

## Reposição de vitamina B12 reduz comportamento depressivo induzido em ratos jovens

*Vitamin B12 replacement therapy reduces induced depressive behavior in young rats*

Adriana Maria de Oliveira Brito<sup>1</sup>, Amanda Sarah Ferreira de Lima Costa<sup>2</sup>, Sharon Lima Oliveira<sup>2</sup>, Alisson Diego Machado<sup>3</sup>, Eder de Carvalho Pincinato<sup>4</sup>, Carlos Eduardo Moscato Fuzaro<sup>5</sup>, Isabela Rosier Olimpio Pereira<sup>6</sup>✉

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, SP.

<sup>2</sup> Curso de Nutrição da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, SP.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Nefrologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

<sup>4</sup> Curso de Farmácia da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, SP.

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmácia Clínica, Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, SP.

<sup>6</sup> Cursos de Farmácia e de Nutrição da Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo, SP.

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliar, em modelo animal, se a depleção suave de vitamina B12, anterior ao desenvolvimento de anemia, induz à depressão; e se a suplementação com vitamina B12 em animais jovens pode atuar como medida preventiva da depressão.

**Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar* divididos em grupo controle (n=11) e grupo B12 (n=10). O grupo B12 recebeu suplementação de vitamina B12 na água de beber, ao longo de todo o estudo. Na fase 1, os animais dos dois grupos receberam por seis semanas dieta adicionada de pectina (50g/kg da ração), para induzir à depleção de vitamina B12. Após esse período, foi aplicado o Teste de Porsolt para indução e avaliação do estado depressivo. Foi realizado também um hemograma para pesquisa de anemia. Na fase 2 (com duração de quatro semanas), a pectina foi removida da ração e os mesmos testes foram aplicados novamente no final do período.

**Resultados:** Durante as duas fases do estudo o número de hemácias, o hematócrito e a concentração de hemoglobina mantiveram-se normais, ou seja, os ratos não desenvolveram anemia. Os resultados do Teste de Nado Forçado ao final da fase 1 mostram que, em relação ao grupo controle, o grupo suplementado apresentou tempo de desistência menor (0,44±0,32 vs. 0,75±0,18 minutos, p=0,024) e tempo de natação maior (4,64±0,27 vs. 4,32±0,28 minutos, p=0,013), indicando redução do estado depressivo com a reposição de vitamina B12. Na comparação entre grupos no final da fase 2 não houve diferença significativa em nenhum dos componentes do Teste de Nado Forçado.

**Conclusões:** A depleção suave de vitamina B12 na dieta, em nível não indutor de anemia, favoreceu o estado depressivo em ratos jovens, enquanto a sua suplementação na situação de depleção reverteu esse quadro. Em condições de nutrição adequada, entretanto, a suplementação dessa vitamina não exerceu efeito sobre o estado depressivo. Estes resultados estimulam a realização de mais estudos que aprofundem a avaliação das relações entre vitamina B12 e depressão em jovens. Além disso, este estudo também abre perspectivas para um novo modelo experimental de depressão, induzida por depleção de vitamina B12.

**DESCRITORES:** depressão; vitamina B12; ratos; modelos animais de doenças; suplementação alimentar.

### ABSTRACT

**Aims:** To assess whether mild vitamin B12 deficiency induces depression prior to the development of anemia, and whether vitamin B12 supplementation can act as a preventive measure against depression in young rats.

**Methods:** *Wistar* rats were divided into control group (n=11) and B12 group (n=10). The B12 group received vitamin B12 supplementation in drinking water throughout the study. In Phase 1, all animals received a pectin-supplemented diet (50g/kg) for six weeks to induce vitamin B12 depletion. After that, the Porsolt test was applied for induction and evaluation of depressive state and blood was collected for a complete blood count. In Phase 2, which lasted two weeks, pectin was removed from the diet and the same tests were applied again at the end.

**Results:** In both phases, erythrocyte count, hematocrit level, and hemoglobin concentration were normal, i.e., the rats did not develop anemia. The forced swim test results at the end of Phase 1 show that the B12 group exhibited shorter immobility time than the control group (0.44±0.32 vs. 0.75±0.18 minutes, p=0.024) and longer swimming time (4.64±0.27 vs. 4.32±0.28 minutes, p=0.013), indicating reduction of depressive state with vitamin B12 replacement therapy. When the groups were compared at the end of Phase 2, there was no significant difference in any of the forced swim test components.

**Conclusions:** Mild vitamin B12 deficiency, at a level that did not induce anemia, led to depressive state in young rats where vitamin B12 supplementation reversed the effects of vitamin depletion. Under normal nutritional circumstances, however, vitamin B12 supplementation did not have any effect on depressive state. These findings encourage further studies to investigate the associations between vitamin B12 and depression in young individuals. Moreover, this study also presents perspectives for a new experimental model of depression induced by vitamin B12 depletion.

**KEY WORDS:** depression; vitamin B12; rats; disease models, animal; dietary supplementary feeding.

**Recebido:** abril, 2016

**Aceito:** setembro, 2016

**Published:** outubro, 2016

✉ Correspondência: [isabela.pereira@mackenzie.br](mailto:isabela.pereira@mackenzie.br)



Este artigo está licenciado sob forma de uma licença Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional, que permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que a publicação original seja corretamente citada. [http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt\\_BR](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt_BR)

**Abreviaturas:** NRC, *National Research Council*; CEUA/UPM, Comitê de Ética para Uso de Animais/Universidade Presbiteriana Mackenzie.

## INTRODUÇÃO

A depressão é um problema de múltiplas expressões e manifestações, que afeta a integridade física, emocional e social do indivíduo [1]. Os tipos primários de depressão incluem a depressão maior – um episódio que dura ao menos duas semanas, podendo chegar a vinte semanas; a distímia – uma forma de depressão crônica e menos grave na qual os sintomas são similares aos da depressão maior, porém mais brandos; a depressão atípica – na qual as pessoas sentem-se melhor temporariamente quando algo de bom acontece (apesar do nome, esta é a forma mais comum de depressão); o ajuste à desordem – que ocorre quando a pessoa responde a um evento ruim na vida como, por exemplo, na morte de uma pessoa querida [2].

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016 quase uma em cada 10 pessoas no planeta (676 milhões) sofrem de depressão. A depressão pode levar à incapacidade e, na pior das hipóteses, ao suicídio, sendo que a cada pessoa que comete suicídio correspondem vinte tentativas. Em 2012, havia mais de 800.000 mortes estimadas de suicídio no mundo, com 86% ocorrendo entre pessoas com idade inferior a 70 anos. Os jovens adultos, com idade entre 15 e 29 anos, correspondem a 8,5% dessas mortes e têm no suicídio a segunda causa de morte, depois dos acidentes de trânsito [3].

Estudos sugerem que a deficiência de vitamina B12, muito frequente em idosos longevos, está relacionada a quadros depressivos. Em alguns estudos com idosos observou-se remissão da depressão com a reposição da vitamina B12 [4-8].

Fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais participam da gênese da depressão. O estudo da fisiopatologia do transtorno depressivo revela que há uma redução no sistema de monoaminas no sistema nervoso central, associada à diminuição da densidade de receptores de serotonina e noradrenalina no córtex pré-frontal e em estruturas límbicas. Também há níveis aumentados de monoamina oxidase no cérebro de doentes deprimidos. A depressão maior tem sido relacionada com danos na via de sinalização que controla a neuroplasticidade e a sobrevivência celular, e com a diminuição do número e tamanho de células

nervosas no hipocampo. Ainda hoje, os fármacos antidepressivos de primeira linha baseiam-se nessa hipótese monoaminérgica [9,10].

Lopes et al. [11] realizaram um estudo sobre depressão e qualidade de vida em jovens de 18 a 24 anos no sul do Brasil. Numa amostra de 1.560 jovens foi encontrada prevalência de depressão de 12,6%. Essa pesquisa ressalta a importância de estudar a depressão e a qualidade de vida em jovens, dado que a maior parte da produção científica sobre esse assunto é voltada para a investigação de adultos, em especial os idosos.

Não há relato na literatura de que a suplementação de vitamina B12 em jovens possa prevenir o estado depressivo. Desta forma, através do presente estudo pretendeu-se analisar se a depleção suave de vitamina B12, anterior ao desenvolvimento de anemia, induz à depressão e, ainda, se a suplementação com vitamina B12 em animais jovens pode atuar como fator preventivo da depressão.

## MÉTODOS

Este estudo foi conduzido dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Processo CEUA/UPM nº 096/03/2013). O estudo foi realizado na Universidade Presbiteriana Mackenzie, de abril a julho de 2013. Vinte e um ratos (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*) machos, recém-desmamados, pesando aproximadamente 50 g, foram obtidos do biotério central da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie em gaiolas com até seis animais, à temperatura ambiental de 23±1°C, mantendo-se um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à comida. Os animais ficaram em adaptação por sete dias antes do início do experimento e foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: o grupo B12 (n=10) e o grupo controle (n=11). Cada animal foi identificado no rabo com caneta porosa por um número, e a gaiola onde o animal ficava também identificava o grupo em que o mesmo estava alocado.

O experimento foi dividido em duas fases: fase 1, com duração de seis semanas, e fase 2, com duração de quatro semanas, totalizando dez semanas de estudo. Na fase 1, ambos os grupos receberam a dieta padrão (com suficiente conteúdo de nutrientes, incluindo vitamina B12), porém adicionada de pectina na proporção de 50 g/kg da ração. A pectina promove a depleção da vitamina B12, já que interfere na circulação

enterohepática, além de reduzir a biodisponibilidade dessa vitamina no intestino [12,13].

Desde o início, o grupo B12 foi suplementado com vitamina B12 na água de beber, enquanto o grupo controle não recebeu suplemento. A quantidade de vitamina B12 adicionada à água foi estimada e ajustada pelo consumo semanal de ração ao valor correspondente a 50 microgramas por quilo da dieta, conforme sugerido pelo *National Research Council Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (NRC) 1995 [14]. Diariamente foi trocada a água e feito o controle do consumo de vitamina B12.

A ração utilizada foi a CR1® (Nuvilab Produtos Agropecuários Ltda., Cutitiba, Brasil). A vitamina B12 utilizada foi V2876® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Dado que a forma de apresentação da vitamina era em pó e a quantidade a ser incorporada era muito pequena, foi usada lactose (Synth®, Diadema, Brasil) como veículo da vitamina B12 apenas para facilitar sua pesagem. Assim, cada um grama de cianocobalamina foi diluída em quatro gramas de lactose. A mesma quantidade de lactose foi adicionada à água do grupo controle (para que a única diferença de nutrientes ingeridos pelo consumo de água fosse a vitamina B12).

Após as seis semanas da fase 1, foi aplicado o Teste de Porsolt (nado forçado) para avaliar o estado depressivo, além de coleta de 100 µL de sangue da veia caudal para obter um hemograma completo, incluindo a concentração de hemoglobina.

Durante as quatro semanas da fase 2, ambos os grupos receberam a dieta padrão, sem pectina. O grupo B12 continuou a ser suplementado com vitamina B12 ajustada à média de consumo semanal de ração. Após esse período, o Teste de Porsolt e a coleta de sangue foram realizados novamente.

Dessa forma, no grupo B12 foram analisadas duas condições de suplementação de vitamina B12: 1) na depleção de vitamina B12 da dieta pelo uso de ração adicionada de pectina e 2) com o nível de vitamina B12 dentro dos parâmetros adequados.

O Teste de Nado Forçado de Porsolt consiste na exposição do rato a uma situação de stress inevitável, na qual o animal é forçado a nadar. Depois de um período inicial de atividade de natação vigorosa na direção para a borda do tanque (latência denominada tentativa de escape), o animal diminui a intensidade dos movimentos, produzindo apenas os movimentos necessários para manter a sua cabeça fora da água. Essa resposta é classificada como imobilidade comportamental, indicando um possível estado de desespero do animal quando ele percebe que não há como escapar. Esse tempo de imobilidade é interpretado

como sendo um sinal de depressão (tempo de desistência ou imobilidade). Essa interpretação é baseada em dados que mostram que esse comportamento é modificado com o uso de fármacos antidepressivos. O tempo que o animal leva nadando antes de desistir (tempo de natação), e que o animal leva tentando escalar o tanque (tempo de escalada) são associados a comportamento ativo e menor tendência a depressão. O animal reveza momentos de natação, escalada e fuga sem um padrão definido. O período de tempo total do teste de Porsolt é sempre igual a 5 minutos. Esse tempo é composto pela somatória dos tempos das categorias desistência, escalada e natação. Dessa forma, quando há aumento de tempo em uma das categorias, alguma ou a duas outras sofrerão redução [15].

Para o teste de Porsolt os ratos foram colocados individualmente em um tanque, cujo nível de água não permitia que o animal se apoiasse no chão, nem escapasse pela borda. A temperatura da água foi mantida a 25°C. Os animais foram submetidos à natação forçada durante 15 minutos no pré-teste. Após os 15 minutos de mergulho forçado, cada animal foi levado para secar na câmara de aquecimento, a 32°C, por 15 minutos. Em seguida, voltaram para suas gaiolas.

Vinte e quatro horas após o pré-teste, os animais foram colocados de volta no tanque individualmente. Nesse momento, a avaliação individual comportamental foi realizada durante cinco minutos. Em seguida, foram novamente conduzidos à câmara de aquecimento. O parâmetro comportamental de imobilidade comportamental (tempo de desistência) foi quantificado com o auxílio de cronômetros digitais, assim como os tempos de escalada e natação. Essas medidas foram realizadas de forma cega, pois os avaliadores não tiveram acesso à identificação dos animais. Foi dado para os avaliadores um novo código de identificação dos animais, com letras, para que registrassem os resultados. Os códigos de letras foram associados ao número e grupo experimental e, ao final da avaliação, os códigos foram divulgados para análise dos resultados.

O hemograma foi feito por contagem automatizada das células no sangue, utilizando o equipamento Humacount (Huma®, HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Wiesbaden, Germany).

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Realizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e, uma vez que os dados apresentavam distribuição normal, as diferenças entre os grupos experimentais foram verificadas pelo teste t de Student. Considerou-se diferença significativa quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS versão 20.0.

## RESULTADOS

A média do consumo diário de água, em ml, dos animais dos grupos controle e B12 foram similares:  $33,10 \pm 7,73$  e  $32,66 \pm 10,98$  ml/dia respectivamente. As quantidades médias de vitamina B12 consumida pelos animais dos dois grupos através da oferta da ração comercial, assim como aquela oferecida pela suplementação na água dos animais do grupo B12, estão apresentadas na **Tabela 1**.

É possível observar que o grupo B12 teve uma oferta de vitamina B12 74% maior em relação ao grupo controle no final da fase 1 e uma oferta maior em 116% no final da fase 2. A diferença encontrada

no consumo de vitamina B12 entre as fases 1 e 2 do grupo B12 se deve à evolução individual de consumo de água, pois como o experimento foi iniciado com animais jovens, recém desmamados, o consumo de água aumentou ao longo do tempo, nos dois grupos, no decorrer das duas fases. Como a vitamina foi diluída na água e teve seu cálculo baseado no peso médio dos animais, o que também aumentou no decorrer das duas fases, a oferta média de B12 na fase 2 foi maior quando comparada à fase 1. Em ambas as fases os animais do grupo B12 consumiram quantidade de vitamina significativamente maior do que o grupo controle. O consumo de ração dos animais e a evolução de peso dos dois grupos foram similares (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Peso corporal, consumo e quantidade de vitamina B12 oferecida aos ratos *Wistar* jovens, durante as duas fases do experimento que usou o Teste de Porsolt para indução e avaliação do estado depressivo.

	Fase 1 (6 semanas)		Fase 2 (10 semanas)	
	Grupo Controle (n=11)	Grupo B12 (n=10)	Grupo Controle (n=11)	Grupo B12 (n=10)
Peso Médio dos Animais (g)	265	270	337	323
Consumo de Ração (g)	20	19	22	26
Oferta de vitamina B12 via ração ( $\mu\text{g}/\text{dia}/\text{animal}$ )	1,20	1,14	1,32	1,56
Oferta de vitamina B12 via ração/peso de animal (pg/g)	4,53	4,22	3,92	4,83
Suplementação de vitamina B12 ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ )	–	0,95	–	1,3
Suplementação de vitamina B12/peso de animal (pg/g)	–	3,5	–	4,0
Oferta total de vitamina B12 ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ )	1,20	2,09	1,32	2,86
Suplementação de Vitamina B12 em relação ao grupo controle (%)	–	74	–	116

Fase 1: dieta com pectina causando depleção de vitamina B12 para os dois grupos e reposição da vitamina apenas para o Grupo B12.

Fase 2: suspensão da pectina, oferta da vitamina B12 na dieta normal para o Grupo Controle e oferta adicional de vitamina B12 para o Grupo B12.

**Tabela 2.** Resultados médios dos valores hematológicos encontrados nos ratos *Wistar* jovens, na fase 1 do experimento (dieta com pectina causando depleção de vitamina B12 para os dois grupos e reposição da vitamina apenas para o grupo B12) e na fase 2 (suspensão da pectina, oferta da vitamina B12 na dieta normal para o grupo controle e oferta adicional para o grupo B12). Grupo Controle: n=10. Grupo B12: n=11.

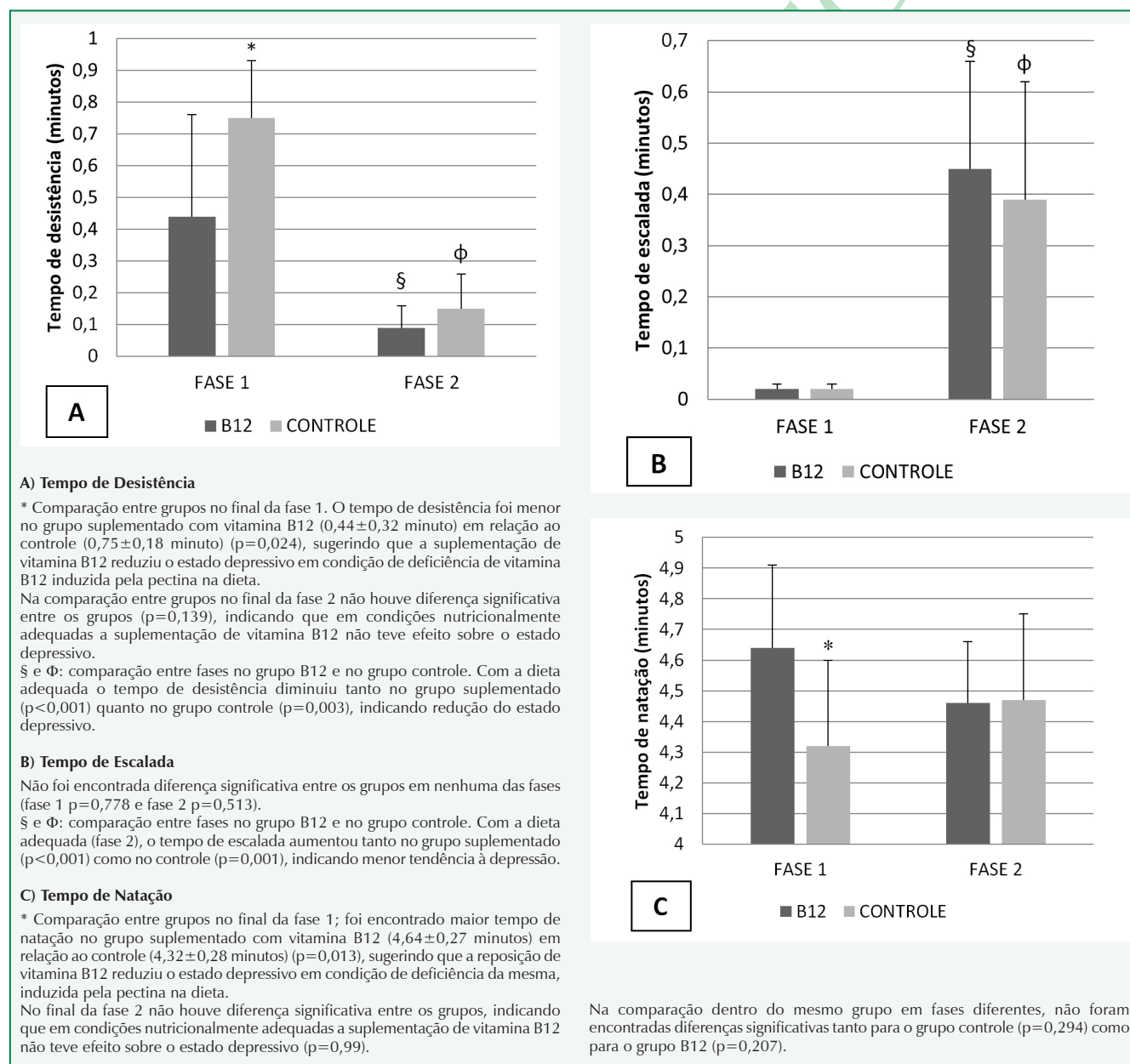
Hemograma	Fase 1			Fase 2			Valores de referência
	Grupo Controle	Grupo B12	p	Grupo Controle	Grupo B12	p	
Leucócitos (10 <sup>6</sup> /l)	7,47 $\pm$ 2,36	6,80 $\pm$ 2,58	0,559	10,25 $\pm$ 3,32	10,62 $\pm$ 3,80	0,832	3,41-13,70 <sup>[26]</sup>
Linfócitos (10 <sup>6</sup> /l)	5,19 $\pm$ 1,72	5,13 $\pm$ 2,18	0,948	5,44 $\pm$ 2,06	5,40 $\pm$ 2,35	0,974	43,41 <sup>[19]</sup>
Monócitos (10 <sup>6</sup> /l)	0,74 $\pm$ 0,30	0,52 $\pm$ 0,14	0,055	1,00 $\pm$ 0,45	1,36 $\pm$ 1,06	0,383	16,24 <sup>[19]</sup>
Granulócitos (10 <sup>6</sup> /l)	1,56 $\pm$ 0,83	1,15 $\pm$ 0,45	0,202	3,82 $\pm$ 1,02	3,89 $\pm$ 1,48	0,911	*
% Linfócitos	69,35 $\pm$ 9,00	74,19 $\pm$ 5,61	0,180	52,63 $\pm$ 5,34	49,82 $\pm$ 13,99	0,596	43,10-93,70 <sup>[26]</sup>
% Monócitos	10,00 $\pm$ 2,84	8,58 $\pm$ 3,35	0,331	9,49 $\pm$ 2,09	11,37 $\pm$ 3,80	0,227	1,00-15,20 <sup>[26]</sup>
% Granulócitos	20,68 $\pm$ 7,02	17,27 $\pm$ 4,47	0,226	37,87 $\pm$ 4,81	38,78 $\pm$ 14,64	0,867	*
Hemácias (10 <sup>6</sup> /l)	8,87 $\pm$ 0,74	8,86 $\pm$ 0,71	0,992	8,97 $\pm$ 1,83	9,60 $\pm$ 1,44	0,427	4,72-10,25 <sup>[26]</sup>
Hemoglobina (g/dL)	13,91 $\pm$ 0,98	14,21 $\pm$ 1,27	0,568	13,65 $\pm$ 2,47	14,86 $\pm$ 1,95	0,26	10,20-17,80 <sup>[26]</sup>
Hematócrito (%)	47,66 $\pm$ 3,15	50,35 $\pm$ 3,80	0,109	46,65 $\pm$ 8,82	49,42 $\pm$ 7,25	0,475	*
Volume corpuscular médio (fl)	53,91 $\pm$ 3,23	56,80 $\pm$ 2,36	<b>0,040</b>	52,36 $\pm$ 3,57	51,50 $\pm$ 2,42	0,554	*
Hemoglobina corpuscular média (pg)	15,72 $\pm$ 0,87	16,05 $\pm$ 0,78	0,392	15,32 $\pm$ 0,95	15,51 $\pm$ 0,66	0,625	*
Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dl)	29,11 $\pm$ 0,72	28,05 $\pm$ 0,81	0,191	29,32 $\pm$ 1,22	30,20 $\pm$ 1,90	0,256	29,71 <sup>[19]</sup>
Distribuição de Hemácias (%)	15,69 $\pm$ 0,56	15,11 $\pm$ 0,43	0,222	15,48 $\pm$ 1,07	16,03 $\pm$ 0,76	0,226	*
Plaquetas (10 <sup>6</sup> /l)	201,09 $\pm$ 113,25	146,10 $\pm$ 77,80	0,237	324,27 $\pm$ 162,94	324,30 $\pm$ 154,40	1,000	150-1351 <sup>[25,26]</sup>
% Plaquetas	0,11 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,05	0,287	0,20 $\pm$ 0,10	0,20 $\pm$ 0,09	0,982	*
Volume Médio de Plaquetas (fl)	5,70 $\pm$ 0,27	5,86 $\pm$ 0,36	0,287	6,1 0,34	6,33 $\pm$ 0,38	0,389	*
Relação % Tamanho Plaquetas	34,37 $\pm$ 1,00	35,04 $\pm$ 1,55	0,274	36,39 $\pm$ 1,05	37,01 $\pm$ 1,59	0,387	*

\* Referência não encontrada. pg, picograma; fl, femtolitros.

A **Tabela 2** mostra os resultados do hemograma dos grupos controle e B12 nas fases 1 e 2. A única variável com diferença significativa foi o volume corpuscular médio na fase 1, que foi menor no grupo controle em relação ao suplementado com vitamina B12 ( $p=0,04$ ). Nos demais parâmetros não foi encontrada diferença significativa.

Os dados referentes ao Teste de Nado Forçado de Porsolt, realizado nos animais dos dois grupos ao final de ambas as fases, estão representados na **Figura 1**.

Os resultados médios do Tempo de Desistência no teste aplicado no final da fase 1, quando os dois grupos foram depletados de vitamina B12 por meio do consumo de ração com pectina e o grupo B12 recebeu suplementação via água, mostram tempo de desistência significativamente menor no grupo com a suplementação de vitamina B12 na água, o que no Teste de Porsolt indica menor comportamento depressivo. Na fase 2, quando os animais dos dois grupos receberam dieta padrão e o grupo B12 suplementação, a diferença



**Figura 1.** Médias dos tempos obtidos no **Teste de Nado Forçado** na fase 1 (dieta com pectina causando depleção de vitamina B12 para os dois grupos e reposição da vitamina apenas para o grupo B12) e na fase 2 (suspensão da pectina, oferta da vitamina B12 na dieta normal para o grupo controle e oferta adicional para o grupo B12). Grupo B12, n=11. Grupo Controle, n=10. Teste t de Student.

entre os tempos de desistência não foi estatisticamente significativa. Estes dados indicam que a reposição de vitamina B12 em caso de deficiência melhorou o estado depressivo (**Figura 1A**).

Ainda na **Figura 1A**, quando se comparam os tempos de desistência da fase 1 de cada grupo, com os resultados da fase 2, observa-se que houve uma redução significativa nos dois grupos. Esse fato indica que com dieta adequada houve melhora do estado depressivo nos animais, tendo sido eles suplementados ou não.

Os resultados do Tempo de Escalada de cada grupo encontram-se representados na **Figura 1B**. No Teste de Porsolt, ao serem comparados os dois grupos, aquele com maior tempo de escalada é o que tem menor nível de comportamento depressivo. Na comparação entre os grupos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das fases. Todavia, o tempo de escalada do grupo B12 aumentou significativamente da fase 1 para a fase 2, o mesmo ocorrendo com o grupo controle o que, mais uma vez, indica que com a dieta padrão, a suplementação com vitamina B12 não favoreceu o grupo experimental (**Figura 1B**).

Os dados referentes ao Tempo de Natação estão representados na **Figura 1C**. No Teste de Porsolt o maior tempo de natação é considerado como sinal de menor nível de comportamento depressivo. No final da fase 1 deste experimento (aquela na qual os dois grupos foram depletados de vitamina B12 e os animais do grupo B12 receberam suplementação via água), quando foram comparados os tempos de natação dos dois grupos, houve diferença estatisticamente significativa, sendo o resultado do grupo controle significativamente maior do que o do grupo B12. O mesmo não ocorreu na fase 2, confirmando que a suplementação de vitamina B12 melhorou o estado depressivo em animais com aporte deficiente da vitamina, mas não nos que estavam recebendo um aporte considerado suficiente. Quanto aos períodos de natação comparando-se as fases 1 e 2 no mesmo grupo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (**Figura 1C**).

## DISCUSSÃO

A alta prevalência, a frequente associação com doenças crônicas, o impacto negativo na qualidade de vida e o risco de suicídio na população senil fazem da depressão um problema de saúde pública [16]. Porém, estudos epidemiológicos demonstram um aumento progressivo das manifestações depressivas também entre jovens nos últimos anos [17]. Este trabalho propôs a avaliação da deficiência e da reposição de

vitamina B12 sobre a indução do estado depressivo em um modelo experimental utilizando ratos jovens. Na fase 1, a pesquisa avaliou se a suplementação de vitamina B12, em situação de depleção desse nutriente, poderia impedir a depressão. Já na fase 2, avaliou se a suplementação de vitamina B12, em condição de nutrição adequada, poderia impedir a depressão.

A evolução do peso dos dois grupos foi compatível com a esperada para modelos biológicos dos ratos *Wistar* do sexo masculino, conforme ficha técnica da Diretoria de Apoio ao Ensino e Pesquisa [18]. O consumo de água dos animais foi compatível com o observado pelo estudo de Carvalho [19]. Desse modo, a ração com pectina e a água com lactose e/ou vitamina B12 não afetaram o consumo de água nem a evolução de peso dos animais.

A oferta de vitamina B12 no grupo suplementado foi aproximadamente o dobro do grupo controle, nas duas fases. O estudo de Syed et al. [20] avaliou a suplementação de vitamina B12 em pacientes com transtorno depressivo maior e verificou melhora significativa dos sintomas utilizando uma dose equivalente a dois picogramas por grama de peso, o que é uma dose com grandeza comparável à usada no presente estudo.

O tempo de desistência menor para o Grupo B12, com relação ao Grupo Controle, na fase 1, indica que o grupo suplementado deprimiu-se menos. Essa situação pode ser explicada pela atuação da vitamina B12 em diferentes processos químicos cerebrais. A deficiência de vitamina B12 é associada à interrupção na metilação ou remetilação da homocisteína. Para evitar o acúmulo de homocisteína, o organismo faz metabolização dessa substância pela via da transulfuração. Dessa forma, a deficiência de vitamina B12 impede a cascata de reações, desviando o substrato para a formação de ácido metilmalônico, suspeito de contribuir para os danos neurológicos [21].

A S-adenosilmetionina é utilizada desde o final da década de 1970 na Europa e desde 1999 nos Estados Unidos como suplemento alimentar para casos de depressão e fibromialgia [22]. Seu efeito antidepressivo pode ser explicado por sua capacidade de doar grupamento metil, essencial para a manutenção da mielina [21], o que pode interferir nos receptores de monoaminas [22]. Considera-se, ainda, o efeito nas reações de metilação envolvidas na síntese e metabolismo de dopamina, noradrenalina e serotonina [23]. O aumento no tempo de desistência pode ser explicado pelo aumento da síntese na monoaminas e redução da sua receptação por aumento de reações de metilação induzidas pela vitamina B12.

Na fase 2, não foi encontrada diferença significativa entre os tempos de desistência dos dois grupos estudados, indicando que a suplementação de vitamina B12 foi eficaz em condições de depleção, mas ineficaz em condição de nutrição adequada. Comparando-se os resultados do tempo de desistência da fase 1 com os da fase 2, percebe-se que a reposição da vitamina B12 reverteu o estado depressivo. Considerando que a vitamina B12 atua na metilação de moléculas precursoras de monoaminas, é possível que haja uma relação entre essa vitamina e os resultados apurados no teste de nado forçado deste experimento.

Com relação aos valores do tempo de desistência da fase 2 serem menores do que os da fase 1, além da correção da dieta que supriu a necessidade de vitamina B12, é possível que outros fatores tenham influenciado esse resultado. Em primeiro lugar, na fase 2 a idade do animal era maior em quatro semanas, o que pode ter provocado maior resistência; em segundo lugar, essa foi a segunda exposição dos ratos ao teste de Porsolt e, por isso, eles podem ter desenvolvido certa aptidão para a prova.

À medida que ocorre alteração no tempo de desistência, o mesmo acontece nos tempos de escalar e nadar, mas no sentido inverso. Assim, observou-se que o tempo de natação e escalada, atividades que são consideradas comportamentos ativos, foram maiores quando o tempo de desistência, que é tido como comportamento passivo, foi menor. Em estudos que fizeram uso de drogas observou-se que tanto a fluoxetina, inibidor seletivo de recaptção de serotonina, como a reboxetina, inibidor seletivo de recaptção de noradrenalina, foram responsáveis por diminuição no tempo de desistência. Todavia, a primeira aumentou o período de natação e a segunda o tempo de escalada [24].

Com relação aos exames hematológicos, os resultados foram semelhantes aos descritos em outros estudos [19-26]. Os valores de contagem de hemácias, hematócrito e hemoglobina, tanto os referentes à coleta feita no final da fase 1, quanto os resultantes da coleta após a fase 2, estavam dentro dos padrões normais de referência [27], o que indica que os animais não estiveram com anemia em nenhuma das fases deste estudo. Embora tenha sido observado um aumento significativo do volume corpuscular médio no grupo suplementado na fase 1, os valores encontrados para os dois grupos estão dentro dos valores de referência, não sendo considerado um achado importante. O fato de não ter sido observada anemia colabora com a hipótese de que uma leve depleção de vitamina B12, sem indução de anemia, é capaz de favorecer o

comportamento depressivo dos ratos jovens, realçando a importância da vitamina B12 em outros processos bioquímicos, além da formação das hemácias [24].

Uma limitação deste estudo foi a impossibilidade de aferição da concentração plasmática de vitamina B12. Entretanto, outros estudos comprovaram a eficácia da pectina adicionada à ração de ratos em provocar depleção dessa vitamina [13,14], o que não deixa dúvidas sobre a ocorrência de depleção da vitamina B12 no experimento realizado. É o caso do estudo de Choi et al. [13] que utilizou pectina na dieta de ratos para indução de deficiência de vitamina B12 com severidade insuficiente para causar anemia ou doenças, mas que gerou aberrações em substituições de base e metilação de DNA. O estudo de Kumar et al. [14], que também utilizou dieta suplementada com 5% de pectina em ratas, provocou redução de 76% na concentração sérica de vitamina B12, com um aumento de 60% na concentração de homocisteína. Os autores observaram, como consequência, que a prole dessas ratas apresentou maior risco para obesidade e doença cardiovascular. A pectina reduz a meia vida da vitamina B12 de 59 para 19 dias, já que, além de diminuir a sua absorção pelo aparelho gastrointestinal, aumenta a excreção fecal e a perda urinária da vitamina [28].

A depleção de vitamina B12 por pectina na dieta pode significar um novo modelo experimental de indução de depressão, o que precisa ser melhor estudado e caracterizado. Sendo essa hipótese confirmada, esse conceito pode contribuir para futuros estudos de variáveis do estado depressivo. A literatura mostra a carência de modelos experimentais não invasivos de depressão [29].

O resultado significativo para o grupo B12 no Teste de Nado Forçado, associado ao fato de que os animais nunca estiveram em estado anêmico, concorda com o relato de caso de Vieira [30], no qual os sintomas depressivos do paciente eram possivelmente decorrentes da deficiência de vitamina B12, valorizando a ideia de que a falta dessa vitamina pode colaborar com a etiologia da síndrome depressiva. Também apoia o estudo de Seppala et al. [23] que concluiu que o baixo nível de vitamina B12 está associado ao alto risco de sintomas de depressão.

Há de se considerar, ainda, que a vitamina B12 também tem efeito neuroprotetor através da modulação da homocisteína [31], cuja hiperprodução, que decorre do estresse oxidativo, está associada a danos na saúde mental [32], inclusive com sintomas depressivos [33]. Dovichi e Lajolo [34] citam em seu estudo que a vitamina B12 retarda o aparecimento de sintomas de demência, se administrada preventivamente. Nesse

mesmo sentido, o estudo de Vieira et al. [30] indica que da deficiência de vitamina B12 decorrem alterações neurológicas, sendo comum a presença de sintomas neuropsiquiátricos isolados.

Este estudo demonstrou que a depleção suave de vitamina B12 na dieta, em nível não indutor de anemia, favoreceu o estado depressivo em ratos jovens, enquanto a sua suplementação na situação de depleção,

reverteu esse quadro. Em condições de nutrição adequada, entretanto, a suplementação dessa vitamina não exerceu efeito sobre o estado depressivo. Estes resultados estimulam a realização de mais estudos que aprofundem a avaliação das relações entre vitamina B12 e depressão em jovens. Além disso, este estudo também abriu perspectivas para um novo modelo experimental de depressão, induzida por depleção de vitamina B12.

## NOTA

### Declaração de conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse relevantes ao conteúdo deste estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Maroto GNV. Depressão e sociedade: estudo das representações sociais da depressão em um grupo de pessoas adultas na cidade de São Carlos [tese]. [Campinas]: Universidade Estadual de Campinas; 2002. 597 p.
2. UMMC. University of Maryland Medical Center Depression [Internet]. Maryland [update 2015 Mar; cited 2013 Dec 20]. Available from: <http://www.umm.edu>
3. World Health Statistics 2016 [Internet]: monitoring health for the SDGs. [cited 2016 July 21]. Available from: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/EN\\_WHS2016\\_Chapter6.pdf?ua=1](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/EN_WHS2016_Chapter6.pdf?ua=1)
4. Gerson BMC. Análise da relação entre sintomatologia depressiva, níveis de vitamina B12 com sintomatologia em idosos longevos Instituto de Geriatria e Gerontologia [dissertation]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2009. 152 p.
5. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry*. 2002;159(12):2099-101. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.2099>
6. Vogiatzoglou A, Refsum H, Johnston C, Smith SM, Bradley KM, de Jager C, Budge MM, Smith AD. Vitamin B12 status and rate of brain volume loss in community-dwelling elderly. *Neurology*. 2008;71(11):826-32. <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000325581.26991.f2>
7. Garibala S, Forster S. Effects of dietary supplements on depressive symptoms in older patients: A randomized double-blind placebo controlled trial. *Clin Nutr*. 2007;26(5):545-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2007.06.007>
8. Ng TP, Feng L, Niti M, Kua EH, Yap KB. Folate, vitamin B12, homocysteine, and depressive symptoms in a population sample of older Chinese adults. *J Am Geriatr Soc*. 2009 May;57(5):871-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2009.02229.x>
9. Lafer B, Vallada Filho HP. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. *Rev Bras Psiquiatr*. 1999;21 Suppl 1:S12-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44461999000500004>
10. Perito MES, Fortunato JJ. Marcadores biológicos da depressão: uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. *Rev Neurocienc*. 2012;20(4):597-603.
11. Lopes MRA, Ribeiro JP, Ores LC, Jansen K, Souza LDM, Pinheiro RT, Silva RA. Depressão e qualidade de vida em jovens de 18 a 24 anos no sul do Brasil. *Rev Psiquiatr*. 2011;33(2):103-8. <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81082011005000001>
12. Choi S, Friso S, Ghandour H, Bagley PJ, Selhub J, Mason JB. Vitamin B12: deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. *J Nutr*. 2004 Apr;134(4):750-5.
13. Kumar KA, Lalitha A, Pavithra D, Padmavathi IJ, Ganeshan M, Rao KR Venu L, Balakrishna N, Shanker NH, Reddy SU, Chandak GR, Sengupta S, Raghunath M. Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan;24(1):25-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.01.004>
14. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 4th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995.
15. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977 Apr 21;266(5604):730-2. <http://dx.doi.org/10.1038/266730a0>
16. Duarte MB, Rego MAV. Comorbidade entre depressão e doenças clínicas em um ambulatório de geriatria. *Cad Saude Publica*. 2007 Mar;23(3):691-700. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000300027>
17. Reppold CT, Hutz CS. Prevalência de indicadores de depressão entre adolescentes no Rio Grande do Sul. *Aval Psicol*. 2003;2(2):175-84.
18. FMUSP. Centro de Bioterismo. Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa. [Internet]. [cited 2013 Mar 21]. Available from: [http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id\\_ani=17&pes\\_idade=si](http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&pes_idade=si)
19. Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio, LC, Machado JP, Mauad H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Rev Ceres*. 2009;56(1):51-7.



20. Syed EU, Wasay M, Awan S. Vitamin B12 supplementation in treating major depressive disorder: a randomized controlled trial. *Open Neurol J*. 2013 Nov 15;7:44-8. <http://dx.doi.org/10.2174/1874205X01307010044>
21. Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pombum VJ, Garcia SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(5):323-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442005000500007>
22. Fábregas BC, Vitorino FD, Teixeira AL. Deficiência de vitamina B12 e transtorno depressivo. *J Bras Psiquiatr*. 2011;60(2):141-3.
23. Seppälä J, Koponen H, Kautiainen H, Eriksson JG, Kampman O, Leiviskä J, Männistö S, Mäntyselkä P, Oksa H, Ovaskainen Y, Viikki M, Vanhala M. Association between vitamin b12 levels and melancholic depressive symptoms: a Finnish population-based study. *BMC Psychiatry*. 2013 May 24;13:145. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-244X-13-145>
24. Fernandes EV, Ramos SP, Estanislau C, Venancio EJ. Efeitos comportamentais e imunológicos da fluoxetina em ratos submetidos ao nado forçado. *Psic: Teor e Pesq*. 2012;4(28):409-15. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-37722012000400008>
25. Branco ACS, Diniz MFFM, Almeida RN, Santos HB, Oliveira KM, Ramalho JA, Dantas JG. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. *Rev Bras Cienc Saúde*. 2011;15(2):209-14. <http://dx.doi.org/10.4034/RBCS/2011.15.02.11>
26. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Albuquerque-Júnior, RLC, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Ratus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 2014; 10(3):1-9.
27. Tomich BP, Rocha RDR, Ferreira MFR. Anemia megaloblástica. *Pós Rev [Internet]*. 2012 [cited 2016];(6). Available from: <http://blog.newtonpaiva.br/pos/e6-farm22-anemia-megaloblastica/>
28. Cullen RW, Oace SM. Dietary pectin shortens the biologic half-life of vitamin B-12 in rats by increasing fecal and urinary losses. *J Nutr*. 1989 Aug;119(8):1121-7.
29. Costa-Nunes JP, Cline BH, Araújo-Correia M, Valença A, Markova N, Dolgov O, Kubatiev A, Yeritsyan N, Steinbusch HW, Strekalova T. Animal models of depression and drug delivery with food as an effective dosing method: evidences from studies with celecoxib and dicholine succinate. *Biomed Res Int*. 2015;2015:596126. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/596126>
30. Vieira N, Rodríguez-Vera J, Arez L, Tomé R. Síndrome depressiva como apresentação de uma Anemia Perniciosa. *Med Int*. 2004; 11(1):13-16.
31. Malouf M, Grimley EJ, Areosa SA. Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003;(4):CD004514. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd004514>
32. Parletta N, Milte CM, Meyer BJ. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *J Nutr Biochem*. 2013 May;24(5):725-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.01.002>
33. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry*. 2002 Dec;159(12):2099-101. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.159.12.2099>
34. Dovichi SS, Lajolo FM. Flavonoides e sistema nervoso central. *Nutrire* 2011;36(2):123-35. 