



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Beatriz da Silva Franco

**ANEMIA: INFLUÊNCIA NO CICLO ESTRAL, NA PRENHEZ, NA
ATIVIDADE LOCOMOTORA E NA PROLE DE RATAS**

Limeira
2016



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Beatriz Franco

**ANEMIA: INFLUÊNCIA NO CICLO ESTRAL, NA PRENHEZ, NA ATIVIDADE
LOCOMOTORA E NA PROLE DE RATAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de bacharel
em Ciências do Esporte à Faculdade
de Ciências Aplicadas da Universidade
Estadual de Campinas.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Maculano Esteves

Limeira

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

F848a Franco, Beatriz da Silva, 1994-
Anemia : influência no ciclo estral, na prenhez, na atividade locomotora e na prole de ratas / Beatriz da Silva Franco. – Limeira, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Andrea Maculano Esteves.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Deficiência de ferro. 2. Atividade física. 3. Síndrome das pernas inquietas. 4. Ciclo estral. 5. Modelos animais. I. Esteves, Andrea Maculano, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Anemia: the influence of the estrous cycle in gestation, locomotion activity and rat's offspring

Palavras-chave em inglês:

Iron deficiency

Physical activity

Restless legs syndrome

Estrous cycle

Animal models

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

Rosângela Maria Neves Bezerra

Data de entrega do trabalho definitivo: 28-06-2016

Autor: Beatriz da Silva Franco

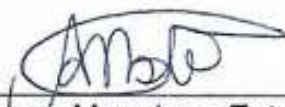
Título: Anemia: influência no ciclo estral, na prenhez, na atividade locomotora e na prole de ratas.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte.

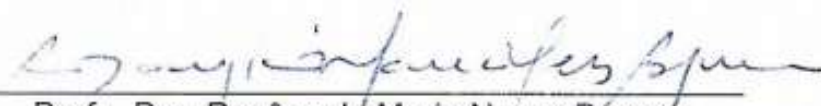
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas.

Aprovado em: 28 / 6 / 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Andrea Maculano Esteves (Orientadora)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Prof. Dra. Rosângela Maria Neves Bezerra

Esse exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada



Prof. Dra. Andrea Maculano Esteves (Orientadora)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer os guerreiros que eu tanto amo, meus pais, Vera e Ricardo e a minha irmã Fernanda. Obrigada por tudo que sempre fizeram e ainda fazem por mim, por terem me ensinado a lutar pelos meus sonhos e fazer tudo com amor e vontade, e a sempre ter um olhar ao próximo. A minha irmã uma grande gratidão pelas ajudas e dicas em toda a minha graduação.

Agradeço também os meus avós por sempre terem batalhado pela educação de seus filhos e netos, apesar de todas as dificuldades e barreiras. E a toda a minha família pela união e amor.

Um agradecimento muito especial e sincero, por todos os nossos momentos e aprendizados é para a minha prima Julia, parceira desde sempre e há alguns anos companheira de casa.

A todos meus colegas de sala e faculdade, obrigada pela companhia e compartilhamento dessa fase tão importante que é a graduação.

Por todos os momentos juntos agradeço aos meus amigos do coração Rafael Campos (Rafa) e Tainara Gava (Tai), duas pessoas incríveis que farão parte da minha vida pra sempre. Agradeço também meu parceiro Gabriel, por todos os momentos especiais e de companheirismo.

Por fim gostaria de agradecer a todos os professores e funcionários da FCA, com certeza todos tiveram influência na minha vida em todos esses anos. Em especial a minha orientadora Andrea e o meu colega de laboratório Paulo por todos os ensinamentos e ajudas.

FRANCO, Beatriz. Anemia: influência no ciclo estral, na prenhez, na atividade locomotora e na prole de ratas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte) - Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2016.

RESUMO

O período reprodutivo feminino é um fator para o aparecimento de deficiência de ferro devido à menstruação. Existe uma alta relação entre a falta de nutrientes e a infertilidade sem causas conhecidas. No entanto, essa relação não é tão bem definida e explicada. A deficiência de ferro afeta milhares de pessoas pelo mundo tornando-se um problema de saúde pública, associada à morbidade e mortalidade, aumentando os riscos em mulheres grávidas. Assim, o objetivo do presente estudo foi observar a influência da dieta de restrição de ferro no ciclo estral, e analisar de acordo com a dieta, a atividade locomotora das mães durante a prenhez e as características das proles. As ratas receberam dietas com diferentes concentrações de ferro durante a prenhez (padrão, restrição e suplementação), sendo o grupo restrição já alimentado com a dieta anteriormente a prenhez. Para a prenhez foram introduzidos ratos machos para o acasalamento. Os resultados demonstraram que as ratas que receberam uma dieta de suplementação de ferro durante a prenhez apresentaram um perfil com maior tempo em freezing (imobilização) e menor locomoção em relação aos outros grupos. Já as que receberam uma dieta de restrição de ferro apresentaram um maior tempo de grooming. A prole das ratas que receberam dieta restrição apresentaram baixo peso, até o desmame, em relação a prole dos outros grupos. Em conclusão, foi demonstrado que a dieta influenciou negativamente o ciclo estral e que a suplementação de ferro alterou a atividade locomotora das ratas prenhas. Também foi demonstrada uma alteração no peso e número de prole em decorrência da alteração de ferro nas dietas.

Palavras chaves: Dietas de ferro, Atividade locomotora, Síndrome das pernas inquietas, ciclo estral, modelo animal.

FRANCO, Beatriz. Anemias: the influence of the estrous cycle in gestation, locomotion activity and rats' offspring. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte) - Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2016.

ABSTRACT

The reproductive time is a factor for the appearance of iron deficiency due to menstruation cycle. There is a close alliance between the lack of nutrients and infertility without known causes. However, this relation is not precise and well explained. The iron deficiency affects thousands of people, and is a public health issue, related to morbidity and mortality, increasing the risks in pregnant women. Therefore, the objective of this paper is to observe the influence of an iron restricted diet during the estrous cycle, and to analyze, according to the different diets, the locomotion activities of the rats during gestation and the characteristics of the offspring. The rats received diets with different amounts of iron (regular, restricted and supplementary) during gestation, and the group with the restricted diet began the diet before gestation. In order to create gestation, male rats were introduced for mating. The results present that rats that received supplementary iron diet during gestation have a profile with more time of freezing behavior and less time of locomotion in relation to other groups. The ones that received iron restricted diet present a bigger time of grooming behavior. The offspring of rats that received iron restricted diet presented with lower weight gain until they were weaned, compared to other groups. In conclusion, it was shown that the iron restricted diet has a negative influence in the estrous cycle and that the supplementary iron diet changed the locomotion activity of pregnant rats. It was also shown different number of descendants and in their weight according to the amount of iron in the mother's diet.

Keywords: Iron diet, Locomotion activity, Restless legs syndrome, Estrous cycle, Animal model.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Intensidades de anemia a partir da taxa de hemoglobina (g/dL) (WHO, 2001)	15
Tabela 2: Formulação da dieta (AIN93-G)	30
Tabela 3: Mix Mineral	31
Tabela 4: Mix Vitaminico	31
Tabela 5: Porcentagem da media do tempo em que as ratas (dieta padrão e dieta restrição) ficaram em cada fase do ciclo estral	34
Tabela 6: Quantidade e porcentagem de filhotes nascidos e as variáveis de filhotes nascidos vivos e mortos	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia da secreção vaginal de rata (CALIGIONI et al., 2009)	29
Figura 2: Porcentagem da media do tempo em que as ratas (dieta padrão e dieta restrição) ficaram em cada fase do ciclo estral	35
Figura 3: Média do peso das ratas (dieta padrão e dieta restrição) durante o esfregaço vaginal	35
Figura 4: Ambulação central dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	37
Figura 5: Ambulação periférica dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	38
Figura 6: Ambulação total dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	39
Figura 7: Reaning dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	40
Figura 8: Grooming dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	41
Figura 9: Eventos de grooming dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	42
Figura 10: Freezing dos animais dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	43
Figura 11: Média do peso das proles dos grupos CTRL, PDP, PDS e PDR	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMO	Diabetes Mellitus Gestacional
NREM	No Rapid Eye Movement
REM	Rapid Eye Movement
SNC	Sistema Nervoso Central
SPI	Síndrome das Pernas Inquietas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3. JUSTIFICATIVA	25
4. METODOLOGIA.....	26
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO/CONCLUSÃO.....	45
7. DIFICULDADES ENCONTRADAS.....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50
9. ANEXO.....	60

1- INTRODUÇÃO

O ferro é um micromineral essencial em todas as espécies por ter participação em seus processos metabólicos, como transporte de oxigênio e regulação do crescimento celular (ANDREWS, 1999). Este micromineral é essencial para o corpo humano, porém seu excesso pode resultar em toxicidade e sua deficiência provoca anemia. (Zhang e Enns, 2008).

Dados da Organização Mundial de Saúde relatam a anemia um problema de saúde pública, sendo a gestacional de intensidade moderada, com prevalência de 39,1%. Já em mulheres com idade reprodutiva, porém não grávidas, a prevalência é de 30,1% e em crianças pequenas é de 44,1% (WHO, 2015).

Os níveis de ferro, durante o período reprodutivo, podem afetar a fertilidade e a fecundidade das mulheres (MILLER, 2014; CHAVARRO et al., 2006). Estudos mostram que o ferro está envolvido na secreção hormonal, na proliferação de células (KOLESAROVA et al., 2011) e desempenha um papel na maturação do óvulo (CHAVARRO et al., 2006). Apesar da necessidade de mais estudos sobre o assunto, estudos suportam a ideia que a transferrina (transportadora do ferro) pode ser um fator de regulação da função ovariana (DURLEJ et al., 2008).

A carência de ferro pode acarretar em diversos efeitos na saúde da população. Esta carência pode afetar negativamente o desenvolvimento motor e cognitivo e causar fadiga, baixa produtividade e alterações na termorregulação e no metabolismo lipídico (STOLTZFUS, 2003; BRIGHAM, 1996), além de apresentar influência no padrão de sono. Quando acometida no período gestacional ela traz consequências como o aumento do risco de mortalidade materna e perinatal (em aproximadamente 20% dos casos) (WHO, 2009), doenças infecciosas, baixo peso no nascimento do bebê e anemia durante o primeiro ano de vida (KOZUKI, 2012; ROCHA et al, 2005), bem como alterações no padrão e duração do sono (DEAN et al., 2006).

Atualmente, alguns autores veem estudando em modelos animais de distúrbios do movimento relacionados ao sono a influência do padrão de ferro

no comportamento e suas consequências no padrão de sono e locomoção (ESTEVES, 2012). No entanto, ainda existe uma lacuna na literatura a respeito da influência do ferro tanto no período pré-gestacional (fertilidade), quanto durante e após a gestação, avaliando os aspectos comportamentais tanto das mães quanto dos filhos.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo principal observar a influencia da dieta de restrição de ferro no ciclo estral, bem como as alterações causadas no comportamento locomotor durante a prenhez. Como objetivos específicos, serão avaliadas as diferenças das proles de mãe com diferentes dietas (padrão, restrição e suplementação) nos quesitos quantidade e peso após o parto até o desmame.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Ferro

Os oligoelementos, ou microminerais, são elementos químicos essenciais para os seres vivos por possuírem funções importantes na regulação do crescimento e do desenvolvimento das espécies, na produção enzimática e no funcionamento dos sistemas imune e reprodutivo (ZLOTKIN, 1995).

O ferro é um micromineral essencial em todas as espécies por ter participação em seus processos metabólicos, como transporte de oxigênio e regulação do crescimento celular (ANDREWS, 1999).

A maior parte do ferro encontrado no corpo é proveniente da alimentação. O ferro advindo do alimento pode ser encontrado da forma heme ou não heme. O ferro heme é encontrado principalmente em carnes vermelhas, peixes e aves, e o não heme em frutas, grãos e produtos lácteos (QUEIROZ, 2000).

O ferro heme é diferenciado da forma não heme devido à presença de um átomo de ferro no centro da molécula. No sangue, esse átomo se liga a cadeia de polipeptídeos encontrada na globina da hemoglobina. A hemoglobina é sintetizada nas células vermelhas do sangue e desempenha um papel fundamental, junto ao ferro, de transporte e armazenamento de oxigênio na corrente sanguínea (AISEN, 1994).

A influência do ferro na fertilidade

O ferro é essencial para o corpo humano, porém seu excesso pode resultar em toxicidade e sua deficiência provoca anemia. (Zhang e Enns, 2008).

A Organização Mundial de Saúde define anemia como uma condição em que a taxa de hemoglobina no sangue está abaixo do valor considerado normal (Tabela1). O motivo principal para tal ocorrência é a falta de um ou mais

nutrientes essenciais no sangue, como exemplo: Ferro, Zinco e proteínas, mas pode ser relacionado a doenças com perdas de sangue e com redução da produção de hemoglobinas no sangue (AISEN, 1994).

Tabela 1. Intensidades de anemia a partir da taxa de hemoglobina (g/dL) (WHO, 2001).

	Anemia	Leve	Moderada	Intensa
Crianças de 6 meses a 5 anos	<11.0	10-10.9	7.0-9.9	<7.0
Crianças de 5 a 11 anos	<11.5	10-11.4	7.0-9.9	<7.0
Crianças de 12 a 14 anos	<12.0	10-11.9	7.0-9.9	<7.0
Mulheres não grávidas (a partir de 15 anos)	<12	10-11.9	7.0-9.9	<7.0
Mulheres grávidas	<11.0	10-10.9	7.0-9.9	<7.0
Homens (a partir de 15 anos)	<13,0	12-12.9	9.0-11.9	<9.0

Anemia mensurada pelo valor da hemoglobina (g/dL)

A anemia por carência de Ferro, denominada Anemia Ferropriva, é a mais comum, sendo estimados 50% dos casos, mas podendo variar de acordo com as condições dos locais e dos países (STEVENS, 2013). O ferro é um nutriente essencial no corpo, e sua deficiência afeta cerca de 2 bilhões de pessoas pelo mundo (STOLTZFUS, 2003). Essa alta prevalência a torna um problema de saúde pública, associada à morbidade e mortalidade, aumentando os riscos em mulheres grávidas, crianças pequenas e mulheres no período fértil (WHO, 2002).

Dados da Organização Mundial de Saúde relatam a anemia um problema de saúde pública, sendo a gestacional de intensidade moderada, com prevalência de 39,1%. Já em mulheres com idade reprodutiva, porém não grávidas, a prevalência é de 30,1% e em crianças pequenas é de 44,1% (WHO, 2015).

O período reprodutivo feminino é também um fator para o aparecimento da anemia, pois, muitas vezes o ferro advindo da alimentação é muito baixo para compensar a perda de sangue pela menstruação (JOHN, 2014).

A infertilidade é uma doença comum no mundo todo, acometendo 10% das mulheres (ZILLER, 2013). Apesar dos avanços da medicina, a infertilidade sem causa explicada é responsável por 10% dos casos (SPEROFF, 2005). Nota-se que existe uma alta relação entre a falta de nutrientes e a infertilidade sem causa determinada (GUO, 2001) e isso se deve ao papel importante desses nutrientes no sistema reprodutor feminino (YANG, 2008).

Os níveis de ferro, durante o período reprodutivo, podem afetar a fertilidade e a fecundidade das mulheres (MILLER, 2016; CHAVARRO, 2006). Estudos mostram que o ferro está envolvido na secreção hormonal, na proliferação de células (KOLESAROVA et al., 2011) e desempenha um papel na maturação do óvulo (CHAVARRO et al., 2006). Apesar da necessidade de mais estudos sobre o assunto, estudos suportam a ideia que a transferrina (transportadora do ferro) pode ser um fator de regulação da função ovariana (DURLEJ et al., 2008).

A suplementação nutricional pode ser uma alternativa complementar para a infertilidade (WESTPHAL, 2004), como descrito por Chavarro (2006) em um estudo com 438 mulheres com infertilidade por desordem ovulatória, onde mostrou que a suplementação de ferro pode diminuir o risco de infertilidade.

O ferro durante a gestação e suas implicações

A carência de ferro pode acarretar em diversos efeitos na saúde da população. Esta carência pode afetar negativamente o desenvolvimento motor e cognitivo e causar fadiga, baixa produtividade e alterações na termorregulação e no metabolismo lipídico (STOLTZFUS, 2003; BRIGHAM, 1996; ECE 1999). Quando acometida no período gestacional ela traz consequências como o aumento do risco de mortalidade materna e perinatal, sendo 20% dos casos (WHO, 2009), e de doenças infecciosas, baixo peso no nascimento do bebê e anemia durante o primeiro ano de vida (KOZUKI, 2012; ROCHA et al, 2005).

O período gestacional é um dos momentos de maior vulnerabilidade na carência de ferro devido a um aumento da necessidade de ferro no organismo

da mãe para o desenvolvimento do feto, placenta e cordão umbilical (ELERT et al., 2013; GAMBLING et al., 2011), e devido a mudanças fisiológicas normais da gravidez (SCHOLL, 1994), aumentando ainda mais essa necessidade no segundo e terceiro trimestre, devido ao rápido crescimento do bebê entre 6 e 18 meses (DALLMAN, 1992). O organismo da mulher prioriza o desenvolvimento do feto, independentemente do estoque do nutriente em seu organismo, podendo ocasionar uma queda em sua taxa de ferro (HALLBERG, 1992). Processos que limitam a disponibilidade de ferro para o feto incluem anemia grave materna, hipertensão materna que restringe o fluxo de nutrientes para a placenta, tabagismo e parto prematuro (SIDDAPPA et al., 2007). Além de um aumento do risco de baixo peso ao nascer e aumento da morbidade e mortalidade, também há sequelas em longo prazo como déficits cognitivos e alterações de comportamento (LOZOFF et al., 2006). A anemia gestacional gera consequências negativas na taxa de ferro do leite materno das mulheres, podendo comprometer a criança durante a amamentação com falta de nutrientes (LYNCH, 2003).

Foi relatado em estudos que filhos de mãe com anemia durante a gestação já nascem com taxas comprometidas de ferro (LLEWELYN, 1965) e em um estudo realizado por Tamura et al., (2002), recém-nascidos com o quartil mais baixo de ferritina sérica (<76 mcg/L) apresentaram mais problemas de desempenho escolar do que as crianças com níveis de ferritina no quartil médio (TAMURA et al., 2002).

Durante a gestação, as mulheres precisam consumir mais ferro para garantir que as reservas de ferro não fiquem abaixo do necessário. A suplementação de ferro durante a gravidez pode beneficiar o bebê, mesmo que a mãe não tenha carência de ferro (COGSWELL, 2003). Para isso, as intervenções são feitas através de capsulas de ferro e por alimentos ricos em ferro (IACG, 1977).

É indicado que o tratamento de suplementação de ferro em gestantes comece o mais rápido possível, sendo a recomendação atual entre 30mg e 60 mg uma vez ao dia (Dietary Reference Intake, 2006; MAHOMED, 2006). Em gestações que a descoberta de deficiência de ferro é próxima ao parto ou com

anemia de intensidade severa, o valor de ferro suplementado pode aumentar em até 120 mg por dia (CDC, 1998). Para uma melhor saúde materna e fetal, é indicado um adicional de 0,4 mg de ácido fólico junto a suplementação de ferro em função do aumento de perdas urinárias e da rápida divisão celular no feto (MAHOMED, 2006).

Estudos evidenciaram que a suplementação de ferro durante a gravidez diminui as chances de nascimento prematuro, de baixo peso do bebê ao nascer e de anemia até as 12 meses da criança, além de aumentar os níveis de ferritina e hemoglobina da mãe, sem passar do valor adequado (MILMAN, 2006).

Altas doses de ferro, liberadas no estômago, são associadas a irritações gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreia (OMS, 2013). Embora ainda existam conflitos sobre esse assunto, estudos mostraram que o excesso de ferro no metabolismo de gestantes pode ser danoso, aumentando o stress oxidativo e a incidência de Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) (BO et al., 2009; PALMA, 2008; CASANUEVA, 2003; WILSON, 2003).

Distúrbios do sono durante a gestação

O sono é considerado um meio de repor energias despendidas durante o período de vigília, e é parte fundamental dos processos de manutenção das atividades e do desenvolvimento do corpo. O sono é um estado fisiológico cíclico e complexo, caracterizado por possuir duas fases fundamentais, o sono NREM (no rapid eye movement) e o sono REM (rapid eye movement). O sono NREM (sem movimentos oculares rápidos) é composto por quatro estágios (I, II, III e IV) sendo o I o mais leve e o IV o de sono mais profundo. O sono NREM é caracterizado por ocorrer relaxamento muscular, progressiva redução de movimentos corporais, ausência de movimentos oculares rápidos e respiração e eletrocardiograma regulares. O sono REM é caracterizado pela presença de sonhos, atonia muscular, movimentos oculares rápidos e respiração e eletrocardiograma irregulares. (FERNANDES, 2006).

O sono é diretamente relacionado com a saúde e consequentemente com a qualidade de vida. A qualidade do sono depende de diversos fatores, tais como uso de medicamento, ingestão de bebidas alcoólicas, alterações psicológicas e sociais, ambiente, prática regular de atividades físicas, distúrbios do sono e outros (GIUSTI, 2007). Dentre todos os distúrbios do sono, os quais são diversos, os mais frequentes são: Insônia, distúrbios respiratórios relacionados ao sono, hipersonias de origem central não causada pelos distúrbios do ritmo, distúrbios do ritmo circadiano do sono, parassonias e distúrbios do movimento relacionados ao sono.

A síndrome das pernas inquietas (SPI) é um distúrbio do movimento relacionado ao sono, caracterizada por desconforto principalmente dos membros inferiores no período da tarde e noite. Os sintomas são sensações de dor, queimação, coceira, tensão e desconforto entre o joelho e o tornozelo (GARCIA-BORREGUERO, 2010; GROTE, 2009; SPOLADOR, 2006). Dentre as principais causas da SPI estão à passagem hereditária, disfunção dopaminérgica e a deficiência de ferro. Weinstock (2012) mostrou que os distúrbios do movimento possuem relação com a baixa taxa de ferro e com o aumento da concentração de hepcidina, porém investigações mais aprofundadas são necessárias (ONER, 2007; WEINSTOCK, 2012).

Durante a gravidez, é comum haver alterações no padrão e duração do sono, associadas às mudanças físicas que ocorrem na mulher grávida. O tempo total de sono da gestante aumenta durante o primeiro trimestre da gravidez, havendo diminuição das fases 3 e 4 do sono não REM a cada trimestre. Durante o terceiro trimestre de gravidez, há a diminuição na porcentagem do sono de ondas lentas e do sono REM, ocorrendo mais eventos de vigília após o início do sono (DRIVER et al., 1992; HERTZ et al., 1992; BRUNNER et al., 1994). Associado a isso, as mulheres relatam aumento da frequência urinária, despertares noturnos, sono agitado e dificuldade em dormir, além de desconforto nas pernas e dores nas costas. Nesse período, diversos distúrbios do movimento podem ocorrer como ataxia, coreia, distonia, tremor essencial, doença de Parkinson, síndrome de Tourette, doença de Wilson, além da síndrome das pernas inquietas (SPI) (KRANICK et al., 2010),

podendo afetar o desenvolvimento fetal, o trabalho de parto, a lactação e a habilidade de cuidar do recém-nascido.

A prevalência da SPI em mulheres grávidas varia entre 11 e 30%. Essa variabilidade se deve principalmente à localização geográfica de cada estudo e à fase da gestação das mulheres analisadas (MANCONI et al., 2004a). A prevalência da síndrome aumenta progressivamente no 3º ou 4º mês de gestação, havendo um pico durante o terceiro trimestre, especialmente no 8º mês, seguida de diminuição dos sintomas no 9º mês e alívio após o parto. A intensidade e frequência dos sintomas também têm pico no terceiro trimestre, tanto em mulheres já afetadas anteriormente quanto em não afetadas (MANCONI et al., 2004a). Em mulheres não afetadas anteriormente, os sintomas da SPI duram aproximadamente 3 a 5 meses. Mulheres que já tiveram várias gestações geralmente reclamam dos mesmos sintomas em todas elas (GOODMAN et al., 1988). Em 2004, Manconi et al. realizaram uma pesquisa em um grupo de 642 mulheres durante todo o período gestacional e encontraram prevalência de 26% de SPI, incluindo mulheres que já haviam sido afetadas antes da gravidez, que correspondiam a aproximadamente 10%, e as que nunca haviam sido afetadas antes da gravidez (MANCONI et al., 2004b).

As causas da associação entre SPI e gravidez são desconhecidas. As hipóteses mais debatidas são: alterações metabólicas, com especial destaque para ferro e deficiência de folato; influências hormonais relacionados com o aumento de prolactina, progesterona e estrogênios durante a fase final da gravidez; e as mudanças dos hábitos motor e estado psicológico das mulheres grávidas.

O ferro é absolutamente necessário para o normal metabolismo energético neuronal e glial, produção de neurotransmissores e mielinização, além da alteração na expressão de genes críticos para a plasticidade neuronal no hipocampo (LOZOFF et al., 2006; BRUNETTE et al., 2010). Essas anormalidades na expressão gênica e na morfologia neuronal podem persistir até a idade adulta (BRUNETTE et al., 2010; TRAN et al., 2009).

Estudos com animais indicam que uma crônica e grave deficiência de ferro durante o desenvolvimento do SNC leva a redução dos receptores de dopamina, o que se torna irreversível, apesar da suplementação de ferro durante o período pós-natal. Os efeitos de identificação, em função da dopamina, incluem a diminuição da densidade do receptor D2 no caudado-putâmen (YOUUDIM et al., 1983) e o aumento dos níveis de dopamina extracelular (CHEN et al, 1995).

Estudos recentes têm avaliado a utilização da hepcidina como um biomarcador da regulação do metabolismo do ferro. A hepcidina tem-se apresentado como o principal regulador da homeostase do ferro e um provável mediador da anemia, de doenças crônicas e inflamação. A hepcidina é um hormônio peptídico circulante composto por 25 aminoácidos, sintetizada no fígado e detectável no sangue e na urina. A determinação das concentrações da hepcidina pode ser utilizada para diferentes diagnósticos de anemia, como a anemia por deficiência de ferro, caracterizada por níveis reduzidos deste hormônio. Em princípio, dosagens de hepcidina poderiam complementar os indicadores mais utilizados de reservas corporais de ferro total, como o ferro e a ferritina séricos (GANZ, 2006a; ROE et al., 2009), além de outros como receptor de transferrina, saturação de transferrina e zinco protoporfirina (PAIVA et al., 2000). A produção de hepcidina é regulada homeostaticamente pela anemia e hipóxia (GANZ, 2006a; THEODORSSON, 2006) além de ser regulada por inflamação e estresse oxidativo (GANZ & NEMETH, 2006B; TRINDER et al., 2008; DARSHAN & ANDERSON, 2009).

Neste contexto, foi demonstrado por Millard et al., (2004) que os níveis maternos de hepcidina diminuem durante a gravidez, voltando ao normal logo após o parto.

Modelos animais

O rato é um mamífero muito utilizado para fins científicos. A linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*) é um dos mais utilizados devido ao seu porte pequeno, baixo custo e principalmente, a sua similaridade genética com os

humanos de 80% (RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM, 2004).

Uma característica marcante nesta espécie é o comportamento de dimorfismo sexual, tendo então diferenças entre o macho e a fêmea e podendo ter alterações conforme o estado fisiológico dos animais (KUSTRITS, 2005). As fêmeas, assim como a mulher, possuem um ciclo reprodutivo que age em conjunto com os hormônios sexuais. Seu sistema reprodutor consiste em: vagina, útero, tubos falópios e ovários (CHIASSON, 1994).

O ciclo reprodutor da rata, conhecido como ciclo estral, começa a partir do 35º a 45º dia de vida e se encerra com aproximadamente 12 meses de vida (MEITES et al., 1980).

O ciclo estral é constituído por quatro fases, sendo elas proestro, estro, metaestro e diestro, e a passagem por todas essas fases dura aproximadamente cinco dias. O Estro tem duração de 25-27 horas, e é a fase que ocorre a ovulação espontânea das fêmeas, tornando-as receptivas aos machos (LONG & EVANS, 1922). O proestro é a fase novos folículos são formados e o volume do útero aumenta para uma possível gravidez no estro seguinte e na fase diestro o útero tem uma redução no volume, se tornando fino e anêmico. (HOAR, 1975).

Cerca de 60% das ratas possuem o ciclo estral regular, porém não é incomum ratas com o ciclo irregular, que é caracterizado por se manter durante dias em apenas uma fase ou por não seguir a sequência dos ciclos correta de proestro, estro, metaestro e diestro (MARCONDES, 2002).

A fertilidade, a maturidade sexual e o ciclo estral de ratas Wistar podem ser afetados pela falta de nutrientes (MAZETI & FURLAN, 2008).

A deficiência de ferro em ratas wistar pode ocasionar em baixo peso, mudanças comportamentais, irregularidade no ciclo estral e concepção reduzida (LI, 2013), porém, são necessários mais estudos que relacionem a deficiência de ferro e o ciclo estral de ratas para um maior e mais amplo entendimento desse contexto.

Modelos animais de distúrbios do movimento relacionados ao sono

No modelo animal é possível reproduzir diversas características de doenças humanas, mantendo a qualidade através da confiabilidade e validade (VAN DER STAAY, 2006).

Atualmente alguns estudos veem sendo realizados para demonstrar um modelo animal para SPI. Uma característica marcante da SPI é o desejo de se mover (ONDO, et al., 2007), e, devido ao não retorno subjetivo dos animais, esse sintoma se torna mais difícil de simular em um protocolo animal. No entanto, diversos estudos foram feitos para simular sintomas semelhantes aos da SPI, sendo maior parte através de modelos com lesão, modelos genéticos, modelos farmacológicos e com privação nutricional (BAIER et al., 2007; ONDO et al., 2000; YODIM, et al., 1981; CLEMENS, et al., 2004). Mariano et al., (2014) demonstrou que ratas grávidas possuem alteração comportamentais parecidas com modelos utilizados para SPI, tornando então possível a avaliação da SPI através do modelo animal.

As duas principais hipóteses fisiopatológicas desse distúrbio do movimento relacionado ao sono (Síndrome das Pernas Inquietas-SPI) envolvem o sistema dopaminérgico (seja por uma alteração no sistema dopaminérgico ou por uma redução no metabolismo do ferro, um co-fator da tirosina hidroxilase - enzima que participa da produção da dopamina), aumentando então o número de estudos voltados a lesão do sistema dopaminérgico.

Em um estudo realizado por Lopes (2012), os ratos que tiveram uma lesão induzida no núcleo dopaminérgico A11 tiveram um aumento significativo de despertares e de movimentos das pernas no período claro (noite dos ratos) comparado ao grupo controle.

Alguns estudos mostraram a alteração no sono de ratas prenhes em relação a não prenhes devido a mudança do metabolismo de ferro, que foi o caso do estudo realizado por Mariano et al. (2014), onde foi verificado que ratas prenhes apresentaram menos eventos de *rearing*, aumento no tempo de duração de *grooming* e redução no tempo de imobilização em relação ao grupo

de ratas controle não prenhes em teste de campo aberto em diferentes momentos da prenhez.

3- JUSTIFICATIVA

Um grande número de modelos tem sido utilizado para estudar o efeito de nutrição materna sobre o desenvolvimento fetal (MCARDLE et al., 2006). Dessa forma, embasado no contexto de alterações que a deficiência de ferro causa no período gestacional, verificar as consequências na prole se torna de fundamental importância. Estudos demonstram que a anemia durante a gravidez resulta em um aumento do risco de mortalidade perinatal e morbidade e é um fator importante no aumento do risco de doenças na vida adulta, além de acarretar alterações cognitivas (LOZOFF et al., 2006), baixo peso e hipertensão (GAMBLING et al., 2003), além de efeitos no sistema dopaminérgico (YOUUDIM et al., 1983).

Assim, se torna importante observar o quanto a deficiência de ferro pode impactar no ciclo estral e na fertilidade de ratas, e o que a dieta com diferentes concentração de ferro (padrão, restrição e suplementação) pode acarretar no comportamento locomotor de ratas prenhez e no desenvolvimento de seus filhotes.

4- METODOLOGIA

Animais

Para a execução do projeto foram utilizadas 16 ratas Wistar com 21 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética da UNICAMP (CEUA: 8876-1). Durante todo período do estudo, os animais foram mantidos em salas aclimatizadas (entre 20°C e 22°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas individuais.

As ratas foram divididas em quatro grupos:

- 1- CTRL dieta padrão não prenhe (CTRL) (n=4)
- 2- Prenhes com dieta padrão de ferro (PDP) (n=4)
- 3- Prenhes com dieta de restrição de ferro (PDR) (n=4)
- 4- Prenhes com dieta de suplementação de ferro apenas na prenhez (PDS) (n=4)

Desenho experimental

O experimento teve início após o desmame das ratas, onde estas receberam por 2 semanas dieta padrão. Após esse período as ratas do grupo PDR passaram a receber a dieta de restrição de ferro, visto que esta dieta foi fornecida para esse grupo até o final da prenhez. Os outros grupos (CTRL, PDP e PDS) receberam a dieta padrão até o início da prenhez, onde o grupo PDS passou a receber a dieta com suplementação de ferro durante os 21 dias de prenhez e os grupos CTRL e PDP continuaram a receber a dieta padrão. Aproximadamente aos 75 dias foi iniciado o esfregaço vaginal, para a identificação das fases do ciclo estral. Todas as ratas foram submetidas a testes de adaptação ao ambiente do campo aberto (*Open-Field*) que é utilizado para avaliar o comportamento locomotor. Uma semana após a adaptação, as ratas foram submetidas novamente ao campo aberto, que constituiu a avaliação Basal de 10 minutos, dividida em 2 períodos de 5 minutos. Após a

avaliação basal, todas as ratas do grupo prenhe foram submetidas à presença do macho para a indução da prenhez, e quando prenhes foram avaliadas no campo aberto nos dias 3, 10 e 19 da prenhez juntamente com o grupo não prenhe CTRL. Após o nascimento das proles, todos os grupos receberam dieta padrão até o desmame. Os filhotes foram contados e pesados no 1º, 7º, 14º e 21º dia de vida. Após o término do experimento, as fêmeas foram eutanasiadas individualmente por aprofundamento anestésico seguido de decapitação (ANDERSEN et al., 2004) e os filhotes machos continuaram em um outro protocolo experimental.

Procedimento experimental

Campo aberto (atividade locomotora)

A atividade locomotora será avaliada no campo aberto (*Open-field*) criado por Broadhurst (1960), que consiste em uma arena em formato circular com 81 cm, e com paredes de 41 cm de altura com a parte superior aberta. Sua parte inferior (chão) é dividida em 19 quadrantes, onde foram colocados os animais individualmente para a avaliação. Cada animal permaneceu no teste por 10 minutos, onde apenas os 5 finais foram avaliados. Foram analisados os parâmetros: ambulação total (quantidade de quadrantes percorridos com as quatro patas dos animais), frequência de *rearing* (contagem de vezes que o animal ficou com apenas duas patas no chão), frequência de *grooming* (contagem de vezes que o animal encostou a boca e/ou as patas pelo corpo e cabeça), duração total de *grooming* (contagem de tempo corrido que o animal encostou a boca e/ou as patas pelo corpo e cabeça e tempo total de imobilização (tempo corrido que o animal permaneceu imóvel) (FUKUSHIRO et al., 2007). Todos os testes serão realizados entre 9h e 11h, pois os ratos são animais de hábitos noturnos, e este horário pode ser correlacionado com o período tarde/noite nos seres humanos, onde ocorre a piora dos sintomas da SPI (QU et al., 2007).

Este teste consiste em uma arena em formato circular com 81cm, e com paredes de 41cm de altura com a parte superior aberta. Sua parte inferior

(chão) é dividida em 19 quadrantes, onde é colocado o animal para a avaliação. Cada animal permanece no teste por 10 minutos, onde apenas os 5 finais são avaliados.

Esfregaço vaginal e Acompanhamento do ciclo estral

Para a identificação das fases do ciclo estral, foi realizado diariamente no mesmo período do dia, o esfregaço vaginal das ratas (MARCONDES et al., 2002).

Durante um ciclo estral normal, a rata passa por quatro fases durante cinco dias: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro (figura 1), onde Estro é a fase que ocorre a ovulação espontânea das fêmeas, tornando-as receptivas aos machos (LONG & EVANS, 1922).

Acompanhamento do ciclo estral A partir do 60º dia de vida, as ratas de ambos os grupos foram monitoradas diariamente quanto à fase do ciclo estral. Para isso, um pequeno volume de solução salina 0,9% era colocado e em seguida removido do canal vaginal por meio de pipeta Pasteur. O material coletado era analisado ao microscópio para identificação dos tipos celulares do epitélio vaginal e determinação da fase do ciclo estral (estro, diestro, metaestro, proestro). A partir do 75º foram colocadas em gaiolas junto a um macho para a copulação.

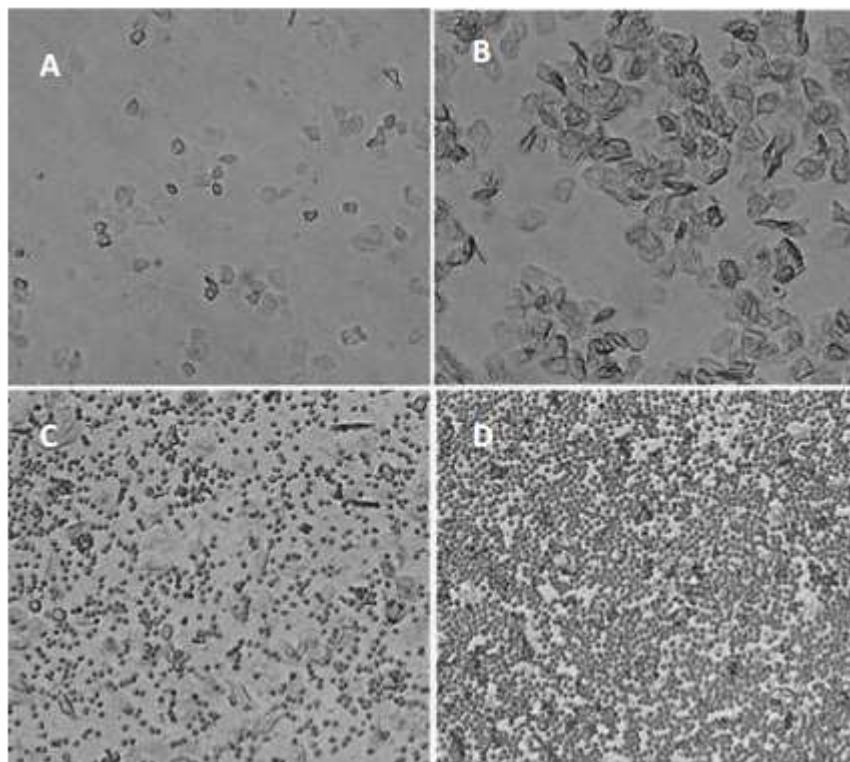


Figura 1. Fotomicrografia da secreção vaginal de rata. A) proestro, que consiste em células nucleadas epiteliais globosas; B) estro, com células anucleadas queratinizadas; C) metaestro, consiste nos três tipos de células, leucócitos, queratinizadas e epiteliais nucleadas; e D) diestro, em que há predominância de leucócitos (CALIGIONI et al., 2009).

Cruzamento

O sistema de acasalamento utilizado foi o Poligâmico Temporário, onde um macho foi introduzido na gaiola com uma matriz de fêmeas durante o período escuro e retirado 12 horas depois. Esse sistema foi usado até ocorrer a copulação e a fecundação.

Dieta de Ferro

Após o desmame as ratas serão alimentadas com dieta padrão por 2 semanas, antes de serem distribuídas aleatoriamente nos grupos. Os grupos CTRL (não prenha) e PDP (n=10 cada) manterão a dieta padrão de Fe (40 mg/kg) (FELT et al., 2006) durante todo o experimento. O grupo PDR (n=10),

passará a receber a dieta com teor de Fe reduzido (4 mg/kg) por 4 semanas antes do acasalamento até o nascimento da prole. Já o grupo PDS (100 mg/kg), receberá a dieta padrão até a detecção da prenhez e durante todo o período de prenhez receberá a dieta de suplementação (FELT et al., 2006). Todas as dietas serão livremente disponíveis, e pesos corporais serão registrados três vezes por semana durante todo o experimento (GAMBLING et al., 2004). Após o nascimento da prole todos os grupos receberão dieta padrão de Fe (40mg/Kg) até o desmame.

A dieta foi produzida em parceria com o curso de Nutrição da FCA/Unicamp. A dieta foi feita a partir de ingredientes purificados e a sua composição seguiu as formulações da AIN93-G, conforme apresentado nas tabelas 1, 2 e 3 (REEVES, 1997). A dieta de restrição e suplementação de ferro foi realizada manipulando o mix mineral de acordo com a % específica que as atenda, ajustando a composição geral do mix pelo veículo (sacarose). Os valores apresentados na AIN93-G correspondem às necessidades da dieta do roedor na fase de crescimento, prenhez e de lactação (REEVES et al., 1993).

Os ingredientes da dieta foram adquiridos por fornecedores especializados e para a determinação da concentração de ferro, amostras foram encaminhadas para o instituto Adolfo Lutz (São Paulo).

Tabela 2. Formulação da dieta (AIN93-G)

Ingredientes	AIN93-G (g/kg de dieta)
Amido de milho	397.486
Caseína	200.000
Amido de milho dextrinizado	132.000
Sacarose	100.000
Óleo de soja	70.000
Fibra	50.000
Mix Mineral	35.000
Mix Vitamínico	10.000
L-Cisteína	3.000
Bitartarato de colina	2.500
tert-butil-hidroquinona	14.0

Tabela 3. Mix mineral

Ingredientes	AIN93-G MX (g or mg/kg mix)
Carbonato de cálcio anidro (40.04% Ca)	357.00
Fosfato de potássio monobásico (22.76% P, 28.73% K)	196.00
Citrato de potássio, tripotássio monohidrato (36,16% K)	70.78
Cloreto de sódio (39,34% Na, Cl 60,66%)	74.00
Sulfato de potássio (44,87% K, 18,39% S)	46.60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24.00
Citrato férrico (16,5% de Fe)	0
Carbonato de Zinco (Zn 52,14%)	1.65
Metassilicato de Sódio 9H ₂ O (9,88% de Si)	1.45
Carbonato de manganês (Mn 47,79%)	0.63
Carbonato cúprico (57,47% de Cu)	0.30
Cromo Sulfato de potássio 12H ₂ O (10.42% Cr)	0.275
Ácido bórico (17,5% de B), mg	81.5
Fluoreto de sódio (45,24% F), mg	63.5
Carbonato de níquel (45% Ni), mg	31.8
Cloreto de lítio (16,38% Li), mg	17.4
Selenato de sódio anidro (41.79% Se), mg	10.25
Iodato de potássio (59,3% I), mg	10.0
Molibdato de amônio 4H ₂ O (54.34% Mo), mg	7.95
Vanadato de amônio (43,55% V), mg	6.6
Sacarose em pó	221,026

Tabela 4. Mix vitamínico

Vitamina	Quantidade (g/kg mix)
Ácido nicotínico	3.000
pantotenato de calico	1.600
Piridoxina-HCl	0.700
Tiamina-HCl	0.600

Riboflavina	0.600
Ácido fólico	0.200
Biotina	0.020
Vitamina B-12 (cianocobalamina) (0,1% em manitol)	2.500
Vitamina E (alfa-tocoferol) 2 (500 UI / g)	15.000
Vitamina A (todo-trans-palmitato de retinol) 2 (500.000 UI / g)	0.800
Vitamina D-3 (colecalfiferol) (400.000 UI / g)	0.250
Vitamina K-1 (filloquinona)	0.075
Sacarose em pó	974.655

Pesagem da Prole

A pesagem dos filhotes ocorreu no 1º, 7º, 14º e no 21º dia de vida, individualmente. O peso foi analisado através da média de cada prole em cada pesagem. Concomitante a pesagem, foi feita a contagem da quantidade de filhotes e a identificação dos sexos.

Eutanásia dos Animais

Após o término dos experimentos os animais serão eutanasiados individualmente por aprofundamento anestésico seguido de decapitação (ANDERSEN et al., 2004).

Análise de Dados

Os dados dos questionários serão armazenados em banco de dados específicos e passarão por análise estatística. A escolha do teste estatístico será realizada após a análise de normalidade dos dados. O nível de significância considerado será o de $p < 0,05$ para a rejeição da hipótese de nulidade.

Análise Estatística

Os resultados preliminares foram analisados através do programa Statistic 7.0. O teste ANOVA para medidas repetidas foi utilizado, no entanto, esse cálculo foi feito somente de forma ilustrativa, visto que os grupos não apresentam N suficiente para a avaliação. Os resultados estão representados em média $\pm$ erro padrão.

5- RESULTADOS

Ciclo Estral

A tabela 5 mostra, através da média e em forma de porcentagem, a diferença entre as ratas com dieta restrição na concentração de ferro e as com dieta padrão, em relação às fases do ciclo estral. É possível notar uma maior porcentagem nas fases proestro e estro no grupo padrão, e no grupo restrição nas fases diestro e metaestro.

Tabela 5. Porcentagem da média do tempo em que os animais do grupo dieta padrão e dieta restrição passaram por cada fase do ciclo estral.

GRUPOS	FASES DO CICLO ESTRAL			
	DIESTRO (%)	PROESTRO (%)	ESTRO (%)	METAESTRO (%)
DIETA PADRÃO	41	37	17	5
DIETA RESTRIÇÃO	45	32	13	10

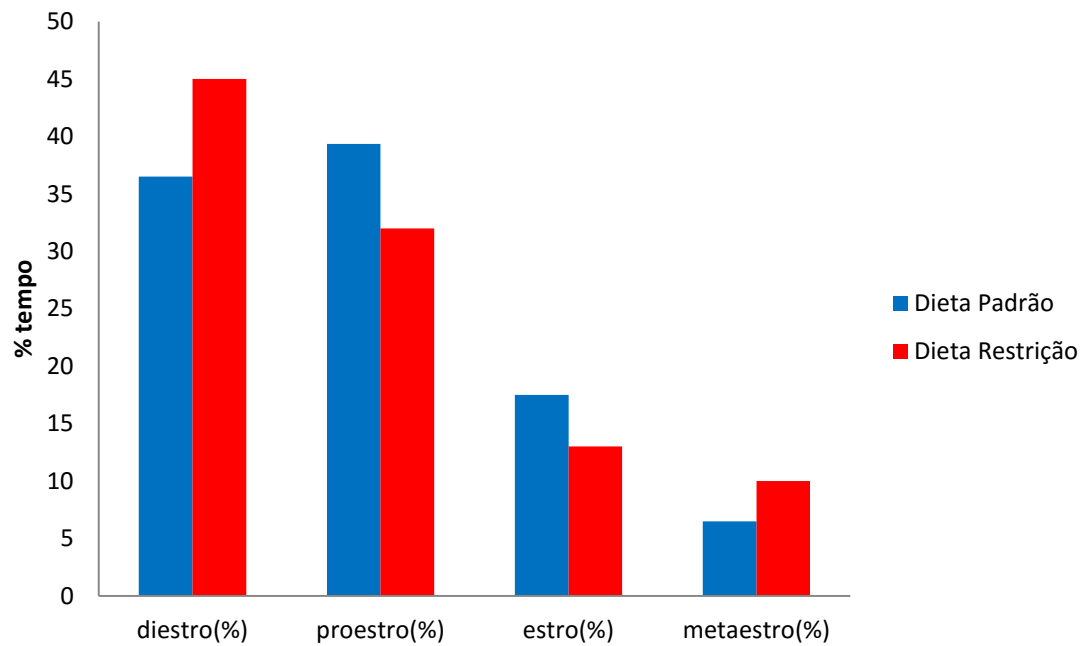


Figura 2. Porcentagem da média do tempo que o grupo dieta padrão e o grupo dieta restrição ficaram em cada fase do ciclo estral anteriormente da prenhez.

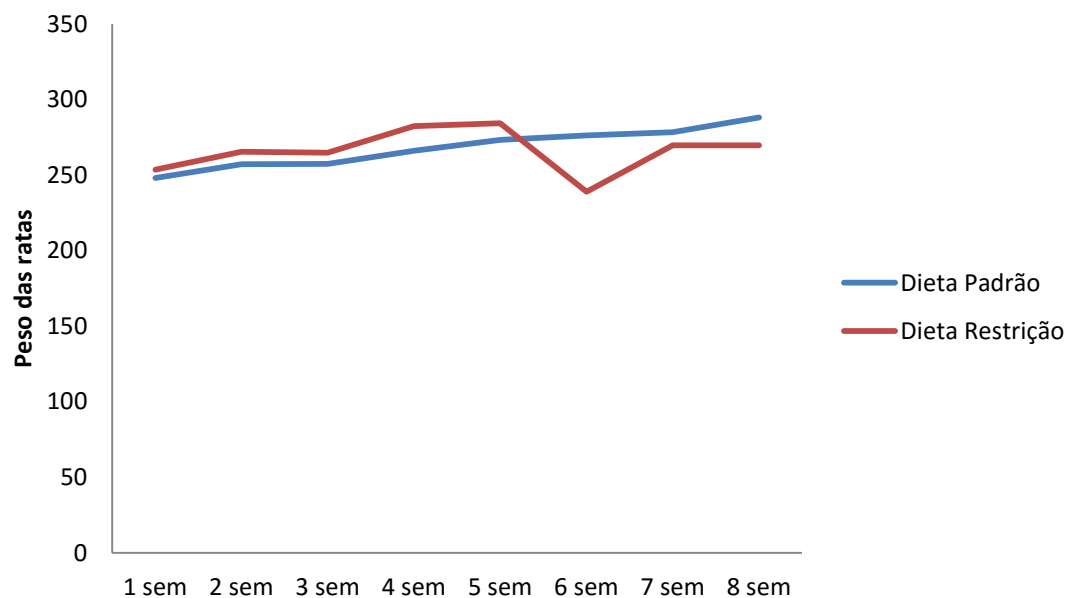


Figura 3. Média dos pesos das ratas grupo dieta padrão e grupo dieta restrição durante o período de esfregaço vaginal.

Open-Field – Atividade comportamental

Os resultados abaixo estão demonstrados através de figuras apresentados em média $\pm$ erro padrão. Os resultados apresentados são preliminares, visto que é necessário aumentar o tamanho da amostra para efetivamente demonstrar as diferenças estatísticas.

Os resultados em relação a ambulação periférica demonstram diminuição do grupo suplementação nos dias 3,10,19º de prenhez em relação ao basal do próprio grupo e redução do momento basal e 3º dia para o grupo CTRL ($F(9, 27)=4,119$; $p=0,01$) (Figura 5).

Na ambulação total, o grupo suplementação obteve resultados parecidos, apresentando redução no 3º e no 19º dia de prenhez em comparação ao basal do próprio grupo e ao basal e 3º dia do grupo CTRL ($F(9, 27)=3,421$, $p=0,03$) (figura 6).

Em relação ao *rearing* o resultado demonstrado foi uma menor quantidade de eventos de *rearing* do grupo suplementação no 3º e 19º dia de prenhez para o seu basal e para todos os momentos (basal, 3, 10 e 19º dia) do grupo CTRL ($F(9, 27)=7,515$, $p=0,008$) (figura 7).

Houve um aumento de tempo *grooming* no 10º dia de prenhez do grupo restrição comparado a todos os momentos do grupo CTRL ($F(9, 27)=10,540$, $p=0,002$) (figura 8).

A figura 10 demonstra um aumento de *freezing* no 19º dia de prenhez do grupo suplementação em relação ao basal e 3º dia do próprio grupo e a todos os momentos (basal, 3, 10 e 19º dia) de todos os outros grupos (CTRL, PDP, PDR E PDS) ($F(9, 27)=4,450$, $p=0,003$).

Não foi encontrada nenhuma diferença significativa para os quesitos ambulação central (figura 4) e eventos de *grooming* (figura 9).

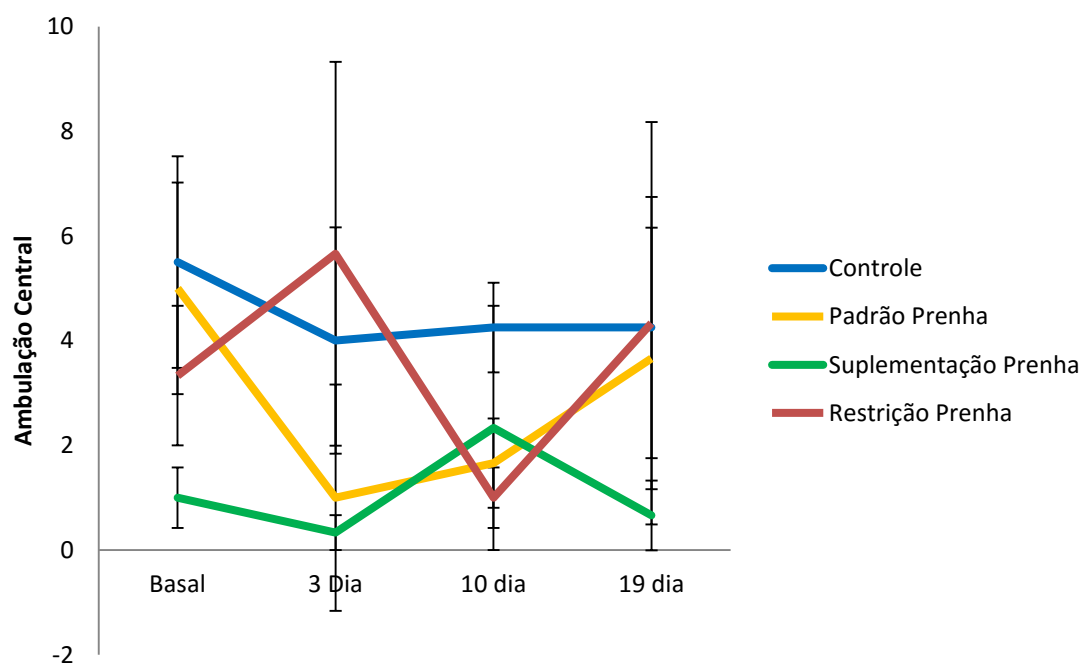


Figura 4. Ambulação central dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA ($F(9, 27)=0,69962$; $p=0,70358$)

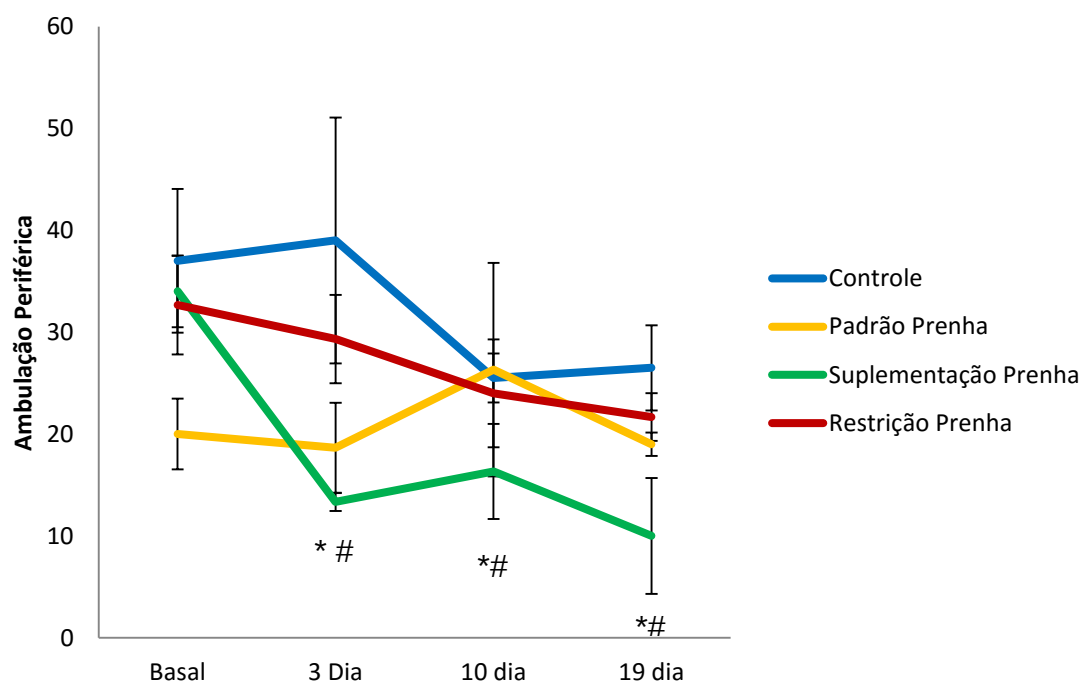


Figura 5. Ambulação Periférica dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; (*) difere do momento basal do próprio grupo; (#) difere do momento basal e 3º dia do grupo controle; ($F(9, 27)=4,119$; $p=0,01$)

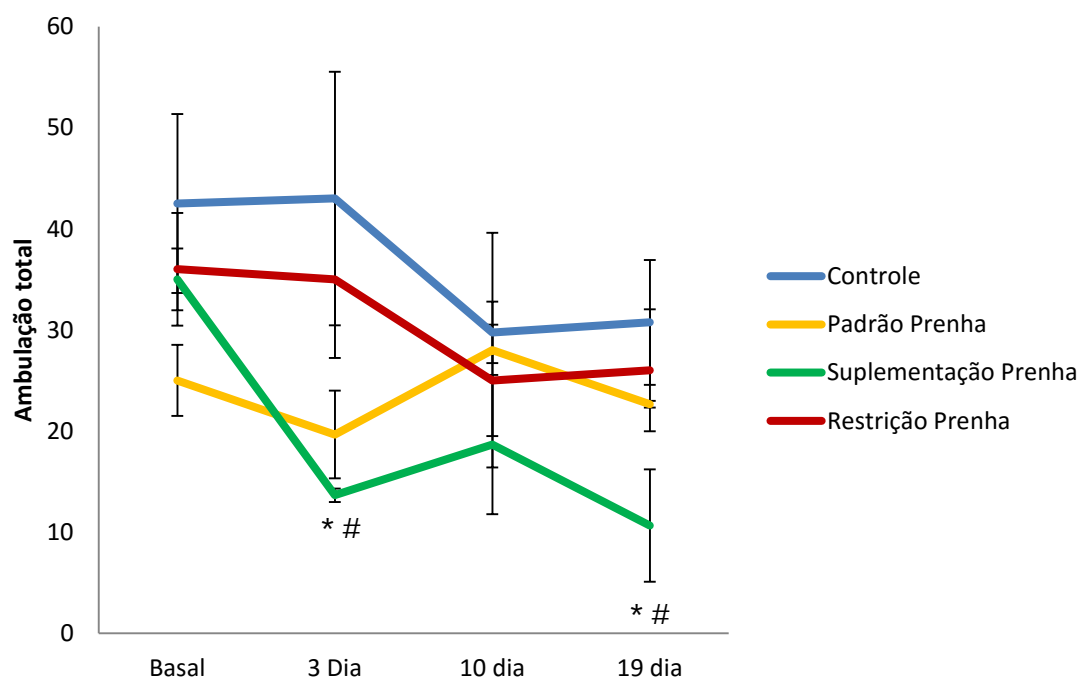


Figura 6. Ambulação Total dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; (*) difere do momento basal do próprio grupo; (#) difere do momento basal e 3º dia do grupo controle; ($F(9, 27)=3,421$; $p=0,03$).

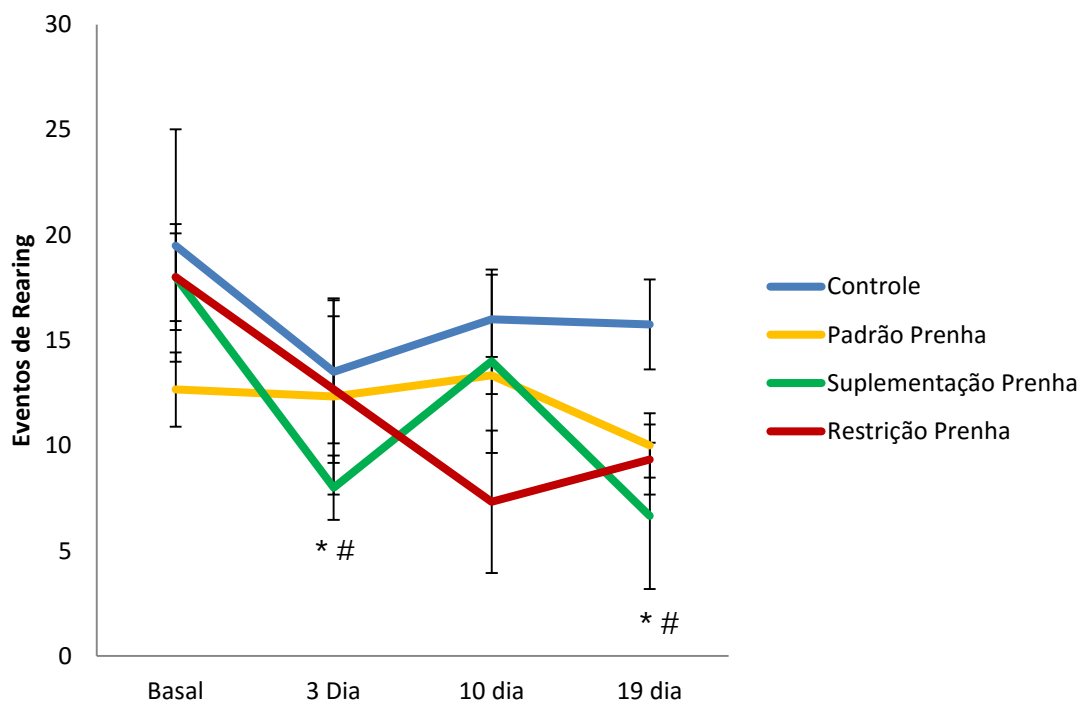


Figura 7. *Rearing* dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; (*) difere do momento basal do próprio grupo; (#) difere de todos os momentos do grupo controle; ($F(9, 27)=7,515$; $p=0,008$).

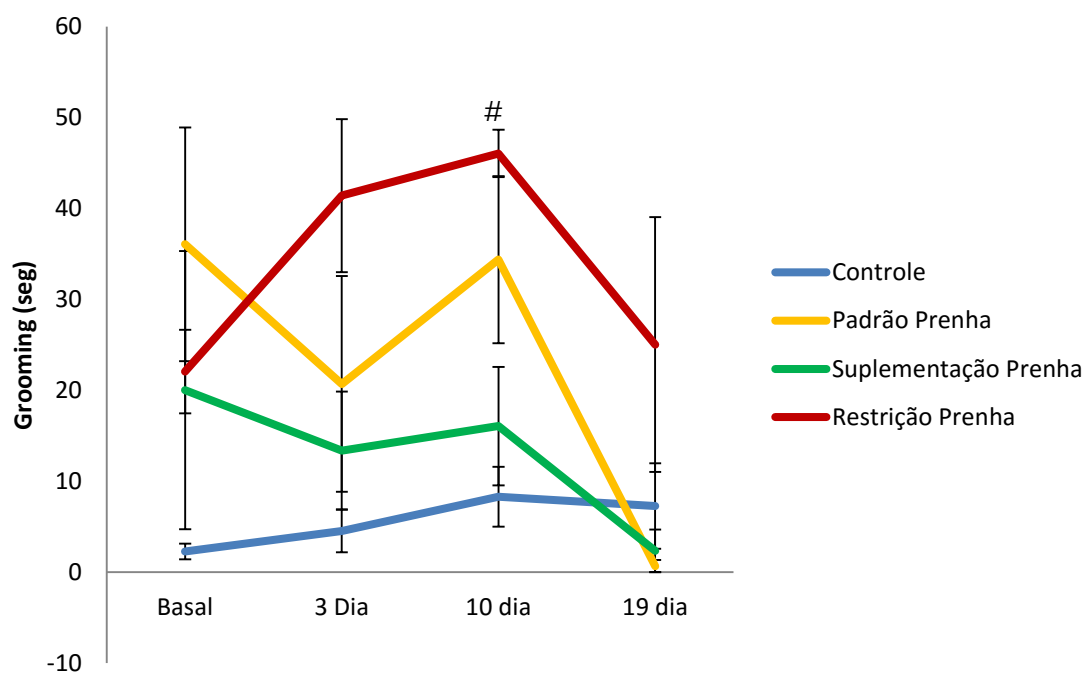


Figura 8. *Grooming* dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; (#) Difere do grupo CTRL nos momentos basal, 3, 10 e 19 dias; ($F(9, 27)=10,540$; $p=0,002$).

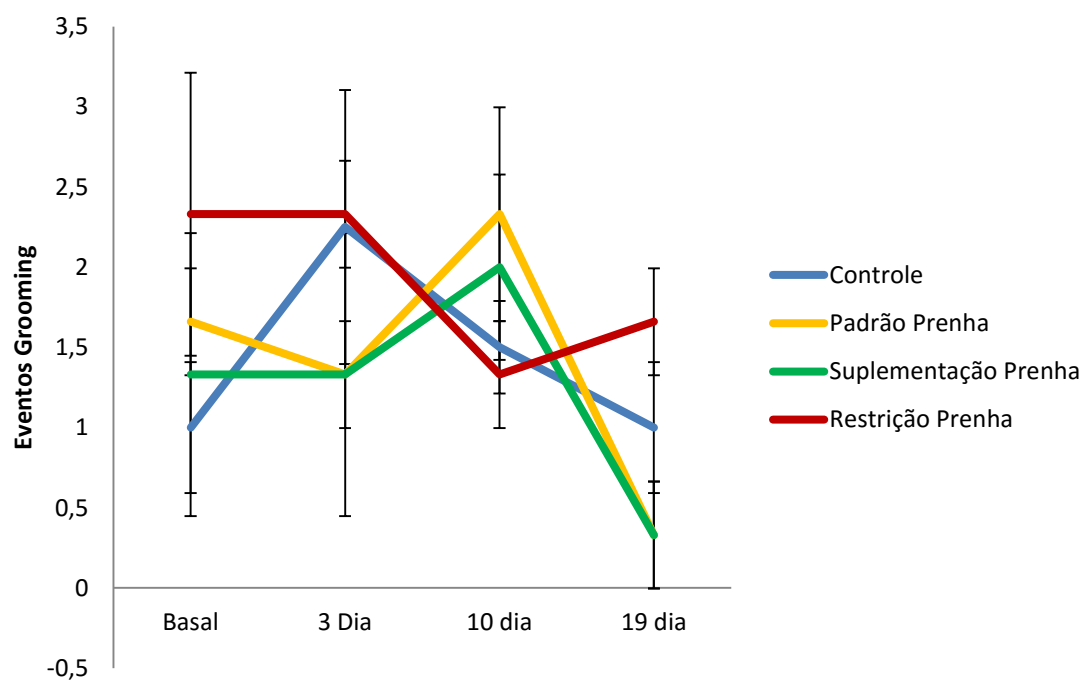


Figura 9. Eventos de *Grooming* dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; ($F(9, 27)=0,96442$; $p=0,48954$).

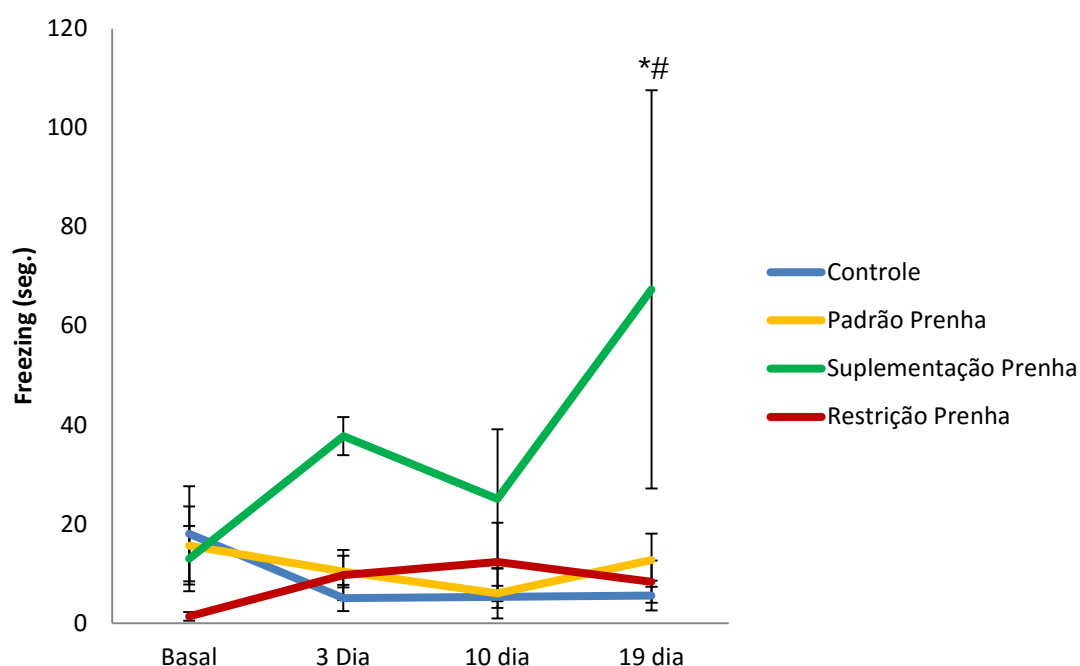


Figura 10. *Freezing* dos animais dos grupos controle não prenha (controle), prenha dieta padrão (padrão prenha), prenha dieta suplementação (suplementação prenha) e prenha dieta restrição (restrição prenha) nos diferentes momentos de avaliação: Basal e dias 3, 10 e 19º dia de prenhez. ANOVA; (*) difere do momento basal e 10º dia do próprio grupo; (#) difere de todos os momentos de todos os grupos; ($F(9, 27)=4,450$; $p=0,003$).

Prole

A figura 11 mostra a diferença do peso das proles dos grupos PDP, PDS e PDR, mostrando que a prole do grupo PDR obteve um menor peso a partir do 7º dia de vida até o desmame. Foi demonstrado também, um aumento do peso, no 21º, da prole do grupo PDS.

A partir da tabela 6 é possível visualizar que o número do total de filhotes nascidos do grupo PDR foi menor, porém a porcentagem de filhotes nascidos mortos do grupo PDR foi próxima a porcentagem do grupo PDP.

Tabela 6. Quantidade e porcentagem de filhotes nascidos e as variáveis de filhotes nascidos vivos e mortos.

	Total de filhotes	%	Vivos	%	Mortos	%
Prole PDP	21	100	16	76	5	24
Prole PDS	19	100	17	89	2	11
Prole PDR	16	100	12	75	4	25

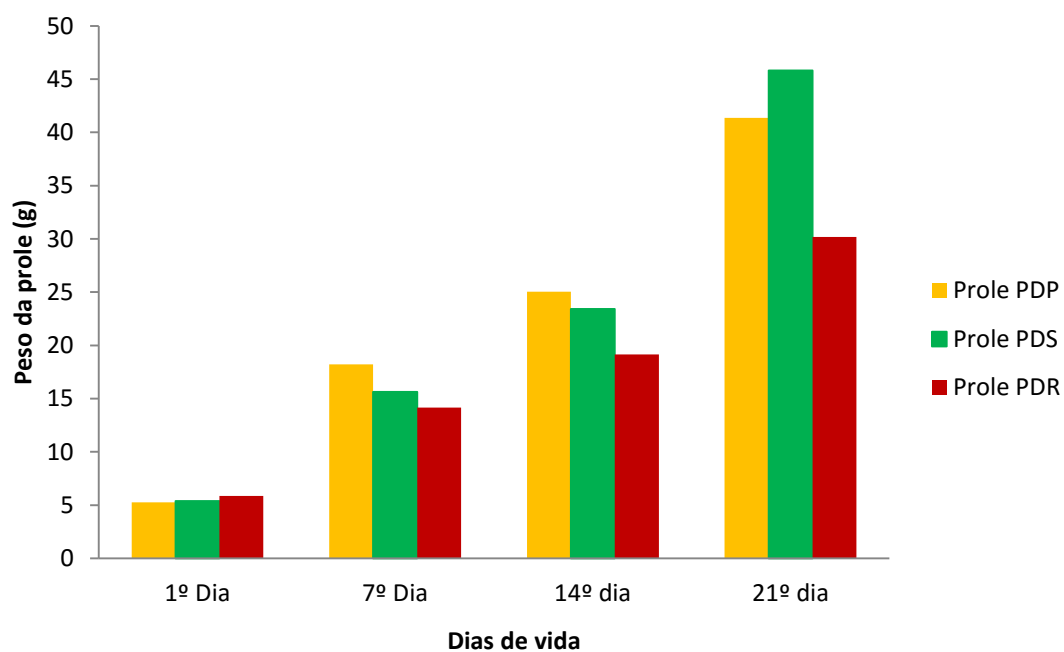


Figura 11. Média do peso das proles dos grupos, prenha dieta padrão (Prole PDP), prenha dieta suplementação (Prole PDS) e prenha dieta restrição (Prole PDR) nos diferentes momentos.

6- DISCUSSÃO / CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou as alterações, causadas pela variação da concentração de ferro na ração de ratas prenhas, no ciclo estral, atividade locomotora e consequências na prole. Os resultados demonstraram que a dieta influenciou negativamente no ciclo estral; a suplementação de ferro alterou a atividade locomotora das ratas prenhas; e também foi demonstrada uma alteração no peso e número de prole em decorrência da alteração de ferro na dieta.

Um estudo realizado por Mazeti & Furlan (2008) concluiu que a fertilidade, a maturidade sexual e o ciclo estral de ratas Wistar podem ser afetados pela falta de nutrientes. A autora mostrou que existe uma diminuição do período estro no ciclo das ratas e que mesmo com o acasalamento, as ratas desnutridas não deram a luz. No presente estudo foi demonstrado que as ratas que receberam a dieta com restrição na concentração de ferro obtiveram menos tempo da fase estro do que as ratas alimentadas com dieta padrão, corroborando com os dados de Mazeti & Furlan (2008). Além disso, 12 ratas foram colocadas para acasalar, porém, apesar de todas terem demonstrado coito através da visualização de espermatozoides no esfregaço vaginal, apenas 9 foram fecundadas e emprenharam. Estudos já demonstram que estímulos laboratoriais através de pipetas podem resultar em uma pseudo-gravidez, em que a fêmea permanece constantemente em diestro, dificultando então a prenhez (ANDERSEN & TUFIK, 2010).

As ratas que receberam dieta restrição começaram com uma média maior de peso do que as ratas dieta padrão, porém a partir da 5ª semana esse cenário mudou, tendo então uma queda do peso das ratas restritas de ferro. No estudo feito por Li et al., (2014) os resultados foram parecidos, onde as ratas do grupo restrição tiveram aumento de peso até a 4ª semana desta dieta, e a partir da 6ª tiveram uma queda significativa comparada ao grupo dieta controle. Ele demonstrou também que a partir da 6ª semana o grupo restrição teve uma queda nos níveis de hemoglobina e de contagem de glóbulos vermelhos, enquanto o grupo controle não, comprovante dessa forma a restrição de ferro no organismo das ratas.

Em relação ao comportamento, as ratas que receberam dieta restrição da concentração de ferro se apresentaram mais assustadas do que as ratas com dieta padrão. Outra característica apresentada por essas ratas foi a perda de pelo próximo ao pescoço (GAMBLING et al., 2003).

A avaliação da atividade locomotora, pelo Open-Field, serve como parâmetro indireto para medir o “desejo de mover”, que é um dos sintomas mais comuns na SPI, um distúrbio do movimento relacionado ao sono (BAIER et al., 2007). Em humanos, esse e outros sintomas são acentuados no início da noite. Neste sentido, o horário escolhido para a realização do teste nos animais foi das 9h às 11h, que é o horário que, para os ratos, corresponde ao início da noite dos humanos.

Apesar de não ter apresentado diferença estatística (devido ao N reduzido dos grupos) a figura 8 mostra que o grupo PDR efetuou mais *grooming* do que os grupos PDP e PDS, aumentando ainda mais essa diferença em relação ao grupo controle, sugerindo então que os sintomas relacionados a SPI aumente durante a prenhez e aumente ainda mais com a restrição de ferro.

As causas entre SPI e gravidez são desconhecidas, no entanto, entre as hipóteses mais debatidas está a alteração de ferro no organismo. No Brasil estima-se que a anemia afete 32,5% das grávidas (WHO, 2015) e a SPI afeta entre 11 a 30% (MANCONI et al., 2004a). Em adição, um dos sintomas mais relatados por mulheres grávidas é o incomodo nas pernas, coobando que gravidez e SPI possuem uma grande relação, podendo aumentar ainda mais com a presença da anemia. Já em modelo animal, um recente estudo, através do teste de campo aberto em diferentes momentos, verificou em ratas prenhes alterações na atividade locomotora e no comportamento. Essas alterações foram demonstradas por menos eventos de *rearing*, aumento no tempo de duração de *grooming* e redução no tempo de imobilização em relação ao grupo de ratas CTRL não prenhes (MARIANO et al., 2014). Neste estudo de Mariano et al., (2014) não foi feita nenhuma manipulação da dieta de ferro nas ratas prenhes, corroborando com os estudos que demonstram que a gestação per se já acarreta na alteração do metabolismo do ferro da mãe (GAMBLING et al.,

2004).

O grupo PDS mostrou resultados diferentes dos outros grupos nos parâmetros de ambulação total e *freezing*. Sendo que, valores reduzidos na ambulação total mostra uma menor necessidade de movimento, assim como o aumento do tempo de *freezing* engrandece essa sugestão.

Em estudos realizados com mulheres grávidas foi demonstrado regressão dos sintomas de SPI com a terapia de suplementação de ferro. As gestantes relataram uma melhor qualidade de vida e de sono e nenhum efeito colateral (VADASZ, 2013). No entanto, em modelos animais ainda existe uma lacuna em estudos que demonstrem a influência da suplementação de ferro na atividade locomotora e suas variáveis.

Em relação aos resultados referentes a prole, foi verificado que os filhotes de ratas alimentadas com dieta restrição da concentração de ferro obtiveram menor peso corporal do que o grupo dieta padrão e o grupo dieta suplementação de ferro. Essa diferença foi aumentando de acordo com as semanas, mostrando ser maior no 21º de vida dos filhotes, podendo comprometer o desenvolvimento para a fase adulta.

Como demonstrado em nossos resultados, a taxa de concepção de filhotes de ratas PDR foi menor do que o das ratas PDP e das PDS, e concomitante a isso a taxa de mortalidade dos filhotes das mães PDR também foi maior, porém, muito próxima ao grupo dieta padrão. Assim como foi mostrado em um estudo que a deficiência de ferro pode levar a não ovulação, a abertura vaginal retardada e ao estro anormal; esta deficiência também pode causar uma redução no número de nascimentos e um aumento na taxa de mortalidade (HIDIROGLOU, 1979). Essa proximidade dos resultados das ratas PDR e PDP pode se dar devido ao fato de que a própria gestação já trás alterações no metabolismo do ferro, muitas vezes provocando uma anemia (GAMBLING et al., 2004). Esse cenário muda no grupo PDS, onde é visto uma taxa menor de mortalidade dos filhotes.

Assim como já visto em diversos estudos, torna-se importante ressaltar que a suplementação de ferro é indicada durante a gestação devido a diversas

mudanças no metabolismo da mulher, para prevenir diversos fatores como: morbidade, partos prematuros, mortalidade materna e perinatal e baixo peso da criança recém-nascida, além de, proporcionar uma melhor saúde para a mulher grávida e agir como um agente terapêutico para os sintomas da SPI (MILMAN, 2006; MAHOMED, 2006; COGSWELL, 2003; CDC,1998; VADASZ, 2013).

Neste contexto, os resultados do presente estudo demonstraram que a dieta restrita de ferro foi capaz de promover mudanças no ciclo estral das ratas, e em consequência alterações negativas na prole. No entanto, a suplementação de ferro acarretou em melhora no comportamento locomotor de ratas prenhas e consequências positivas na prole.

7- DIFICULDADES ENCONTRADAS

Ate o momento não foi possível atingir o número amostral desejado. Foram encontradas dificuldades no método para emprenhar as ratas, reduzindo assim, o número de ratas prenhes.

Os dados apresentados são dados preliminares, no entanto mais experimentos estão sendo realizados para uma análise estatística mais completa. Mesmo com um número reduzido de animais, os resultados já demonstraram alterações.

8- REFERÊNCIAS

AISEN P. Iron metabolism: an evolutionary perspective. In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW. **Iron metabolism in health and disease**. London: W.B. Saunders Company Ltd; 1–30, 1994.

ANDERSEN ML, D'ALMEIDA V, KO GM, KAWAKAMI R, MARTINS PJF, MAGALHÃES LE, TUFIK S. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de experimentação**, 73-74, 2004.

ANDERSEN ML, TUFIK, S. **Animals Models as Tools in Ethical Biomedical Research**. FAPESP, São Paulo , 2010.

ANDREWS N.C. **Disorders of iron metabolism**. N. Engl. J. Med.; 341:1986–1995. doi: 10.1056/NEJM199912233412607, 1999.

BAIER PC, ONDO WG, WINKELMANN J. **Animal studies in restless legs. Syndrome**. Movement Disorders, v. 22, p. 459-65, 2007.

BO S, MENATO G, VILLOIS P, et al. **Iron supplementation and gestational diabetes in midpregnancy**. Am J Obstet Gynecol; 201:158.e1-6, 2009.

BRIGHAM D, BEARD J. **Iron and thermoregulation: a review**. Crit Rev Food Sci Nutr 36: 747–763, 1996.

BROADHURST, PL. **Experiments in psychogenetics**. In Eysenck, H. J. (ed.), Experiments in Personality, Psychogenetics and Psychopharmacology, Vol. 1, Routledge and Kegan Paul, London, pp. 3-102, 1960.

BRUNETTE KE, TRAN PV, WOBKEN JD, CARLSON ES, GEORGIEFF MK. **Gestational and neonatal iron deficiency alters apical dendrite structure of CA1 pyramidal neurons in adult rat hippocampus**. Dev Neurosci 32,238–248, 2010.

BRUNNER DP, MUNCH M, BIEDERMANN K, HUCH R, HUCH A, BORBELY AA. **Changes in sleep and sleep electroencephalogram during pregnancy**. Sleep 17,576-82, 1994.

CALIGIONI CS. **Assessing reproductive status/stages in mice**. Current Protocols in Neuroscience, 2009.

CASANUEVA E, VITERI FE. **Iron and Oxidative Stress in Pregnancy.** J. Nutr.; 133:1700–08, 2003.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States.** Morbidity and Mortality Weekly Report; 47(RR-3):1–29, 1998.

CHAVARRO JE, RICH-EDWARDS JW, ROSNER BA, WILLETT WC. **Iron intake and risk of ovulatory infertility.** Obstet Gynecol; 108: 1145-1152, 2006.

CHEN Q, BEARD JL, JONES BC. **Abnormal brain monoamine metabolism in iron deficiency anemia.** J Nutr Biochem 6,486– 93, 1995.

CHIASOON RB. Laboratory **Anatomy of the White Rat.** New York: McGraw-Hill, 1994.

COGSWELL ME, PARVANTA I, ICKES L, YIP R, BRITTENHAM GM. **Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial.** Am J Clin Nutr ; 78:773–81, 2003.

DALLMAN PR. **Changing iron needs from birth through adolescence.** New York: Nestec Ltd., Vevy/Raven Press, Ltd., 1992.

DARSHAN D, ANDERSON GJ. **Interacting signals in the control of hepcidin expression.** Biometals 22,77-87, 2009.

DEAN T JR, ALLEN RP, O'DONNELL CP, EARLEY CJ. **The effects of dietary iron deprivation on murine circadian sleep architecture.** Sleep Med 7(8),634-40, 2006.

DIETARY REFERENCE INTAKES. **The essential guide to nutrient requirements.** Institute of Medicine. National Academy of Science, Washington, D.C, 2006.

DRIVER HS, SHAPIRO CM. **A longitudinal study of sleep stages in young women during pregnancy and postpartum.** Sleep 15,449-53, 1992.

DURLEJ M, DUDA M, KNAPCZYK K, SŁOMCZYŃSKA M. **Effects of transferrin on aromatase activity in porcine granulosa cells in vitro.** Folia Histochem Cytobiol 46: 423-428, 2008.

ELERT VW, MACHADO AK, PASTORE CA. **Anemia gestacional:**

prevalência e aspectos nutricionais relacionados em parturientes de um hospital público do sul do Brasil. Aliment. Nutr;24(3):353-9, 2013.

ESTEVEES AM, LOPES C, FRUSSA-FILHO R, FRANK MK, CAVAGNOLLI D, ARIDA RM, TUFIK S, DE MELLO MT. **Spontaneously hypertensive rats: possible animal model of sleep-related movement disorders.** J Mot Behav 45(6),487-93, 2013.

ESTEVEES AM, SQUARCINI CF, LANCELOTTI CL, TUFIK S, DE MELLO MT. **Characteristics of muscle fibers in rats with limb movements during sleep after spinal cord injury.** Eur Neurol 67(2),107-15, 2012.

EZZATI M, LOPEZ AD, RODGERS A, MURRAY CJL, EDITORS. **Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors.** Geneva: World Health Organization; 2004:163–210; accessed 20 May, 2015.

FELT BT, BEARD JL, SCHALLERT T, SHAO J, ALDRIDGE JW, CONNOR JR, GEORGIEFF K. **Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats.** Behav Brain Res 171(2), 261-70, 2006.

FERNANDES, RMF. **O sono normal.** Medicina, Ribeirão Preto, 39 (2): 157-168, abr./jun. 2006.

FUKUSHIRO DF, CALZAVARA MB, TROMBIN TF, LOPEZ GB, ABÍLIO VC, ANDERSEN ML, TUFIK S, FRUSSA-FILHO R. **Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice.** Physiology & Behavior 92,773–779, 2007.

GAMBLING L, ANDERSEN HS, CZOPEK A, WOJCIAK R, KREJPCIO Z, MCARDLE HJ. **Effect of timing of iron supplementation on maternal and neonatal growth and iron status of iron-deficient pregnant rats.** J Physiol 561,195-203, 2004.

GAMBLING L, LANG C, MCARDLE H.J. **Fetal regulation of iron transport during pregnancy.** Am J Clin Nutr: 1903S–1907S, 2011.

GAMBLING L, DUNFORD S, WALLACE DI, ZUUR G, SOLANKY N, SRAI SK, MCARDLE HJ. **Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat.** J Physiol 15,603-10, 2003.

GANZ T, NEMETH E. **Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290,G199-203, 2006(b).

GANZ T. **Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism.** Am J Hematol 1,29-35, 2006(a).

GARCÍA-BORREGUERO D, WILLIAMS AM. **Dopaminergic argumentation of restless legs syndrome.** Sleep Med Rev; 14:339–4, 2010.

GIUSTI, B. **Qualidade de sono em praticantes de atividade física regular.** Coleção Pesquisa em Educação Física - Vol.6, n 2, 2007.

GOODMAN JDS, BRODIE C, AYIDA GA. **Restless leg syndrome in Pregnancy.** British Medical Journal 297,1101-1102, 1988.

GROTE L, LEISSNER L, HEDNER J, USFBERG J. **A randomized, double-blind, placebo controlled, multi-center study of intravenous iron sucrose and placebo in the treatment of restless legs syndrome.** Mov Disord; 24:1445–52, 2009.

GUO H, GAO Q, CHU X: **Trace elements and infertility.** Henan J Prev Med; 12:274–275, 2001.

HALLBERG L. **Iron Balance in Pregnancy and Lactation. In: Nutritional Anemias.** Nestlé Nutrition Workshop Series. Vol. 30. Editors: Samuel J. Fomon & Stanley Zlotkin. New York: Raven Press, 1992.

HERTZ G, FAST A, FEINSILVER SH, ALBERTARIO CL, SCHULMAN H, FEIN AM. **Sleep in normal late pregnancy.** Sleep 15,246-51, 1992.

HIDIROGLOU, M. **Trace elemento deficiencies and fertility in reinants: a review.** J Dairy Sci, 62, pp. 1195–1206, 1979.

HOAR, W.S. **General and Comparative Physiology.** 2nd ed. Prentice-Hall International, ed. New Jersey EUA, 1975.

INTERNATIONAL ANAEMIA CONSULTATIVE GROUP. **Guidelines for the eradication of iron deficiency anaemia. A report of the International Nutritional Anaemia Consultative Group.** Washington, DC, The Nutrition Foundation; 1-29, 1977.

JOHN W., E.J. et al. **Present Knowledge in Nutrition**. Ingarss 2014. Doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2, 2014.

KOLESAROVA A, CAPCAROVA M, MEDVEDOVA M, SIROTKIN AV, KOVACIK J. **In vitro assessment of iron effect on porcine ovarian granulosa cells: secretory activity, markers of proliferation and apoptosis**. *Physiol Res*; 60:503–510, 2011.

KOZUKI N, LEE AC, KATZ J. **Child Health Epidemiology Reference Group. Moderate to severe, but not mild, maternal anemia is associated with increased risk of small-for-gestational-age outcomes**. *J Nutr*. 142:358–62. doi:10.3945/jn.111.149237, 2012.

KRANICK SM, MOWRY EM, COLCHER A, HORN S, GOLBE LI. **Movement Disorders and Pregnancy: A Review of the Literature**. *Movement Disorders* 6,665-671, 2010.

KUSTRITZ MVR. **Reproductive behavior of small animals**. *Theriogenology*; 64:734-46. 2005.

Li YQ, Cao XX, Bai B, Zhang JN, Wang MQ, Zhang YH. **Severe iron deficiency is associated with a reduced conception rate in female rats**. *Gynecol Obstet Invest* 77:19–23, 2014.

LLEWELYN-JONES D. **Severe anaemia in pregnancy as seen in Kuala Lumpur**. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*; 5:191–7, 1965.

LONG JA, EVANS HM. **The estrous cycle in the rat and its associated phenomena**. *Memories of University of California*, v.6, p.1-148, 1922.

LOPES C, ESTEVES AM, FRUSSA-FILHO R, TUFIK S, DE MELLO MT. **Evaluation of periodic limb movements in a putative animal model of restless leg syndrome**. *Mov Disord*. Mar;27(3):413-20, 2012.

LOZOFF B, BEARD J, CONNOR J, BARBARA F, GEORGIEFF M, SCHALLERT T. **Long-lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy**. *Nutr Rev* 64,S34–S91, 2006.

LYNCH SR, STOLTZFUS RJ. **Iron and ascorbic Acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds**. *J Nutr*; 133:2978S–84S, 2003.

MAHOMED K. **Iron and folate supplementation in pregnancy (Cochrane Review)**. In: The Cochrane Library, Issue 4. Chichester, John Wiley & Sons, 2006.

MANCONI M, GOVONI V, DE VITO A, ECONOMOU NT, CESNIK E, CASETTA I, MOLLICA G, FERINI-STRAMBI L, GRANIERI E. **Restless legs syndrome and pregnancy**. Neurology 63,1065-1069, 2004(b).

MANCONI M, GOVONI V, DE VITO A, ECONOMOU NT, CESNIK E, MOLLICA G, GRANIERI E. **Pregnancy as a risk factor for restless legs syndrome**. Sleep Medicine 5,305-308, 2004(a).

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. **Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations**. Brazilian Journal of Biology 62(4A), 609-614, 2002.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. **Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations**. Brazilian Journal of Biology 62(4A), 609-614, 2002.

MARIANO MO, ESTEVES AM, FRANK MK, CAPERUTO LC, MANCONI M, TUFIK S, DE MELLO MT. **Changes in motor behavior during pregnancy in rats: the basis for a possible animal model of restless legs syndrome**. Rev Bras Ginecol Obstet 36(10),436-41, 2014.

MAZETI, C.M.; MONSERRAT, FURLAN, M.M.D.P. **Crescimento e parâmetros reprodutivos de rats wistar, em restrição alimentar desde o nascimento**. Acta Sci. Biol, Sci. Maringá. Vol. 30. Num. 2. p. 197-204, 2008.

MCARDLE HJ, ANDERSEN HS, JONES H, GAMBLING L. **Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats - a review**. Placenta 27,56-60, 2006.

MEITES J, STERGER RW, HUANG HHH. **Relation of neuroendocrine system to the reproductive decline in aging rats and human subjects**. Federation Proc; 39:3168-72, 1980.

MILLARD KN, FRAZER DM, WILKINS SJ, ANDERSON GJ. **Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat**. Gut 53(5),655-60, 2004.

MILLER EM. **Iron status and reproduction in US women: National Health**

and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. PLoS One 9:e112216, 2014.

MILMAN N, BYG KE, BERGHOLT T, et al. **Body iron and individual iron prophylaxis in pregnancy—should the iron dose be adjusted according to serum ferritin?** Ann Hematol.; 85:567-73, 2006.

OMS. **Diretriz: Suplementação diária de ferro e ácido fólico em gestantes.** Genebra: Organização Mundial da Saúde; 2013.

ONDO WG et al. **Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: A possible model for restless legs syndrome.** Movement Disorders, v.15, p.154-8, 2000.

ONER P, DIRIK EB, TANER Y, CAYKOYLU A, ANLAR O. **Association between low serum ferritin and restless legs syndrome in patients with attention deficit hyperactivity disorder.** Tohoku J Exp Med; 213:269–76, 2007.

PAIVA AA, RONDÓ PH, GUERRA-SHINOHARA E. **Parameters for the assessment of iron status.** Rev Saúde Publica 34,421-6, 2000.

PALMA S, PEREZ-IGLESIAS R, PRIETO D, PARDO R, LLORCA J, DELGRADO-RODRIGUEZ M. **Iron but not folic acid supplementation reduces the risk of low birthweight in pregnant women without anaemia: a case-control study.** J Epidem Comm Health; 62:120-4, 2008.

QU S, LE W, ZHANG X, XIE W, ZHANG A, ONDO WG. **Locomotion is increased in A11- lesioned mice with iron deprivation: a possible animal model for restless legs syndrome.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 66, 383-388, 2007.

QUEIROZ, S. D. S. **Anemia ferropriva na infância Iron deficiency anemia in children.** J. Pediatr. (Rio. J). 76, 298–304, 2000.

RAT GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORTIUM. **Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution.** Nature, v.428, p.493-521, doi:10.1038/nature 02426, 2004.

REEVES PG, NUELSEN FH, FAHEY GC JR. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** J Nutr 123(11),1939-51, 1993.

REEVES PG. **Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet.** J Nutr 127,838S-841S. Review, 1997.

ROCHA, D.S. et al. **Estado nutricional e anemia ferropriva em gestantes: relação com o peso da criança ao nascer.** Rev. Nutr., v.18, p.481-89, 2005.

ROE MA, COLLINGS R, DAINY JR, SWINKELS DW, FAIRWEATHER-TAIT SJ. **Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men.** Am J Clin Nutr 89,1088-91, 2009.

SCHOLL TO, HEDIGER ML. **Anemia and iron-deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome.** Am J Clin Nutr ; 59(suppl):492S–501S, 1994.

SIDDAPPA AJ, RAO R, LONG JD, WIDNESS JA, GEORGIEFF MK. **The assessment of newborn iron stores at birth: A review of the literature and standards for ferritin concentrations.** Neonatology 92,73–82, 2007.

SPEROFF L, FRITZ MA. **Clinical gynecologic endocrinology and infertility.** 7th ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 2005.

SPOLADOR T, ALLIS JC, PONDÉ MP. **Treatment of restless legs syndrome.** Revista Brasileira de Psiquiatria; 28:308–15, 2006.

STEVENS GA, FINUCANE MM, DE-REGIL LM, PACIOREK CJ, FLAXMAN SR, BRANCA F et al. **Global, regional, and national trends in haemoglobin concentration and prevalence of total and severe anaemia in children and pregnant and non-pregnant women for 1995–2011: a systematic analysis of population-representative data.** Lancet Glob Health. 2013.

STOLTZFUS RJ. **Iron deficiency: global prevalence and consequences.** Food Nutr Bull 24: S99–103, 2003.

TAMURA T, GOLDENBERG RL, HOU J, JOHNSTON KE, CLIVER SP, RAMEY SL, NELSON KG. **Cord serum ferritin concentrations and mental and psychomotor development of children at five years of age.** J Pediatr 140,165–170, 2002.

THEODORSSON E. **Haemochromatosis, hepcidin and disorders of iron metabolism: fields of substantial clinical relevance and current advances.** Scand J Clin Lab Invest 66,79-82, 2006.

TRAN PV, FRETHAM SJ, CARLSON ES, GEORGIEFF MK. **Long-term reduction of hippocampal brain-derived neurotrophic factor activity after fetalneonatal iron deficiency in adult rats.** *Pediatr Res* 65,493–498, 2009.

TRINDER D, AYONRINDE OT, OLYNYK JK HCV. **Iron, and oxidative stress: the new choreography of hepcidin.** *Gastroenterology* 134,348-51, 2008.

VAN DER STAAT FJ. **Animal modelo f behavioral dysfunction: basic concepts and classifications, and na evaluation strategy.** *Brain Res Ver*; 52:131-59, 2006.

WEINSTOCK LB, WALTERS AS, PAUEKSAKON P. **Restless legs syndrome – Theoretical roles of inflammatory and immune mechanisms.** *Sleep Med Rev*; 16:341–54, 2012.

WESTPHAL L M, POLAN ML, TRANT AS, MOONEY SB. **A nutritional supplement for improving fertility in women: a pilot study.** *J. Reprod. Med.*; 49, 289 -293, 2004.

WHO. **The global prevalence of anemia in 2011.** Geneva: World Health Organization, 2015.

WHO. **Worldwide prevalence of anemia 1993-2005: WHO global database on anemia.** Geneva, Switzerland, 2008.

WHO/UNICEF/UNU. **Iron deficiency anaemia. Assessment prevention and control. A guide for programme managers.** Geneva, WHO/UNICEF/UNU, 2001.

WILSON JG, LINDQUIST JH, GRAMBOW SC, CROOK ED, MAHER JF. **Potential role of increased iron stores in diabetes.** *Am J Med Sci.*; 325:332-9, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.** Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2002: reducing risks, promoting healthy life.** Geneva: WHO, 2002.

YANG D, WU J, LI C, WANG S. **Microelement and eugenics.** *Chin J Woman Child Health Res*; 19:143–145, 2008.

YOUDIM MBH, YEHUDA S, BEM-URIAH Y. **Iron deficiency-induced**

circadian rhythm reversal of dopaminergic-mediated behaviours and thermoregulation in rats. European Journal of Pharmacology. 74(4):295-301, 1981.

YOUDIM MB, BEN-SHACHAR D, ASHKENAZI R, YEHUDA S. **Brain iron and dopamine receptor function.** Adv Biochem Psychopharmacol 37,309-21, 1983.

ZHANG AS, ENNS CA. **Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms.** J Biol Chem; 284,711-5, 2008.

ZILLER V, HADJI P, THIELSCHER C, ZILLER M, KOSTEV K. **Prevalence of female subfertility in German gynecological practices.** Gynecol Endocrinol; 29: 767–770, 2013.

ZLOTKIN SH, ATKINSON S, LOCKITCH G. **Trace elements nutrition for premature infants.** Clin Perinat; 22: 223-41, 1995.

9- ANEXOS



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**DISTÚRBIOS DO MOVIMENTO RELACIONADOS AO SONO: INTERFACES ENTRE EXERCÍCIO FÍSICO E METABOLISMO DO FERRO EM RATOS**", protocolo nº **3876-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Andrea Maculano Esteves / Beatriz da Silva Franco**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em **30 de julho de 2015**.

Vigência do projeto: **07/2015-07/2017**

Espécie/Linhagem: **Rato heterogênico / Wistar**

No. de animais: **102**

Peso/Idade: **21 dias / 30g**

Sexo: **42 machos / 60 fêmeas**

Origem: **CEMIB/UNICAMP**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, **30 de julho de 2015**.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva