

**UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-CCBS**

ADRIANA MARIA DE OLIVEIRA BRITO

**VALIDAÇÃO DE MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B₁₂**

SÃO PAULO

2017

ADRIANA MARIA DE OLIVEIRA BRITO

**VALIDAÇÃO DE MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B₁₂**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Distúrbio do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Distúrbios do Desenvolvimento

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Roberta Monterazzo Cysneiros

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Miriam de Oliveira Ribeiro

SÃO PAULO

2017

B862v Brito, Adriana Maria de Oliveira.

Validação de modelo animal de depressão induzida por
deficiência de vitamina B12 / Adriana Maria de Oliveira Brito.

44 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento) -
Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2017.

Orientadora: Roberta Monterazzo Cysneiros

Bibliografia: f. 38-44

1. Vitamina B12. 2. Depressão. 3. Pectina. 4. Teste do nado
forçado. I. Cysneiros, Roberta Monterazzo. II. Título.

CDD_362.25

ADRIANA MARIA DE OLIVEIRA BRITO

VALIDAÇÃO DE MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO INDUZIDA POR
DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B₁₂

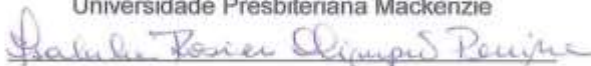
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Distúrbios do
Desenvolvimento.

Aprovada em 24 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof.ª Dra. Isabela Rosier Olímpio Pereira
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder força, determinação e saúde durante toda essa caminhada, condições imprescindíveis para cumprir esse novo desafio.

Ao meu marido Osias e aos meus filhos Marianna, Danilo, Thiago e Sabrina por toda a compreensão, dedicação, amor e incentivo que me deram suporte para vencer mais essa batalha.

À Profª Drª Roberta Monterazzo Cysneiros por acreditar no projeto, sugerir seu modelo, orientar-me para sua elaboração, além de compartilhar comigo toda a sua vasta gama de conhecimento, em todos os tópicos envolvidos.

À Profª Drª Isabela Rosier Olímpio Pereira que, além de também me orientar no desenvolvimento do projeto, foi amiga e grande incentivadora durante toda a sua execução e a quem também agradeço o último empurrão, esse determinante para a finalização deste trabalho.

À Profª Drª Miriam de Oliveira Ribeiro pelo apoio e sugestões para a melhoria do modelo apresentado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva pela participação ativa nas bancas, com sugestões interessantes para o bom desenvolvimento e conclusão do projeto.

A Alexandre Arnould que, sempre paciente, dividiu comigo seu conhecimento no trato e exames dos roedores.

A Júlia Parra e Larissa Dias, que muito me auxiliaram na aplicação dos testes comportamentais nos animais.

A Bruna e Fernanda pela paciência didática e dedicação na execução dos testes genéticos.

Ao programa de Distúrbios de Desenvolvimento da Universidade Mackenzie, na forma de seus docentes, colegas e funcionários, responsável direto pelas condições necessárias para o bom desenvolvimento deste projeto e minha evolução acadêmica.

A Zilda, Alessandra e Amanda pelo suporte emocional, ajuda prática e manutenção da regularidade da minha vida profissional e dom

A muitos outros que, apesar de não estarem apoio ou disseminação de conhecimento para projeto.

A todos os meus amores, pelo incentivo, doação e crença na realização deste projeto.

“O vazio ocupa um espaço imenso”

Isabela Oller

RESUMO

A depressão acomete de 13 a 20% da população mundial. A deficiência de vitamina B₁₂ está relacionada com a depressão. A falta dessa vitamina pode ser induzida em ratos pela adição de pectina à dieta. Esta depleção gera aberrações em substituições de base e metilação de DNA. Dada a necessidade de modelos animais com fundamentos neurobiológicos que melhor representem a depressão, o objetivo deste trabalho foi o de validar e caracterizar um modelo experimental de depressão induzido pela deficiência de vitamina B₁₂ em ratas alimentadas com dieta adicionada de pectina. O projeto foi elaborado em duas fases e contou com 40 ratas Wistar, acompanhadas desde seu desmame até 133 dias de vida. Na primeira, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, que se diferenciaram pela alimentação oferecida (ração com ou sem pectina). Ao final desta fase os animais foram submetidos a hemograma e aos testes de contraste positivo de sacarose, campo aberto e labirinto em cruz elevado, para avaliar se a ingestão de pectina alterou variáveis hematológicas e comportamentais. Na segunda fase, o grupo com pectina foi dividido em três grupos: um grupo continuou com a mesma alimentação, outro continuou com a mesma alimentação mas passou também a receber antidepressivo na água e um terceiro grupo iniciou alimentação com ração comercial. O grupo com ração sem pectina foi dividido em dois: um continuou com a mesma alimentação e o outro passou a alimentar-se com ração acrescida de pectina. Ao final dessa fase os animais foram submetidos aos mesmos testes elencados acima e, após eutanásia, tiveram o cérebro removido para análise da expressão de genes do hipocampo e do córtex pré-frontal envolvidos em depressão em ratas. Os tempos de desistência obtidos pelos grupos no teste do nado forçado (pectina=108 segundos e grupo padrão=77 segundos, com p=0,03), aplicado no final da primeira fase, indicam que o grupo alimentado com pectina foi induzido a comportamento do tipo depressivo. Os resultados dos outros testes confirmam que esse resultado não ocorreu por problemas de locomotores e/ou ansiogênicos. Na segunda fase não houve diferença entre os tempos, o que indica que esse comportamento não foi observado nessa época da vida dos animais. Conclui-se, então, que a depleção de vitamina B₁₂ pode induzir ratos à depressão mas, possivelmente, apenas dentro de uma janela temporal que vai até a juventude desses animais. Há três outras hipóteses que podem justificar o resultado encontrado: houve uma adaptação fisiológica ao consumo de pectina; animais com mais idade podem necessitar de maior ingestão da fibra para diminuir a absorção da vitamina ou talvez seja necessária uma depleção mais intensa nessa fase da vida para levar a esse comportamento.

Palavras chave: vitamina B₁₂, depressão, pectina, teste do nado forçado.

ABSTRACT

Depression affects 13% to 20% of the world's population. Vitamin B₁₂ deficiency is related to depression. The lack of this vitamin can be induced in rats by the addition of pectin to the diet. This depletion generates aberrations in base substitutions and DNA methylation. Given the need for animal models with neurobiological fundamentals that best represent depression, the objective of this paper was to validate and characterize an experimental model of depression induced by vitamin B₁₂ deficiency in female rats fed with an added diet pectin. The project was elaborated in two phases and involved 40 Wistar rats, monitored from their weaning to their 133th day of life. In the first phase, the animals were randomly separated into two groups, which differed by the feed offered (ration with or without pectin). At the end of this phase, the animals were submitted to a blood count and tests of positive contrast of sucrose, open field and high cross labyrinth, to evaluate if the vitamin deficiency had altered hematological and behavioral variables.

In the second phase, the pectin group was divided into three groups: one group continued with the same diet, another group continued with the same diet but also received antidepressant in the water and a third group started to be fed with the regular feed. The pectin-free fed group was divided into two groups: one continued with the same feed and the other fed with increased pectin feed.

At the end of this phase the animals were submitted to the same tests listed above and, after their euthanasia, the brains were removed for analysis of the expression of genes involved in depression in rats in the hippocampus and prefrontal cortex. The dropout times obtained by the groups in the forced swim test (pectin = 108 seconds and standard group = 77 seconds, with $p = 0.03$), applied at the end of the first phase, indicate that the pectin-fed group was behavior-induced of the depressive type.

The output of the other tests confirm that this result did not occur due to locomotor and/ or anxiogenic problems. In the second phase, there was no difference between the times, which indicates that this behavior was not observed at this time of the lives of the animals. It is concluded, then, that pectin intake can induce rats to depression but possibly only within a time window that goes until 11 weeks of age. There are three other hypotheses that may justify the results found: there was a physiological adaptation to pectin consumption; older animals may require increased fiber intake to decrease vitamin uptake or perhaps more intense exhaustion at this stage of life is required to lead to this behavior.

Key words: vitamin B₁₂, depression, pectin, forced swimming test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo integrado de cadeia de processos biológicos implicados no quadro depressivo: implicação interligada dos estresses biológicos e ambientais	9
Figura 2	Metabolismo da vitamina B ₁₂ , folato e homocisteína	11
Figura 3	Delineamento do experimento proposto	16
Figura 4	Linha do tempo da primeira fase do projeto	17
Figura 5	Linha do tempo da segunda fase do projeto	17
Figura 6	Fase do diestro	18
Figura 7	Imagem ilustrativa do teste do animal em imobilidade no teste do nado forçado.....	19
Figura 8	Imagem ilustrativa do aparato para teste do campo aberto	20
Figura 9	Imagem ilustrativa do teste do labirinto em cruz elevado	21
Figura 10	Resultados do teste do nado forçado - Fase 1	24
Figura 11	Resultados do teste do campo aberto - Fase 1	25
Figura 12	Resultados do teste do labirinto em cruz elevado - Fase 1	25
Figura 13	Resultados do teste do nado forçado - Fase 2 (grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU	27
Figura 14	Resultados do teste do nado forçado - Fase 2 (grupos PEC/PAD e PAD/PEC)	28
Figura 15	Resultados do teste do campo aberto - Fase 2 (grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU)	28
Figura 16	Resultados do teste do campo aberto - Fase 2 (grupos PEC/PAD e PEC/FLU	29
Figura 17	Resultados do teste do labirinto em cruz elevado - Fase 2 (grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU)	29
Figura 18	Resultado do teste do labirinto em cruz elevado - Fase 2 (grupos PEC/PAD e PAD/PEC)	30
Figura 19	Resultado das PCRs	31
Figura 20	Fatores nutricionais das rações padrão e pectina	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes mais frequentemente associados à depressão.....	12
Tabela 2	Cronologia dos testes comportamentais	17
Tabela 3	Consumo diário de água por grupo experimental	23
Tabela 4	Consumo diário de ração por grupo experimental	23
Tabela 5	Evolução semanal do peso por grupo experimental	25
Tabela 6	Resultado do teste do contraste positivo de sacarose – Fase 1	26
Tabela 7	Resultados dos hemogramas.....	26
Tabela 8	Resultado do teste do contraste positivo de sacarose - Fase 2	30
Tabela 9	Resultados dos hemogramas - Fase 2	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2.2.1	Avaliar se a deficiência de vitamina B₁₂, induzida precocemente pela adição de pectina à dieta de ratas recém desmamadas e sua posterior reposição, alteram as seguintes variáveis:	14
2.2.1.1	Perfil hematológico: glóbulos vermelhos e hemoglobina	14
2.2.1.2	Fenótipo comportamental:	14
2.2.1.2.1	<i>Comportamento do tipo depressivo</i>	14
2.2.1.2.2	<i>Comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora</i>	14
2.2.1.3	Expressão dos genes	14
2.2.2	Avaliar se o início tardio da dieta com pectina em ratas jovens (após 12 semanas de vida), também é capaz de induzir comportamento do tipo depressivo	14
2.2.3	Avaliar o efeito da dieta de pectina prolongada (por 12 semanas), verificando se o efeito da dieta é cumulativo	14
2.2.4	Avaliar se o uso de fluoxetina como antidepressivo pode reverter a depressão induzida pela deficiência de vitamina B₁₂	14
3	MÉTODO	15
3.1	ÉTICA	15
3.2	ANIMAIS	15
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	15
3.4	LINHA DO TEMPO	17
3.5	HEMOGRAMA	18
3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS	18
3.6.1	Teste do nado forçado	18
3.6.2	Contraste positivo de sacarose	19
3.6.3	Campo aberto	20
3.6.4	Labirinto em cruz elevado	21
3.7	EUTANÁSIA	21
3.8	PREPARO DAS AMOSTRAS DO CÉREBRO	21
3.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	22
3.10	ANÁLISE BROMATOLÓGICA DAS RAÇÕES	22
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4	RESULTADOS	23
4.1	FASE 1	24
4.1.1	Nado forçado	24
4.1.2	Campo aberto	25
4.1.3	Labirinto em cruz elevado	25
4.1.4	Contraste positivo de sacarose	26
4.1.5	Hemograma	26
4.2	FASE 2	27
4.2.1	Nado forçado	27
4.2.1.1	Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU	27
4.2.1.2	Grupos PED/PAC e PAD/PEC	27
4.2.2	Campo aberto	28
4.2.2.1	Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU	28

4.2.2.2	Grupos PED/PAC e PAD/PEC	29
4.2.3	Labirinto em cruz elevado	29
4.2.3.1	Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU	29
4.2.3.2	Grupos PED/PAC e PAD/PEC	30
4.2.4	Contraste positivo de sacarose	30
4.2.5	Hemograma	31
4.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL .	31
4.4	AVALIAÇÃO BROMATOLÓGICA DAS RAÇÕES	32
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	37
7	REFERÊNCIAS	38

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). 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 mais acarreta incapacidade por período de tempo. É uma doença duas vezes mais frequente em mulheres adultas do que em homens (SULZBACH et al., 2013).

O World Mental Health Survey Initiative 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) (TAKAKURA; TUNG, 2012). No Brasil, essa taxa ficou em 18,4% (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. 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).

Depressão materna está associada com o desenvolvimento de autismo na prole. Um estudo realizado com 1.227 crianças, que tiveram indicação do distúrbio antes dos 10 anos de idade, concluiu que pais de crianças com autismo foram mais hospitalizados com doenças mentais do que pais de crianças controle, sendo que a depressão e o transtorno de personalidade ocorreram com maior frequência em mães de crianças com autismo do que nas mães de crianças controle (DANIELS et al., 2008). O estudo de Braithwait et al. (2015) relacionou a depressão pré-natal à

diminuição da expressão do gene BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) em bebês de ambos os sexos. Este mesmo gene está igualmente associado ao autismo (ESPADA, 2010). Mars et al. (2015) também relacionam a depressão materna pré-natal ao risco de psicopatologias nos filhos. De um modo geral, fatores ambientais, assim como a psicopatologia parental pré-natal, estão associados ao risco de autismo (LARSON et al., 2004). Deste modo, a relação entre depressão materna e o desenvolvimento de autismo parece ser importante. Todavia, fazem-se necessários maiores esclarecimentos a respeito do assunto.

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 (Figura 1). 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. ”

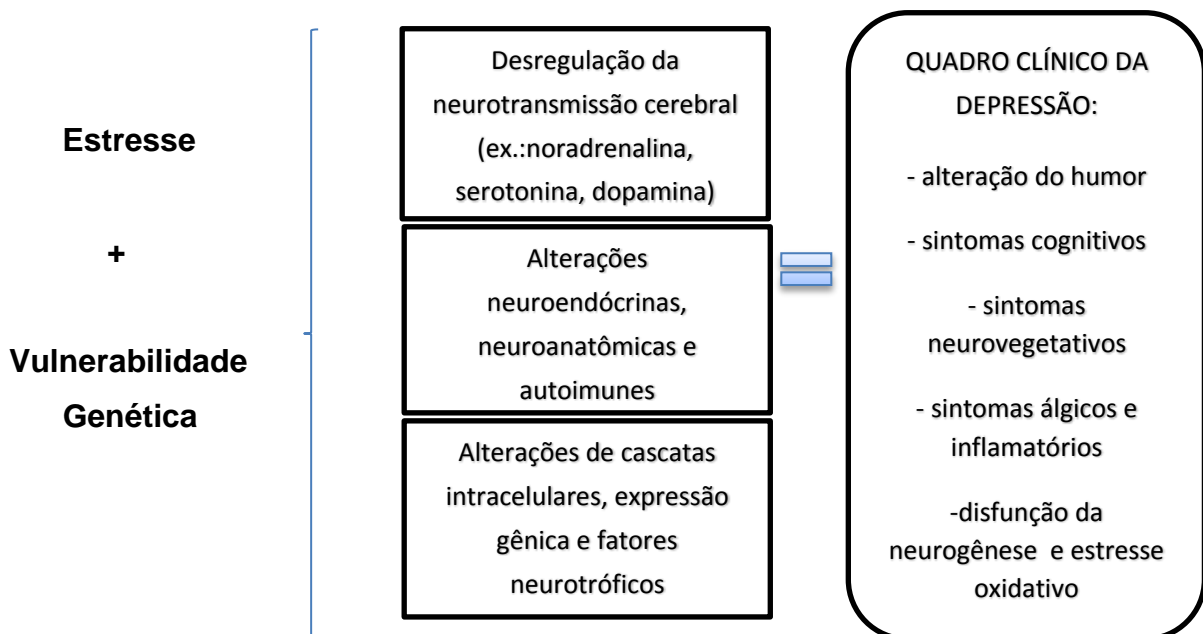


Figura 1 - Modelo integrado de cadeia de processos biológicos implicados no quadro depressivo: implicação interligada dos estresses biológicos e ambientais

Fonte: 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). 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 das vitaminas B₁₂ e B₆.

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 (PARLETTA, MILTE, MEYER, 2013). As concentrações séricas de vitamina B₁₂, folato e homocisteína estão relacionadas à depressão (Parletta et al., 2013). Um resumo do metabolismo dessas substâncias é mostrado na figura 2.

Deficiências subclínicas da vitamina B₁₂ podem contribuir silenciosamente com problemas cardíacos e neurológicos, desde os de ordem sensorial até os de distúrbios psiquiátricos e da aprendizagem. Disfunções neurológicas isoladas podem ser o resultado clínico da deficiência crônica de vitamina B₁₂, mesmo sem nenhum sinal de anemia (PANIZ et al., 2005).

No plasma, a vitamina B₁₂ circula ligada às proteínas transportadoras denominadas transcobalaminas (Tc). A holo-Tc contém a fração biologicamente ativa da cobalamina, pois promove a entrada específica dessa vitamina em todas as células do corpo. Por representar a única fração acessível às células, funciona como um marcador precoce de deficiência tecidual desse nutriente sendo, portanto, um importante marcador para deficiência subclínica de vitamina B₁₂ (PANIZ et al., 2005).

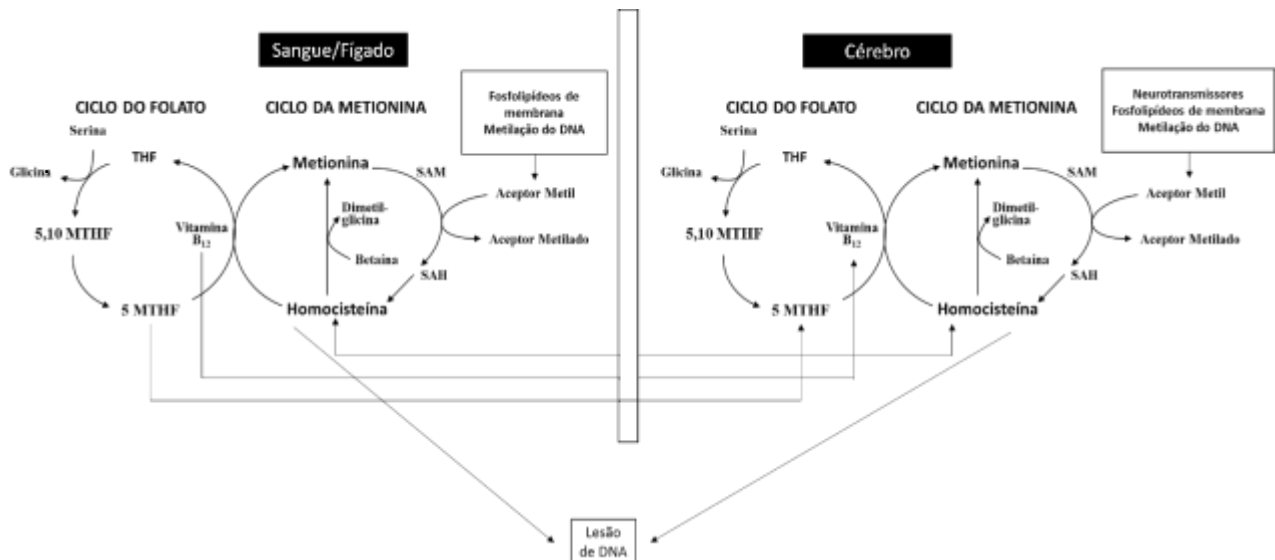


Figura 2 – Metabolismo da vitamina B₁₂, folato e homocisteína

B₆=vitamina B₆; B₁₂=vitamina B₁₂; HCY=homocisteína; MTHF=5-metiltetrahidrofolato; SAH=S-adenosilhomocisteína; SAM=S-adenosil metionina; THF=tetrahidrofolato. Homocisteína pode ser transportada para neurônios via transportadores específicos de membrana. Remetilação de homocisteína a metionina ocorre na presença de folato e B₁₂. Homocisteína pode causar lesão de DNA diretamente ou através de redução na metilação, levando a disfunção sináptica e apoptose.

Fonte: adaptado de PARLETTA, MILTE, MEYER, (2013).

A deficiência de vitamina B₁₂ pode ser induzida em ratos pela adição de pectina à dieta, pois se complexa à vitamina B₁₂ no intestino e interfere na circulação entero-hepática reduzindo a sua biodisponibilidade (CULLEN e OACE, 1989). Um estudo, que utilizou dieta suplementada com 5% de pectina em ratas, observou a 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).

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.

Por outro lado, diversos estudos em modelos animais de depressão mostram que há redução importante na expressão de RNAm para diversos genes no hipocampo de ratos com comportamento do tipo depressivo (LABERMAIER et al., 2013; BAGOT et al., 2014; VILLANUEVA, 2013; ANACKER et al., 2013), assim como no córtex pré-frontal (YAMAGATA et al., 2017) . A tabela 1 mostra os genes mais frequentemente associados com a depressão.

Tabela 1 – Genes mais frequentemente associados à depressão

SIGLA	NOME	FONTE
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral	www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNF
Htr1b	Receptor 1B de 5 hidroxitriptamina	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HTR1B
Htr2c	Receptor de 2C hidroxitriptamina	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HTR2C
Gr	Receptor de glicocorticoide	Juruema, M.F. et al. (2004)
Mr	Receptor de mineralocorticoide	Alheira, F.V.; Brasil, M.A.A. (2005)
B1AR	Receptor beta adrenérgico 1	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB1
B2AR	Receptor beta adrenérgico 2	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB2
B3AR	Receptor beta adrenérgico 3	http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB3
IL-10	Interleucina 10	www.wikigenes.org/e/gene/e/3586.html
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos	Vilannueva, R. (2013)
SGK	Soro / regulado por glicocorticóides quinase	Anacker, C. et al.(2013)
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina	Labermaier, Masana, Müller (2013)
CRHR1	Hormônio liberador de corticotrofina do receptor 1	www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=crhr1
CRHR2	Hormônio de liberação de corticotrofina do receptor 2	www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=crhr2
NR3C1	Receptor nuclear subfamília 3, grupo C, membro 1	Oberlander, T.F. et al. (2008)
SLC6A4	Soluto portador da família 6 (transportador do neurotransmissor), membro 4	Bagot, R.C. et al. (2014)
HTR1B	Receptor tipo 1B de serotonina	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=HTR1B
HTR2C	Receptor tipo 2C de serotonina	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=HTR2C
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro	Bagot R.C. et al.(2014)

Neste trabalho foram analisados os genes: HRT1B e HTR2C, codificadores dos receptores de serotonina do tipo 1b e 1c, respectivamente; GR, que codifica o receptor de glicocorticoide; MR codificador do receptor para mineralocorticoide; B1AR, B2AR e B3AR, que codificam os receptores beta-adrenérgicos 1, 2 e 3,

respectivamente. Essa análise é relevante dado que a depleção de vitamina B₁₂ leva a menor produção de neurotransmissores, o que induz o organismo a aumentar a expressão de receptores, num mecanismo de autorregulação (*up-regulation*), para otimizar a captação dos neurotransmissores disponíveis (ORGONE, 2017).

Em um estudo preliminar do nosso grupo de pesquisa (BRITO et al., 2016) foi observado que a dieta adicionada de 5% de pectina em ratos machos jovens produziu comportamento do tipo depressivo mensurado pelo nado forçado, sem a presença de anemia, o que foi prevenido pela suplementação com a vitamina B₁₂.

Este estudo abriu perspectivas para um novo modelo experimental de depressão induzida por deficiência de vitamina B₁₂ na dieta e pode contribuir para futuros estudos de variáveis dessa condição.

Entende-se como modelo animal aquele que permite a avaliação de ocorrências biológicas do tipo natural, induzida e/ou comportamental comparáveis ao fenômeno humano que se pretende estudar (FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA, 2005). A literatura mostra a carência de modelos experimentais não invasivos para análise da depressão (COSTA-NUNES et al., 2015). Alguns modelos utilizam operação cirúrgica (bulbectomia olfatória bilateral), outros usam animais geneticamente modificados, outros fazem uso de intervenções com uso prolongado de medicamentos, etc (COSTA-NUNES et al., 2015; HOLMES, 2003), o que não pode ser replicado em humanos.

Deste modo, o presente trabalho almeja validar e caracterizar um modelo experimental de depressão induzida pela 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. Pretende também explorar, de forma mais detalhada, os parâmetros bioquímicos, hematológicos e comportamentais desse modelo, tornando-o confiável o que permitirá que a comunidade científica o utilize em estudos que envolvam a depressão e seus efeitos.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Validar e caracterizar o modelo experimental de depressão induzido pela deficiência de vitamina B₁₂ em ratas (fêmeas) alimentadas com dieta adicionada de pectina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar se a deficiência de vitamina B₁₂, induzida precocemente pela adição de pectina à dieta de ratas recém desmamadas e sua posterior reposição, alteram as seguintes variáveis:

2.2.1.1. Perfil hematológico: glóbulos vermelhos e hemoglobina, através do hemograma;

2.2.1.2. Fenótipo Comportamental:

2.2.1.2.1. *Comportamento do tipo depressivo, através do teste do nado forçado*

2.2.1.2.2. *Comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora, através dos testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado*

Expressão dos genes, através do PCR em tempo real:

Htr1b, Htr2c, Gr, Mr, B1AR, B2AR e B3AR

2.2.2. Avaliar se o início tardio da dieta de pectina em ratas jovens (após 12 semanas de vida), também é capaz de induzir comportamento do tipo depressivo.

2.2.3. Avaliar o efeito da dieta de pectina prolongada (por 12 semanas), verificando se o efeito da dieta é acumulativo.

2.2.4. Avaliar se o uso de fluoxetina como antidepressivo pode reverter a depressão induzida pela deficiência de vitamina B₁₂.

3 MÉTODO

3.1. ÉTICA

Os protocolos experimentais foram submetidos ao comitê de ética para uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie e aprovados, sob o protocolo CEUA/UPM 129/10/2015.

3.2. ANIMAIS

Foram estudadas 40 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*) fêmeas, recém-desmamadas (22 dias de vida), pesando aproximadamente 50g, provenientes do biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, onde foram mantidas em gaiolas, à temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, num ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à comida. Foram utilizadas, dependendo do grupo e da fase do experimento, ração comercial padrão para ratos da marca Nuvital® ou ração Pectina composta de ração comercial para ratos da marca Nuvital® (95%), enriquecida com 5% de pectina (%m/m). Os consumos de ração e água, além do peso dos animais foram medidos semanalmente. Na fase 1, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos denominados Padrão e Pectina. Na fase 2, os animais do grupo Padrão foram divididos aleatoriamente em dois novos grupos: PAD/PAD e PAD/PEC. Os do grupo Pectina foram separados, também aleatoriamente, em outros 3 grupos: PEC/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU.

3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Um esquema ilustrativo com o delineamento da parte experimental do projeto está representado na figura 3. O experimento foi dividido em duas fases, totalizando 12 semanas de estudo (6 semanas para cada fase).

Na primeira fase do projeto, o grupo Padrão foi alimentado com ração comercial e o grupo Pectina com ração com pectina. No final da fase 1 (6 semanas após o desmame - época na qual esses animais iniciam a vida adulta e que, de acordo com a literatura, a depleção de vitamina B₁₂ ainda não induziu à anemia), esses grupos participaram dos testes comportamentais descritos a seguir e foi feita a coleta de 1000 µL de sangue da veia caudal para elaboração de hemograma completo.

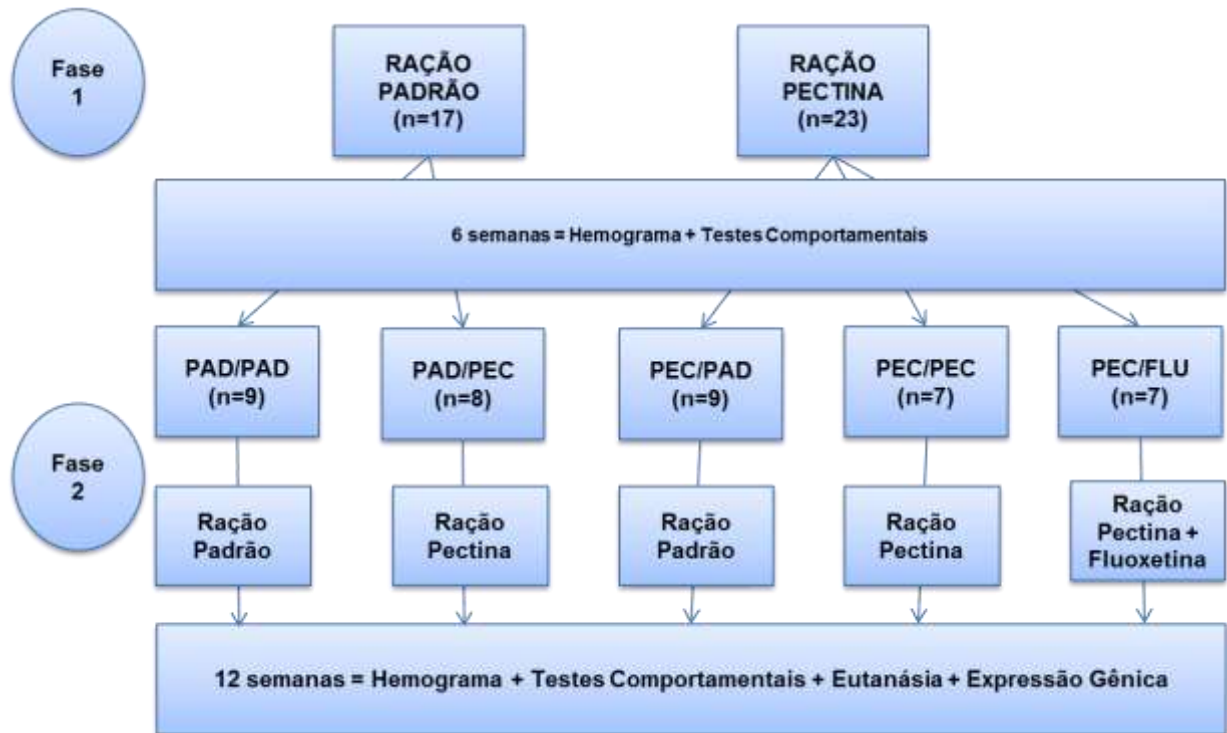


Figura 3 – Delineamento do experimento proposto

Na fase 2, os grupos “PAD/PAD” e “PEC/PAD” receberam ração padrão e os grupos “PAD/PEC”, “PEC/PEC” e “PEC/FLU” receberam a ração com pectina. O grupo “PEC/FLU” recebeu fluoxetina à base de 10 mg/kg/dia na água de beber, conforme esquema proposto por Holick et al. (2008). No final dessa fase houve nova coleta de sangue (1000 μ L) para realização do hemograma e nova aplicação dos testes comportamentais. Após, os animais foram eutanasiados. O cérebro foi removido para análise da expressão de genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O grupo “PAD/PAD” permaneceu com a ração padrão para ratos durante todo o período experimental. O objetivo do grupo “PEC/PAD”, na fase 1, foi o de confirmar se o uso de 5% de pectina na ração dos animais influencia no humor do animal, induzindo-o a comportamento do tipo depressivo. Na fase 2, foi o de verificar se a reposição de vitamina B₁₂, através do retorno à dieta padrão para ratos, poderia reverter essa situação. O grupo “PAD/PEC” teve por objetivo avaliar se o início da dieta de pectina após 12 semanas de vida do animal ainda é capaz de induzir ao comportamento depressivo. O grupo “PEC/PEC” teve por objetivo avaliar o efeito da dieta de pectina por 12 semanas, verificando se o seu efeito é cumulativo. O grupo “PEC/FLU” teve por objetivo avaliar o poder de reversão do esperado

comportamento depressivo do grupo, com a administração de um antidepressivo (fluoxetina) em conjunto com a reposição de vitamina B₁₂ pelo uso da ração padrão.

3.4. LINHA DO TEMPO

As diferentes atividades desenvolvidas ao longo do projeto, que atendem ao protocolo experimental, estão descritas na linha do tempo representadas nas figuras 4 e 5.

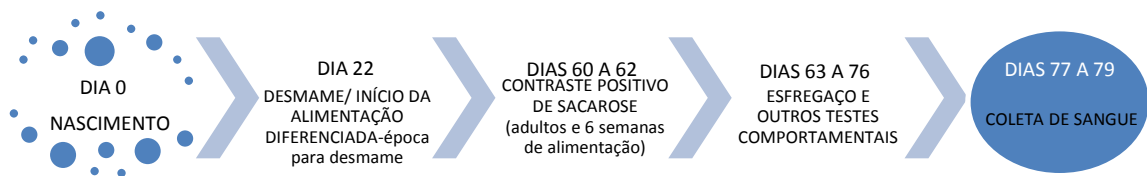


Figura 4 – Linha do tempo da primeira fase do projeto

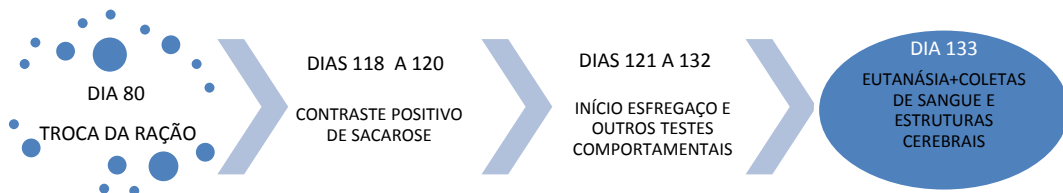


Figura 5 – Linha do tempo da segunda fase do projeto

Os testes comportamentais foram aplicados na sequência descrita na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Cronologia dos testes comportamentais

DIESTRO			
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1º CICLO ESTRAL	Contraste Positivo de Sacarose	Contraste Positivo de Sacarose	Contraste Positivo de Sacarose
2º CICLO ESTRAL	Campo Aberto Labirinto em cruz elevado		
3º CICLO ESTRAL	Nado Forçado - Treino	Nado Forçado - Teste	

3.5. HEMOGRAMA

O hemograma foi feito por contagem automatizada das células no sangue utilizando o equipamento Humacount (Huma®) que inclui, entre outros, as contagens de de glóbulos vermelhos e hemoglobina.

A coleta do sangue foi efetuada via caudal no final da fase 1 e após decaptação na fase 2.

3.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram executados no final das fases 1 e 2 do projeto e, para evitar qualquer viés nos resultados oriundos de variação hormonal, foram realizados após identificação da fase do ciclo estral de cada animal, o que foi feito através de avaliação por esfregaço, conduzido no período matutino. As roedoras que se encontravam na fase do diestro foram levadas a teste ainda no período da manhã. Optou-se pelo diestro por ser esta a fase com maior duração dentro do ciclo estral de roedoras (MARCONDES, BIANCHI E TANNO, 2002) importando, assim, maior tempo para a realização dos testes. O diestro é reconhecido microscopicamente quando o lavado vaginal é constituído predominantemente por leucócitos (figura 6) (VILELA, SANTOS JÚNIOR E CASTRO E SILVA, 2007)

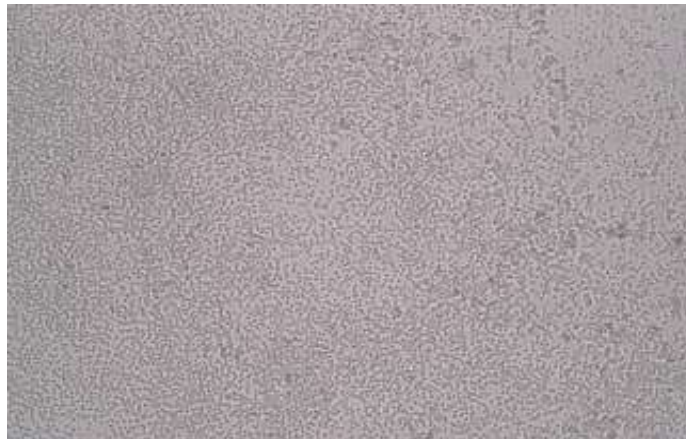


Figura 6: Fase do diestro – predomínio de leucócitos
Fonte: VILELA, SANTOS JÚNIOR E CASTRO E SILVA, 2007

3.6.1. Teste do nado forçado

Este teste é usado para avaliação do comportamento tipo depressivo em animais. As ratas foram expostas a duas sessões de nado, com um intervalo de 24 horas entre eles, num tanque trapezoidal, com largura de fundo e comprimento iguais a 20

cm, largura de topo e comprimento iguais a 35 cm e altura do silo igual a 60 cm, com água a 25°C, no nível de 40 cm.

No pré-teste (primeira sessão) 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.

No teste (vinte e quatro horas após o pré-teste), os animais voltaram ao tanque para nadar por 5 minutos e em seguida foram levados à câmara de aquecimento. O teste foi filmado para posterior análise. Nessa análise foram mensurados o tempo de imobilidade (período no qual o animal desiste de nadar e/ou faz movimentos apenas suficientes para manter o focinho fora da água) (figura 7), o tempo de latência (período entre o início do teste e o primeiro momento de desistência) e o número de episódios de imobilidade.

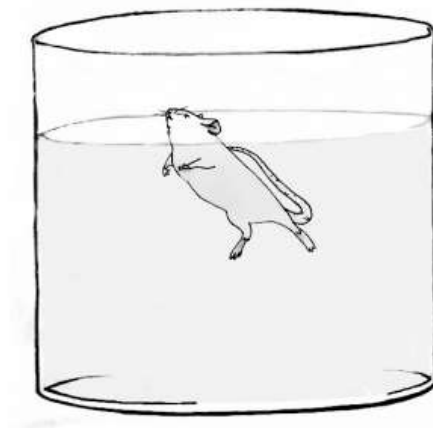


Figura 7 - Figura ilustrativa do animal em imobilidade no teste do nado forçado.

Fonte: SAMPAIO, 2015

3.6.2. Contraste positivo de sacarose

O teste é utilizado para avaliar um dos sintomas da depressão, a anedonia. O teste foi executado em 3 dias consecutivos. No primeiro foi ofertada uma solução de sacarose a 5%; no segundo a 10% e no terceiro a 15%. Duas garrafas idênticas, previamente identificadas, contendo solução de sacarose e água foram disponibilizadas nas gaiolas. Ao final de 24 horas, foi medido o consumo de ambas as garrafas pela diferença de quantidade inicial e final. De um dia para o outro, as garrafas tiveram suas posições invertidas para evitar comportamento de preferência por lugar. O índice utilizado para avaliar o consumo de sacarose foi calculado pela

razão entre o consumo da solução com sacarose dividido pelo consumo total (água + solução com sacarose). (Riaz et al., 2015)

3.6.3. Campo Aberto

O objetivo deste teste é o de avaliar a capacidade locomotora e o grau de ansiedade do animal. O equipamento consiste de uma arena circular com aproximadamente 60 cm de diâmetro, dividido em 12 zonas, sendo 8 periféricas e 4 centrais e envolto por uma parede circular de 49 cm de altura (figura 8). Os animais foram colocados no centro da arena e contabilizou-se o número de vezes que o roedor cruzou os vários quadrantes e o número de vezes que ele esteve nos quadrantes centrais, durante os cinco minutos de teste. A atividade locomotora foi expressa em número de quadrantes cruzados e pela relação entre a locomoção central e a total $[(\text{locomoção central}/\text{locomoção total}) * 100]$. Foi considerado cruzamento quando o animal colocou as 4 patas em diferente quadrante. O equipamento foi limpo com álcool 5% após a exposição de cada animal.



Figura 8 - Imagem ilustrativa do aparato para teste do campo aberto

Fonte: BONTHÉ, 2017

3.6.4. Labirinto em Cruz Elevado

Este teste tem como objetivo avaliar o comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora. O aparato consiste em quatro braços, sendo 2 fechados e 2 braços abertos, elevados a 55 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 (figura 9) e permaneceram por 5 minutos nesse aparelho. O número de entradas e o tempo de permanência em cada tipo de braço foram registrados e expressos em percentuais de entradas ou tempo dispendido no braço aberto: $(\text{[braço aberto}/(\text{braço aberto} + \text{braço fechado}) * 100])$. Foi considerada troca de localização quando o roedor colocou suas quatro patas em outro ambiente. O equipamento foi limpo com álcool 5% após a exposição de cada animal.

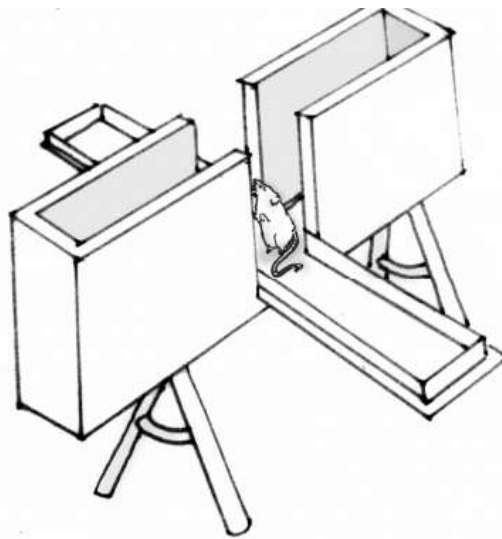


Figura 9 - Imagem ilustrativa do teste do labirinto em cruz elevado.

Fonte: SAMPAIO, 2015

3.7. EUTANÁSIA

Ao término dos testes comportamentais da segunda fase, os animais foram decapitados sob anestesia profunda com uretana (1,2g/kg do animal).

3.8. PREPARO DAS AMOSTRAS DO CÉREBRO

Após a decapitação, os cérebros foram retirados e lavados em solução salina gelada (4°C). Logo após, os cérebros foram dissecados sobre placas de Petri rodeadas por pedras de gelo seco - para que esse microambiente estivesse o mais frio possível. Algumas estruturas cerebrais - hipocampo e córtex - foram retiradas, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido e depois mantidos em freezer a -80°C até a realização dos ensaios para análise da expressão gênica.

3.9. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

O hipocampo e o córtex foram isolados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para medida dos níveis de RNAm para os receptores, Htr2c (receptor de 2C hidroxitriptamina), Gr, Mr (Mr-forward=CCA AAG GCT ACC ACA GTC TC; Mr-reverse= TCC CAG ACC GAC TAT TGT CT), B1AR (B1AR-forward= CTG CTA CAA CGA CCC CAA GTG; B1AR-reverse= AAC ACC CGG AGG TAC ACG AA), B2AR (B2AR-forward= GAG CCA CAC GGG AAT GAC A; B2AR-reverse= CCA GGA CGA TAA CCG ACA TGA) e B3AR (B3AR-forward= TTC CCA GCG GAG TTT TCA TC; B3AR-reverse= AGC GGG TTG AAG GCA GAG T), através da técnica de PCR em tempo real. Inicialmente foi realizada a extração do RNAm do tecido com o auxílio da solução de TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (500µl) e por métodos colorimétricos, utilizando o equipamento de espectrofotometria NanoDrop 2000. Foi, então, iniciada a reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), sendo necessários cerca de 2-4µg do RNAm obtido, que foi processado por meio da utilização do kit comercial SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR em termociclador Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Após, foi realizada a PCR em tempo real com o auxílio do kit comercial QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Valencia CA, EUA). Ao término dessa etapa foi verificada a especificidade da geração obtida do fragmento amplificado por meio da determinação da *melting curve*, sendo que o cDNA obtido foi utilizado para a determinação da expressão do RNA mensageiro dos genes mencionados anteriormente, além do Gapdh (gliceraldeído-3-fostato desidrogenase), que foi utilizado como gene constitutivo. Por fim, os valores referentes à amplificação do RNA mensageiro de cada um dos genes analisados foram determinados por meio de métodos de fluorescência e quantificados por um termociclador e detector Rotor-Gene 6000 (Corbert, Austrália).

3.10 ANÁLISE BROMATOLÓGICA DAS RAÇÕES

Foram colhidas amostras dos dois tipos de rações que alimentaram os animais: a ração padrão e a ração com pectina. Essas amostras sofreram análise bromatológica de umidade, cinzas, lipídeo, proteína, fibra e carboidrato, de acordo com o protocolo para análise físico-química para análise de alimento do Instituto Adolf Lutz, 2008).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A distribuição foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado quando comparados dois grupos experimentais e por análise de variância mista (ANOVA MISTA) de duas vias seguida do teste de Bonferroni quando analisados os cinco grupos nas duas fases. Diferenças significativas foram consideradas quando o valor de $p \leq 0,050$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism, da GraphPad Software, versão 7.03.

4 RESULTADOS

Os consumos de água e ração dos ratos foram medidos três vezes por semana. Os resultados obtidos estão demonstrados, pela média, por grupo e a cada 4 semanas, nas tabelas 3 e 4 abaixo, estando o consumo de água dos animais acima do esperado e o de ração dentro da expectativa, conforme Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (USP, 2017).

Tabela 3 – Consumo diário de água por grupo experimental

GRUPO EXPERIMENTAL	SEMANA 1 a 4 (em ml)	SEMANA 5 a 8 (em ml)	SEMANA 9 a 12 (em ml)	SEMANA 13 a 16 (em ml)	ESPERADO (*)
PAD/PAD	28	29	29	29	10 a 20 ml
PEC/PAD	29	29	28	30	10 a 20 ml
PAD/PEC	29	29	35	29	10 a 20 ml
PEC/PEC	26	34	30	30	10 a 20 ml
PEC/FLU	20	29	22	22	10 a 20 ml

(*) Fonte: USP, 2017

Tabela 4 – Consumo diário de ração por grupo experimental

GRUPO EXPERIMENTAL	SEMANA 1 a 4 (em g)	SEMANA 5 a 8 (em g)	SEMANA 9 a 12 (em g)	SEMANA 13 a 16 (em g)	ESPERADO (*)
PAD/PAD	15	17	15	15	10 a 20 g
PEC/PAD	14	17	16	16	10 a 20 g
PAD/PEC	17	18	18	16	10 a 20 g
PEC/PEC	14	16	16	16	10 a 20 g
PEC/FLU	15	17	15	15	10 a 20 g

(*) Fonte: USP, 2017

Os animais foram pesados semanalmente. A evolução encontrada está apontada na Tabela 5 e o peso na fase adulta está de acordo com o esperado de acordo com Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (USP, 2017).

Tabela 5 – Evolução semanal do peso por grupo experimental

GRUPO EXPERIMENTAL	SEMANA 1 a 4 (em g)	SEMANA 5 a 8 (em g)	SEMANA 9 a 12 (em g)	SEMANA 13 a 16 (em g)	ESPERADO (*)
PAD/PAD	133	217	241	252	250 - 350g
PEC/PAD	134	222	248	259	250 - 350g
PAD/PEC	139	231	266	281	250 - 350g
PEC/PEC	136	215	250	268	250 - 350g
PEC/FLU	140	229	253	262	250 - 350g

(*) Fonte: USP, 2017 - para fêmeas adultas

4.1 FASE 1

4.1.1 Nado forçado

No tempo de imobilidade foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($t=2,2510$; $p=0,0308$), tendo o grupo Pectina revelado um tempo maior de imobilidade. O tempo de latência e número de episódios de imobilidade não diferiram estatisticamente entre os grupos, ($t =0,4408$; $p=0,6621$ e $t=1,0970$; $p=0,2803$, respectivamente) (figuras 10A, 10B e 10C).

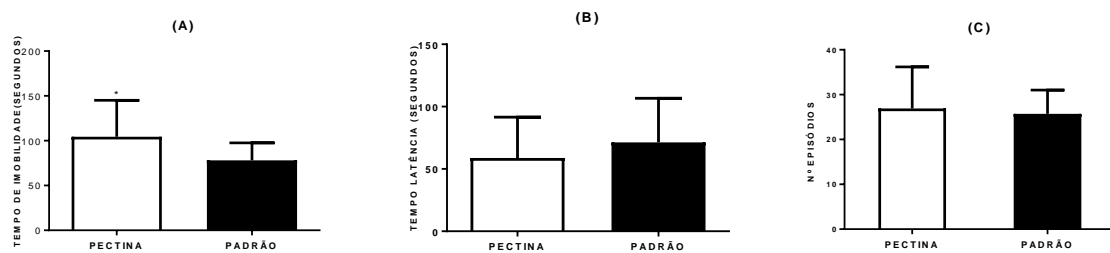


Figura 10 - Teste do nado forçado

Nota: (A) Tempo de imobilidade, (B) Tempo de latência e (C) número de episódios de desistência do teste do nado forçado, representados como média \pm desvio-padrão, dos dois grupos alimentares: Ração com Pectina ($n=23$) e Ração Padrão ($n=14$). O tempo de imobilidade foi significativamente menor no grupo tratado com pectina em comparação ao grupo que recebeu dieta padrão ($*p=0,0308$). O tempo de latência e número de episódios não diferiram entre os grupos.

4.1.2 Campo aberto

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da locomoção total ($t= 0,0955$; $p=0,9244$) e da relação entre as locomoções central ($t=0,4389$; $p=0,6633$) (figuras 11A e 11B).

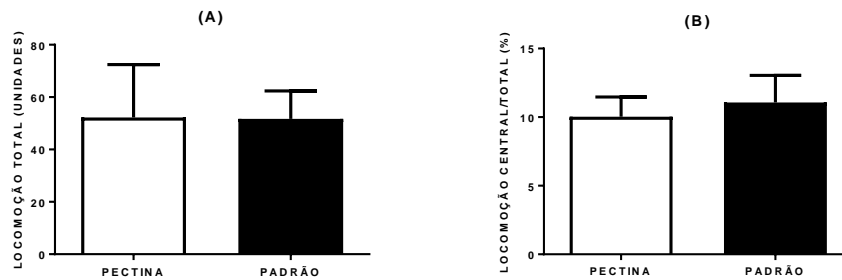


Figura 11 - Teste do campo aberto

Nota: (A) Total de locomoção, (B) razão entre a locomoção central e a total do teste do campo aberto, expressos como média \pm desvio padrão dos dois grupos alimentares: Ração com Pectina ($n=23$) e Ração Padrão ($n=16$). Não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os parâmetros analisados.

4.1.3 Labirinto em cruz elevado

Não houve diferença estatística significativa entre os resultados da locomoção total, percentual entre o número de entradas no braço aberto e o número total de entradas e percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto e o tempo total ($t= 0,5512$; $p=0,5849$, $t=1,1693$; $p=0,990$ e $t=1,651$; $p=0,1074$, respectivamente) (figuras 12A, 12B e 12C).

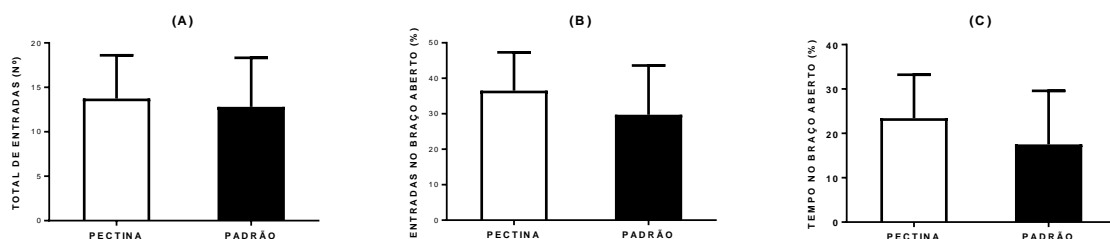


Figura 12 - Teste do labirinto em cruz elevado

Nota: (A) Locomoção total, (B) relação percentual entre o número de entradas no braço aberto e o número total de entradas e (C) percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto do aparato e o tempo total do teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão, dos dois grupos alimentares: Ração com Pectina ($n=23$) e Ração Padrão ($n=15$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativa em todos os parâmetros analisados.

4.1.4 Contraste positivo de sacarose

A razão entre o consumo médio da solução de sacarose e o de total de líquido ingerido por cada grupo alimentar está apresentada na tabela 6. Os dados estão expressos em média.

Tabela 6 - Resultado do teste de contraste positivo de sacarose

GRUPOS ALIMENTARES	SACAROSE/TOTAL
PECTINA	62,79%
PADRÃO	64,19%

Nota: Relação percentual entre o consumo da solução com sacarose e o total de líquido ingerido no período do teste, dos dois grupos alimentares: Ração com Pectina (n=23) e Ração Padrão (n=17).

Não foi possível medir o consumo por animal, o que impossibilitou o teste estatístico.

4.1.5 Hemograma

O sangue dos animais foi coletado nos dias seguintes ao término da aplicação dos testes comportamentais, para evitar que o *stress* causado por este procedimento pudesse interferir nos resultados. A tabela 7 abaixo mostra os valores médios, por grupo alimentar, das contagens de glóbulos vermelhos e de hemoglobina, apontando que não há diferença estatística significativa entre eles. Os valores médios encontrados estão dentro do padrão normal de referência para essas células sanguíneas em roedores. Para glóbulos vermelhos é esperado o volume de 4,72 a 10,25 $10^6/\mu\text{l}$ e para hemoglobina de 10,20 a 17,80 g/dL (Lima et al., 2014).

Tabela 7 – Resultados dos hemogramas

RESULTADOS	CONTAGEM MÉDIA			
	GLÓBULOS VERMELHOS		HEMOGLOBINA	
	RAÇÃO PECTINA	RAÇÃO PADRÃO	RAÇÃO PECTINA	RAÇÃO PADRÃO
MÉDIA	8,21	8,89	14,21	15,53
DP (\pm)	2,21	1,29	3,61	1,94
"p"	0,257		0,157	

Nota: Resultado da quantidade de glóbulos vermelhos e de hemoglobina. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão, dos dois grupos alimentares: Ração com Pectina (n=23) e Ração Padrão (n=17). Não foram observadas diferenças entre os grupos.

4.2 FASE 2

4.2.1 Nado forçado

4.2.1.1 Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU

No tempo de imobilidade houve diferença estatística entre as fases ($F_{1,15}=39,800$, $p<0,0001$), não houve diferença entre os grupos ($F_{2,15}=1,871$, $p=0,1882$) e nem na interação entre os fatores ($F_{2,15}=0,3424$, $p=0,7155$).

No número de episódios de imobilidade houve diferença estatisticamente significativa na interação entre os fatores ($F_{2,15}=5,115$, $p=0,0202$), mas não houve diferença entre as fases ($F_{1,15}=3,579$, $p=0,078$) nem entre os grupos ($F_{2,15}=0,4829$, $p=0,6233$).

Não houve diferença no tempo de latência.

Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 13A, 13B e 13C.

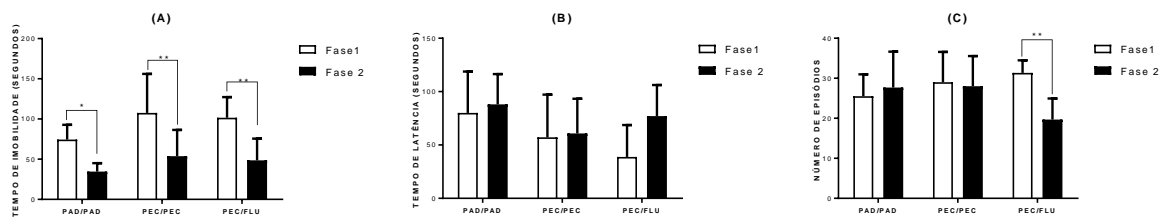


Figura 13 - Teste do nado forçado (grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU)

Nota: Tempo de imobilidade (A), tempo de latência para imobilidade (B) e número de episódios de imobilidade (C) no teste do nado forçado dos grupos PAD/PAD ($n=9$), PEC/PEC ($n=7$) e PEC/FLU ($n=7$). Houve redução no tempo de imobilidade na fase 2 em todos os grupos sendo as dos grupos PEC/PEC e PEC/FLU mais significativas, além de interação de fatores no número de episódios de imobilidade. Não houve diferença no tempo de latência. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ comparados com o tempo da fase 1.

4.2.1.2 Grupos PEC/PAD e PAD/PEC

No tempo de imobilidade houve diferença estatística entre as fases ($F_{1,12}=8,439$, $p=0,0132$), não houve diferença entre os grupos ($F_{1,12}=0,7682$, $p=0,3980$) e nem na interação entre os fatores ($F_{1,12}=0,8868$, $p=0,3649$).

Não houve diferença nos outros parâmetros analisados.

Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 14A, 14B e 14C.

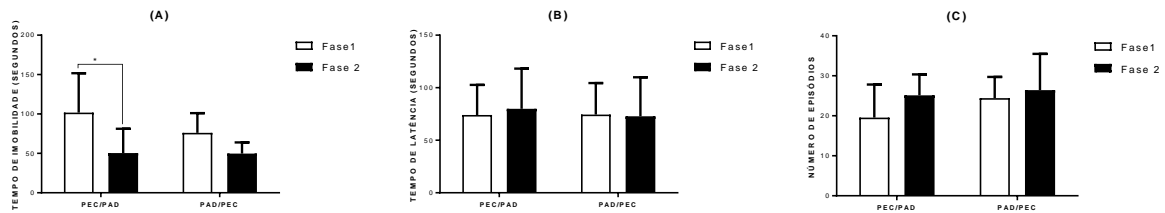


Figura 14 - Teste do nado forçado (grupos PEC/PAD e PAD/PEC)

Nota: Tempo de imobilidade (A), tempo de latência para imobilidade (B) e número de episódios de imobilidade (C) no teste do nado forçado dos grupos PEC/PAD (n=9) e PAD/PEC (n=8). Houve redução significativa no tempo de imobilidade na fase 2 no grupo PEC/PAD. Não houve diferença nos outros parâmetros analisados. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. * $p < 0,05$ comparado com tempo da fase 1.

4.2.2 Campo aberto

4.2.2.1 Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU

Na razão entre locomoção central e total locomoção total houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{2,19}=10,7400$, $p=0,0008$). Não houve diferença na locomoção total ($F_{2,19}=0,9297$, $p=0,4119$). Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 15A e 15B.

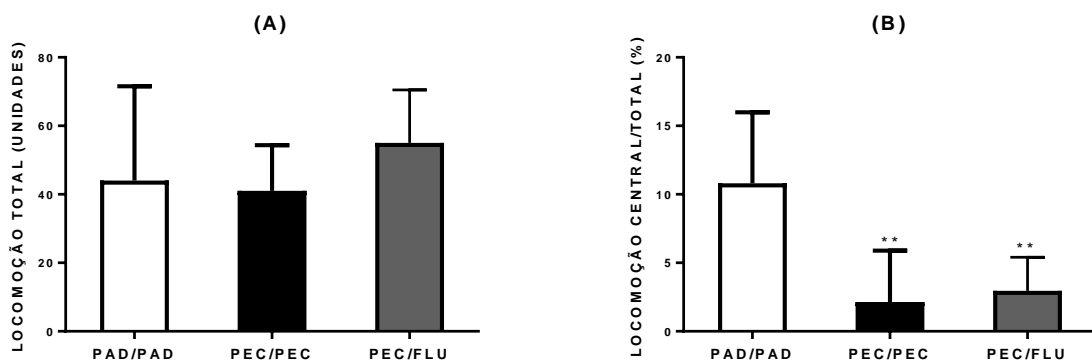


Figura 15 - Teste do campo (grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU)

Nota: (A) Total de locomoção e (B) razão entre a locomoção central e total, no teste campo aberto, dos grupos PAD/PAD (n=9), PEC/PEC (n=7) e PEC/FLU (n=7). Houve diferença significativa na exposição às frações centrais nos grupos PEC/PEC e PEC/FLU. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. ** $p=0,0011$ (PEC/PEC); ** $p=0,0025$ (PEC/FLU) comparados com grupo PAD/PAD.

4.2.2.2 Grupos PEC/PAD e PAC/PED

Não houve diferença na locomoção total entre os grupos ($t=0,2762$, $p=0,7864$) e nem na razão entre locomoção central e total ($t=1,4800$, $p=0,1611$). Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 16A e 16B.

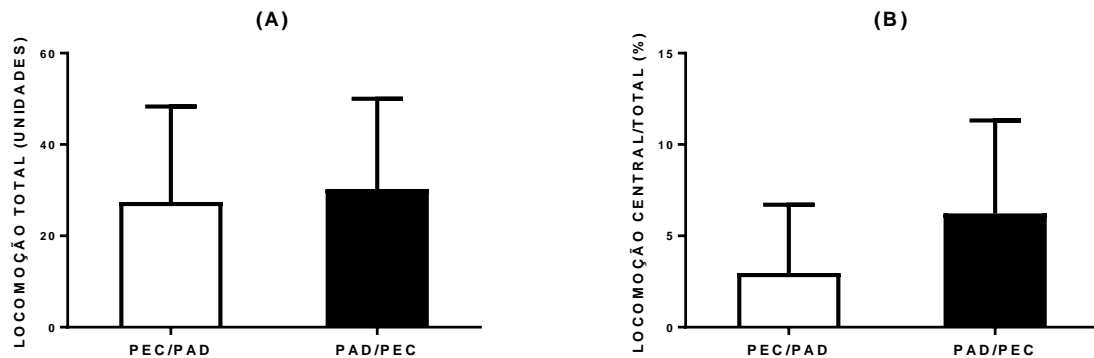


Figura 16 - Teste do campo aberto (grupos PEC/PAD e PEC/FLU)

Nota: (A) Total de locomoção e (B) razão entre a locomoção central e a total, no teste do campo aberto, dos grupos PEC/PAD ($n=9$) e PAD/PEC ($n=8$). Não houve diferenças estatísticas significativas em todos os parâmetros analisados.

4.2.3 Labirinto em cruz elevado

4.2.3.1 Grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU

Não houve diferença estatisticamente significativa na locomoção total ($F_{2,19}=1,222$, $p=0,3170$), nem na relação percentual entre o número de entradas no braço aberto ($F_{2,19}=1,1622$, $p=0,2236$) e nem na percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto ($F_{2,19}=2,587$, $p=0,1015$).

Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 17A, 17B e 17C.

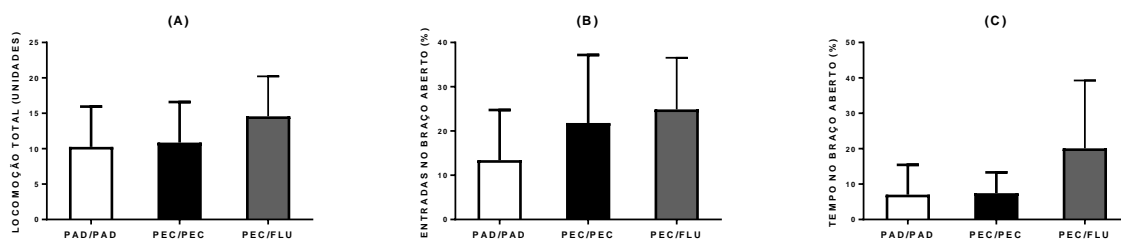


Figura 17 – Labirinto em cruz elevado (PAC/PAC, PEC/PEC e PEC/FLU)

Nota: (A) Locomoção total, (B) relação percentual entre o número de entradas no braço aberto e o número total de entradas e (C) percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto do aparato e o tempo total do teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos PAD/PAD ($n=9$), PEC/PEC ($n=7$) e PEC/FLU ($n=7$). Não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros analisados. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

4.2.3.2 Grupos PEC/PAD e PAD/PEC

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na locomoção total ($t=2,221$, $p=0,0433$). Não houve diferença na relação percentual entre o número de entradas no braço aberto e o número total de entradas ($t=1,144$, $p=0,2716$) e nem na percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto ($t=1,265$, $p=0,2264$).

Os dados estão representados por média \pm desvio-padrão nas figuras 18A, 18B E 18C

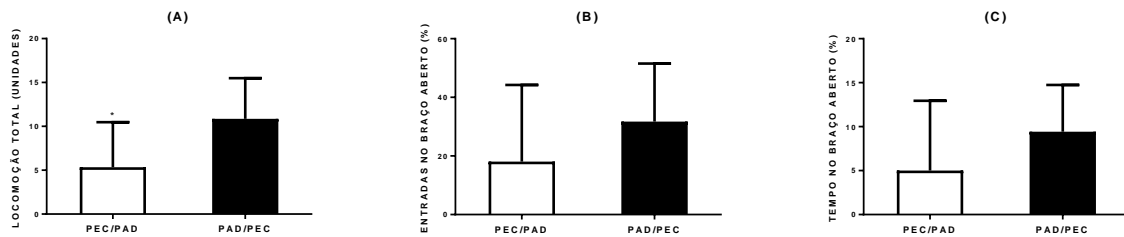


Figura 18 - Teste do labirinto em cruz elevado (grupos PEC/PAD e PAD/PEC)

Nota: (A) Locomoção total, (B) relação percentual entre o número de entradas no braço aberto e o número total de entradas e (C) percentagem entre o tempo dispendido no braço aberto do aparato e o tempo total do teste do labirinto em cruz elevado, dos grupos PEC/PAD ($n=9$) e PAD/PEC ($n=8$). Houve diferença estatisticamente significativa na locomoção total. Não houve diferença nos outros parâmetros analisados. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão. * $p=0,04333$ comparado ao resultado do grupo PAD/PEC.

4.2.4 Contraste positivo de sacarose

A relação percentual média entre o consumo da solução de sacarose e o de total de líquido ingerido por cada grupo está apresentada na tabela 8. Os dados estão expressos em médias.

Tabela 8 – Resultado do teste do contraste positivo de sacarose

GRUPOS EXPERIMENTAIS	SACAROSE/TOTAL
PAD/PAD	77,09%
PEC/PEC	75,92%
PEC/PAD	73,49%
PAD/PEC	77,84%
PEC/FLU	79,86%

Nota: Relação percentual entre o consumo da solução com sacarose e o total de líquido ingerido no período do teste, dos grupos PAD/PAD ($n=9$), PEC/PAD($n=9$), PAD/PEC ($n=8$), PEC/PEC ($n=7$) e PEC/FLU ($n=7$).

Não foi possível mensurar o consumo por animal, o que impossibilitou o teste estatístico.

4.2.5 Hemograma

A tabela 9 abaixo mostra os valores médios, por grupo experimental, das contagens de glóbulos vermelhos e de hemoglobina dos animais, apontando que não há diferença estatística significativa entre eles. Os valores médios encontrados estão dentro do padrão normal de referência para essas células sanguíneas em roedores descritos no mesmo item do resultado da fase 1 do projeto.

Tabela 9 – Resultados dos hemogramas

GRUPOS EXPERIMENTAIS	CONTAGEM MÉDIA					
	GLÓBULOS VERMELHOS			HEMOGLOBINA		
	Nº MÉDIO	DP	"p"	Nº MÉDIO	DP	"p"
PAD/PAD	8,65	1,15		15,03	2,12	
PEC/PAD	8,58	0,47	0,931	14,90	0,14	0,884
PAD/PEC	9,02	0,62	0,583	15,33	0,71	0,765
PEC/PEC	8,86	0,99	0,803	15,70	0,95	0,628
PEC/FLU	7,48	1,95	0,261	13,35	3,29	0,349

Nota: Números médios das contagens de glóbulos vermelhos e hemoglobina nos hemogramas realizados nos animais. Os dados estão expressos como média \pm desvio-padrão, dos grupos experimentais: PAD/PAD (n=9), PEC/PAD (n=9), PAD/PEC (n=8), PEC/PEC (n=7) e PEC/FLU (n=7). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros analisados.

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Conforme está demonstrado na figura 19, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise da expressão gênica dos grupos PAD/PAD e PEC/PEC.

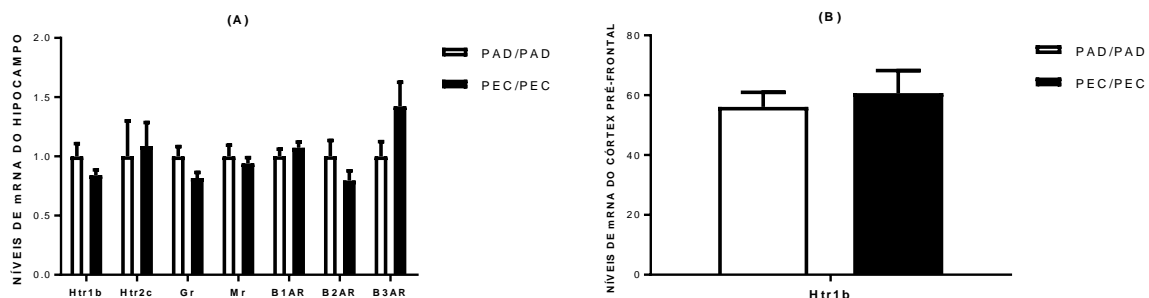


Figura 19 - Resultado das PCRs

Nota: (A) Perfil de genes do hipocampo e (B) Perfil do gene do córtex pré-frontal relacionados à depressão, analisados por PCR em tempo real e usando Gapdh como controle interno. Os valores estão expressos em média \pm desvio-padrão dos grupos experimentais PAD/PAD (n=9) e PEC/PEC (n=7). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros avaliados.

4.4 AVALIAÇÃO DA RAÇÃO

A figura 20 mostra os resultados dos fatores nutricionais das rações oferecidas aos animais. Houve diferença significativa no quesito umidade ($p < 0,0001$).

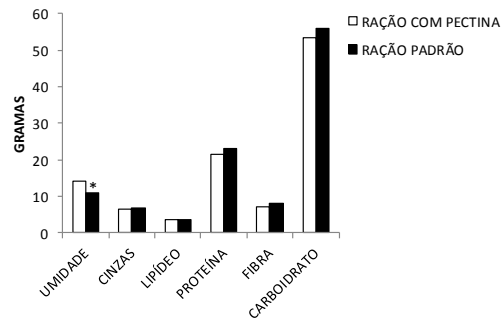


Figura 20 - Fatores nutricionais das rações padrão e pectina

Nota: O teor de umidade da ração padrão é significativamente menor do que o da ração com pectina ($* < 0,0001$). Os valores estão representados por média. Não houve diferença nos outros parâmetros analisados. $p < 0,0001$ em comparação com a ração com pectina.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a validar um modelo animal de depressão induzida pela deficiência de vitamina B₁₂ causada pela ingestão de pectina.

Essa hipótese foi confirmada na primeira fase do projeto quando se verificou que os animais induzidos à menor absorção da vitamina B₁₂ tiveram maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado (grupo pectina=108 segundos e grupo padrão=77 segundos, com $p=0,03$), conforme mostra a figura 10. De acordo com Calil et al. (2002), o maior tempo de imobilidade implica em estado depressivo uma vez que, quando um indivíduo com esse humor é colocado em circunstâncias de desafio, tende a escolher estratégias do tipo passiva, situação correlata ao estado de imobilidade.

Os resultados nos testes do campo aberto (figura 11) e labirinto em cruz elevado (figura 12), sem diferença estatística significativa entre os grupos, mostraram que a imobilidade observada não estava associada a problemas de locomoção ou emocionais, evitando assim um falso positivo. Os resultados dos hemogramas (tabela 7) e da composição das rações (figura 20) garantiram que a diferença não se deu por questões de saúde ou nutrição, evitando também o falso positivo.

O teste do contraste positivo de sacarose (tabela 6) não mostrou diferença de consumo entre os grupos e, portanto, não apontou estado anedônico nos animais do grupo ração com pectina. Embora fosse esperada essa diferença, ela não é a única que aponta para a depressão. Conforme esclarece o trabalho de Freitas (2012), o diagnóstico de depressão é feito a partir da identificação de pelo menos um de dois sintomas: anedonia ou humor deprimido. Logo, a falta de diferença no consumo entre os grupos não elimina a hipótese de comportamento do tipo depressivo.

Na segunda exposição dos animais ao teste do nado forçado (figuras 13 e 14), foi observado que houve uma redução de cerca de 50% no tempo de imobilidade de todos os grupos. Contrário a esses resultados estão os achados nos estudos de Dal-Zotto et al. (2000) e França et al. (2016). Seus animais aumentaram o tempo de imobilidade quando submetidos a novos testes de nado forçado. Porém, nesses estudos, a exposição aconteceu 15 vezes e em dias consecutivos, o que difere do protocolo deste experimento que repetiu o teste uma única vez e após 50 dias da primeira exposição. França et al. (2016) sugerem que o aumento observado

por eles é decorrente do benefício gerado pela prática de exercício crônico, o que pode ter reduzido o nível de ansiedade dos animais e, em consequência, o desespero deles por comportamento de fuga. Os animais deste estudo não tiveram esse ganho.

O tempo de imobilidade (figuras 13 e 14) mostrou-se comum a todos os grupos, sugerindo que os animais não apresentaram comportamento relacionado à depressão na fase 2 do projeto. Esse fato pode estar associado a algum tipo de adaptação fisiológica à ingestão de pectina ou à redução da absorção de vitamina B₁₂, da mesma forma que ocorre adaptação intestinal para absorção de nutrientes na síndrome do intestino curto (VALÉRIO, 2014) ou adaptação fisiológica pós-cirurgia bariátrica para absorção de ácido fólico (BORDALO et al., 2011). Também pode ser decorrente do fato de que, para se induzir à depressão na fase adulta do animal, seja necessária uma depleção mais drástica da vitamina B₁₂.

Quando comparados os tempos de imobilidade entre as duas fases do projeto, observou-se que a diferença de tempo dos grupos PEC/PEC e PEC/FLU foi maior do que a do grupo PAD/PAD (figura 13). O maior esforço dos grupos PEC/PEC e PEC/FLU (que foram depletados) para atingir o desempenho do grupo PAD/PAD, corrobora a hipótese de que houve depressão na fase 1. Já o fato de não haver diferença significativa no tempo de imobilidade entre esses grupos, indica que o consumo de pectina a longo prazo, na proporção oferecida neste projeto, não leva a comportamento do tipo depressivo. Por outro lado, a falta de diferença no tempo de imobilidade do grupo PEC/FLU - que foi medicado com antidepressivo - e o grupo PEC/PEC - que não recebeu esse tratamento - mostra, mais uma vez, que os animais não estavam deprimidos nessa fase da vida. Também há que ser considerado o efeito da dose ministrada, já que outros trabalhos indicam o uso da droga em doses maiores e em mais de uma vez por dia (FERNANDES ET AL., 2012; ROGÓZ E SKUZA (2006).

O tempo de latência para imobilidade e número de episódios de desistência é comum entre os grupos, nas duas fases do projeto (figuras 10, 13 e 14). O trabalho de Xiaofang et al. (2107) mostra tempo de latência similar ao deste estudo.

Dado que não foi detectado comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado, os resultados dos testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado se prestam apenas a sugerir o efeito da ingestão de pectina no estado ansiogênico e capacidade de locomoção dos animais.

A locomoção total dos animais no teste do campo aberto dos grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU (figura 15) manteve-se em torno de 45/50 frações, resultado semelhante ao de Sampaio (2015). A locomoção pelas frações centrais do grupo PAD/PAD, em torno de 10%, encontra similaridade ao encontrado por Moysés (2010). A falta de diferença significativa entre os grupos, indicam que o consumo de pectina não alterou o comportamento desses animais. Porém, a menor exposição dos grupos PEC/PEC e PEC/FLU (figura 15B) ao espaço central, indica que esses grupos mantiveram-se em estado ansiogênico, o que pode ter sido induzido por esse consumo prolongado. Por outro lado, os resultados desse teste dos grupos PEC/PAD e PAD/PEC (figura 16) é inferior aos das bibliografias consultadas o que, o desenho deste projeto não permite identificar a razão.

No do teste do labirinto em cruz elevado, não houve diferença entre os grupos PAD/PAD, PEC/PEC e PEC/FLU (figura 17), indicando que esse instrumento não captou o mesmo comportamento do teste do campo aberto. Houve diferença apenas entre os grupos PEC/PAD e PAD/PEC (figura 18) no parâmetro locomoção total, resultado que este projeto não permite interpretação.

Na segunda fase também não houve diferença nos resultados dos hemogramas, garantindo o estado de saúde semelhante entre os animais.

A inexistência de diferença nos resultados do PCR entre os grupos mostra que não houve alteração na expressão gênica dos receptores testados. Tal resultado pode estar relacionado ao fato de que na fase 2 os animais não estavam deprimidos. Porém, há de se considerar que cada tipo de depressão envolve aspectos diferentes. Por exemplo, Dunjic-Kostic et al. (2012) sugeriram que “a diferença nos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode refletir uma diferença biológica entre depressão melancólica e atípica”.

Uma limitação importante observada na execução deste projeto foi a impossibilidade da quantificação do nível sérico da vitamina B₁₂ e seus metabólitos, nas duas fases do projeto, o que permitiria avaliar se a ingestão de pectina realmente causou deficiência de vitamina B₁₂ e em qual nível. Conhecer o nível de depleção seria importante para confirmar ou não a hipótese de que é necessária maior ingestão da fibra para induzir à deficiência. Também poderia auxiliar a

esclarecer se é necessário provocar uma deficiência mais drástica da vitamina para induzir ao comportamento do tipo depressivo.

Outra limitação importante foi a impossibilidade de analisar a expressão gênica dos receptores dos animais no final da fase 1 do projeto. Nesse momento, no qual o resultado do teste do nado forçado indicou que houve comportamento do tipo depressivo no grupo que se alimentou com pectina, teria sido possível avaliar se houve associação do comportamento à expressão gênica de receptores.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o consumo de pectina leva a comportamento do tipo depressivo durante uma janela temporal (até 11 semanas de vida). A ingestão da fibra, nesse período, não alterou os parâmetros de locomoção, ansiedade e saúde hematológica dos animais, o que confirma que o resultado do teste do nado forçado é somente decorrente do estado deprimido.

Esses resultados também indicam que o consumo de pectina por período prolongado (até 19 semanas de vida) pode trazer alteração no estado de ansiedade dos animais.

A reprodução deste projeto, com amostra maior de animais, pode vir a corroborar a conclusão deste estudo.

Um outro desenho metodológico pode contribuir no estudo da ação ansiogênica da ingestão de pectina.

7 REFERÊNCIAS

ALHEIRA, F.V.; BRASIL, M.A.A. O papel dos glicocorticoides na expressão dos sintomas de humor – uma revisão. *Rev. Psiquiatr. RS*, v.2, n.27, p.177-186, 2005.

ANACKER, Christoph et al. Role for the kinase SGK1 in stress, depression, and glucocorticoid effects on hippocampal neurogenesis. *PNAS*, v.110, n.21, 2013.

BAGOT, Rosemary C. et al. Epigenetic signaling in depression. *Dialogues Clin Neurosci.*, n.16, p.281-295, 2014.

BONThER - Equipamentos para ensino e pesquisa. Disponível em <http://www.bonther.com.br/produtos/busca/9/psicologia/0/todas/3>. Acesso em junho/2017.

BORDALO, Livia Azevedo; TEIXEIRA, Tatiana Fiche Sales; BRESSAN, Josefina, MOURÃO, Denise Machado. Cirurgia bariátrica: como e por que suplementar. *Rev Assoc Med Bras*, v.1, n.57, p.113-120, 2011.

BRITO, Adriana Maria de Oliveira et al. Reposição de vitamina B₁₂ reduz comportamento depressivo induzido em ratos jovens. *Scientia Medica*, v.26, n.3, 2016.

CALIL, Caroline Morini; BIACHI, Fábio José; TANNO, Ana Paula; CUNHA, Tatiana de Sousa; MARCONDES, F. K. Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.4, p.479-485.

CHOI, Sang-Woon; FRISO, Simonetta; GHANDOUR, Haifa; BAGLEY, Pamela J.; SELHUB, Jacob; MASON, Joel B. 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, Leonardo Gazzi; MAGALHÃES, Pedro Vieira da Silva. Epidemiologia de transtorno depressivo maior. In: QUEVEDO, João, SILVA, Antônio Geraldo. *Depressão. Teoria e Clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2013. p.30-38.

COSTA-NUNES, João P., et al. Animal models of depression and drug delivery with food as an effective dosing method: evidences from studies with celecoxib and dicholine succinate. *BioMed Research Internacional*, v.2015, 2015.

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.*, v.8, n.119, p.1121-1127, 1989.

DANIELS, Julie L. et al. Parental psychiatric disorders associated with autism spectrum disorders in the offspring. *Pediatrics*, v.5, n.122, p.1357-1362, 2008.

DAL-ZOTTO, S.; MARTI, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural Brain Research*, v.114, p. 175–81, 2000.

DUNJIC-KOSTIC, B.; IVKOVIC M.; RADONJIC N.V.; PETRONIJEVIC N.D.; PANTOVIC M.; DAMJANOVIC A.; POZNANOVIC S.T.; JOVANOVIC A.; NIKOLIC T.; JASOVIC-GASIC M. Melancholic and atypical major depression - connection between cytokines, psychopathology and treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. v.3, n.43, p.1-6, 2013.

ESPADA, Maria Margarida Saial Santos Guiomar. *Envolvimento da via de sinalização BDNF/TRKB na etiologia do autismo: análise genética*. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

FÁBREGAS, Bruni Cópico; VITORINO, Flávia Domingues; TEIXEIRA, Antônio Lúcio. Deficiência de vitamina B12 e transtorno depressivo. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, v.60, n.12, 2011.

FERNANDES, Eduardo Vignoto; RAMOS, Solange de Paula; ESTANISLAU, Célio; VENÂNCIO, Émerson José. Efeitos comportamentais e imunológicos da fluoxetina em ratos submetidos ao nado forçado. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, v.28, n.4, p.409-415, 21012.

FERREIRA, Lydia Masako; HOCHMAN, Bernardo; BARBOSA, Marcus Vinícius Jardim. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20, n.2, 2005.

FMUSP - Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa – Centro de Bioterismo – DTAPEP Premium – ROE Wistar. Disponível em http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=rato&id_ani=17&caract=sim. Acesso em abril/2017.

FRANÇA, Arthur S.C.; RUFINO, Fabíola P.S.; SOARES, Bruno Lobão; RIBEIRO, Sidarta. Nado forçado crônico diminui a ansiedade em camundongos. *Revista da Biologia*, v.1, n.16, 2016.

FREITAS, Andiará Espíndola. *Mecanismos envolvidos na ação antidepressiva de *Tabebuia avellanedae**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

GERZSON, Branca Maria Cereser. *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.

HOLICK Kerry A.; LEE Daniel C.; HEN René; DULAWA, Stephanie C. Behavioral Effects of Chronic Fluoxetine in BALB/cJ Mice Do Not Require Adult Hippocampal Neurogenesis or the Serotonin 1A Receptor. *Neuropsychopharmacology*, n.33, p. 406-417, 2008.

JURUEMA, Mario F.; CLEARE, Anthony J.; PARIANTE, Carmine M. O eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Ver. Bras. Psiquiatr.*, n.3, v.26.

KUMAR, Kalle Anand; LALITHA, Anumula; PAVITHRA, Dhandapani; PADMAVATHI, Inaganapa J.; GANESHAN, Manisha; RAO, Kalashikan Rajender 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.

LABERMAIER Christiana; MASANA Mercé A.; MÜLLER Marianne B. Biomarkers Predicting Antidepressant Treatment Response: How Can We Advance the Field? *Disease Markers*, v.35, p.23-31, 2013.

LARSON, Heide Jeanet et al. Risk factors for autism: perinatal factors, parental psychiatric history, and socioeconomic status. *American Journal of Epidemiology*, v.161, n.10, p.916-925, 2004.

LIMA Cláudio Moreira et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Ratus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 2014; 10(3).

LUTZ, Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, p. 101, 2008. Versão eletrônica, p. 1020, 2008. Disponível em http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em junho/2017.

MARCONDES, Fernanda Klein; BIANCHI, F. J. e TANNO, A. P.. Determinação das fases do ciclo estral em ratas: considerações úteis. *Braz. J. Biol.[online]*, v. 62, n.4a, p.609-614, 2002.

MARS, B. et al. Longitudinal symptom course in adults with recurrent depression: Impacto and impairment and risk of psychopathology in offspring. *J. Affect Disord*, n.182, p.32-38, 2015.

MOYSÉS, Felipe dos Santos. *Rato como modelo animal para avaliação da toxicidade induzida pela exposição crônica a efluentes de curtumes: parâmetros comportamentais e bioquímicos*. 2010, 65p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Departamento de Fisiologia, Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

OBERLANDER, Tim F. et al. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*, n.3, p.97-106, 2008.

ORGONE – Psicologia clínica. Transtornos do Humor I. Disponível em http://www.orgone.com.br/a_thumor1.html. Acesso em setembro/2017.

PANIZ, Clóvis; GROTTTO, Denise; SCHMITT, Gabriela Cristina; VALENTINI Juliana; SCHOTT, Karen Lílian; POMBLUM, Valdeci Juarez; GARCIA, Solange Cristina. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *J Bras Patol Med Lab*, v.41, n.5, p.323-334, 2005.

PARLETTA Natalie; MILTE Catherine M.; MEYER Barbara J. Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.5, n.24, p.725-743, 2013.

RIAZ Muhamad S.; BOHLEN Martin O.; GUNTER Barak W.; PAUL Ian A. Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiol Behav*. v.15, 2015..

SAMPAIO, Waneli Cristine Moraes. *Influência da musicoterapia no comportamento de animais em desenvolvimento*, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

SLATTERY, David A.; CRYAN, John F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, v.7, n.6, p.1009-1012, 212.

SOEIRO-DE-SOUZA, Márcio Gerhardt; VIEIRA, Rodrigo Machado. Neurobiologia do transtorno depressivo maior. In: QUEVEDO, João, SILVA, Antônio Geraldo. *Depressão. Teoria e Clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap.4, p.49-56.

SULZBACH, Mireia. Depressão gestacional e pós-parto. In: QUEVEDO, João, SILVA, Antônio Geraldo. *Depressão. Teoria e Clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 16, p.179-195.

TAKAKURA, Tania Yumi.; TENG, Chei Tung. Como diagnosticar e tratar depressão. *Revista Brasileira de Medicina*, v.69,n.12, 2012.

USP - Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Instituto de Química (FCF-IQ/USP). Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. Disponível em <http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>. Acesso em abril/2017.

VALÉRIO, Fernando Borges. *Síndrome do intestino curto: aspectos nutrológicos e novas abordagens terapêuticas*.2014, 34p. Monografia (Conclusão do curso em Nutrologia), Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, SP, 2014.

VILELA, Márcio Gomes; SANTOS JÚNIOR, João Lúcio dos; CASTRO E SILVA, João Gilberto. Determinação do ciclo estral em ratas por lavagem vaginal. *Femina*, v.35, n.10, p.667-670, 2007.

VILLANUEVA, Rosa. Neurobiology of Major Depressive Disorder. *Neural Plasticity*, v. 2013, 7 p., 2013.

XIAOFANG, Lu; YUEFEN, Wang; CHUNYAN, Liu; YANGANG, Wang. Depressive disorder and gastrointestinal dysfunction after myocardial infarct are associated with abnormal tryptophan-5-hydroxytryptamine metabolism in rats. *PLoS ONE*, v.2, n.12, 2017.

WHO. Mental Health. *Depression*. Disponível em <http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/> Acesso em 28/jun/2015.

YAMAGATA, Hirotaka; UCHIDA, Shusaku; MATSUO, Koji; HARADA, Kenichiro; KOBAYASHI, Ayumi; NAKASHIMA, Mami; NAKANO, Masayuki; OTSUKI, Koji, ABE-HIGUCHI, Naoko; HIGUCHI, Fumihiko; WATANUKI, Toshio; MATSUBARA, Toshio; MIYATA, SHIGEO; FUKUDA, Masato; MIKUNI, Masahiko; WATANABE, Yoshifumi. Identification of commonly altered genes between in major depressive disorder and a mouse model of depression. *Scientific Reports* 7, artigo 3044, 2017.