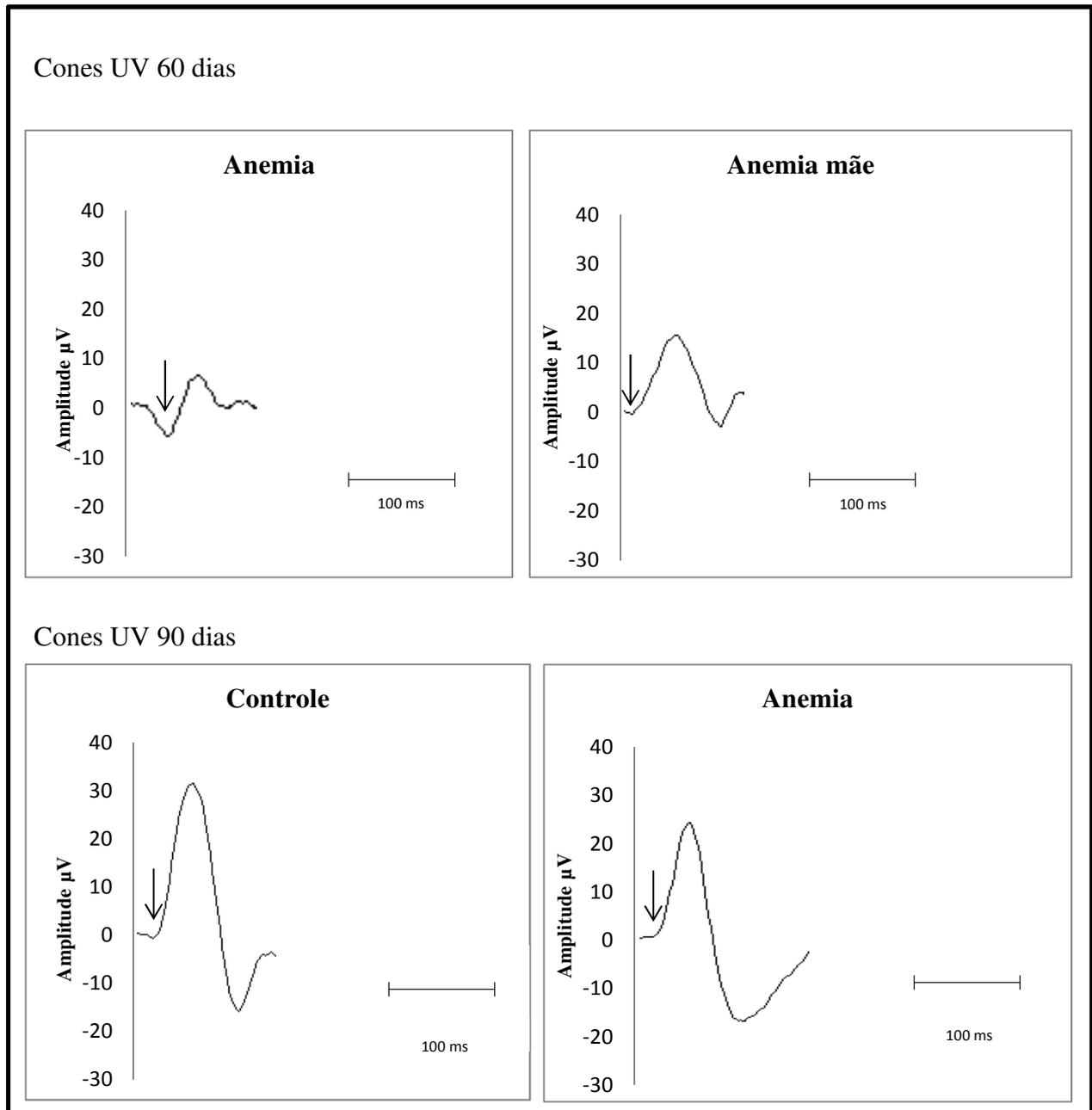
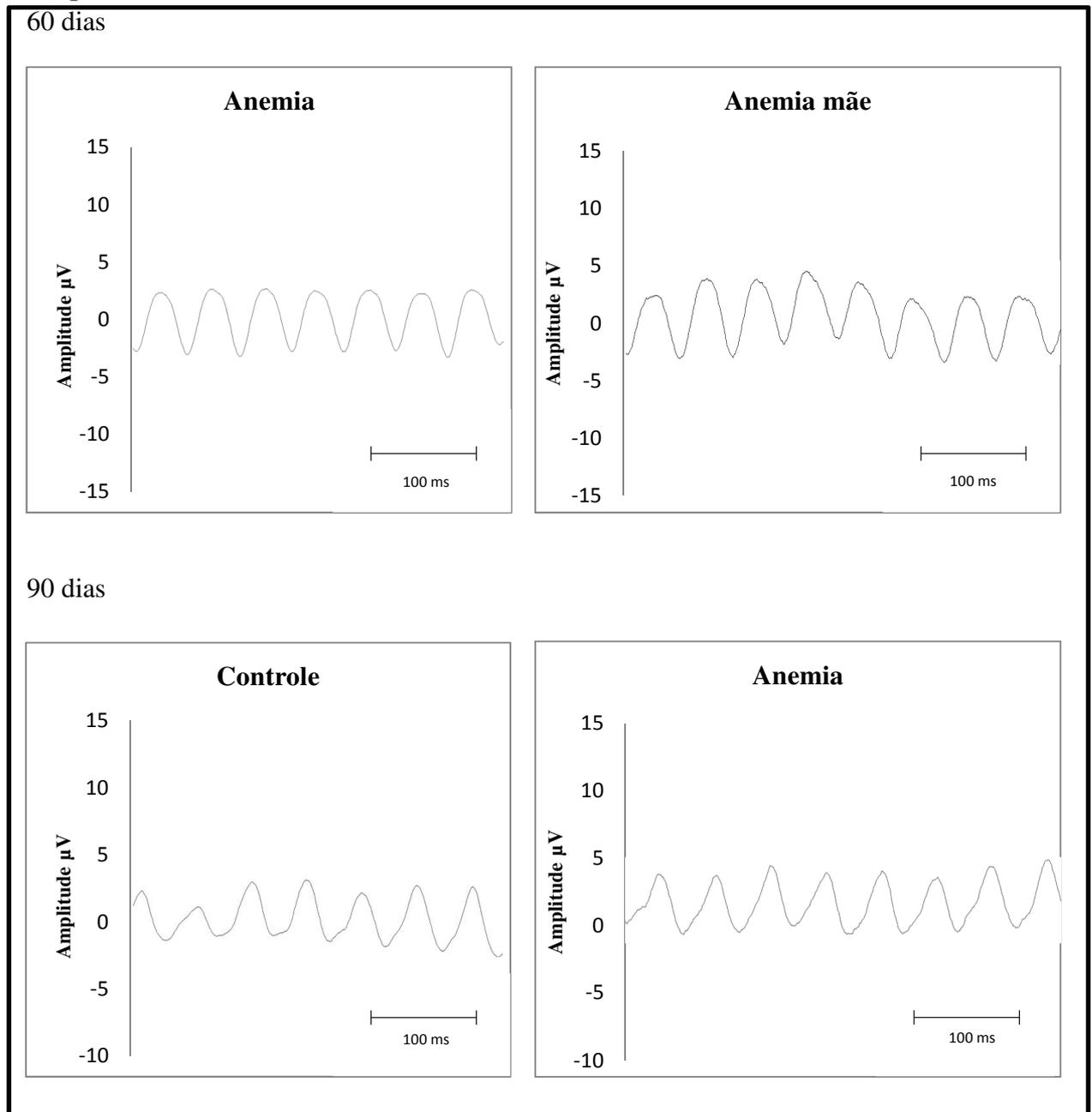
Respostas fotópica – cones UV

Figura 26

Registro de respostas fotópica de cones UV. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início da resposta

Respostas de Flicker – 18 Hz*Figura 27*

Registro de respostas de Flicker 18 Hz. As figuras são mostradas para melhor compreensão. A seta indica o início da resposta

Respostas de Flicker – 24 e 30 Hz

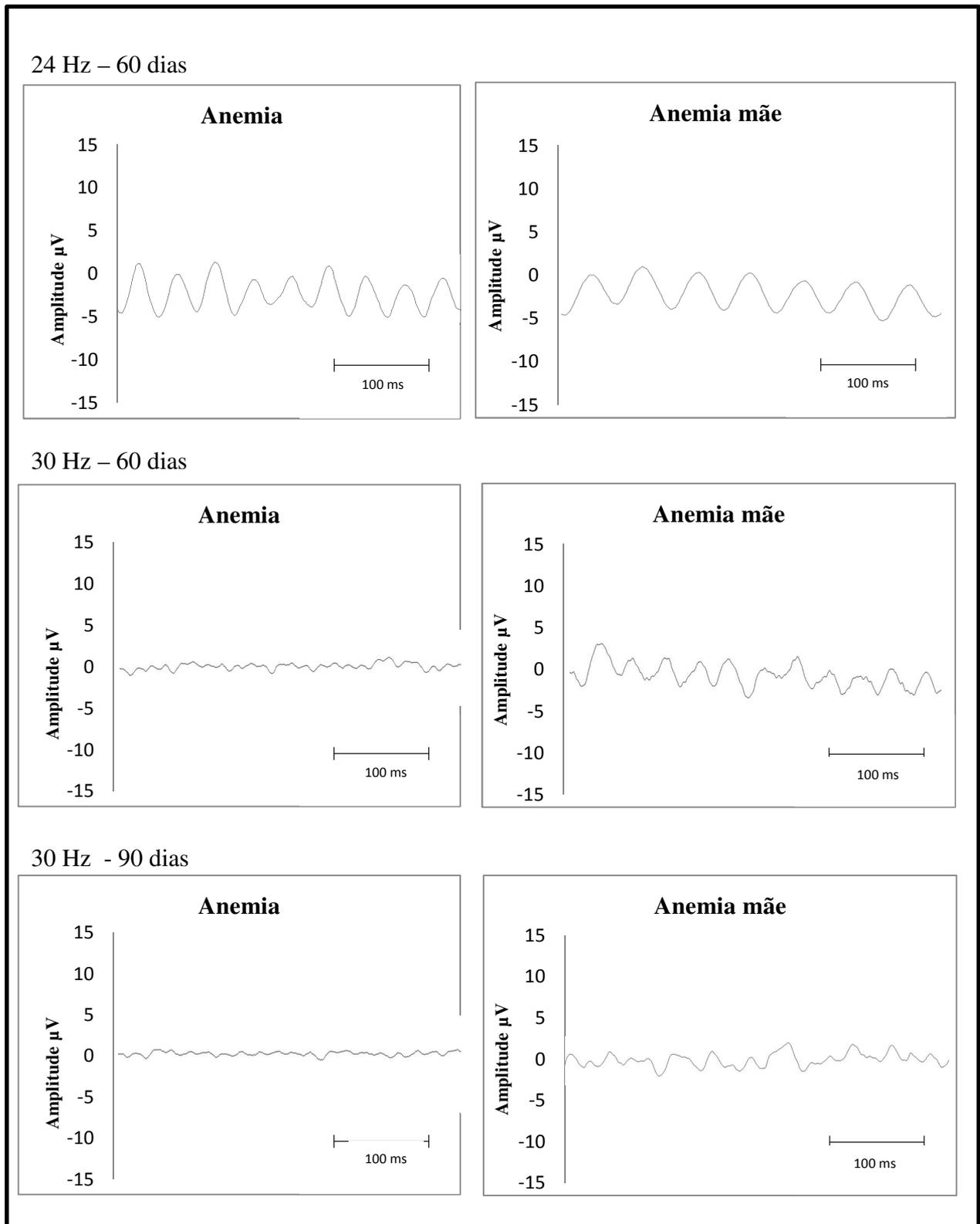


Figura 28

Registro de respostas de Flicker 24 e 30 Hz. As figuras são mostradas para melhor compreensão.

Resultados dos testes comportamentais

A taxa de respostas de pressão a barra foram monitoradas através de protocolo próprio, idealizado pela pesquisadora, no qual obteve-se dados referentes a razão entre os número de eventos brutos, com intervalos de 5 minutos, sendo a sessão totalizada em 10 minutos. O peso corporal também foi avaliado, a fim de investigar se houve alguma correlação entre a massa corporal, as taxas e as fases dos testes comportamentais, totalizando 16 sessões. As taxas de reposta foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA uma via, com pós-teste de Tukey, atribuindo valores de $p < 0,05$.

Tabela 18

Médias e desvio padrão de taxas de pressão a barra, ingestão de água, peso e sessões experimentais.

	Pressões a barra	Ingestão de água	Peso	Sessões
Controle (GC)	2,39 ± 0,112	1,95 ± 0,40	22,82 ± 1,81	4,5 ± 0,5
Anemia aprendizagem I	5,32 ± 1,421	2,74 ± 1,493	44,29 ± 2,70	7,5 ± 0,50
Anemia aprendizagem II	2,11 ± 0,025	1,90 ± 0,13	18,80 ± 0,10	5 ± 0,50
Anemia mãe	2,53 ± 0,29	2,19 ± 0,21	35,90 ± 2,50	5,5 ± 0,5

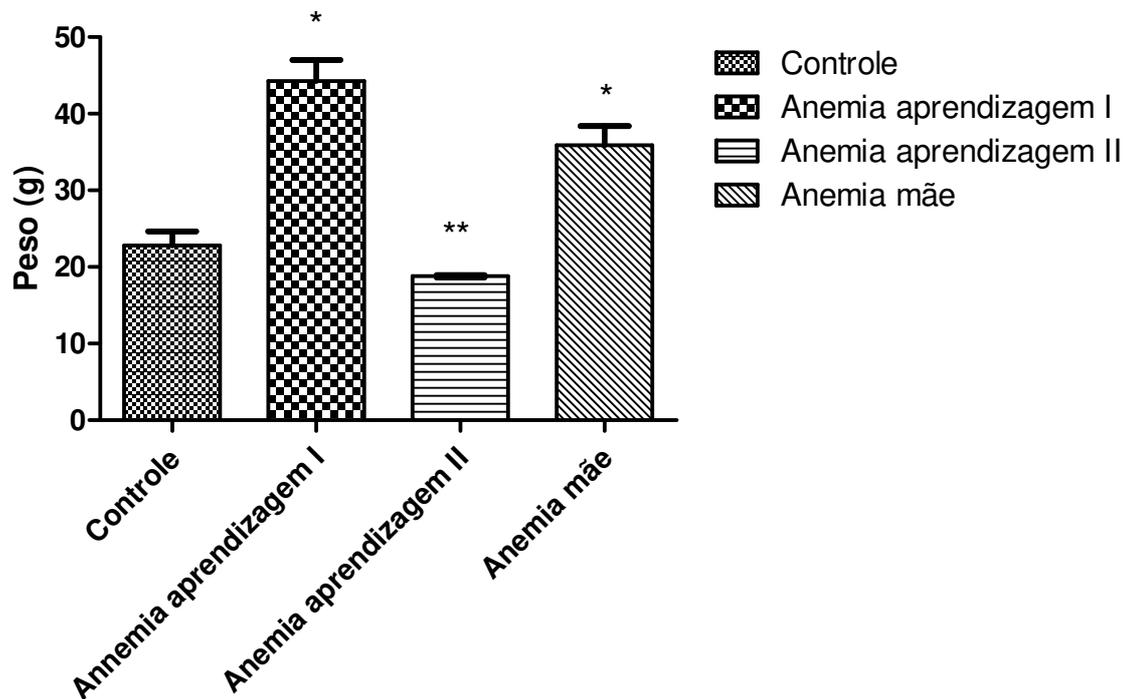


Figura 29

Média da massa corporal dos animais nos grupos comportamentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Observou-se que houve significância entre as médias da massa corporal, com valores significativos do grupo anemia aprendizagem I e anemia mãe comparado ao grupo controle e os grupos anemia aprendizagem I e II mostraram resultados significativos comparados ao grupo anemia mãe.

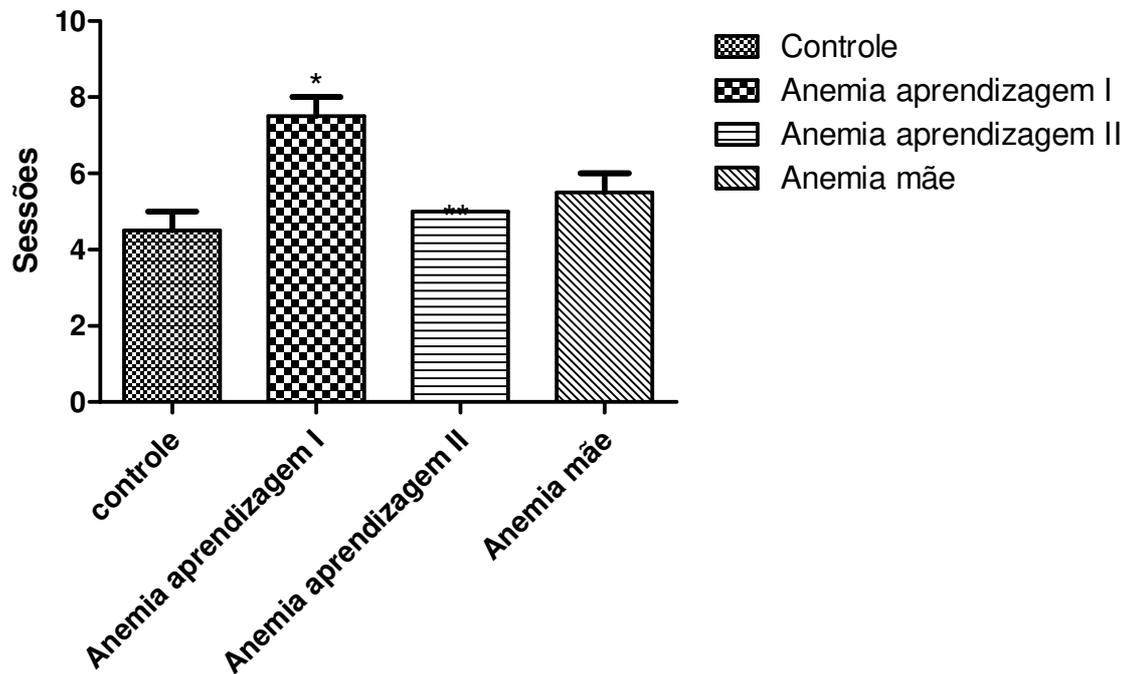


Figura 30

Número de sessões necessárias para transição da fase de treino de resposta ao bebedouro para intermitente 2 e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

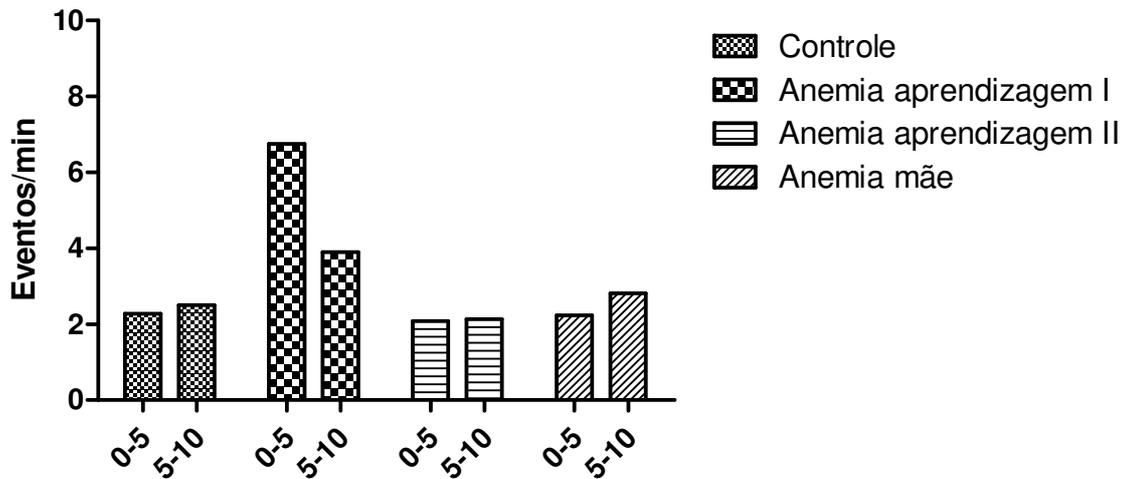


Figura 31

Taxas de respostas de pressão a barra por intervalos de cinco minutos e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

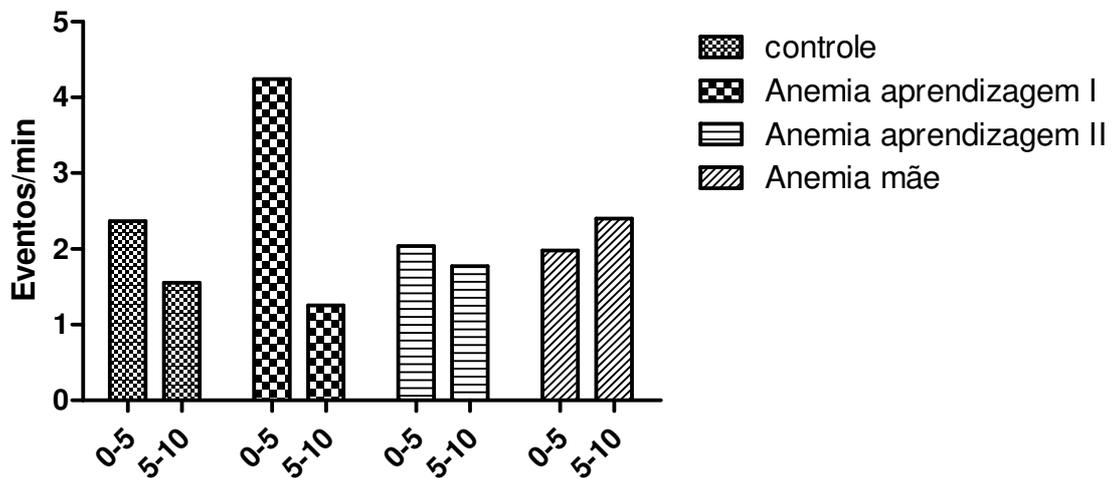


Figura 32

Taxas de respostas ingestão de água por intervalos de cinco minutos e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir deste estudo ratificam que o modelo experimental da patologia apresenta viabilidade em sua execução, embora ainda não seja abordado com muita frequência pela literatura, pois as pesquisas utilizam-se de modelos experimentais isoladamente, principalmente em relação a roedores e o modelo escolhido depende da finalidade do estudo.

Para a indução de uma anemia ferropriva, existem dois principais métodos para a indução. O primeiro está relacionado a anemia nutricional, com a ingestão de ração pobre em ferro, conforme descrito nos trabalhos de Barbosa, (2013) e De Mamman (2008), vantajoso pelo baixo grau de invasividade e da anemia de inflação crônica, que podem ser ocasionadas por doenças inflamatórias no intestino, por exemplo (Rivera & Ganz, 2009). Os eventos isquêmicos nestas duas situações possuem repercussões na anemia e tendem produzir resultados diversos. Por exemplo, fator nutricional, ou seja, deficiência de ferro / B12 / fosfato tem consequências de longo alcance no corpo além da anemia por reduzido transporte de oxigênio, que também pode ser enquadrado como deficiência de ferro. As doenças inflamatórias tendem a apresentar uma evolução e consequências aos sistemas.

O sistema imunológico em eventos isquêmicos pode ser agravado por mais reação autoimune, elevando a produção de hemácias atípicas, levando a uma combinação de isquemia e anemia, tornando-se um meio efetivo para indução da anemia nestes animais, uma vez que se tem assegurado o período de início e fim de ingestão da droga, comparado a outros procedimentos que deixariam dúvidas com relação a eficácia do modelo.

O modelo experimental, como descrito nos resultados, foi confirmado pelo baixo número de hemácias e hemoglobina nos animais e o aumento do peso corporal em 15% do peso inicial antes da indução pelo DSS5%, presença de fezes amolecidas e em maior quantidade, como foi descrita no trabalho de Watts & Harris (2014). Outro diferencial no nosso estudo foi o fato dos animais não entrarem em eutanásia após a ingestão do DSS 5% e

do teste eletrofisiológico contínuo, após a indução. Durante o estudo, os animais evoluíram de forma satisfatória, pois nenhum morreu por efeito imediato da droga ou efeitos colaterais. Foi observado que alguns destes apresentavam uma constituição corporal maior comparado a outros animais mais velhos, dos demais grupos da pesquisa, que pode ser uma proposta de um monitoramento acerca da massa corporal de animais anêmicos em futuras investigações.

Ainda sobre os efeitos biológicos, no período do experimento, foi observado que o grupo anemia obteve uma progressão no ganho de massa corporal mais lento, pois os mesmos ainda tiveram seus pesos monitorados anteriormente ao início dos testes comportamentais.

Os animais provenientes do grupo anemia mãe nasceram em estrutura corporal menor do que observados nos grupos controle e anemia. Nesse caso, o estudo não contou com nenhum protocolo que salvaguardasse a mensuração do tamanho dos camundongos e a observação deste fenômeno consta inicialmente como um relato observado durante o experimento. No entanto, o estudo de Rodriguez, Szarfacs & Benicio (2009) mostra essa correlação em crianças nascidas de mães anêmicas, pois tendem a desenvolver pouca estatura, observando os parâmetros considerados para o desenvolvimento típico de crianças sem nenhum agravo a saúde.

Durante o período dos experimentos, alguns animais apresentaram perda de pêlos e algumas alterações na pele, principalmente na cabeça, como se fossem pequenas mutilações/ferimentos na região da face e nas orelhas, que não se caracterizava por uma lesão de qualquer outra origem que o animal tenha vindo a ser acometido (por ex. briga entre animais). Procurou-se investigar na literatura se esse fato seria um possível efeito colateral da indução do DSS 5%, no entanto, nada foi constatado na literatura pesquisada, ponto que merece uma melhor investigação em futuras pesquisas.

O nosso estudo evidenciou alteração na resposta escotópica de bastonetes aos 90 dias e mista¹ aos 60 e 90 dias de experimento como também nas respostas fotópicas de cone e

respostas de Flicker de 18, 24 e 30 Hz. Esses resultados demonstram a diminuição da função retiniana (sinalização ERG) obtida no modelo DSS aguda de colite e a patologia causando diminuição nas amplitudes de onda a, onda b e respostas de Flicker e atraso no tempo implícito, conforme observado nas pesquisas de Watts & Haris (2014).

No estudo de Watts *et al.*, (2013), foi relatado que em camundongos colícticos no modelo experimental de inflamação crônica do intestino foi observada alterações tanto na amplitude e/ou no tempo implícito de nos registros escotópicos e fotopicos do do ERG / potencial oscilatório, (sendo especificado os potenciais oscilatórios de 0,1, 1, 4 e 16 Hz), indicando possível disfunção neuronal em múltiplas camadas da retina. Uma diminuição do fluxo sanguíneo da retina pode dificultar a função visual. Houve alteração significativa das ondas a e b, no entanto, em menor proporção, comparados a estudos que envolvem isquemia retiniana. Vale ressaltar que nenhum dos trabalhos foi observado investigação em cones UV, portanto, não obtivemos parâmetros para analisar nossos achados.

Conforme Block & Schwrsz (1998), as ondas b do eletrorretinograma apresentaram redução significativa, de aproximadamente 30% da sua amplitude quando os pesquisadores analisaram as ondas do ERG, utilizando cinco modelos experimentais de isquemia retiniana *in vivo*. Nesse estudo, os autores constataram que o grau de redução na amplitude da onda b durante a isquemia corresponda à gravidade dos danos ocasionados; o grau de recuperação da onda b durante a reperfusão depende da duração da isquemia e uma ocorre uma liberação maciça de glutamato, sobrecarregando o meio intracelular com a produção com cálcio e radicais livres, sendo que estes eventos são sugeridos como três principais processos fisiopatológicos que contribuem para as consequências da isquemia retiniana.

Para a continuidade do nosso estudo, é interessante uma investigação celular e molecular para se conhecer os efeitos adversos da anemia em camundongos, conferindo uma

maior complexidade ao estudo e investigar a influencia dos comportamentos externos ao organismo do animal, se há alguma correlação que interferira nos comportamentos desses eventos intracelulares.

Nas observações de Watts & Haris (2014), assim como no estudo colite crônica, os autores constataram diminuição das amplitudes da onda b, diminuição das amplitudes de potenciais oscilatórios e atraso nos mesmos. Entretanto, mudanças nas *ondas a* diferiram entre os dois modelos, com o modelo crônico causando um atraso nas *ondas a*, mas sem alteração nas amplitudes das mesmas, contrastando com a diminuição da amplitude da onda sem atraso no modelo DSS agudo.

Outro fator relacionado, segundo Watts & Harris (2014) é que a associação da diferença dos achados no ERG pode ser hipoteticamente decorrente do fornecimento inadequado de oxigênio na retina, em consequência a colite. Existem poucas investigações realizadas sobre essas vias desconhecidas e sua correlação com o estudo atual, pois acredita-se na hipótese que seja possível uma hipóxia possa levar ao estresse oxidativo. Além disso, e embora ainda não estudado, no entanto foi suposto que o complexo imune poderia desempenhar um papel na inflamação ocular encontrados em pacientes com DII.

Outro estudo afirma que a função visual pode ser prejudicada pela queda no hematócrito, com correlatos de diminuição da sinalização do ERG do animal anemia (Imai *et al.*, 2004), sendo esta uma condição que afeta 40% dos adultos com DII e 70% das crianças com DII e esses casos, torna-se indispensável uma exame do olho posterior desses pacientes, conforme foi descrito por Felekis *et al.* (2009), 8 de 26 pacientes com DII investigados em seu estudo apresentaram manifestações negativas relacionadas ao segmento ocular posterior, como coroidite, vasculite retiniana, neurite óptica, distúrbios do epitélio pigmentar da retina, ou desprendimento retiniano seroso.

Nossos resultados sugerem que a anemia é possivelmente um, mas não o único fator que contribui para a diminuição da função retiniana induzida por DSS. Embora mais dados sobre este contraste sejam necessários para interpretar esses achados, a comparação sugere que os efeitos da colite aguda nos fotorreceptores podem ser transitórios ou bifásicos ou possivelmente dependentes de mecanismos diferentes de inflamação de tecido distante entre os dois modelos de colite de ratos. Finalmente, a colite aguda induzida pela ingestão DSS influencia negativamente a função retinal avaliada pelo ERG, além de outros fatores concomitantes com a anemia podem desempenhar um papel importante na atenuação da função da retina neste modelo de colite aguda.

Um desses possíveis fatores adicionais que contribuíram para os resultados da diminuição da função retiniana neste estudo foi a ocorrência de situações estressoras vivenciada pelos animais durante os experimentos, com a colocação dos animais em período de *overnight* por cerca de 14 horas e a privação de água como etapa precedente aos testes na caixa de condicionamento operante. Em estudos de Deng *et al.*, (2016) , o estresse psicológico tem sido associado a doença gastrointestinal e recidiva de doenças inflamatórias do intestino. Nesse mesmo estudo, foi constatado que o estresse psicológico foi um fator agravante no percurso da colite induzida por DSS e foram observadas manifestações de erosões e ulcerações maciças da mucosa digestiva, infiltração de neutrófilos e aumento da permeabilidade epitélio. O estresse psicológico resultou em aumento expressivo das citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Para o nosso estudo, não foi possível constatar essa correlação, mas que é plausível supor a sua ocorrência com base no estudo supracitado. Esse pode ser um ponto a ser considerado em estudos futuros para testar essa hipótese.

Na etapa dos experimentos comportamentais, foram realizadas diversas adaptações para se chegar a um equipamento ideal para a realização dos testes. Esse delineamento deteve uma boa etapa da pesquisa, fato que repercutiu no número pequeno de

sessões experimentais efetivas durante o estudo. No entanto, fez-se necessário, uma vez que também procuramos utilizar tecnologias de baixo custo e ao garantir que o experimento fosse replicável em estudos futuros.

Uma das dificuldades presentes foi realizar toda a adaptação da caixa de modelo operante para o camundongo, uma vez que suas medidas são projetadas para roedores com um porte maior do que os animais que participaram do nosso estudo. Foram alteradas as medidas da caixa, reduzido a 50% do seu tamanho original, a colocação de uma tela de proteção no piso, que facilitou a mobilidade do animal na caixa; o rebaixamento da alavanca para o estímulo e o cuidado a utilização de um material leve, pois pela própria constituição corporal do camundongo, que aos 3 meses tem um peso médio de 32-35g, a força exercida pelo animal era insuficiente para acionar a alavanca e dispensar o reforço (água), sendo esse um ponto de grande atenção, pois não queríamos que a resposta fosse extinta ou caracterizasse, por exemplo, treino intermitente.

Outro fato observado foi a correspondência do peso e a atividade comportamental. Como foi possível acompanhar oito animais após os testes eletrofisiológicos, os animais com maior massa corporal possuíam uma melhor facilidade no acionamento da barra da caixa de condicionamento operante, fato observado principalmente no grupo que recebeu a indução por DSS. Nas primeiras sessões, embora esses animais acionassem facilmente a barra, foi observado que esse grupo necessitou de mais sessões para avanço na etapa de resposta de pressão a barra para treino intermitente, o que pode ser um indicativo de que a anemia dificultou a aprendizagem dos animais. Essa hipótese precisa ser verificada em estudos futuros.

Não houve diferença significativa entre as taxas de pressão a barra e ingestão de água, mas percebeu-se que as taxas apresentaram elevação nos primeiros 5 minutos que o animal estava na caixa, mostrando o interesse pelo elemento reforçador. As maiores taxas de

ingestão de água foram observadas no grupo anemia, encorajando a hipótese de que os animais com anemia necessitavam de uma maior ingestão de água. É possível que os animais tratados sofressem maior desidratação, no entanto, não foram encontrados correlatos na literatura.

Antes de adaptarmos o tempo de permanência do camundongo na caixa de condicionamento operante para 10 minutos, os animais realizavam os testes em 20 minutos, de acordo com protocolos vigentes de experimentação para ratos.

Em relação ao tempo de aprendizagem, a pesquisa evidenciou que os animais tratados necessitaram de um número maior de sessões para avançarem na etapa de CRF para o treino de intermitência razão 2. Em pesquisas realizadas por Grantham-McGregor & Ani (2001) constatou-se que infantes que possuem anemia são mais sensíveis a agravos no desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor, em decorrência dos comprometimentos de processos fisiológicos relativos à produção de hemoglobina e conseqüente baixo transporte de oxigênio ao cérebro, alterando a neurotransmissão e mielinização. Embora preliminares, nossos resultados encorajam novas pesquisas a respeito do efeito da anemia sobre a aprendizagem, pois os animais do estudo também se apresentavam numa fase crítica do desenvolvimento, que poderia comprometer o desenvolvimento de forma global.

No estudo, os animais do grupo anemia mãe não apresentaram maior tempo no aprendizado, fato que necessita de uma melhor investigação, pois segundo os achados de Felt, *et al.* (2006) acerca da anemia intrauterina, ratos com anemia ferropriva perinatal crônica apresentavam comprometimento comportamental, que sugerem disfunção persistente do dopamina estriatal e do hipocampo, apesar da normalização da hematologia, do crescimento e da maioria das medidas cerebrais.

Em geral, as alterações na dopamina estriatal estão relacionadas a disfunção motora, do prazer e na capacidade de memorização, enquanto que disfunções hipocampais

acarretam disfunção severa da memória. Dessa forma, acreditamos que tanto os animais provenientes de uma mãe anêmica quanto aqueles que foram acometidos pela anemia tendem a apresentar deficiências na cognição, desfavorecendo os processos de aprendizagem e memória e, pontos que merecem maior investigação em futuros trabalhos.

Nos minutos finais, saciados de água, os mesmos emitiam comportamentos de desinteresse pela água e dispersavam, explorando o ambiente da caixa e nessas sessões, acionando a barra, com o comportamento de subida e descida, disparando várias vezes. Temos a hipótese que o estímulo sonoro (clanct) também exerceu papel de reforçador durante a atividade na caixa. Tomarani (2000) afirma que eventos inicialmente neutros podem exercer um papel de função reforçadora, por meio do processo de aprendizagem. Em determinadas condições específicas, a associação entre um estímulo reforçador inicialmente estabelecido e um e um estímulo inicialmente neutro pode fazer com que o segundo exerça uma função reforçadora e esse fenômeno.

Uma vez que a câmara experimental já foi adaptada e o protocolo de treino já foi modificado para se adequar às peculiaridades dos camundongos, será interessante que estudos futuros deem continuidade à investigação da psicofísica visual de camundongos com anemia. Todavia, será prudente que sejam feitos antes estudos para verificar se a indução de anemia prejudica a aprendizagem nesses animais.

CONCLUSÃO

Com os resultados do nosso trabalho, pode-se observar que a anemia resultante de uma doença inflamatória do intestino – a colite aguda – pode ocasionar a perda da função visual de camundongos e dificuldade na aprendizagem durante a etapa de treino a resposta ao bebedouro.

O modelo experimental produzido em nosso laboratório é eficaz no estabelecimento da anemia, no qual foi possível identificar mudanças no eletrorretinograma semelhante a estudos anteriores.

A diminuição da função visual nos animais acometidos pela anemia foi evidente no período de 90 dias, que é crucial para o desenvolvimento destes animais, mostrando que a evolução da patologia agrava o sistema visual, comprometendo principalmente os grupos anemia e anemia mãe, dado este ainda não descrito na literatura científica.

Este estudo por ser lançado a uma proposta transdisciplinar, enfocando principalmente os níveis de análise das neurociências e análise experimental do comportamento, se torna um incentivo para futuras pesquisas, que investiguem comportamentos celulares e moleculares para fomentar uma compreensão mais global e fundamentada sobre os prejuízos que a anemia pode trazer não somente para o sistema visual e seu comportamento em camundongos jovens e em fase de crescimento e desenvolvimento, mas também investigar outras repercussões inerentes à patologia em outros sistemas e futuramente subsidiar estudos paralelos com humanos.

REFERENCIAS

- Andrade, A., Pinto, SC., & Oliveira, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6.
- Alencar, C. C. G. (2014). *Efeitos da desnutrição proteica na percepção do contraste e acuidade visual em humanos e ratos*. Dissertação de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Neurociência e comportamento, Universidade de São Paulo (90f).
- Assunção, M. C. F., Santos, I. F., Barros, A. J. D. Gigante, D. P., & Victória, C. G. (2007). Anemia em menores de seis anos: estudo de base populacional em Pelotas, RS. *Revista de Saúde Pública*, 41, 328-335.
- Barbosa, E. H. (2013). *Avaliação morfológica e morfométrica dos efeitos da estimulação tátil neonatal sobre o nervo óptico de ratos Wistar hípidos ou submetidos a uma dieta deficiente em ferro no período pós-natal precoce* (Dissertação de doutorado, Universidade de São Paulo).
- Barger, P. (2015). Anemia in Inflammatory Bowel Diseases is much more than Levels of Hemoglobin. *Journal Gastrointestin Liver Disease*, 24, 145-146.
- Block, F., & Schwarz, M. (1998). The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(3), 281-287.
- Brasil (2009). Ministério da Saúde. *Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher-PNDS 2006: dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança*.
- Brigell, M.; Bach, M.; Barber, C.; Kawasaki, K. & Kooijman, A. (1998). Guidelines for calibration of stimulus and recording parameters used in clinical electrophysiology of vision. Calibration Standard Committee of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV). *Documenta Ophthalmologica*, 95, 1-14.
- Cançado, R. D, & Langhi Junior, D (2012). Blood donation, blood supply, iron deficiency and anemia: it is time to shift attention back to donor health. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 34, 330-331.
- Callahan, L.S.N., Thibert, K.A., Wobken, J.D., & Georgieff, M.K., (2013). Early Life Iron Deficiency Anemia Alters the Development and Long-term Expression of Parvalbumin and Perineuronal Nets in the Rat Hippocampus. *Development Neuroscience* 35, 427–436.
- Catania, A. C. (1999). *Aprendizagem: comportamento, linguagem e cognição* (DG Souza, Trad.). *Porto Alegre: Artmed.*(Trabalho original publicado em 1998).
- Congdon, E.L., Westerlund, A., Algarin, C.R., Peirano, P.D., Gregas, M., Lozoff, B., & Nelson, CA (2013). Iron Deficiency in Infancy is Associated with Altered Neural Correlates of Recognition Memory at 10 Years. *The Journal of Pediatrics* 160, 1027 – 1033.
- Coren, S.; Ward, L.M., & Enns, J.T. (1994). *Sensation and perception*. Orlando: Harcourt Brace and Company.

- Costa, A. B. (2013). *Avaliação do efeito protetor da Euterpe oleracea (açai) na resposta eletrofisiológica da retina de ratos expostos ao metilmercúrio* (Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará).
- Dani C., Rossetto S., Castro S.M., & Wagner S.C. (2008) Prevalência da anemia e deficiências nutricionais, através de diferentes parâmetros laboratoriais, em mulheres grávidas atendidas em dois serviços de saúde pública no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40: 171-175.
- Da Silva Souza, A., & Abreu-Rodrigues, J. (2012). Extinção e estímulos independentes da resposta: efeitos de relações de não-contingência sobre o comportamento. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 25(4).
- De Camargo, R. M., Espinosa, M. M., Pereira, S. F., & Schirmer, J. (2013). Prevalência de anemia e deficiência de ferro: relação com índice de massa corporal em gestantes do Centro-Oeste do Brasil. *Medicina (Ribeirão Preto.)*, 46, 118-127.
- DeMaman A.S., Homem J.M., & José-Lachat, J. (2008). Early iron deficiency produces persistente damage to visual tracts in Wistar rats. *Nutritional Neuroscience*, 11, 283-289.
- Deng, Q., Chen, H., Liu, Y., Xiao, F., Guo, L., Liu, D. & Qi, S. (2016). Psychological stress promotes neutrophil infiltration in colon tissue through adrenergic signaling in DSS-induced colitis model. *Brain, behavior, and immunity*, 57, 243-254.
- Dobson, V & Teller, DY (1978). Visual acuity in humans infants: a review and comparison of behavioral and eletrophysiological study. *Vision Research*, 18, 1469-1483.
- Escott–Stump, S. (2011) *Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento*. 6ª ed. Barueri, SP. Manole.
- Felekis, T *et al.*, (2009) Spectrum and frequency ophthalmologic manifestations in patients with inflammatory bowel disease: a prospective single-center study. *Inflammatory Bowel Disease*, 15, 29–34.
- Felt, B. T., Beard, J. L., Schallert, T., Shao, J., Aldridge, J. W., Connor, J. R., ... & Lozoff, B. (2006). Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats. *Behavioural brain research*, 171(2), 261-270
- Gadelha, *et al.*(2010) *Sensibilidade ao contraste acromático para grades senoidais verticais em adolescentes e adultos*. *Psicologia: Teoria e Prática*, 12(1):59-70
- Garcia, V.D. (2012) *Visão de cores, sensibilidade ao contraste e eletrorretinograma multifocal em indivíduos com Diabetes Mellitus do tipo 1*. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Psicologia. Área de concentração Neurociência e comportamento. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- García-Castiñeiras, S. (2010) Iron, the retina and the lens: a focused review. *Expression Eye Research*, 90, 664–678.
- Georgieff, MK. (2011) Long-term brain and behavioral consequences of early iron deficiency. *Nutrition Reviews*, 69, 43-48.

- Georgieff, M.K. (2008). The Role of Iron in Neurodevelopment: Fetal Iron Deficiency and the Developing Hippocampus. *Biochemistry Society Transactions*, 36, 1267–1271.
- Goodhand J.R., *et al.* (2012). Prevalence and management of anemia in children, adolescents, and adults with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*; 18, 513–519.
- Grantham-McGregor, S., & Ani, C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *The Journal of nutrition*, 131(2), 649S-668S.
- Guagnozzi, D. & Lucendo, A.J. (2014) Anemia in inflammatory bowel disease: A neglected issue with relevant effects. *World Journal Gastroenterology*, 20, 3542–3551.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2011). *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier, 12ed
- Hansen, J. (2011). *Netter Atlas de Fisiologia Humana*. Elsevier Brasil.
- Heckenlively J. R. & Arden G.B. (2006). *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology*. 2^a ed. Massachusetts: Massachusetts institute of technology.
- Hisatomi, O., Yamamoto, S., Kobayashi, Y., Honkawa, H., Takahashi, Y., & Tokunaga, F. (2002). Evolution of Visual Pigments and Related Molecules. *Journal of Photoscience*, 9, 41-43.
- Histed, M. H., Carvalho, L. A., & Maunsell, J. H. (2012). Psychophysical measurement of contrast sensitivity in the behaving mouse. *Journal of neurophysiology*, 107(3), 758-765. Imai E,
- Kunikata H, Udono T, et al. (2004) Branch retinal artery occlusion: a complication of iron deficiency anemia in a young adult with a rectal carcinoid. *Tohoku Journal Exp Med.*; 203:141–144.
- Jacobs, G. H. (2009). Evolution of colour vision in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 2957-2967.
- Keller, J., Strasbruger, H., Cerutti, D.T., & Sabel, B.A., (2). Assessing spatial-vision automated measurement of the contrast sensitivity function in the hooded rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 97, 103-110.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., & Jassel, T.M. (2003) *Princípios da Neurociência*. 4a ed. São Paulo: Manole.
- Lima, M.G., Gomes, B.D., Ventura, D.F., & Silveira, L.C.L. (2011). Métodos utilizados na avaliação psicofísica da visão de cores humana. *Psicologia USP*, 22, 197-222
- Lozoff B., Beard J., Connor J., Felt B., Georgieff, M.K., & Schallert, T. (2006) Long-lasting neural and behavioral effects of early iron deficiency in infancy. *Nutrition Review*, 64, 34–43.
- Mata, N. L., Kubota, R., Schneider, S., Kissner, J., Birch, D. G., & Dugel, P. U. (2013). Pharmacodynamics of visual cycle modulation in the treatment of GA. *Retin Phys*, 10, 22-5.

- Marmor M.F., Hood, D.C., Keating, D., Kond, M., Seeliger, M.W., & Miyake, Y. (2003) Guidelines for basic Multifocal Electroretinography (mfERG). *Documents Ophthalmology*; 106,105-115. Erratum in: *Documents Ophthalmology*, 106, 338.
- Monga M, Walia V, Gandhi A, Chandra, J. & Sharma, S. (2010). Effect of iron deficiency anemia on visual evoked potential of growing children. *Brain Development*, 32, 213–216
- Moreira, M. B., & de Medeiros, C. A. (2009). *Princípios básicos de análise do comportamento*. Artmed Editora.
- Morrow, E. M., Chen, C. A., & Cepko, C. L. (2008). Temporal order of bipolar cell genesis in the neural retina. *Neural development*, 3(1), 2.
- Neves, M.B.P., Silva, E.M.K., & Morais, M.B. (2005). Prevalência e fatores associados à deficiência de ferro em lactentes atendidos em um centro de saúde-escola em Belém, Pará, Brasil. *Cadernos Saúde Pública*, 21, 1911-1918.
- Oliveira, A. P. D. N., Pascoal, M. N., Santos, L. C. D, Pereira, S. C. L., Justino, L. E. H., Petarli, G. B., & Kitoko, P. M. (2013). Prevalência de anemia e sua associação com aspectos sociodemográficos e antropométricos em crianças de Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Ciência e Saúde coletiva*, 18, 3273-3280.
- Oliveira, F.G. (2013). *Aspectos anatômicos e neuroquímicos da retina do mocó (Koredon rupestris)*. Tese de doutorado da Universidade do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de pós-graduação em Psicobiologia. Natal, RN.
- Oliveira, T. D. S. C., da Silva, M. C., Santos, J. N., da Silva Rocha, D., Alves, C. R. L., Capanema, F. D., & Lamounier, J. A. (2014). Anemia entre pré-escolares—um problema de saúde pública em Belo Horizonte, Brasil. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, 19, 59-66.
- Paiva, A.A., Rondo, P.H.C., Latorre, M.R.D.O., Cardoso, M.A.A., & Gondim, S.S.R. (2007). Relationship between the iron status of pregnant women and their newborns. *Revista de Saúde Pública*, 41, 321-327.
- Prette, G. D. (2011). Treino didático de análise de contingências e previsão de intervenções sobre as consequências do responder. *Perspectivas em análise do comportamento*, 2(1), 53-71.
- Prusky, G.T., West, P.W.R., & Douglas, R.M. (2002). Behavioral assessment of visual acuity in rats and mice. *Vision Research*, 40, 2201 – 2209.
- Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002*. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico, constante do anexo desta Resolução. Brasília, 2002. Recuperado em 15/07/2015. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f851a500474580668c83dc3fbc4c6735/RDC_344_2002.pdf?MOD=AJPERES
- Rivera, S., & Ganz, T. (2009, October). Animal models of anemia of inflammation. In *Seminars in hematology* (Vol. 46, No. 4, pp. 351-357). WB Saunders.

- Rocha, F.A.F., Ahnelt, P.K., Peichl, L., Saito, C.A., Silveira, L.C.L., & Lima, S.M.A. (2009). The topography of cone photoreceptors in the retina of a diurnal rodent, the agouti (*Dasyprocta aguti*). *Visual neuroscience*, 26, 167-175.
- Rodriguez, O. T. S., Szarfarc, S. C., & Benicio, M. H. D. A. (1991). Anemia e desnutrição maternas e sua relação com o peso ao nascer. *Revista de saúde pública*, 25(3), 193-197.
- Rohlich, P., Van Veen, T., Szél A. (1994). Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron*, 5, 1159-66.
- Santos, I, César, J.A., Minten, G., Valle, N., Neumann, N.A., & Cercato, E. (2004). Prevalência e fatores associados à ocorrência de anemia entre menores de seis anos de idade em Pelotas, RS. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7, 403-415.
- Santos, N., & Simas, M.L.B. (2001a). Percepção visual de contraste em humanos: evidências psicofísicas para canais de frequência angular alta. *Psicologia: reflexão e crítica*, 14, 589-597.
- Santos, N. A., & de Bustamante Simas, M. L. (2001b). Função de sensibilidade ao contraste: Indicador da percepção visual da forma e da resolução espacial. *Psicologia: reflexão e crítica*, 14(3), 589-597.
- Schwartz, S.H. (2010). *The visual perception: a clinical orientation*. New York: McGraw Hill Medical, 2ª Ed.
- Stebbins, W.C. (1970). *Animal Psychophysics – the design and conduct of sensory experiments*. New York: Springer.
- Sigh, N., Haldar, S., Tripathi, A.K., Horback, A.K., Wong, J., Sharma, D., Beserra, A., Suda, S., Anbalagan, C., Dev, S., Mukhopadhyay, C.K., & Singh, A. (2014). Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 1324-1364.
- Silla, L.M.D.R., Zelmanowicz, A., Mito, I., Michalowski, M., Hellwing, T., *et al.*, (2013) High Prevalence of Anemia in Children and Adult Women in an Urban Population in Southern Brazil. *PLoS ONE*, 8, 1-6.
- Song, D., & Dunaief, J.L. (2013) Retinal iron homeostasis in health and disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 1-13
- Szél, Á., Vígh, B., Van Veen, T., Rohlich, P. (1998) Development of cone distribution patterns in mammals. In: *development and organization of the retina*. L. M. Chalupa & I. Finlay (eds.), New York: Plenum press. P 43 – 59
- Tomanari, G. Y. (2000). Reforçamento condicionado. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 2(1), 61-67.
- Tomotani, B.M., Oda, G.A. (2012). Diurnos ou Noturnos? Discutindo padrões temporais de atividade. *Ensaio Revista da Biologia*, 9, 1–6.
- Ugarte, M., Osborne, N.N., Brown, L.A., & Bishop, P.N. (2013). Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease survey. *Ophthalmology*, 5, 585 - 609

- Valberg, A. (2005). *Light Vision Color*. Chichester: John Wiley e Sons, LTDA p (103-278).
- Watts, M. N., Leskova, W., Carter, P. R., Zhang, S., Kosloski-Davidson, M., Grisham, M. B., & Harris, N. R. (2013). Ocular dysfunction in a mouse model of chronic gut inflammation. *Inflammatory bowel diseases*, *19*(10), 2091.
- Watts, M.N., & Harris, N.R. (2014). Anemia and retinal function in a mouse model of acute colitis *Pathophysiology*, *21*, 301–308
- World Health Organization. (2008). *Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005*: WHO global database on anaemia.
- World Health Organization and Centers for Disease Control and Prevention (2004). *Assessing the iron status of populations: Report of a Joint World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention Technical Consultation on the assessment of Iron status at the Population Leve*. Geneva
- Wu, S. M., Baehr, W., & Crair, M. (2004). *The mouse visual system: from photoreceptors to cortex*.
- Ye, H. & Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry*; *49*, 4945-4956.

APENDICE 1: Ficha de coleta de dados comportamentais

Data: __/__/__

Grupo:

Animal:

DN: __/__/__

Peso: Inicial: ____ Final: ____ Fase do teste:

Dia:

Eventos/agua										
Tempo										
Taxa										

Obs:

Grupo:

Animal:

DN: __/__/__

Peso: Inicial: ____ Final: ____ Fase do teste:

Dia:

Eventos/agua										
Tempo										
Taxa										

Obs:

Grupo:

Animal:

DN: __/__/__

Peso: Inicial: ____ Final: ____ Fase do teste:

Dia:

Eventos/agua										
Tempo										
Taxa										

Obs:

Grupo:

Animal:

DN: __/__/__

Peso: Inicial: ____ Final: ____ Fase do teste:

Dia:

Eventos/agua										
Tempo										
Taxa										

Obs:

Grupo:

Animal:

DN: __/__/__

Peso: Inicial: ____ Final: ____ Fase do teste:

Dia:

Eventos/agua										
Tempo										
Taxa										

Obs: