

AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B₁₂ INDUZIDA POR DIETA RICA EM PECTINA SOBRE TESTES COMPORTAMENTAIS EM RATOS

Julia Altero Parra e Isabela Rosier Olimpo Pereira

Apoio: PIVIC Mackenzie

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define depressão como sendo “um transtorno mental comum e caracterizado por tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, distúrbios do sono ou do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração”. A depressão incapacita o indivíduo doente, na medida em que ele passa a ver limitada sua condição de vida diária, diminuindo, inclusive, sua capacidade de estudar e/ou de ser ativo economicamente (WHO, 2015). Alguns estudos sugerem que a deficiência de vitamina B₁₂ (cobalamina), muito frequente em idosos longevos, está relacionada a quadros depressivos (GERZSON, 2009). Disfunções neurológicas isoladas podem ser o resultado clínico da deficiência crônica de vitamina B₁₂, mesmo sem nenhum sinal de anemia (PANIZ et al., 2005). A deficiência de vitamina B₁₂ pode ser induzida em ratos pela adição de pectina à dieta, pois se complexa a vitamina B₁₂ no intestino e interfere na circulação entero-hepática, o que reduz a sua biodisponibilidade (CULLEN, OACE, 1989). O propósito deste estudo é observar se a dieta adicionada de 5% pectina em ratas fêmeas jovens produz comportamento do tipo depressivo mensurado pelo teste do nado forçado. Além disso, pretende-se ampliar os testes comportamentais. Além do nado forçado, outros testes são propostos para confirmar os efeitos da deficiência de vitamina B₁₂ sobre o comportamento dos tipos depressivo, ansioso, atividade locomotora e aprendizagem e memória.

Palavras-chave: Vitamina B₁₂. Dieta. Testes comportamentais.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) defines depression as "a common mental disorder characterized by sadness, loss of interest or pleasure, guilt or low self-esteem, sleep or appetite disorders, tiredness and lack of concentration". Depression incapacitates the sick individual as they become limited in their daily living conditions, even reducing their ability to study and / or to be economically active (WHO, 2015). Some studies suggest that vitamin B₁₂ deficiency (cobalamin), which is very common in the elderly, is related to depressive symptoms (GERZSON, 2009). Isolated neurological dysfunctions may be the clinical result of chronic vitamin B₁₂ deficiency, even without any signs of anemia (PANIZ et al., 2005). Vitamin B₁₂ deficiency can be

induced in rats by the addition of pectin to the diet, since vitamin B12 in the gut complexes and interferes with the enterohepatic circulation, which reduces its bioavailability (CULLEN, OACE, 1989). The purpose of this study is to observe whether the diet added of 5% pectin in young female rats produces depressive behavior measured by the forced swimming test. In addition, it is intended to broaden the behavioral tests. In addition to forced swimming, other tests are proposed to confirm the effects of vitamin B12 deficiency on the behavior of depressive, anxious, locomotor activity, and learning and memory types.

Keywords: B₁₂ vitamin. Diet. Behavioral tests.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define depressão como sendo “um transtorno mental comum e caracterizado por tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimento de culpa ou baixa autoestima, distúrbios do sono ou do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração”. A depressão incapacita o indivíduo doente, na medida em que ele passa a ver limitada sua condição de vida diária, diminuindo, inclusive, sua capacidade de estudar e/ou de ser ativo economicamente (WHO, 2015).

O “World Mental Health Survey Initiative” (WMHSI) foi um inquérito epidemiológico de larga escala, desenvolvido pela OMS, que abrangeu 18 países e mostrou que a taxa média de prevalência da depressão é de 14,6% nos 10 países de alta renda analisados (Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Israel, Itália, Holanda, Nova Zelândia, Japão e Estados Unidos) e de 11,1% nos 8 países de média e baixa renda que participaram do projeto (Brasil, Colômbia, México, Líbano, África do Sul, Ucrânia, Índia e China). No Brasil, essa taxa ficou em 18,4% (HARVARD, 2005; COSTA, MAGALHÃES, 2013). Atualmente acredita-se que a depressão resulta da interação entre fatores biológicos, psicológicos, ambientais e genéticos – portanto, de caráter multifatorial – associados a efeitos estressores. (SOEIRO-DE-SOUZA, VIEIRA, 2013).

Alguns estudos sugerem que a deficiência de vitamina B₁₂ (cobalamina), muito frequente em idosos longevos, está relacionada a quadros depressivos (GERZSON, 2009). Disfunções neurológicas isoladas podem ser o resultado clínico da deficiência crônica de vitamina B₁₂, mesmo sem nenhum sinal de anemia (PANIZ et al., 2005).

Fábregas et al. (2011) sugeriram em seu estudo que a propriedade da vitamina B₁₂ e do ácido fólico em metilar moléculas precursoras de monoaminas tais como a serotonina, a noradrenalina e a dopamina, poderia explicar, ao menos em parte, a fisiopatologia dos transtornos de humor associados à sua deficiência. Além das monoaminas, a síntese de S-adenosil-metionina (SAM), responsável por várias reações de metilação no cérebro e com possíveis efeitos no humor, também depende dessas vitaminas.

A deficiência de vitamina B₁₂ pode ser induzida em ratos pela adição de pectina à dieta, pois se complexa a vitamina B₁₂ no intestino e interfere na circulação entero-hepática, o que reduz a sua biodisponibilidade (CULLEN, OACE, 1989). O estudo de Choi et al. (2004) utilizou pectina na dieta de ratos para indução de deficiência de vitamina B₁₂ com severidade insuficiente para causar anemia ou doenças. Esta depleção foi capaz de gerar aberrações em substituições de base e metilação de DNA.

Outro estudo também utilizou dieta suplementada com 5% de pectina em ratas, provocando a redução de 76% na concentração sérica de vitamina B₁₂ e um aumento de 60% na concentração de homocisteína (KUMAR et al. 2013).

Num estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa foi observado que a dieta adicionada de 5% pectina em ratos machos jovens produziu comportamento do tipo depressivo mensurado pelo teste do nado forçado (resultados preliminares serão mostrados no final do projeto entre métodos e cronograma). O propósito da presente proposta de estudo é confirmar se o mesmo resultado pode ser observado em fêmeas, com o intuito de posteriormente verificar o efeito sobre a prole. Além disso, pretende-se ampliar os testes comportamentais. Além do nado forçado, outros testes são propostos para confirmar os efeitos da deficiência de vitamina B12 sobre o comportamento dos tipos depressivo, ansioso, atividade locomotora e aprendizagem e memória.

Deste modo, o presente trabalho pretende avaliar se a dieta enriquecida em pectina para provocar deficiência de vitamina B12 é capaz de induzir comportamento tipo depressivo e ansioso e afetar a atividade locomotora, aprendizagem e memória de ratas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O termo depressão é historicamente novo e foi usado pela primeira vez em 1680, indicando um estado de desânimo ou perda de interesse (SOUZA; LACERDA, 2013). Atualmente, esse termo tem sido utilizado genericamente tanto para expressar um estado afetivo comum à vida do ser humano - a tristeza - quanto para expressar a síndrome ou a doença (DEL PORTO, 1999).

As relações estudadas entre a incapacidade sofrida em decorrência de qualquer doença e o tempo de vida do indivíduo, revelam que a depressão é uma das doenças que sobressaem sob esse aspecto. É uma enfermidade duas vezes mais frequente em mulheres adultas do que em homens (SULZBACH et al, 2013).

O “World Mental Health Survey Initiative” (WMHSI) foi um inquérito epidemiológico de larga escala, desenvolvido pela OMS, que abrangeu 18 países e mostrou que a taxa média de prevalência da depressão é de 14,6% nos 10 países de alta renda analisados (Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Israel, Itália, Holanda, Nova Zelândia, Japão e Estados Unidos) e de 11,1% nos 8 países de média e baixa renda que participaram do projeto (Brasil, Colômbia, México, Líbano, África do Sul, Ucrânia, Índia e China). No Brasil, essa taxa ficou em 18,4% (COSTA; MAGALHÃES, 2013).

Acredita-se que a depressão resulta da interação entre fatores biológicos, psicológicos, ambientais e genéticos – portanto, de caráter multifatorial – associados a efeitos estressores. Como risco ambiental entende-se o uso de substâncias psicoativas como álcool, droga, inibidores de apetite e antidepressivos, a alteração dos ritmos

biológicos e ocorrências de situações inadequadas para a idade (SOEIRO-DE-SOUZA; VIEIRA, 2013).

De acordo com Soeiro-de-Souza e Vieira (2013), na neurobiologia da depressão destacam-se “os achados associados a alterações em sistemas de neurotransmissão, especialmente de monoaminas e, mais recentemente, os sistemas glutamérgico e melatonérgico, além de alterações neuroendócrinas centrais e periféricas, bem como neuroimunes, com concomitantes alterações estruturais e bioquímicas no cérebro. Tais alterações também envolvem mudanças na regulação de cascatas intracelulares, na expressão gênica e em fatores neurotróficos, todos diretamente envolvidos na modulação de mecanismos neuroprotetores e de resiliência celular.”

Desde a década de 1960, estudos de caso-controle têm mostrado relação entre folato, vitamina B₁₂ e depressão (TIEMEIER et al, 2002).

Fábregas, Vitorino e Teixeira (2011) mostram em seu estudo que: “A propriedade da vitamina B₁₂ e do ácido fólico de metilar moléculas precursoras de monoaminas como serotonina, noradrenalina e dopamina poderia explicar, ao menos em parte, a fisiopatologia dos transtornos do humor associados à sua deficiência. Além das monoaminas, a síntese da S-adenosil-metionina (SAM), responsável por várias reações de metilação no cérebro e com possíveis efeitos no humor, também depende da vitamina B₁₂ e do ácido fólico.”

A metilação da homocisteína (Hcy) repõe os estoques de SAM quando a metionina dietética estiver em baixas concentrações. A SAM é o único doador de grupamentos metil para numerosas reações de metilação, incluindo algumas essenciais para a manutenção da mielina. A deficiência de vitamina B₁₂ leva ao aumento de Hcy, diminuição da SAM e conseqüente redução de importantes reações de transmetilação do organismo, provocando defeitos desmielinizantes no sistema nervoso (PARLETTA; MILTE; MEYER, 2013).

A deficiência de vitamina B₁₂ também resulta em uma deficiência funcional de folato. A deficiência de folato poderá reduzir os ciclos de metilação do DNA. As concentrações séricas de vitamina B₁₂, folato e homocisteína estão relacionadas à depressão (PARLETTA; MILTE; MEYER. 2013).

A deficiência de vitamina B₁₂ pode ser induzida em ratos pela adição de pectina à dieta, pois se complexa a vitamina B₁₂ no intestino e interfere na circulação entero-hepática reduzindo a sua biodisponibilidade (CULLEN; OACE, 1989). O estudo de Choi et al. (2004) utilizou pectina na dieta de ratos para indução de deficiência de vitamina B₁₂ com severidade insuficiente para causar anemia ou doenças. Esta depleção foi capaz de gerar aberrações em substituições de base e metilação de DNA. \

Um estudo que também utilizou dieta suplementada com 5% de pectina em ratas provocou redução de 76% na concentração sérica de vitamina B12 e um aumento de 60% na concentração de homocisteína. A prole destas ratas apresentaram maior risco para obesidade e doença cardiovascular (KUMAR et al, 2013).

3. METODOLOGIA

O estudo foi conduzido dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsinque e submetido ao comitê de ética para uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Processo CEUA/UPM).

Utilizaram-se ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*) fêmeas, recém-desmamadas (45 a 50 dias), pesando aproximadamente 50g, que foram obtidas do biotério central da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie em gaiolas, à temperatura ambiente de 22°C \pm 2, num ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à comida. Serão utilizadas, dependendo do grupo e fase do experimento, ração comercial padrão para ratos da marca Nuvital® ou ração pectina composta de ração comercial para ratos (Nuvital®) enriquecida com 5% de pectina (%m/m). O consumo de ração e o peso dos animais são controlados semanalmente. Os animais ficaram em adaptação por 7 dias antes do início do experimento e distribuídos aleatoriamente em dois grupos com n=10 em cada um, denominados “Controle” e “Deprimido”.

Um esquema ilustrativo com o delineamento da parte experimental do projeto está na figura 1. O experimento foi dividido em duas fases, totalizando 12 semanas de estudo (6 semanas para cada fase). Na primeira fase do projeto, o grupo “Deprimido” foi alimentado com ração com pectina e o grupo “Controle” foi alimentado com ração padrão. No final dessa fase, os dois grupos participaram dos testes comportamentais descritos a seguir. Na fase 2, os grupos receberam ração padrão. No final dessa nova fase realizaram os testes comportamentais novamente.

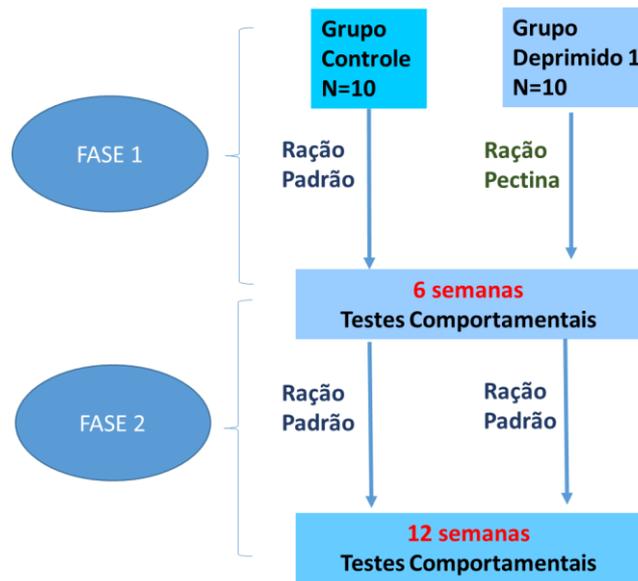
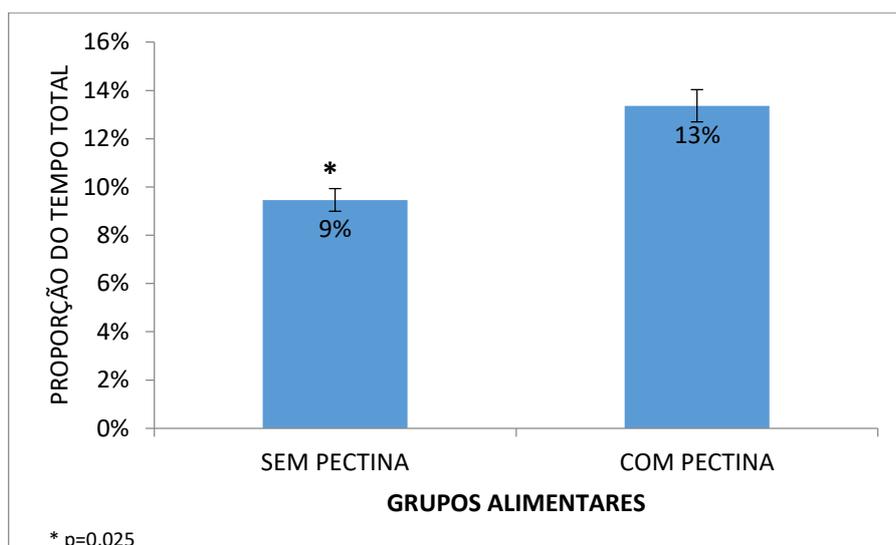


Figura 1 – Delineamento do experimento proposto.

Testes Comportamentais

Teste do Nado Forçado (Teste de Porsolt)

De acordo com o INEC (2012) “existe a hipótese de que algumas espécies de animais podem exibir alterações do comportamento depressivo, principalmente em roedores. Em geral, os animais são expostos a um evento estressante inescapável e no dia seguinte o comportamento deste animal submetido ao mesmo contexto do evento estressante é avaliado. De todos os modelos utilizados no estudo da depressão em roedores, o desamparo aprendido e o teste do nado forçado são os mais utilizados.” Assim, os ratos foram expostos a duas sessões de nado, com um intervalo de 24 horas entre eles, num cilindro transparente de 27cm de diâmetro e 20 cm de altura, com água a 25°C no nível de 13 cm. No pré-teste os animais foram submetidos à natação forçada durante 15 minutos, após os quais cada animal foi levado para secar na câmara de aquecimento, a 32°C, por 15 minutos, e então voltaram para suas gaiolas (MENDES-DA-SILVA et al., 2002). No teste (vinte e quatro horas após o pré-teste), os animais retornaram ao tanque para nado por 5 minutos e posteriormente levados à câmara de aquecimento. A imobilidade comportamental, ou tempo de desistência, que representa o tempo que o animal faz apenas movimentos suficientes para manter o focinho fora da água (MENDES-DA-SILVA et al., 2002), foi quantificada com o auxílio de cronômetros digitais. Todo o teste será filmado e analisado por 2 avaliadores diferentes.

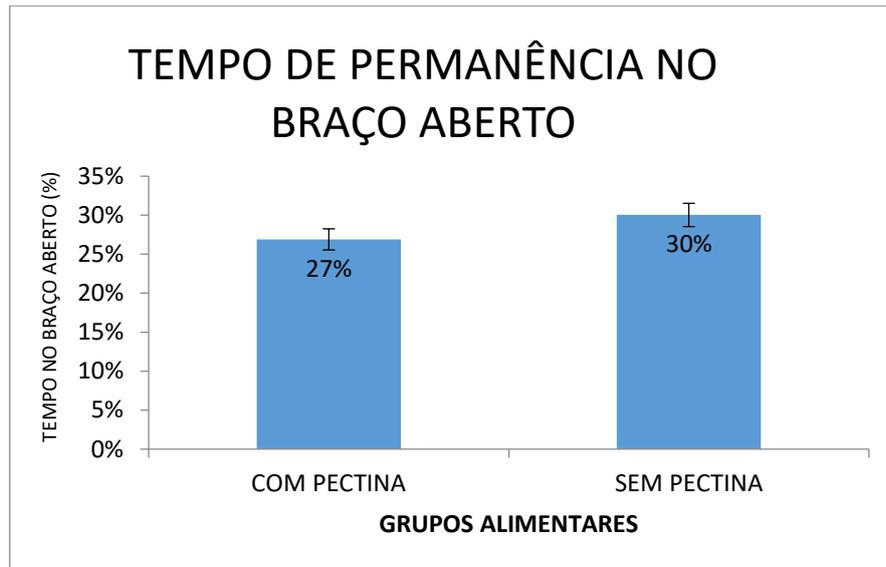


Análise do tempo de imobilidade (período de desistência):

Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,025$) entre os grupos, o que indica que os animais alimentados com dieta enriquecida de pectina apresentaram comportamento do tipo depressivo ($t=-2,283$).

Labirinto em Cruz Elevado

Este teste tem o objetivo de avaliar o comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora. O aparato consiste de quatro braços, sendo 2 fechados e 2 braços abertos elevados a 50 cm da superfície. Todos os braços são ligados por uma plataforma central. Os ratos foram introduzidos na área central com a face voltada para o braço aberto e permaneceram por 5 minutos. Foram anotados os números de entradas e tempo de permanência em cada tipo de braço. Os dados foram comparados com parâmetros previamente estabelecidos. O teste foi elaborado num ambiente escuro para que a luminosidade possa ser controlada (COSTA-NUNES et al., 2015). Os animais dos diferentes grupos foram avaliados de forma alternada, e o equipamento será limpo com álcool 5% entre cada período de observação.

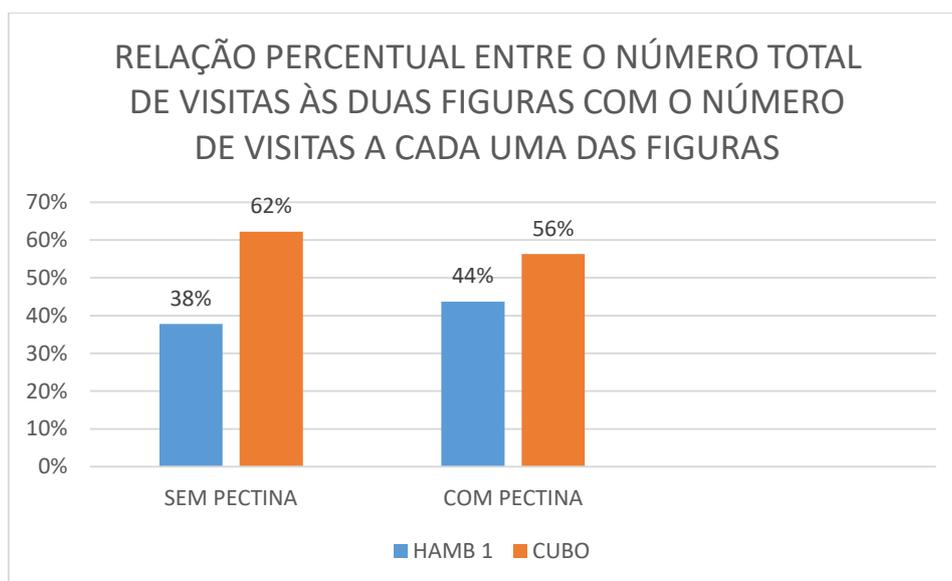


Análise da emocionalidade:

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,621$) entre os grupos, o que indica que os animais alimentados com dieta enriquecida de pectina não têm problema com a emocionalidade.

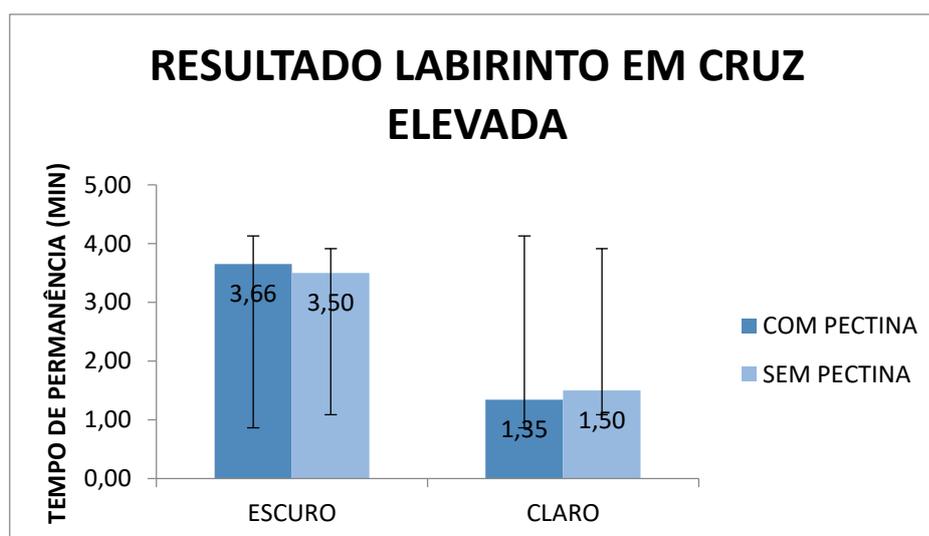
Reconhecimento de Objetos

O teste tem o objetivo de avaliar a memória de curto e de longo prazo. O teste se baseia em um comportamento típico dos roedores de quando apresentados a um objeto familiar e não familiar apresentarem a tendência de explorarem por mais tempo a novidade. O teste foi dividido em 3 fases: treino, teste e o reteste e todos ocorreram em uma arena de campo aberto. Antes do treino, os animais passaram por um período de habituação no campo aberto. Na sessão de treino, os animais foram apresentados a dois objetos idênticos (A1 e A2) por 5 minutos, sendo os mesmos fixados no chão da arena por uma fita adesiva. O tempo de exploração (cheirar ou tocar os objetos) foi avaliado. O procedimento foi repetido 3 horas após o treino para avaliação da memória de curto prazo utilizando os objetos A e B e 24 horas após o treino, para avaliação da memória de longo prazo, utilizando os objetos A e C. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados de forma alternada, e o equipamento foi limpo com álcool 5% entre cada período de observação (BEVINS; BESHEER, 2006; MOYSÉS, 2010).



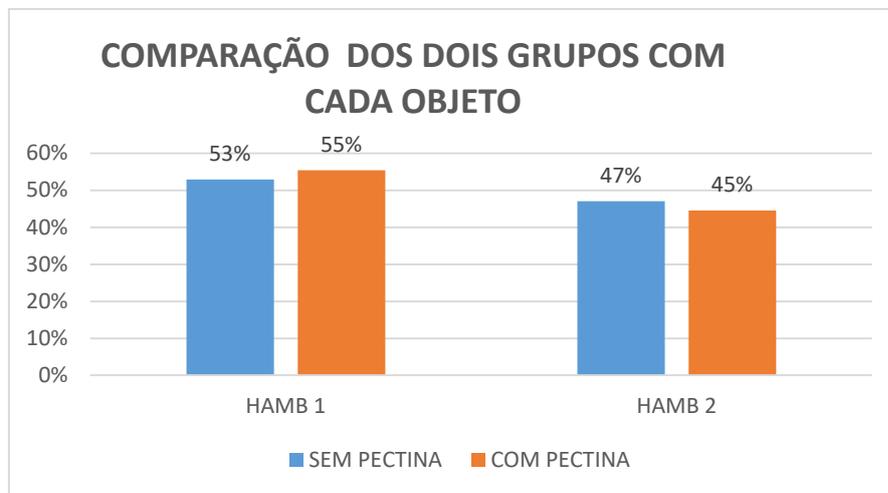
4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Labirinto em Cruz elevada

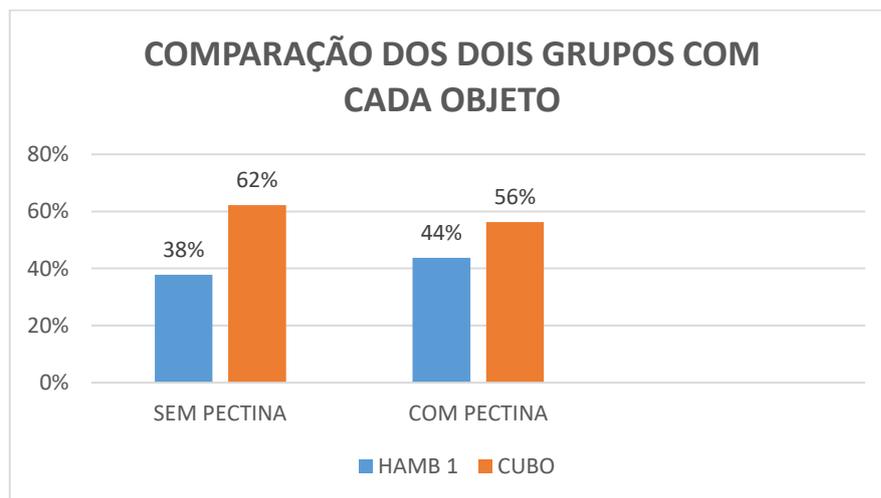


Reconhecimento de objetos

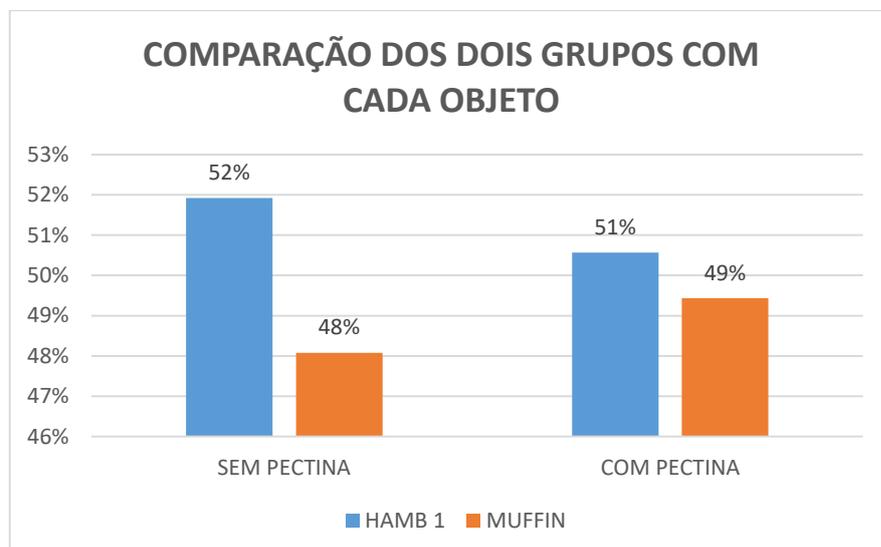
Reconhecimento pré-teste



Reconhecimento 4 horas



Reconhecimento 24 horas



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o achado de que fêmeas são mais suscetíveis à depressão em modelo experimental (KENNETT et al., 1986) e que a depressão é mais prevalente em mulheres (SULZBACH et al., 2013), o presente trabalho validou e caracterizou um modelo experimental de depressão induzido pela suposta deficiência de vitamina B₁₂, com o diferencial de ser realizado em ratas (fêmeas), favorecendo o posterior estudo de efeitos da deficiência materna de vitamina B₁₂ e da depressão sobre a prole.

Não foi possível confirmar a hipótese devido à falta de financiamento para realizar as análises de Vitamina B₁₂, vitamina B₁₂ ativa (Holo-TC), ácido fólico e homocisteína séricos, necessitando, portanto, de novos estudos.

6. REFERÊNCIAS

CHOI, S.; FRISO, S.; GHANDOUR, H.; BAGLEY, P.J.; SELHUB, J.; MASON, JB. Vitamin B12: Deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. **The Journal of Nutrition**, n.4, v.134, p.750-5, 2004.

COSTA, L.G.; MAGALHÃES, P.V.S. Epidemiologia de transtorno depressivo maior. In: QUEVEDO, J., SILVA, A.G. **Depressão. Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 2, p.30-38.

CULLEN R.W., OACE S.M. Dietary pectin shortens the biologic half-life of vitamin B12 in rats by increasing fecal and urinary losses. **J Nutr.**, n.119, v.8, p.1121-1127, 1989.

FÁBREGAS, B.C., VITORINO, F.D., TEIXEIRA, A.L. Deficiência de vitamina B12 e transtorno depressivo. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v.60, n.12, 2011.

GERZSON, B.M.C. **Análise da relação entre sintomatologia depressiva, níveis de vitamina B12 com sintomatologia em idosos longevos**. 2010. 52p. Dissertação (Mestrado em Gerontologia Biomédica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HARVARD Medical School. Health Care Policy. **The World Mental Health Survey Initiative (WMHSI)**. Disponível em <<http://www.hcp.med.harvard.edu/wmh/index.php>> Acesso em 28/junho/2015.

KUMAR, K.A.; LALITHA, A.; PAVITHRA, D.; PADMAVATHI, I.J.; GANESHAN, M.; RAO, K.R. et al. Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n.24, p.25-31, 2013.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, n.60.v.4. P.928-931, 2002.

PANIZ, C; GROTO, D; SCHMITT, GC; VALENTINI J; SCHOTT, KL; POMBLUM, VJ; GARCIA, SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**, n.5, v. 41,p.323-334, 2005.

RIAZ MS, BOHLEN MO, GUNTER BW, HENRY Q, STOCKMEIER CA, PAUL IA. Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiol Behav*. 2015; S0031-9384(15)30101-3. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.09.005.

SOEIRO-DE-SOUZA, M.G; VIEIRA, R.M. Neurobiologia do transtorno depressivo maior. In: QUEVEDO, J., SILVA, A.G. Depressão. **Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap.4, p.49-56.

WHO. Mental Health. **Depression**. Disponível em
<http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/> Acesso em
08/abr/2017.

Contatos: ju_parra22@hotmail.com e isabela.pereira@mackenzie.br