

Morgana Moretti

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO  
ÁCIDO ASCÓRBICO COMO UMA NOVA ALTERNATIVA  
PARA O TRATAMENTO DA DEPRESSÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós  
graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia  
Severo Rodrigues.

Florianópolis  
2013

## Ficha catalográfica

Aprovação banca



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jenecy e Roseli, por terem investido na minha educação, me ensinado os melhores valores e por terem me apoiado durante todo este tempo. Serei eternamente grata!

Ao meu querido Paulo, com quem dividi todos os momentos dessa jornada. Serei sempre grata pelo companheirismo, compreensão, incentivo e por fazer minha vida mais feliz.

À Professora Ana Lúcia, pela oportunidade e confiança em mim depositada. Pelo apoio e orientação neste trabalho. Seus ensinamentos foram muito valiosos para mim e fundamentais para minha formação.

Aos Professores Marcelo e Rodrigo, pela colaboração nos trabalhos e disponibilidade em auxiliar sempre que precisei.

Aos colegas que contribuíram diretamente na execução dos experimentos: Andi, Grasi, Sinara, Camille, Vivian, Danúbia, Alessandra, Débora, Luana, Juliana, André, Priscila e especialmente a Josi, colaboradora em todos os meus projetos e companheira em todas as horas durante o período que estivemos juntas no doutorado. Muito obrigada!

Aos demais colegas do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, que de alguma forma contribuíram para a viabilização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, sempre serei muito grata!

A todos os familiares e amigos que torceram por mim, muito obrigada!

À CAPES, pela concessão da bolsa.



O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.

(Isaac Newton , 1687)





## RESUMO

Dados clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que o ácido ascórbico possui propriedades antidepressivas. O presente estudo investigou o envolvimento dos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA), da via da L-arginina-óxido nítrico-GMPc e dos canais de  $K^+$  no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no teste da suspensão pela cauda (TSC). Adicionalmente avaliamos os efeitos comportamentais e bioquímicos deste composto em camundongos submetidos ao estresse de contenção e estresse crônico imprevisível. O efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico (1 mg/kg) no TST foi prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com NMDA (0,1 pmol/sítio), L-arginina (750 mg/kg) ou sildenafil (5 mg/kg). Adicionalmente, a combinação de MK-801 (0,001 mg/kg), 7-nitroindazol (25 mg/kg) e 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) (30 pmol/sítio) com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg) produziu um efeito do tipo-antidepressivo sinérgico no TSC. A administração de uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg) combinada com doses sub-ativas de inibidores de canais de  $K^+$  (TEA, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina), produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC em camundongos, enquanto o tratamento dos animais com ativadores de canais de  $K^+$  (cromacalim e minoxidil) reverteu o efeito tipo-antidepressivo de uma dose ativa de ácido ascórbico (1 mg/kg). Da mesma forma, a administração de cromacalim reverteu o efeito tipo-antidepressivo sinérgico resultante da administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol. A exposição dos camundongos ao estresse de contenção agudo (7 horas) ou estresse crônico imprevisível (14 dias) aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (TNF) e TSC, respectivamente, além de causar um dano oxidativo no córtex cerebral e hipocampo dos mesmos, efeitos que foram revertidos pela administração de ácido ascórbico nas doses de 1 mg/kg (estresse de contenção) e 10 mg/kg (estresse imprevisível). Em conjunto, nossos resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC é dependente do bloqueio dos receptores NMDA, da inibição da síntese de NO/GMPc e inibição dos canais de potássio. Além disso, o ácido ascórbico desempenha um importante efeito antidepressivo em modelos animais de depressão induzida por estresse, pelo menos em parte, devido ao seu papel antioxidante.

Palavras chave: ácido ascórbico, depressão, estresse, estresse oxidativo, NMDA



## ABSTRACT

Clinical and preclinical data have reported that ascorbic acid has antidepressant properties. The present study investigated the involvement of N-metil D-Aspartate NMDA receptors, L-arginine-NO-cGMP pathway and K<sup>+</sup> channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test (TST). In addition, we evaluated the behavioral and biochemical effects of this compound in two different models of depression induced by stress (restraint stress and chronic unpredictable stress). The anti-immobility effect of ascorbic acid (1 mg/kg, p.o.) in the TST was prevented by the pre-treatment of mice with NMDA (0.1 pmol/site), L-arginine (750 mg/kg) or sildenafil (5 mg/kg). Moreover, the administration of MK-801 (0.001 mg/kg), 7-nitroindazole (25 mg/kg) or 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) (30 pmol/site) in combination with a sub-effective dose of ascorbic acid (0.1 mg/kg) produced a synergistic antidepressant effect in the TST. The administration of a sub-effective dose of ascorbic acid (0.1 mg/kg) combined to sub-effective doses of inhibitors of K<sup>+</sup> channels (TEA, glibenclamide, charibdotoxin or apamin), elicited synergistic antidepressant-like effect in TST, while the pre-treatment of animals with K<sup>+</sup> channel openers (cromakalim and minoxidil) reversed the antidepressant-like effect of an active dose of ascorbic acid (1 mg/kg). Similarly, the administration of cromakalim abolished the synergistic antidepressant effect elicited by the combined treatment with sub-effective doses of ascorbic acid and 7-nitroindazole. Exposure of mice to stressors applied acutely (restraint stress – 7 hours) or chronically (chronic unpredictable stress – 14 days) promoted an increase in the immobility time of mice in the forced swimming test and TST, respectively. Besides, the stress protocols cause an oxidative damage in the cerebral cortex and hippocampus of mice, effects which were reversed by ascorbic acid administration (1 mg/kg in the restraint stress protocol and 10 mg/kg in the chronic unpredictable stress protocol). Altogether, our results suggest that the antidepressant effect of ascorbic acid in the TST is dependent on the blockade of NMDA receptors, inhibition of K<sup>+</sup> channels and NO/GMPc synthesis. Furthermore, ascorbic acid displays an important antidepressant effect in animal models of depression induced by stress, at least in part, due to its antioxidant properties.

Keywords: ascorbic acid, depression, NMDA, oxidative stress, stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O eixo HPA. ....	25
Figura 2. Bioquímica do ácido ascórbico.....	34
Figura 3. Biossíntese do ácido ascórbico em animais. ....	35
Figura 4. Esquema de captação e metabolismo do ascorbato no SNC.....	36
Figura 5. Envolvimento dos receptores NMDA e a via da L-arginina-NO-GMPc no efeito do tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. ....	50
Figura 6. Envolvimento de canais de $K^+$ no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC.....	52
Figura 7. Esquema ilustrativo do efeito do ácido ascórbico em modelos animais de depressão induzida por estresse de contenção e estresse crônico imprevisível. ....	60
Figura 8. Principais mecanismos responsáveis pelo efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico em camundongos. ....	63



## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina  
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico  
AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato  
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ATP - Adenosina trifosfato  
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
CAT - Catalase  
CREB - Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc  
CRH - Hormônio liberador de corticotropina  
EROs - Espécies reativas de oxigênio  
GCs - Guanilato ciclase solúvel  
GMPc - Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico  
GPx - Glutaciona peroxidase  
GR - Glutaciona redutase  
GSK-3 $\beta$  - Glicogênio sintase cinase-3 $\beta$   
GTP - Guanosina 5'-trifosfato  
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal  
I.c.v. - Intracerebroventricular  
I.p. - Intrapertoneal  
NMA - N-Metil-D,L-aspartico  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
NO - Óxido nítrico  
NOS - Óxido nítrico sintase  
NOS 1 - Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS 2 - Óxido nítrico sintase induzida  
NOS 3 - Óxido nítrico sintase endotelial  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Ânion superóxido  
ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona]  
P.o.- Per oral (via oral)  
PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase  
PKG - Proteína cinase dependente de GMPc  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SOD - Superóxido dismutase  
SVCT - Transportadores de vitamina C dependentes de sódio  
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TEA - Tetraetilamônio  
TNF - Teste do nado forçado  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TrkB - Tropomiosina cinase B

TSC - Teste da suspensão pela cauda



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1	DEPRESSÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	19
1.2	BASES ETIOLÓGICAS DA DEPRESSÃO .....	20
1.2.1	Sistemas monoaminérgicos.....	20
1.2.2	Sistema glutamatérgico.....	20
1.2.3	Via da L-arginina-óxido nítrico (NO) e canais de potássio (K <sup>+</sup> ).....	22
1.2.4	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e depressão .....	24
1.2.5	Vias de sinalização intracelular .....	27
1.2.6	Estresse oxidativo .....	29
1.3	MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO .....	31
1.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DEPRESSÃO .....	32
1.5	ÁCIDO ASCÓRBICO .....	33
1.5.1	Aspectos gerais .....	33
1.5.2	Biossíntese e metabolismo.....	34
1.5.3	Funções biológicas.....	37
1.5.4	Funções no SNC e potencial efeito antidepressivo .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>PESPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO A - Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test ..</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO B - Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test .....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO C - Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress .....</b>	<b>115</b>
	<b>ANEXO D - Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice .....</b>	<b>127</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais frequentes no mundo ocidental (OLESEN; LEONARDI, 2003) com aproximadamente 240 milhões de pessoas afetadas, o que reflete uma prevalência ao longo da vida de cerca de 17% na população (WONG; LICINIO, 2001; NESTLER et al., 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde, nos anos 90, o transtorno depressivo maior representava a quarta causa de incapacitação entre adultos, entretanto estima-se que atinja o segundo lugar até 2020, perdendo somente para doenças cardíacas isquêmicas (MURRAY et al., 2008). Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas terão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (NARDI, 2000).

A depressão possui grandes implicações sociais, uma vez que os pacientes deprimidos apresentam limitação da sua atividade e bem-estar e maior utilização de serviços de saúde (NEMEROFF, 2007). Adicionalmente, tal transtorno parece ser um importante fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral, além de estar associado com morte prematura por suicídio (NEMEROFF; OWENS, 2002), o que reflete maiores níveis de mortalidade (NEMEROFF, 2007).

O diagnóstico para a depressão maior baseia-se na observação clínica dos sintomas e critérios estabelecidos pela Associação Americana de Psiquiatria. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais caracteriza o transtorno depressivo maior quando um indivíduo apresenta cinco ou mais dos seguintes sintomas: 1) humor deprimido; 2) anedonia (perda de interesse ou prazer por quase todas as atividades); 3) alterações do apetite ou peso; 4) insônia ou hipersonia; 5) retardo ou agitação psicomotora; 6) fadiga ou perda de energia; 7) sentimento de desvalia ou culpa excessiva; 8) diminuição da concentração ou indecisão e 9) pensamentos de morte, incluindo ideação suicida, planos ou tentativas de suicídio. É importante ressaltar que estes sintomas devem estar presentes por um período mínimo de duas semanas, sendo que pelo menos um deve ser humor deprimido ou anedonia durante a maior parte do tempo.

## 1.2 BASES ETIOLÓGICAS DA DEPRESSÃO

### 1.2.1 Sistemas monoaminérgicos

A etiologia da depressão ainda não é bem estabelecida, entretanto sabe-se que este transtorno está associado em parte, a uma deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo (ELHWUEGI, 2004). A hipótese monoaminérgica da depressão postula que esta psicopatologia pode ser consequência de uma redução dos níveis de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica. Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica (CUMMINGS, 1993; ELHWUEGI, 2004; PRINS et al., 2011).

Apesar de bem estabelecida, a hipótese monoaminérgica possui falhas: (i) não explica o fato de que os efeitos clínicos dos antidepressivos são observados apenas após cerca de 3-4 semanas do início da terapia, ao passo que estes medicamentos aumentam os níveis sinápticos de monoaminas agudamente (ELHWUEGI, 2004); (ii) o fato de que a depressão está fortemente associada a fatores genéticos (HYDE et al., 2008) e a exposição a agentes estressores (TOUMA, 2011), e que apesar das inúmeras tentativas de associação entre variabilidade em genes relacionados a funções monoaminérgicas e situações de estresse em transtornos afetivos, uma relação consistente ainda não está bem estabelecida (HARRO; ORELAND, 2001); (iii) compostos que aumentam níveis sinápticos de monoaminas, como por exemplo a anfetamina, não tem ação antidepressiva (BALDESSARINI, 1996). Neste sentido, acredita-se que outros sistemas neurais e mecanismos bioquímicos estejam envolvidos na etiologia da depressão.

### 1.2.2 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal mediador da transmissão sináptica excitatória no Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos. Esse neurotransmissor exerce suas ações através da estimulação de receptores específicos, classificados com base em características estruturais e farmacológicas em metabotrópicos ou ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos incluem os do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e cainato. Em condições fisiológicas, o glutamato tem um papel proeminente na plasticidade sináptica, aprendizado e memória, no entanto, um aumento

da atividade glutamatérgica leva à excitotoxicidade, frequentemente associada a doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo a depressão (SKOLNICK, 1999; ZARATE et al., 2010; CALABRESE et al., 2012).

Muitos eventos podem contribuir para a hiperfunção glutamatérgica alterada em transtornos do humor, incluindo aumento nos níveis de glutamato por excitação excessiva ou anormalidades em células gliais devido à diminuição na recaptação de glutamato extracelular (KUGAYA; SANACORA, 2005). Vale destacar ainda que estudos demonstram que pacientes com depressão possuem altos níveis de glutamato no sangue (MAURI et al., 1998; MITANI et al., 2006) e no encéfalo (HASHIMOTO et al., 2007), além de uma desregulação dos níveis deste neurotransmissor no líquido cefalorraquidiano (LEVINE et al., 2000; FRYE et al., 2007).

Corroborando estes achados, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que antagonistas de receptores NMDA apresentam propriedades antidepressivas e que o tratamento com antidepressivos pode ter um efeito sobre a função destes receptores (SKOLNICK, 1999; MATHEW et al., 2005; GARCIA et al., 2008b; GARCIA et al., 2008a; CHUNG, 2012; SANACORA et al., 2012). Também foi demonstrado um papel importante dos receptores NMDA na modulação das funções serotoninérgicas. Antagonistas dos receptores NMDA podem liberar serotonina e estimular sua renovação em várias regiões do encéfalo, o que pode contribuir para suas propriedades antidepressivas (LOSCHER; HONACK, 1992; FINK et al., 1995). Ainda é importante ressaltar que fármacos que bloqueiam os receptores NMDA têm efeitos protetores em modelos animais que estudam condições agudas de dano cerebral (MUIR, 2006) e propriedades antidepressivas em modelos animais de depressão, como o estresse inescapável (TRULLAS; SKOLNICK, 1990) e o estresse crônico moderado (PAPP; MORYL, 1994). A administração de antagonistas de receptores NMDA também é capaz de mimetizar o efeito de antidepressivos, revertendo a anedonia induzida pelo estresse crônico moderado (PAPP; MORYL, 1994), além de potencializar o efeito tipo-antidepressivo da fluoxetina, venlafaxina e imipramina no teste do nado forçado (TNF) (ROGOZ et al., 2002; PRUUS et al., 2010).

Ainda no que se diz respeito às propriedades antidepressivas da modulação da neurotransmissão glutamatérgica, um estudo demonstrou que a cetamina, um antagonista de receptores NMDA, produz um rápido efeito antidepressivo em pacientes, além de ser efetiva em casos de depressão resistente ao tratamento (ZARATE et al., 2006). Estudos têm demonstrado que a cetamina aumenta de maneira rápida a sinaptogênese

no córtex pré-frontal de roedores, produz um rápido efeito do tipo antidepressivo em modelos animais de depressão e reverte o déficit do número de sinapses induzido por estresse crônico moderado (LI et al., 2010; LI et al., 2011), o que reforça os receptores NMDA como um alvo para novas estratégias no tratamento da depressão.

### 1.2.3 Via da L-arginina-óxido nítrico (NO) e canais de potássio (K<sup>+</sup>)

A descoberta da função do NO como molécula sinalizadora alterou radicalmente o conceito de comunicação neural (ESPLUGUES, 2002). O NO é sintetizado a partir do aminoácido catiônico L-arginina, por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS). Essa síntese pode ocorrer mediante a ação de três diferentes isoformas da NOS: neuronal (NOS 1), induzível (NOS 2) e endotelial (NOS 3) (MAGARINOS; MCEWEN, 1995), sendo que, no encéfalo de mamíferos, mais de 90% da produção é realizada pela nNOS. Um dos alvos intracelulares do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (DENNINGER; MARLETTA, 1999).

Além de ser uma importante substância neurotransmissora e neuromoduladora e possuir um importante papel fisiológico no organismo, o NO também tem sido implicado em patologias do SNC como epilepsia, esquizofrenia, ansiedade e depressão (DHIR; KULKARNI, 2011). Tal substância também parece estar envolvida na morte neuronal induzida por glutamato (STRIJBOS et al., 1996), e no estresse oxidativo em condições patológicas como isquemia e doenças neurodegenerativas (GUIX et al., 2005; SHAHANI; SAWA, 2012).

Na depressão, a investigação do papel do NO começou a ser encorajada principalmente após a constatação de que a paroxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, é também um inibidor da NOS (FINKEL et al., 1996). Este estudo foi o precursor de uma série trabalhos que apresentaram evidências indicando que o NO está envolvido na fisiopatologia deste transtorno. Foi observado que em pacientes depressivos há um aumento na produção de NO (LEE et al., 2006), e que substâncias que inibem a NOS ou a GCs tem efeito antidepressivo em modelos animais de depressão (YILDIZ et al., 2000; HARKIN et al., 2003; KASTER et al., 2005a; JOCA; GUIMARAES, 2006). Além disso, o efeito de antidepressivos convencionais como a imipramina, a bupropiona e a venlafaxina é revertido por substâncias que aumentam os níveis de NO em modelos pré-clínicos (HARKIN et

al., 1999; DHIR; KULKARNI, 2007a; b; KRASS et al., 2011). Assim como os antidepressivos monoaminérgicos diminuem a atividade da NOS no hipocampo, foi demonstrado que inibidores da NOS aumentam os níveis de serotonina e dopamina nessa estrutura (WEGENER et al., 2003).

Cabe ressaltar que a exposição de animais ao estresse crônico, além de diminuir a neurogênese hipocampal, causa um aumento na expressão da NOS 1 nesta estrutura encefálica. Tal prejuízo pode ser revertido mediante o tratamento com inibidores da NOS 1, restaurando a neurogênese e as alterações comportamentais observadas nesses animais (JOCA; GUIMARAES, 2006; KHOVRIAKOV et al., 2009).

Alguns estudos descrevem que o NO e o GMPc, produzidos através da ativação da NOS e GCs, respectivamente, além de modularem a atividade de alvos intracelulares como as proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG), podem ativar diferentes tipos de canais de  $K^+$  em vários tecidos (BOLOTINA et al., 1994; GARTHWAITE; BOULTON, 1995; JEONG et al., 2001). De forma contrária, a inibição dos receptores NMDA, com conseqüente redução nos níveis de NO, previne a ativação desses canais iônicos (CHRISTIE, 1995).

Os canais de  $K^+$  são membros de uma família de proteínas que permite a rápida difusão de íons  $K^+$  pela membrana plasmática, a favor de um gradiente de concentração. Tais canais desempenham um papel fundamental na regulação da excitabilidade neuronal e propagação de sinal pelo sistema nervoso; a abertura dos canais de  $K^+$  provoca uma hiperpolarização da membrana plasmática, levando à redução da excitabilidade da célula (MACKINNON, 2003). Além do papel bem estabelecido dos canais de  $K^+$  na excitabilidade neuronal, muitos estudos indicam que estes canais são importantes nos mecanismos de resposta a antidepressivos ou compostos dotados de propriedades antidepressivas (KASTER et al., 2005b; TAYLOR et al., 2005; BUDNI et al., 2007; KASTER et al., 2007; SU et al., 2007; LODGE; LI, 2008; LOCKRIDGE et al., 2010). De fato, diferentes tipos de inibidores de canais de  $K^+$ , como tetraetilamônio (TEA), apamina, caribdotoxina, gliquidona e glibenclamida apresentam efeito tipo-antidepressivo no TNF em camundongos (GALEOTTI et al., 1999; KASTER et al., 2005b), enquanto ativadores de canais de  $K^+$ , como o minoxidil e a cromacalim são capazes de induzir um aumento no tempo de imobilidade neste teste (GALEOTTI et al., 1999), o que indica um comportamento do tipo-depressivo.

Estudos apontam ainda para uma forte associação entre a estimulação dos receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT) e a inibição dos

canais de  $K^+$  em neurônios do SNC (BOBKER; WILLIAMS, 1990). Há evidências que mostram que antidepressivos, especialmente aqueles cujo mecanismo de ação envolve a modulação do sistema serotoninérgico (fluoxetina, sertralina e venfalaxina), são potentes inibidores dos canais de  $K^+$  (CHOI et al., 2004; INAN et al., 2004; BORTOLATTO et al., 2010). Além disso, o bloqueio dos canais de  $K^+$  aumenta a liberação basal de serotonina em fatias hipocâmpais de ratos (SCHECHTER, 1997). Corroborando a hipótese de que a inibição dos canais de  $K^+$  está envolvida nos mecanismos de ação de fármacos antidepressivos, foi demonstrado que doses sub-ativas de bloqueadores de canais de  $K^+$  (quinina ou gliburida) combinadas com doses sub-ativas de diferentes antidepressivos (citalopram, fluoxetina, paroxetina, e imipramina) também produziram efeito tipo-antidepressivo no TNF (GUO et al., 1995; GUO et al., 1996).

#### 1.2.4 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e depressão

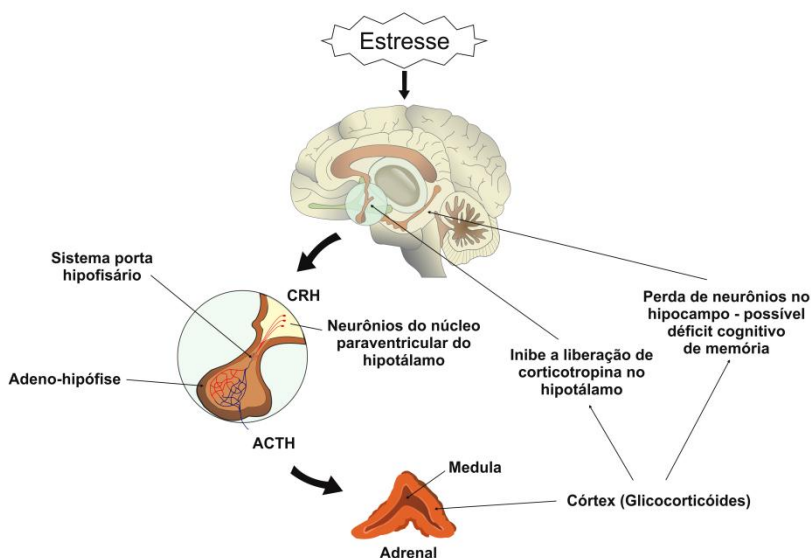
Embora a depressão seja uma doença multifatorial e de etiologia ainda desconhecida, estudos indicam que tal transtorno pode ser resultante de uma interação entre os efeitos do estresse e a predisposição genética. Estudos epidemiológicos apontam o estresse crônico como um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo à depressão (NESTLER et al., 2002) e, consistente com essa hipótese, em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de situações de estresse, sobretudo de origem psicossocial (SIEGRIST et al., 2012).

O eixo HPA, responsável pelo controle da síntese e liberação dos glicocorticóides, desempenha um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos. A resposta mais característica ao estresse é a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo e seu transporte para a pituitária anterior. Neste local, o CRH estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez estimula a síntese e liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) (Figura 1) (GILLESPIE; NEMEROFF, 2005). Os glicocorticóides são importantes na preparação do organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e são importantes para a consolidação da resposta ao estresse (PEETERS; BROEKKAMP, 1994)

A resposta neuroendócrina ao estresse é contra-regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides sobre



componentes do SNC, o qual inibe a liberação de CRH e ACTH, consequentemente causando a diminuição da liberação de glicocorticóides (CARRASCO; DE KAR, 2003) (Figura 2). O término da liberação de glicocorticóides é essencial para limitar a duração da exposição dos tecidos corporais aos glicocorticóides, visto que eles são capazes de promover ações catabólicas, antirreprodutivas e imunossupressivas (CHARMANDARI et al., 2005). A persistência e a intensidade exagerada do estresse podem tornar o eixo hiper-reactivo, com prejuízos potenciais ao organismo (HUETHER et al., 1999).



**Figura 1. O eixo HPA.**

O hipotálamo é estimulado a secretar o CRH no sistema porta-hipofisário. O CRH estimula a adeno-hipófise a secretar o ACTH na corrente sanguínea. O ACTH estimula o córtex das glândulas adrenais a liberar glicocorticóides. A adrenalina é liberada da medula adrenal por ativação dos neurônios simpáticos (GILLESPIE; NEMEROFF, 2005). Colocar CRH na figura

A desregulação do eixo HPA na depressão é um achado consistente. Muitos estudos relatam um aumento na liberação de cortisol em pacientes deprimidos (DEUSCHLE et al., 1997; STRICKLAND et al., 2002; BHAGWAGAR et al., 2005; BURKE et al., 2005; VREEBURG et al., 2009), bem como uma sensibilidade reduzida ao mecanismo de retroalimentação negativa, possivelmente resultante de um transporte exagerado de CRH (NEMEROFF, 1996) e/ou redução do

funcionamento dos receptores para os glicorticóides (HOLSBOER, 2000; PARIANTE; MILLER, 2001; HOWELL et al., 2011). Em humanos, níveis elevados de cortisol durante a vida predizem atrofia hipocampal, com consequentes prejuízos nos mecanismos de neuroplasticidade, incluindo redução da neurogênese, aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, redução de proteínas antiapoptóticas e redução do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (NESTLER et al., 2002). Em roedores, a exposição ao modelo de depressão induzida pelo estresse crônico moderado provoca a hipertrofia da glândula adrenal (KONARSKA et al., 1990; HARRO et al., 2001; LUCCA et al., 2008; GARCIA et al., 2009; LUCCA et al., 2009b; LUCCA et al., 2009c), o que pode levar a um aumento nos níveis de corticosterona, fato que tem sido documentado por alguns autores (LUCCA et al., 2008, 2009b, 2009c, GARCIA et al., 2009).

Algumas evidências apontam para a hipótese de que a neurotransmissão serotoninérgica esteja envolvida na sensibilidade ao estresse e em processos de adaptação a eventos aversivos. Em roedores, o estresse repetido diminui o número e a função de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo (FLUGGE, 1995; VAN RIEL et al., 2003; KIERAN et al., 2010), um efeito provavelmente mediado por glicocorticóides. Além disso, fármacos inibidores seletivos da recaptção de serotonina aumentam a expressão de receptores para glicocorticóides (ERDELJAN et al., 2001) (provavelmente como um mecanismo compensatório em resposta à diminuição desses receptores induzida pelo estresse) e normalizam os déficits comportamentais induzidos pelo estresse em modelos animais (LEVENTOPOULOS et al., 2009). Considerando que, em humanos, a depressão está associada com uma redução de 5-HT no encéfalo (CASTREN, 2005), o prejuízo da neurotransmissão serotoninérgica causado por exposição ao estresse dificultaria a adaptação do indivíduo a esta condição, tornando-o mais propenso ao desenvolvimento da depressão. Por outro lado, o efeito terapêutico de antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina seria dependente da capacidade desses fármacos de diminuir a atividade do eixo HPA, restaurando sua responsividade (GRIFFITHS et al., 2012).

Estudos demonstram ainda uma relação entre o sistema glutamatérgico e o eixo HPA, visto que níveis aumentados de glicocorticóides foram correlacionados com elevados níveis de glutamato no encéfalo (JACOBS et al., 2000). A literatura mostra ainda que a administração do ácido N-Metil-D,L-aspartico (NMA - agonista glutamatérgico) ou NMDA induz um aumento na secreção de ACTH, efeito que foi prevenido pelo tratamento com antagonistas dos

receptores NMDA (FARAH et al., 1991; JEZOVA et al., 1991). Estes estudos são corroborados pelos achados de Garcia e colaboradores (2009), que mostraram que a cetamina, um antagonista de receptores NMDA, regulou os níveis de cortisol e ACTH e preveniu a hipertrofia da glândula adrenal em animais submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado. Além disso, foi demonstrado que antagonistas glutamatérgicos podem atenuar ou bloquear alguns dos efeitos crônicos do excesso de glicocorticóides na morfologia hipocampal (MAGARINOS; MCEWEN, 1995).

### 1.2.5 Vias de sinalização intracelular

Nos últimos anos, um número expressivo de estudos apontam para o envolvimento de vias de sinalização intracelular que regulam a neuroplasticidade e resiliência celular na fisiopatologia e tratamento da depressão (MANJI et al., 2001; D'SA; DUMAN, 2002; NESTLER et al., 2002; YOUNG, 2002; VOLETI; DUMAN, 2012). Apesar de as adaptações envolvidas na ação terapêutica dos antidepressivos permanecerem pouco claras, o fato de haver um tempo de latência para a resposta a estes fármacos torna atrativa a hipótese de que a inibição da recaptação dos neurotransmissores não seja, sozinha, suficiente para estabelecer alterações em longo prazo. Deste modo, alterações como o aumento da neurogênese, crescimento das fibras nervosas, formação de novas sinapses e estabilização das já existentes podem ser responsáveis por essas mudanças (GONCALVES; COELHO, 2006).

A hipótese da neuroplasticidade na fisiopatologia da depressão tem sido extensivamente investigada por diversos grupos de pesquisa ao longo dos últimos anos. Tal teoria concentra a sua atenção em grupo de moléculas que funcionam em cascata e são responsáveis pela unificação de mecanismos como a reestruturação dendrítica, aumento da neurogênese hipocampal e aumento da sobrevivência celular do SNC (KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003). Vários estudos indicam que a ação terapêutica dos antidepressivos é dependente do aumento da expressão destes elementos. Dentre as neurotrofinas, o BDNF vem sendo bastante estudado por exercer um importante efeito antidepressivo. Tal substância desempenha um papel crítico como modulador de diversas funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal (PARK; POO, 2012).

Estudos demonstram que o tratamento com antidepressivos aumenta a expressão de BDNF e seu receptor TrkB através da ativação

do AMPc e da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB). O aumento da expressão de BDNF e TrkB em regiões límbicas resulta em crescimento neuronal, neurogênese, plasticidade sináptica e efeitos comportamentais em modelos de depressão. Por outro lado, níveis de BDNF diminuídos são descritos em modelos animais de depressão, particularmente aqueles induzidos por estresse, e em pacientes deprimidos. Um estudo mostrou que ratos resistentes ao desenvolvimento de anedonia em resposta ao estresse crônico, tinham um aumento da expressão de RNAm para BDNF no hipocampo, sugerindo o envolvimento desta neurotrofina no mecanismo envolvido na resistência ao estresse nesses animais (BERGSTROM et al., 2008).

Um dos mecanismos envolvidos no aumento da sobrevivência neuronal mediado pelo BDNF parece ocorrer por intermédio da diminuição da apoptose (MANJI et al., 2003). Nesse contexto, a família de proteínas da Bcl-2 pode ser crucial, dado seu papel na regulação da sobrevivência celular (MARTINOU; YOULE, 2011). Essa família é composta por proteínas antiapoptóticas, tais como a Bcl-2 e a Bcl-XL e pró-apoptóticas como a Bad, Bax e a Bim, sendo que várias dessas proteínas são expressas no SNC de mamíferos (GRAHAM et al., 1999). A Bcl-2 é uma importante proteína neuroprotetora e possui papel fundamental na regulação da função mitocondrial, motivo pelo qual vem sendo bastante estudada quanto a sua participação nos processos fisiológicos e patológicos do SNC. Esta molécula além de ter propriedades antiapoptóticas, também confere proteção contra estímulos nocivos como o estresse oxidativo e a neurotoxicidade glutamatérgica (PREHN et al., 1994; KOWALTOWSKI; FISKUM, 2005). A literatura sugere ainda que a Bcl-2 possui funções neurotróficas de crescimento neuronal, ramificação dendrítica e regeneração axonal (CHARNEY et al., 2004).

Consistente com a hipótese de que a apoptose pode desempenhar um papel importante na etiopatogenia da depressão, um estudo demonstrou que filhotes de ratos privados do contato materno tiveram um aumento significativo da apoptose, bem como uma diminuição da proliferação celular no giro denteado (LEE et al., 2001), efeito idêntico ao encontrado em ratas repetidamente privadas do contato com o filhote (SUNG et al., 2010), o que sugere que a separação materna, freqüentemente associada com déficits cognitivos e comportamento tipo-depressivo, está relacionada com proliferação celular reduzida e apoptose aumentada. Da mesma forma, foi demonstrado que ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico, modelo amplamente utilizado para a indução de comportamento-tipo

depressivo, tiveram um aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da proteína antiapoptótica Bcl-2 no bulbo olfatório (YANG et al., 2011). No que diz respeito ao efeito dos antidepressivos e de suas possíveis propriedades tróficas, um estudo mostrou que o tratamento com o tianeptina reduziu a apoptose no córtex temporal e giro denteado de musaranhos submetidos a um protocolo de estresse crônico (LUCASSEN et al., 2004). Além disso, o tratamento com fluoxetina foi capaz de prevenir a apoptose e aumentar a proliferação celular no giro denteado de animais privados do contato materno (LEE et al., 2001).

Uma possível associação entre a apoptose e as cascatas de sinalização intracelular no modelo da neuroplasticidade, poderia se dar através da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/proteína cinase B (AKT). As PI3Ks são elementos da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos e iniciam cascatas de sinalização fundamentais em processos celulares que incluem o crescimento e a sobrevivência, bem como a plasticidade sináptica (KENNEDY et al., 1997; YANG et al., 2008). Apesar de diversos efeitos da PI3K terem sido descritos, estudos demonstram que os efeitos sobre a sobrevivência celular ocorrem através da proteína AKT (TOKER, 2000; SUTTON; CHANDLER, 2002). A ativação da via da PI3K/AKT é mediada pela atividade de diversos receptores e está relacionada com a plasticidade sináptica e o efeito antidepressivo induzidos pela inativação de receptores NMDA e pela ativação de receptores de neurotrofinas, principalmente o BDNF (KELLY; LYNCH, 2000; CHEN et al., 2008; YANG et al., 2008). Além disso, a literatura demonstra que pacientes vítimas de suicídio apresentam uma diminuição na expressão e na atividade da PI3K (DWIVEDI et al., 2008).

Quando ativada, a via da PI3K/AKT é responsável por regular negativamente a atividade da enzima glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) via fosforilação da serina 9 N-terminal (BEAULIEU et al., 2009). A GSK-3 $\beta$ , também implicada na fisiopatologia da depressão, é uma proteína envolvida na regulação da apoptose e plasticidade celular (DOBLE; WOODGETT, 2003; ZHAO et al., 2007). Evidências sugerem que a atividade aumentada de GSK-3 $\beta$  estimula processos apoptóticos e a inibição da GSK-3 $\beta$  atenua ou previne a apoptose (GOULD et al., 2004).

### 1.2.6 Estresse oxidativo

Alguns estudos têm consistentemente demonstrado uma associação entre estresse oxidativo e o transtorno depressivo. Nos organismos aeróbios, a geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, decorrente de processos metabólicos que incluem a atividade enzimática, processos de transporte de elétrons e oxidação de compostos solúveis no citosol. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de adenosina trifosfato (ATP), por meio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, a produção excessiva de radicais livres pode conduzir a danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A instalação do processo de estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e o DNA, com conseqüente dano às suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (DALLE-DONNE et al., 2006).

Com o objetivo de limitar os níveis intracelulares destas espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante não-enzimático e enzimático, este último sendo constituído por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (MAYNE, 2003; URSO; CLARKSON, 2003). A SOD, em condições normais, catalisa a reação de conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é eliminado pela ação das enzimas CAT e GPx (HALLIWELL, 1987).

Dados da literatura sugerem que o aumento do estresse oxidativo ou uma diminuição das defesas antioxidantes podem estar relacionados à depressão. Estudos que investigaram o balanço oxidativo em pacientes deprimidos descrevem alterações nas enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, além de maior peroxidação lipídica em pacientes com depressão, quando comparado com controles saudáveis (KHANZODE et al., 2003; OZCAN et al., 2004). Corroborando estes achados, estudos pré-clínicos demonstram que modelos animais de depressão baseados na indução de estresse aumentam as espécies reativas de oxigênio (EROs) e modificam as defesas antioxidantes no encéfalo de ratos (MADRIGAL et al., 2001; FONTELLA et al., 2005; LUCCA et al., 2009c), sugerindo fortemente que a depressão está associada com um desbalanço entre processos pró- e antioxidantes.

Diversas evidências indicam ainda que os antidepressivos diminuem o estresse oxidativo em modelos animais de estresse crônico

(ABDEL-WAHAB; SALAMA, 2011; LEE et al., 2011) e em pacientes depressivos (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003; HERKEN et al., 2007). Apesar de o mecanismo exato pelo qual os antidepressivos exercem estes efeitos ainda não ter sido totalmente elucidado, uma hipótese é que eles podem suprimir citocinas pró-inflamatórias e a produção de EROs, ou ainda aumentar as defesas antioxidantes como por exemplo as enzimas antioxidantes SOD e CAT espécies reativas. Em concordância com estes achados, alguns estudos básicos demonstram que compostos antioxidantes podem apresentar propriedades antidepressivas (ZAFIR et al., 2009b; ARENT et al., 2012).

### 1.3 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

A preocupação com o desenvolvimento de novas terapêuticas antidepressivas com mecanismos distintos das atuais, mais eficazes e com ação mais rápida, tem conduzido investigações que buscam o entendimento das bases etiológicas da depressão. Neste contexto, a utilização de modelos animais de depressão se faz indispensável para a compreensão e evolução da pesquisa acerca deste transtorno.

Modelos com validade preditiva, como o TNF e o teste de suspensão pela cauda (TSC) são amplamente utilizados para o estudo da depressão (NESTLER et al., 2002; MCARTHUR; BORSINI, 2006). O TNF foi descrito primeiramente por PORSOLT et al. (1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente em camundongos, enquanto o TSC foi descrito em camundongos por STERU et al. (1985). Estes modelos baseiam-se na observação do animal em estado de desespero comportamental, que se movimenta para fugir de uma situação inescapável, desenvolvendo após os primeiros minutos uma postura imóvel que pode ser reduzida pela administração de antidepressivos. Estes dois modelos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (BOURIN et al., 2005); são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (CRYAN et al., 2002).

Além da validade preditiva, modelos animais de depressão com validade fenomenológica e/ou de constructo também são utilizados. Entre estes, destacam-se os modelos baseados na indução de estresse e os modelos farmacológicos para depressão (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Os modelos de indução ao estresse baseiam-se em estudos epidemiológicos, que relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental de risco para o desenvolvimento da depressão (TENNANT, 2002). Nestes modelos, os animais são expostos

a diversos fatores estressantes e, como resultado, apresentam comportamentos tipo-depressivo (MCARTHUR; BORSINI, 2006), tais como: aumento do tempo de imobilidade em modelos preditivos de atividade antidepressiva como o TNF e o TSC (GUTIERREZ-GARCIA; CONTRERAS, 2009), aumento da secreção de corticosterona (KUBERA et al., 2001; SILBERMAN et al., 2004), aumento da transmissão glutamatérgica no giro denteado, apoptose, diminuição da neurogênese hipocampal (JOELS et al., 2004), entre outras alterações. Esses parâmetros fisiológicos e comportamentais garantem ao modelo uma alta validade preditiva e fenomenológica. Além disso, a relevância dos modelos animais de depressão induzida por estresse é evidenciada tendo em vista que os déficits nos parâmetros comportamentais são revertidos pelo tratamento com antidepressivos (WILLNER et al., 1987; WILLNER et al., 1992). Entre os modelos animais de depressão induzidos pelo estresse, encontram-se o estresse crônico moderado (WILLNER, 1997) e o estresse imprevisível (LU et al., 2006).

Os modelos farmacológicos induzem um comportamento tipo-depressivo através de alterações neuroquímicas semelhantes àquelas encontradas na depressão (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Entre estes modelos destacam-se a administração de reserpina (MCARTHUR; BORSINI, 2006), de anfetamina (CRYAN et al., 2003) e citocinas pró-inflamatórias como interferon- $\alpha$  (MAKINO et al., 1998; MAKINO et al., 2000), interleucina- $1\beta$  (DUNN; SWIERGIEL, 2005), interleucina-6 (CHOURBAJI et al., 2006) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (KASTER et al., 2012).

#### 1.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DEPRESSÃO

A terapia antidepressiva moderna inclui intervenções psicológicas, físicas e a farmacoterapia com antidepressivos. As intervenções psicoterápicas podem ser de diferentes tipos, como psicoterapia de apoio, terapia interpessoal, comportamental, cognitiva comportamental, de grupo, de casais e de família. Tais intervenções podem ser efetivas como único tratamento somente na ocorrência de depressão branda, caso contrário são utilizadas em combinação com antidepressivos.

Existem várias classes de antidepressivos disponíveis para o tratamento da depressão, incluindo os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os inibidores mistos da recaptação de serotonina e noradrenalina (BERTON; NESTLER, 2006; NEMEROFF, 2007). Todavia, estes



fármacos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 50% dos indivíduos, ainda que muitos (mais que 80%) exibam respostas parciais (NESTLER et al., 2002), e causam muitos efeitos colaterais (BRUNELLO et al., 2002). Além disto, a resposta terapêutica a estes fármacos não é imediata e costuma ocorrer entre a segunda e quinta semanas após o início do tratamento (BRUNELLO et al., 2002).

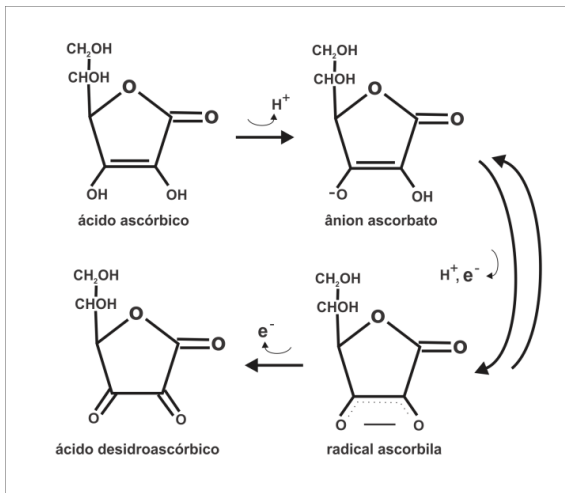
Considerando a baixa eficácia clínica (NESTLER et al., 2002) e diversos efeitos colaterais causados pelos fármacos utilizados para o tratamento da depressão, o que muitas vezes contribui para o abandono do tratamento pelo paciente (BRUNELLO et al., 2002), existe uma grande necessidade de desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam otimizar a eficácia clínica do tratamento para a depressão.

## 1.5 ÁCIDO ASCÓRBICO

### 1.5.1 Aspectos gerais

O L-ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$  - Figura 2), popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel antioxidante que participa de múltiplas funções vitais e que tem como propriedade característica o seu poder redutor (NAIDU, 2003). Tal substância é estável na sua forma seca, no entanto, oxida-se com facilidade em solução, e ainda mais facilmente quando exposta ao calor. Nos mamíferos, em pH fisiológico, essa molécula se ioniza liberando um próton e passando a se chamar ascorbato (REBEC; PIERCE, 1994) (Figura 2).

O nome químico “ácido ascórbico” representa as duas propriedades da substância, uma química e a outra biológica. Sua estrutura contém um grupo hidróxi-enólico, tautômero da  $\alpha$ -hidroxicetona, que lhe fornece não somente capacidade redutora, mas também um comportamento ácido. Por outro lado, a palavra *ascórbico* refere-se ao valor biológico que tornou a vitamina conhecida, a proteção contra o escorbuto, doença provocada pela carência grave de vitamina C na dieta e cujos principais sintomas são fadiga, dificuldade de cicatrização, dentes soltos e dores musculares (HALLIGAN et al., 2005). Atualmente o ácido ascórbico é muito usado como suplementação vitamínica, sendo consumido sob diversas formas sólidas como cápsulas, drágeas, comprimidos efervescentes, bem como em formas líquidas (NAIDU, 2003).



**Figura 2. Bioquímica do ácido ascórbico.**

Em pH fisiológico de mamíferos, o ácido ascórbico é encontrado sob a forma de ânion ascorbato. A estrutura do ascorbato permite a perda de elétrons e assim sua oxidação em um processo reversível de duas etapas. Inicialmente o ascorbato é oxidado através da perda de um elétron, formando um radical intermediário chamado de radical ascorbila ou semi-desidroascorbato. Através da perda de um segundo elétron e desprotonação, este é oxidado a ácido desidroascórbico ou desidroascorbato.

### 1.5.2 Biossíntese e metabolismo

Alguns animais sintetizam o ascorbato a partir da D-glicose e D-galactose (Figura 3). Em mamíferos capazes de produzir níveis elevados de ascorbato, a síntese ocorre no fígado; já em répteis e aves a síntese de ascorbato ocorre nos rins. Contudo, alguns animais como morcegos frugívoros, macacos, cobaias, peixes, invertebrados e humanos não são capazes de sintetizar esta vitamina devido à ausência, geneticamente determinada, da enzima L-gulonolactona oxidase, requerida no último passo de biossíntese do ascorbato (Figura 3). Essa mutação não causa problemas aos organismos incapazes de sintetizar ascorbato, visto que a vitamina C é facilmente encontrada na dieta e captada, especificamente, no intestino desses animais. A captação no intestino é realizada por uma família de transportadores dependentes de sódio, denominada SVCT1 (RICE, 2000). Após ser absorvido, o ascorbato é direcionado à corrente sanguínea e amplamente distribuído ao organismo. Cabe mencionar que as maiores concentrações de

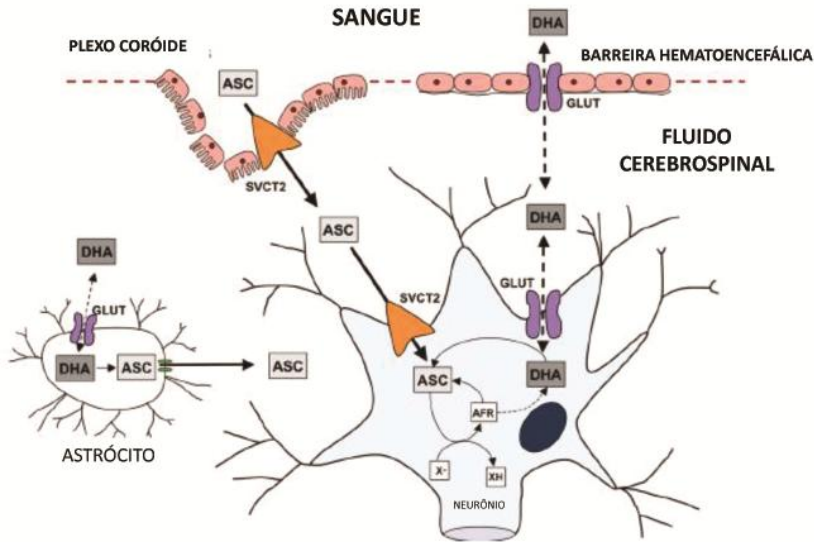
ascorbato são encontradas nas glândulas supra-renais, medula espinhal e encéfalo (REBEC; PIERCE, 1994; RICE, 2000).



**Figura 3. Biossíntese do ácido ascórbico em animais.**

O L-Ácido ascórbico é sintetizado principalmente a partir da glicose através de uma série de reações enzimáticas. Humanos e outros animais como macacos, morcegos frugívoros e cobaias não sintetizam ácido ascórbico devido a presença do gene não-funcional para a enzima L-gulono-lactona oxidase (adaptado de NAIDU, 2003).

No SNC, o ácido ascórbico pode ser captado da corrente sanguínea para o líquido cefalorraquidiano sob a forma de ascorbato, através do plexo coróide, via transportadores dependentes de sódio (SVCT2) ou pode ainda ser captado sob a forma de desidroascorbato (sua forma oxidada) pela barreira hematoencefálica, via transportadores de glicose. De maneira similar, o ascorbato é incorporado por neurônios através de SVCT2 ou como desidroascorbato, via transportadores de glicose, sendo posteriormente reduzido a ascorbato e armazenado. Células gliais obtêm ascorbato através da redução de desidroascorbato que é captado através dos transportadores de glicose (HARRISON; MAY, 2009) (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de captação e metabolismo do ascorbato no SNC**

Neurônios podem captar ascorbato (através dos SVCT2) ou desidroascorbato (através dos transportadores de glicose). Células gliais captam desidroascorbato (através dos transportadores de glicose), que é posteriormente reduzido a ascorbato e armazenado ou liberado. ASC: ascorbato, DHA: desidroascorbato, GLUT: transportadores de glicose, SVCT2: transportador de vitamina C dependentes de sódio do tipo 2, AFR: radical livre ascorbato (adaptado de HARRISON; MAY, 2009).

O ascorbato pode ser oxidado através de um processo reversível de duas etapas, formando o produto de sua oxidação, o ácido desidroascórbico (REBEC; PIERCE, 1994; RICE, 2000). O ácido desidroascórbico pode ser reconvertido a ascorbato por diferentes reações enzimáticas bem como por agentes redutores presentes nos sistemas biológicos ou sua estrutura pode ser irreversivelmente hidrolisada formando um dos seus principais metabólitos, o ácido 2,3-dicetogulônico, que pode ser metabolizado a ácido oxálico, xilose, xilonato, entre outros produtos (PADAYATTY et al., 2003). A principal rota de eliminação do ascorbato e de seus metabólitos é através da urina (NAIDU, 2003). Em humanos, a maior parte do ácido ascórbico (80-90%) é absorvida quando o consumo é de até 100 mg/dia, entretanto, em

níveis elevados, a eficiência da absorção da substância é rapidamente diminuída (NAIDU, 2003).

### 1.5.3 Funções biológicas

O ácido ascórbico participa de múltiplas funções vitais, as quais estão relacionadas com a sua capacidade de óxido-redução (REBEC; PIERCE, 1994; NAIDU, 2003). Possui um papel bem documentado como um importante co-fator enzimático em reações de hidroxilação, como por exemplo, para a hidroxilação catalisada pelas enzimas prolil e lisil hidroxilase. Nestas reações são adicionados grupos hidroxila aos resíduos de prolina e lisina na molécula de colágeno, o que contribui para o aumento da estabilidade da estrutura em tripla hélice da molécula (PETERKOFISKY, 1991). Na ausência de ascorbato, ocorre uma síntese alterada do colágeno, o que pode levar ao desenvolvimento de escorbuto.

O ácido ascórbico também é indispensável na síntese de carnitina, atuando como co-fator na hidroxilação envolvida na sua síntese. A carnitina é essencial no transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria, facilitando sua oxidação e geração de ATP pela célula (REBOUCHE, 1991). Outra enzima que utiliza o ascorbato como co-fator é a dopamina  $\beta$ -hidroxilase, enzima que catalisa a conversão de dopamina em norepinefrina, importante regulador do humor em mamíferos (TAYLOR et al., 2005). A 7  $\alpha$ -hidroxilase, enzima do primeiro passo para a síntese de ácidos biliares, que converte o colesterol a 7  $\alpha$ -hidroxicolesterol também utiliza o ascorbato como co-fator. Já foi descrito que cobaias escorbúticas apresentam aterosclerose devido ao acúmulo de colesterol causado pela ineficiência da enzima em questão (MURRAY et al., 2002).

Além da atuação como cofator enzimático, o ácido ascórbico detoxifica radicais orgânicos, atuando como um antioxidante endógeno (SCHREIBER; TROJAN, 1991; NAIDU, 2003). Este composto pode reagir com EROs e estabilizar radicais livres produzidos durante o metabolismo celular (PADAYATTY et al., 2003). As EROs possuem alta reatividade e podem oxidar biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, causando diferentes tipos de danos biológicos e podendo causar morte celular (SIES, 1993). Os metabólitos das EROs estão associados com processos degenerativos, como a doença de Parkinson. Além disso, as EROs estão relacionadas com os efeitos neurotóxicos causados pela excessiva liberação de glutamato (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993), implicada em uma grande variedade de

condições neuropatológicas como a doença de Huntington, Alzheimer, Parkinson, epilepsia, esquizofrenia e depressão (MAES et al., 2011; YAO; KESHAVAN, 2011; AGUIAR et al., 2012; GANDHI; ABRAMOV, 2012; SOROLLA et al., 2012).

Além das funções descritas, estudos mostram ainda que o ácido ascórbico pode desempenhar outras funções biológicas como auxiliar na absorção de Ferro (BENDICH; COHEN, 1990), atuar como imunomodulador, no controle da síntese de glicocorticóides pela glândula adrenal (KOLB, 1990; NAIDU, 2003), possui putativa ação antitumoral (NAIDU, 2003; PADAYATTY et al., 2004; CHEN et al., 2008) e antinociceptiva (ROSA et al., 2005).

Paradoxalmente, estudos revelam que elevadas concentrações de ácido ascórbico produzem efeitos citotóxicos associados à inibição da proliferação celular e aumento da apoptose, efeito que ocorre preferencialmente em células neoplásicas, preservando as células normais (PADAYATTY et al., 2006).

#### 1.5.4 Funções no SNC e potencial efeito antidepressivo

A distribuição de ascorbato no encéfalo é dinamicamente regulada (GRUNEWALD, 1993) e sua concentração pode variar de acordo com a região cerebral. Foi verificado que estruturas pertencentes à região anterior do encéfalo como o hipocampo, neocórtex, amígdala, neoestriado, núcleo accumbens, hipotálamo e o septo apresentam altas concentrações de ascorbato, enquanto que estruturas mediais e posteriores apresentam concentrações reduzidas dessa molécula (MILBY et al., 1982). Uma exceção para esse gradiente é o cerebelo, que embora esteja localizado na região posterior do encéfalo apresenta altas concentrações de ascorbato (OELRICHS et al., 1988).

Além das funções biológicas já citadas, o ascorbato é capaz de exercer diversas funções no sistema nervoso. Tal substância exerce influência na formação da bainha de mielina por células de Schwann, visto que a sua ausência diminui a formação de colágeno do tipo IV, que é essencial para a formação da lâmina basal, estrutura fundamental para a mielinização dos axônios (CAREY; TODD, 1987; ELDRIDGE et al., 1987). O ascorbato também é capaz de regular a ação da sódio-potássio ATPase, inibindo essa enzima (GOTO; TANAKA, 1981; NG et al., 1985), além de ser essencial para a síntese de catecolaminas (como co-fator da dopamina  $\beta$ -hidroxilase, conforme previamente descrito). Um estudo demonstrou ainda um papel para o ascorbato na liberação de acetilcolina de vesículas sinápticas de sinaptossomas de cérebro de rato

(KURO; YOSHIDA, 1980) e de células cromafins da medula da adrenal em cultura (LEVINE et al., 1983).

O ácido ascórbico apresenta ainda uma importante ação neuromoduladora, tanto sobre a neurotransmissão dopaminérgica como glutamatérgica (GRUNEWALD, 1993; REBEC; PIERCE, 1994; RICE, 2000). Já foi descrito que a administração de agonista dopaminérgicos, como a meta-anfetamina, aumenta a liberação de ascorbato no estriado e no núcleo acumbens de ratos (DAI et al., 2006; GU et al., 2006). Quanto à neurotransmissão glutamatérgica, o ânion ascorbato é liberado dos neurônios glutamatérgicos como parte do processo de recaptação do glutamato, no qual transportadores de glutamato de alta afinidade trocam ascorbato por glutamato. Apesar de não se conhecer totalmente os transportadores e tipos celulares específicos envolvidos neste mecanismo, os transportadores de glutamato do tipo EAAT2 e EAAT3 parecem estar mais associados a este processo, que pode ocorrer em neurônios e em células gliais, garantindo um elevado nível de ascorbato extracelular em muitas regiões do encéfalo (REBEC; PIERCE, 1994; RICE, 2000).

Foi demonstrado ainda que o ascorbato inibe os receptores NMDA através de um fenômeno redox (MAJEWSKA et al., 1990). Adicionalmente, o ácido ascórbico possui um papel importante no desenvolvimento e maturação neuronal, além de exibir propriedades antioxidantes contra a excitotoxicidade mediada pelos receptores NMDA (QIU et al., 2007). Considerando os estudos que implicam os receptores NMDA na fisiopatologia da depressão (CHUNG, 2012) e o efeito inibitório que ácido ascórbico possui sobre a função estes receptores (MAJEWSKA et al., 1990), pode-se sugerir que tal vitamina pode apresentar um efeito antidepressivo dependente desta propriedade.

Nos transtornos do humor, um papel para o ácido ascórbico foi sugerido a partir de observações clínicas da recuperação da depressão idiopática (sem causa conhecida) por altas doses de ácido ascórbico, bem como da depressão associada ao uso de ACTH em uma criança com hepatite (COCCHI et al., 1980). Um estudo também relatou que a administração de ácido ascórbico por 14 dias diminuiu os escores no inventário Beck de depressão em indivíduos saudáveis (BRODY, 2002). Outro estudo verificou uma diminuição dos níveis de ácido ascórbico no plasma de pacientes com depressão maior (KHANZODE et al., 2003). Além disso, um estudo clínico reportou o caso de um paciente deprimido que desenvolveu escorbuto (CHANG et al., 2007), o que sugere que uma ingestão inadequada desta vitamina, e consequentemente baixos níveis endógenos de ascorbato, pode estar

relacionada à patogênese da depressão. Além disso, outros estudos relatam uma comorbidade existente entre escorbuto e depressão (DESANTIS, 1993; STOKER et al., 1994; NGUYEN et al., 2003).

Em animais, foi relatado que ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado apresentam uma redução do conteúdo de ácido ascórbico no córtex cerebral (EREN et al., 2007). Adicionalmente, um estudo do nosso grupo mostrou que o ácido ascórbico possui ação antidepressiva no TSC em camundongos, o qual envolve uma ativação dos sistemas monoaminérgicos (BINFARE et al., 2009).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos da administração de ácido ascórbico em modelos animais de depressão, bem como os possíveis mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo desta vitamina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o envolvimento dos receptores NMDA e a via da L-arginina-NO no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC e no teste do campo aberto em camundongos.
- Investigar o envolvimento dos canais de  $K^+$  no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC e no teste do campo aberto em camundongos.
- Verificar o efeito da administração de ácido ascórbico em um modelo animal de depressão induzida por estresse crônico imprevisível através da avaliação comportamental no TSC, teste do campo aberto e parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo e córtex cerebral de camundongos.
- Verificar o efeito da administração de ácido ascórbico em um modelo animal de depressão induzida por estresse de contenção no TNF, teste do campo aberto, parâmetros de estresse oxidativo bem como a fosforilação de GSK-3 $\beta$  e expressão de Bcl-2 e Bax no hipocampo e córtex cerebral de camundongos.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia empregada nos estudos realizados neste trabalho encontra-se dividida em capítulos, sob forma de artigos científicos, os quais se encontram nos anexos A, B, C e D.



## 4 RESULTADOS

O presente trabalho resultou na publicação de 4 artigos científicos em periódicos de circulação internacional, listados abaixo e incluídos nesta tese sob forma de anexos:

O anexo A traz um manuscrito completo relacionado ao objetivo 1 publicado no periódico *Behavioural Brain Research*.

O anexo B traz um manuscrito completo relacionado ao objetivo 2 publicado no periódico *European Journal of Pharmacology*.

O anexo C traz um manuscrito completo relacionado ao objetivo 3 publicado no periódico *Journal of Psychiatric Research*.

O anexo D traz um manuscrito completo relacionado ao objetivo 4 publicado no periódico *Journal of Molecular Neuroscience*.



## 5 DISCUSSÃO

Apesar de alguns estudos clínicos já terem sugerido que o ácido ascórbico possui propriedades antidepressivas (COCCHI et al., 1980; KHANZODE et al., 2003; CHANG et al., 2007), há poucas informações disponíveis na literatura acerca dos efeitos dessa substância em modelos animais de depressão. Da mesma forma, os mecanismos responsáveis por esse efeito foram pouco investigados.

Nosso grupo foi o pioneiro na investigação dos efeitos do ácido ascórbico em modelos animais preditivos de ação antidepressiva. BINFARÉ et al. (2009) demonstrou que a administração sistêmica (por via intraperitoneal ou oral) ou central (por via intracerebroventricular) de ácido ascórbico produz efeito tipo-antidepressivo no TSC e que esse efeito é dependente de uma ativação dos sistemas monoaminérgicos.

No presente estudo, confirmamos que, após uma única administração em camundongos, o ácido ascórbico promove um efeito tipo-antidepressivo no TSC. Além disso, estendemos nossos achados prévios mostrando que, neste mesmo teste comportamental, o tratamento repetido (7 dias) com essa substância foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo em camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível. Em outro protocolo experimental, demonstramos que a administração aguda de ácido ascórbico previne o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse de contenção em camundongos avaliados no TNF.

O TSC e o TNF são dois modelos amplamente utilizados na pesquisa básica e visam identificar e caracterizar a eficácia de compostos com ação antidepressiva (CRYAN et al., 2005). Nos dois modelos, os animais são expostos a eventos estressantes incontroláveis em que não há possibilidade de escape e a ação tipo-antidepressiva é expressa pela diminuição do tempo de imobilidade dos animais (BOURIN et al., 2005), um efeito que é característico de antidepressivos convencionais de diferentes classes (PORSOLT et al., 1977; STERU et al., 1985). Além do vasto uso desses modelos para identificar ação antidepressiva de novas drogas e compostos, esses também são importantes ferramentas para o estudo dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas antidepressivas (STERU et al., 1985; BOURIN et al., 2005).

Neste estudo utilizamos o TNF e principalmente o TSC para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico. Através de um conjunto de evidências, demonstramos que a inibição dos receptores NMDA está envolvida no efeito anti-

imobilidade dessa substância. A administração de NMDA foi capaz de promover uma reversão completa do efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. Além disso, uma segunda evidência que sugere a modulação dos receptores NMDA como parte do mecanismo pelo qual o ácido ascórbico exerce seu efeito antidepressivo é o fato de que a administração combinada de doses sub-efetivas de ácido ascórbico e MK-801, foi efetiva em produzir um efeito tipo-antidepressivo no TSC. O MK-801 possui a capacidade de ligar-se a um sítio dentro do canal, conhecido como sítio PCP (devido à ligação da droga fenciclidina) bloqueando de maneira não competitiva os receptores NMDA.

Atualmente um grande número de trabalhos vem se dedicando ao estudo da sinalização glutamatérgica, particularmente dos receptores NMDA, na fisiopatologia da depressão. Foi demonstrado que os níveis de glutamato no soro de pacientes com depressão estão significativamente mais elevados que controles saudáveis (KIM et al., 1982), resultados confirmados posteriormente por outros autores (ALTAMURA et al., 1993; MAURI et al., 1998). Além disso, uma correlação positiva entre os níveis de glutamato no plasma e a severidade dos sintomas depressivos em pacientes já foi descrita (MITANI et al., 2006). É interessante destacar que o tratamento com antidepressivos (5 semanas) foi capaz de diminuir significativamente os níveis de glutamato no soro de pacientes depressivos (MAES et al., 1998), sugerindo que a sinalização pelo glutamato exerce um papel importante no efeito dos antidepressivos. Em animais, modelos de depressão induzida pelo estresse crônico ou pela bulbectomia ofatória causam um aumento na liberação de glutamato em regiões encefálicas implicadas na fisiopatologia da depressão (HO et al., 2000; TARDITO et al., 2010).

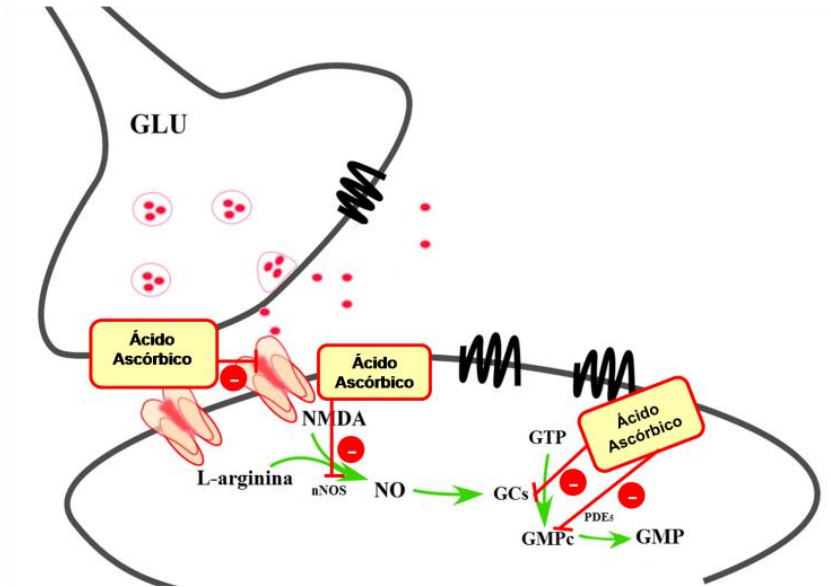
Considerando a hipótese de que o receptor NMDA pode ser um alvo dos antidepressivos, alguns estudos investigaram o potencial terapêutico de antagonistas do receptor NMDA em roedores. Foi demonstrado que a administração de 2-amino-7-ácido fosfonoheptanóico (antagonista não competitivo do receptor NMDA), ácido 1-aminociclopropano carboxílico (agonista parcial do sítio de ligação da glicina) e MK-801 (antagonista de receptor NMDA) são eficazes em produzir um efeito tipo-antidepressivo em testes pré-clínicos (TRULLAS; SKOLNICK, 1990; TRULLAS et al., 1991; MAJ et al., 1992; SKOLNICK et al., 1992). Mais recentemente, alguns estudos mostraram que a administração aguda de memantina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, exerce efeitos antidepressivos em ratos e camundongos submetidos ao TNF (ROGOZ



et al., 2002; SKUZA; ROGOZ, 2003; ALMEIDA et al., 2006; REUS et al., 2010), além de produzir um efeito tipo-antidepressivo sinérgico neste teste quando coadministrada com antidepressivos (ROGOZ et al., 2002). Adicionalmente, a memantina também apresentou eficácia antidepressiva em humanos (FERGUSON; SHINGLETON, 2007).

Resultados promissores na terapia antidepressiva também foram obtidos com a administração de cetamina, outro antagonista de receptores NMDA. Estudos indicam que esta substância possui ações antidepressivas em animais (ROGOZ et al., 2002; GARCIA et al., 2008a; GARCIA et al., 2009) e pacientes (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006). Surpreendentemente, o tratamento com cetamina produz um rápido efeito antidepressivo e é eficaz no tratamento de pacientes com depressão resistente ao tratamento (ZARATE et al., 2006). Dados da literatura demonstram ainda que antidepressivos como a fluoxetina e a desipramina, em concentrações terapêuticas, inibem os receptores NMDA (SZASZ et al., 2007; MAYER et al., 2009).

Sobre a capacidade do ácido ascórbico de inibir os receptores NMDA, nossos achados estão de acordo com um estudo prévio que demonstrou que a administração intraperitoneal dessa substância em camundongos foi capaz de atenuar a resposta nociceptiva induzida pela injeção intretecal de glutamato, um efeito que foi dependente da inibição da via da L-arginina-NO e da ativação (oxidação) do sítio redox do receptor NMDA (ROSA et al., 2005). Além disso, outros trabalhos têm sugerido que o ácido ascórbico está envolvido na regulação do sistema glutamatérgico, principalmente, por modular a função do receptor NMDA. Por exemplo, já foi verificado que o ascorbato inibe a ligação de glutamato nos receptores NMDA, além de produzir alterações conformacionais decorrentes de mudanças na carga elétrica do receptor, promovendo a internalização do mesmo (MAJEWSKA et al., 1990; CHOI; LIPTON, 2000). Nossos resultados também estão apoiados na já consolidada teoria de que a regulação das concentrações de ascorbato e glutamato no SNC é mediada por um mecanismo de trocadores e/ou transportadores, onde a liberação de ascorbato promove a captação de glutamato (REBEC; PIERCE, 1994), diminuindo os níveis extracelulares de glutamato e reduzindo a excitotoxicidade provocada pelo excesso desse neurotransmissor na fenda sináptica.



**Figura 5. Envolvimento dos receptores NMDA e a via da L-arginina-NO-GMPc no efeito do tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC.**

O efeito do tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC é mediado, pelo menos em parte, pelo bloqueio de receptores NMDA, inibição das enzimas NOS e GCs e diminuição dos níveis de GMPc neuronais.

O presente estudo também evidenciou que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC, além de ser dependente da inibição dos receptores NMDA, envolve a modulação da via L-arginina-NO-GMPc, conforme sumarizado na Figura 5. A L-arginina está envolvida em múltiplos processos celulares, variando do equilíbrio redox ao ciclo celular e, além disso, uma de suas principais funções é ser o substrato para a produção de NO, através da ação da NOS (WU; MORRIS, 1998). Os efeitos do NO são mediados diretamente por segundos mensageiros, sendo a via da ativação da enzima GCs a mais estudada. Esta enzima catalisa a conversão de GTP em GMPc, um mediador de muitos efeitos do NO (DENNINGER; MARLETTA, 1999). Apesar do conhecido papel dessa molécula como modulador do sistema nervoso, o aumento da biodisponibilidade de NO em consequência da liberação exagerada de glutamato ou diminuição da sua recaptação, pode causar danos oxidativos às células, especialmente na presença de superóxidos (HABIB; ALI, 2011). Por este motivo, a

elevada produção de NO está implicado em processos biológicos associados à depressão como o estresse oxidativo (BERGSTROM et al., 2008) e a excitotoxicidade glutamatérgica (STRIJBOS et al., 1996).

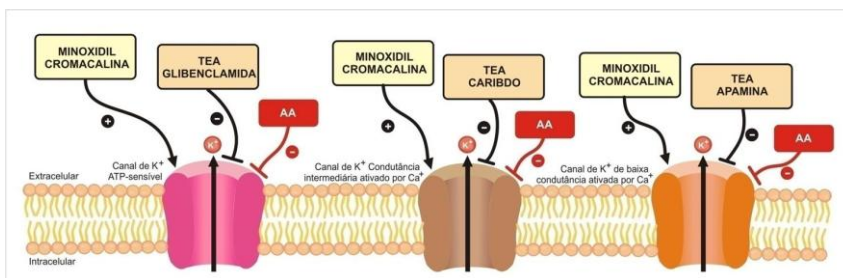
Estudos clínicos encontraram níveis elevados de NO em pacientes que realizaram tentativa de suicídio (KIM et al., 2006) e, corroborando estes achados, foi observado que animais submetidos ao protocolo de estresse imprevisível, além de mostrarem alterações comportamentais que se assemelham à depressão em humanos, tiveram um aumento na expressão de NOS 1 em estruturas encefálicas relacionadas ao transtorno, como o hipocampo, a amígdala e o córtex cerebral (DE OLIVEIRA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008).

No presente estudo, nós demonstramos que o pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (substrato da NOS), preveniu o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico no TSC. Além disso, a administração combinada de doses sub-ativas de ácido ascórbico e 7-nitroindazol em camundongos promoveu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico em comparação ao grupo controle ou às drogas administradas isoladamente. O 7-nitroindazol é um inibidor específico da NOS 1 que apresenta propriedades antidepressivas em modelos animais (YILDIZ et al., 2000; JOCA; GUIMARAES, 2006). Juntos, estes resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC é dependente, pelo menos em parte, da inibição da síntese de NO. De maneira semelhante, estudos básicos demonstraram que o efeito antidepressivo da imipramina, venfalaxina e bupropiona foi bloqueado pelo pré-tratamento com L-arginina (HARKIN et al., 2003; KRASS et al., 2011), indicando que a inibição da síntese de NO está envolvida no efeito destes antidepressivos.

Neste trabalho demonstramos também que o tratamento com ácido ascórbico em doses sub-ativas, foi eficaz em promover um efeito antidepressivo sinérgico quando administrada com doses sub-efetivas de ODQ, um inibidor da GCs. Além disso, o pré-tratamento dos animais com sildenafil (um inibidor seletivo da fosfodiesterase 5) preveniu o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. Considerando que o NO ativa a enzima GCs, que por sua vez converte GTP a GMPC (DENNINGER; MARLETTA, 1999) e que a inibição da fosfodiesterase 5 aumenta os níveis de GMPC, nossos resultados indicam que o efeito do tipo-antidepressivo do ácido ascórbico envolve uma redução dos níveis de GMPC, possivelmente como uma consequência da redução da síntese de NO. Resultados similares foram obtidos com outros compostos dotados de propriedades antidepressivas. A administração de doses sub-efetivas de melatonina, agmatina, e escitalopran produziu um efeito

antidepressivo sinérgico com o ODQ em testes preditivos de atividade antidepressiva (MANTOVANI et al., 2003; KASTER et al., 2005a; ZOMKOWSKI et al., 2010). Além disso, diversos estudos demonstram que a administração de sildenafil reverte o efeito antidepressivo de diversos compostos em modelos animais (KASTER et al., 2005a; BROCARDO et al., 2008; DHIR; KULKARNI, 2008).

Como descrito no Capítulo 2 e sumarizado na Figura 6, o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico também envolve a inibição da ativação de diferentes tipos de canais de  $K^+$ . O presente trabalho demonstrou que a administração de doses sub-ativas de TEA (inibidor de canais de  $K^+$  dependentes de voltagem), glibenclamida (inibidor de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP), caribdotoxina (inibidor de canais de  $K^+$  de alta condutância ativados por cálcio) ou apamina (inibidor de canais de  $K^+$  de baixa e média condutância modulados por cálcio) em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico produz um efeito tipo-antidepressivo no TSC. A hipótese de que o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico seja dependente da inibição da ativação dos canais de  $K^+$  é reforçada pelos resultados que mostram que o pré-tratamento dos animais com cromacalim, um ativador de canais de  $K^+$ , foi efetivo em reverter o efeito tipo-antidepressivo produzido por uma dose ativa da vitamina.



**Figura 6. Envolvimento de canais de  $K^+$  no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC.**

O efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico envolve a inibição dos canais de  $K^+$ . Doses sub-ativas de TEA (inibidor de canais de  $K^+$  dependentes de voltagem), glibenclamida (bloqueador de canais de  $K^+$  sensível ao ATP), caribdotoxina (bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por cálcio de alta e intermediária condutância) e apamina (bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por cálcio de baixa condutância) combinadas com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico produziram um efeito tipo-antidepressivo no TSC. Adicionalmente, o pré-tratamento dos animais com ativadores de canais de  $K^+$  (cromacalim e minoxidil) reverteu o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico no TSC.

A participação dos canais de  $K^+$  na modulação do humor tem sido sugerida em vários estudos e, mais especificamente, a inibição desses canais vem sendo associada com efeitos antidepressivos em estudos pré-clínicos. Consistente com esta hipótese, KASTER et al. (2005) mostrou que a inibição farmacológica dos canais de  $K^+$  produz um efeito tipo-antidepressivo no TNF. De maneira inversa, o tratamento com agentes que promovem a abertura dos canais de  $K^+$  produzem efeitos depressogênicos (GUO et al., 1996; GALEOTTI et al., 1999). Além disso, um efeito antidepressivo sinérgico decorrente da administração combinada de antidepressivos com bloqueadores de canais de  $K^+$  também já foi descrito (GUO et al., 1995; GUO et al., 1996; INAN et al., 2004; KASTER et al., 2007; BORTOLATTO et al., 2010).

Ainda tem sido relatado que a estimulação dos receptores serotoninérgicos pode afetar diversos tipos de canais de  $K^+$  em neurônios do SNC (BOBKER; WILLIAMS, 1990). Corroborando estes achados, existem diversas evidências que indicam uma associação entre os canais de  $K^+$  e o mecanismo de ação dos antidepressivos, especialmente aqueles que promovem a ativação do sistema serotoninérgico, incluindo a fluoxetina, a sertralina e a venfalaxina (CHOI et al., 2004; INAN et al., 2004; BORTOLATTO et al., 2010). Estudos também sugerem que o bloqueio dos canais de  $K^+$  aumenta a liberação basal de serotonina em fatias hipocâmpais de ratos (SCHECHTER, 1997). De fato, o efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela administração combinada de ácido ascórbico e inibidores dos canais de  $K^+$  pode ser, pelo menos em parte, dependente da ativação do sistema serotoninérgico, visto que já foi demonstrado que a administração de NAN-190 (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), ketanserina (antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) e MDL72222 (antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>) previne o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC (BINFARE et al., 2009).

Já foi previamente demonstrado pelo nosso grupo que a administração de L-arginina (precursora de NO) ou sildenafil (inibidor da enzima fosfodiesterase-5, envolvida na degradação do GMPc) reverte o efeito tipo-antidepressivo produzido pelo tratamento com bloqueadores de canais de  $K^+$  como o TEA, a glibenclamida, a apamina e a caribdotoxina, sugerindo que o NO e GMPc são importantes moduladores de alguns canais de  $K^+$  (KASTER et al., 2005b). Além deste, outros estudos têm relatado que o NO e o GMPc podem ativar diferentes tipos de canais de  $K^+$  (BOLOTINA et al., 1994; JEONG et al.,

2001). Um achado interessante do presente estudo é o fato de que a administração de cromacalim (um ativador dos canais de  $K^+$ ) foi efetiva em suprimir o efeito antidepressivo sinérgico produzido pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol (um inibidor da atividade da NOS). Este resultado, juntamente com os dados apresentados no capítulo 1, sugere que o bloqueio indireto dos canais de  $K^+$  pelo ácido ascórbico, através da inibição dos receptores NMDA e da síntese de NO, pode estar relacionado com os resultados comportamentais obtidos no TSC. Entretanto, a possibilidade de que o ácido ascórbico cause uma inibição direta dos canais de  $K^+$  não pode ser descartada, especialmente considerando trabalhos anteriores que demonstram a capacidade deste composto de interagir com os canais de  $K^+$ . Por exemplo, já foi demonstrado que o ácido ascórbico reverte a inibição das correntes de  $K^+$  para dentro de células provocada pelo peróxido de hidrogênio (ZHANG et al., 2001). Além disso, este composto foi efetivo em reduzir as correntes de  $K^+$  em neurônios de *Drosophila* (ALSHUAIB; MATHEW, 2006), além de diminuir as correntes de  $K^+$  dependentes de voltagem nas células bipolares da retina de peixe dourado (FAN; YAZULLA, 1999).

Além de investigar o mecanismo de ação responsável pelo efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC, este estudo também buscou avaliar o efeito da administração desse composto sobre o comportamento tipo-depressivo de camundongos submetidos a protocolos de estresse. Os modelos de comportamento tipo-depressivo baseados na indução de estresse são utilizados na pesquisa pré-clínica por promoverem alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas que mimetizam sintomas de depressão (LU et al., 2006; MCARTHUR; BORSINI, 2006). Um dos parâmetros comportamentais avaliados após a exposição de roedores aos protocolos de estresse é o tempo de imobilidade dos animais em modelos preditivos de ação antidepressiva como o TNF e o TSC. Camundongos e ratos expostos a situações de estresse emocional e físico costumam apresentar um aumento do tempo de imobilidade nesses testes, o que é interpretado como um comportamento tipo-depressivo (MINEUR et al., 2006; DUNN; SWIERGIEL, 2008; MURRAY et al., 2008; GUTIERREZ-GARCIA; CONTRERAS, 2009).

Em concordância com estudos já publicados na literatura, neste trabalho, a exposição dos camundongos a agentes estressores aplicados de maneira aguda (estresse de contenção – 7 horas) ou crônica (estresse crônico imprevisível – 14 dias) foi efetiva em aumentar o tempo de imobilidade dos animais no TNF e TSC, respectivamente, o que é

consistente com um fenótipo tipo-depressivo. No modelo de estresse crônico imprevisível, apesar de não termos observado alterações no peso corporal dos animais ou nos níveis de corticosterona, evidenciamos que os camundongos estressados apresentaram uma diminuição do tempo de *grooming* no *splash* test, sugerindo um comportamento anedônico induzido pelo estresse, o que corrobora os resultados obtidos no TSC.

Estudos pré-clínicos evidenciam que o tratamento com antidepressivos, incluindo a fluoxetina, tianeptina, cetamina, venlafaxina e imipramina, reverte os déficits comportamentais induzidos pelo estresse (GARCIA et al., 2009; LARSEN et al., 2010; LI et al., 2011; MUTLU et al., 2012). No presente trabalho, a administração aguda (uma única administração) ou repetida (sete dias) de ácido ascórbico foi capaz de reverter o comportamento depressogênico induzido pelo estresse de contenção e estresse crônico imprevisível, respectivamente. É importante ressaltar que os efeitos comportamentais obtidos após o tratamento com ácido ascórbico, em ambos os modelos de depressão induzida por estresse, foram comparáveis ao alcançado com a administração de fluoxetina, antidepressivo amplamente utilizado na clínica. Estes resultados sugerem que o ácido ascórbico pode possuir propriedades semelhantes a dos antidepressivos.

Além disso, cabe destacar que no estudo desenvolvido por BINFARE et al. (2009), o ácido ascórbico (administrado de forma sistêmica ou central), apresentou efeito tipo-antidepressivo no TSC, mas não no TNF, provavelmente devido a diferentes substratos e vias neuroquímicas que medeiam a performance dos camundongos nestes testes (BAI et al., 2001). A reversão do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse de contenção (avaliado no TNF) sugere que a exposição aguda ao estresse é suficiente para induzir alterações comportamentais nos camundongos que levam a uma maior sensibilidade à ação antidepressiva do ácido ascórbico. Este resultado está de acordo com estudos que mostraram que doses sub-ativas de imipramina e magnésio foram capazes de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse de imobilidade, sem causar qualquer efeito nos animais não-estressados (POLESZAK et al., 2006; CAPRA et al., 2010).

Apesar de não podermos apontar com clareza o mecanismo pelo qual o ácido ascórbico exerce efeitos protetores contra as alterações causadas pelo estresse agudo e crônico, com base nos nossos estudos prévios podemos especular que a ativação dos sistemas monoaminérgicos, inibição dos receptores NMDA e da via L-arginina-NO-GMPc, bem como o bloqueio dos canais de  $K^+$  podem estar

implicados neste efeito protetor. Em animais, já foi reportado que o estresse crônico imprevisível estimula a atividade da enzima monoamina oxidase (LIN et al., 2005; KUMAR et al., 2011), que pode resultar em uma diminuição dos níveis de monoaminas no cérebro, um achado interessante considerando a capacidade do ácido ascórbico de estimular os sistemas monoaminérgicos (BINFARE et al., 2009). Além disso, a superativação dos receptores NMDA, bem como a diminuição da captação de glutamato já está bem caracterizada em protocolos de estresse (MOGHADDAM, 1993; REAGAN et al., 2004; YANG et al., 2005). Tais eventos podem levar a excitotoxicidade glutamatérgica, ativação da via da L-argina-NO-GMPc e dos canais de  $K^+$ , que também podem ser modulados pelo ácido ascórbico.

Sabe-se ainda que os processos excitotóxicos induzidos pela exposição ao estresse são acompanhados de um desequilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes (BILICI et al., 2001; EREN et al., 2007; LUCCA et al., 2009a), ocasionando um potencial dano oxidativo às células. Considerando que as propriedades antioxidantes do ácido ascórbico (SCHREIBER; TROJAN, 1991; NAIDU, 2003) também podem estar envolvidas no seu efeito protetor contra o estresse em animais, avaliamos alguns parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral e hipocampo de camundongos submetidos aos protocolos de estresse de contenção e de estresse crônico imprevisível, bem como o efeito do ácido ascórbico neste contexto.

No protocolo de estresse de contenção, o comportamento tipo-depressivo induzido pela restrição física durante 7 horas foi acompanhado por um estado pró-oxidativo, que levou a um aumento da peroxidação lipídica no córtex cerebral e hipocampo. Nos animais estressados, um aumento das defesas antioxidantes também foi observado, provavelmente como uma resposta compensatória. De maneira similar, camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível, apresentaram um aumento no dano oxidativo no córtex cerebral e hipocampo, como evidenciado pelos resultados que mostram um aumento da peroxidação lipídica e diminuição das defesas antioxidantes nessas regiões encefálicas.

Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, que de fato já mostraram um aumento significativo da peroxidação lipídica no cérebro de roedores após o estresse de contenção, aplicado de maneira aguda ou crônica (KUMAR; GOYAL, 2008; ZAFIR et al., 2009a; KUMAR et al., 2010; AHMAD et al., 2012; GARCIA-FERNANDEZ et al., 2012). Além disso, consistente com nossos achados, estudos prévios demonstram que a exposição de ratos e



camundongos ao protocolo de estresse crônico imprevisível é capaz de aumentar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no encéfalo (LUCCA et al., 2009a; KUMAR et al., 2011). Em humanos, os níveis de malondialdeído (um produto final da peroxidação lipídica) também estão aumentados no soro e plasma de pacientes depressivos (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003).

Como sumarizado na Figura 7, nossos resultados mostraram também que em ambos os protocolos experimentais, a administração de ácido ascórbico promoveu efeitos benéficos contra o dano oxidativo induzido pelo estresse em paralelo com a prevenção do comportamento tipo-depressivo, sugerindo uma possível relação entre estes eventos. Em concordância com nossos resultados, um estudo prévio mostrou que a peroxidação lipídica no hipocampo durante convulsões experimentais foi atenuada com a administração de ácido ascórbico (SANTOS et al., 2009). Além disso, a adição de ascorbato em cultura de células, fatias e microsomas cerebrais previniu a peroxidação lipídica induzida por diferentes agentes oxidantes (SEREGI et al., 1978; KOVACHICH; MISHRA, 1983). Corroborando estes achados, a administração concomitante da vitamina C e E em ratos estressados preveniu a inibição da atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons e do citocromo C oxidase, além de prevenir o comportamento tipo-depressivo (TAGLIARI et al., 2010), indicando um possível envolvimento do estresse oxidativo nessas alterações.

O sistema de defesa antioxidante primário, que envolve efeitos coordenados da SOD, CAT e glutaciona, tem sido bastante estudado na depressão (NG et al., 2008). A SOD é a primeira linha de defesa contra as EROs e cataliza a dismutação do radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) ao peróxido de hidrogênio (MCCORD; FRIDOVICH, 1988) que pode ser reduzido a água e  $O_2$  pela CAT (CHELIKANI et al., 2004) ou GPx (FLOHE, 1971). Além de detoxificar o peróxido de hidrogênio, a GPx pode reduzir hidroperóxidos lipídicos e não-lipídicos às custas da glutaciona, a qual, torna-se oxidada, formando a glutaciona dissulfeto (FLOHE, 1971).

No presente estudo, o estresse induzido pela restrição física durante 7 horas provocou um aumento das atividades da SOD, GPx (córtex cerebral e hipocampo) e glutaciona redutase (GR) (somente no córtex cerebral). O referido aumento nas atividades dessas enzimas antioxidantes pode ser decorrente de uma resposta compensatória ao aumento da formação de radicais livres, induzido pelo estresse agudo de contenção em camundongos. Já no protocolo de estresse crônico imprevisível, encontramos uma diminuição na atividade da CAT (córtex

cerebral e hipocampo) e da GR (hipocampo) nos camundongos estressados. Além disso, menores níveis de glutatona no córtex cerebral também foram observados em animais submetidos ao estresse crônico. Associados com os resultados do TBARS, estes dados suportam a idéia de que o estresse é capaz de induzir a um aumento da formação de EROs, acompanhado por um desbalanço no sistema de defesa antioxidante no encéfalo.

Estudos em que utilizam protocolos de estresse como modelos animais de depressão, podem encontrar diferentes efeitos nas atividades das enzimas antioxidantes. Estas inconsistências podem ocorrer em função de uma série de variações quanto aos procedimentos ou animais utilizados, como idade e sexo dos animais, intensidade, duração, frequência e tipo do estressor (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009). No que diz respeito ao estresse de contenção, já foi demonstrado que ratos estressados durante uma hora por dias, por um período de 40 dias, apresentaram um aumento da atividade da GPx no hipocampo (FONTELLA et al., 2005). De forma similar, atividades aumentadas da SOD e CAT no cérebro de camundongos submetidos ao estresse agudo de contenção (2 h/dia durante 3 dias) também já foram descritas (KIM et al., 2005). Um estudo realizado em 2010 observou ainda que ratos submetidos ao estresse crônico de contenção (1 h/dia durante 40 dias) apresentaram um aumento na atividade da CAT no estriado (BALK RDE et al., 2010) e, mais recentemente foi demonstrado que camundongos submetidos a um protocolo de estresse de contenção idêntico ao utilizado no presente estudo tiveram um aumento das atividades da SOD, CAT, GR e GPx (BUDNI et al., 2012).

Contraopondo nossos resultados e reforçando a idéia de que há heterogeneidade nos resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa que utilizam modelos de estresse, já foi descrito uma redução nas atividades da CAT e GR após a submissão de roedores a protocolos agudos de estresse de contenção (somente uma exposição) (KUMARI et al., 2007; KUMAR; GOYAL, 2008; KUMAR et al., 2010). Além disso, estudos realizados com estresse crônico de contenção (4 h/21 dias) encontraram atividades reduzidas da SOD, CAT e GR (ZAFIR et al., 2009a; ZAFIR; BANU, 2009).

No que se refere ao estresse crônico imprevisível, já foi descrito que o comportamento tipo-depressivo induzido pela exposição de ratos a diferentes estressores aplicados diariamente durante 28 dias está acompanhada por uma redução significativa da atividade da GPx e dos níveis de glutatona (EREN et al., 2007). LUCCA et al. (2009b) observaram ainda uma diminuição na atividade da SOD no córtex

cerebral, hipocampo e estriado de ratos estressados cronicamente, dados que juntos, corroboram nossos achados.

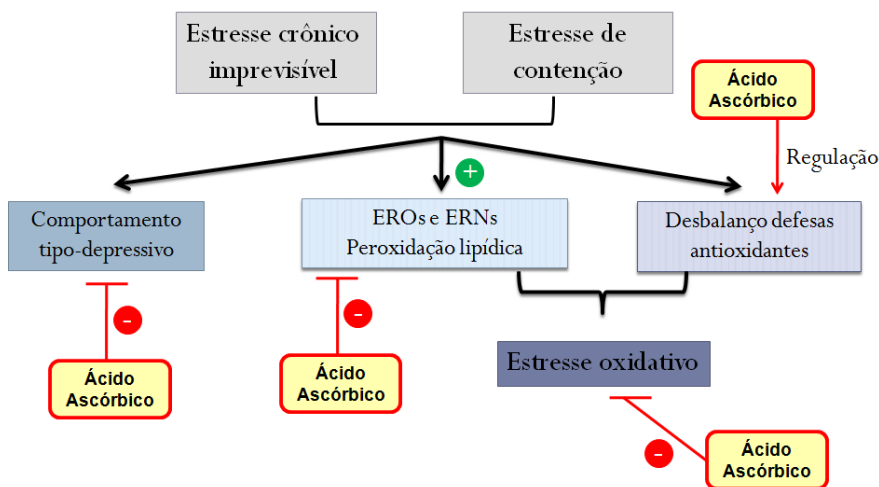
Em pacientes depressivos, diferentes resultados já foram obtidos quanto à atividade das enzimas antioxidantes. Por exemplo, estudos mostram que pacientes deprimidos podem apresentar atividade aumentada da GR no plasma, e atividade aumentada da GPx (BILICI et al., 2001), SOD (BILICI et al., 2001; GALECKI et al., 2009; KOTAN et al., 2011) e CAT (GALECKI et al., 2009) nos eritrócitos. Além disso, um estudo *post-mortem* observou um aumento da atividade da SOD no córtex pré-frontal de pacientes deprimidos (MICHEL et al., 2007). Por outro lado, um estudo clínico reportou que esses pacientes possuem uma menor atividade da CAT e níveis reduzidos de glutatona quando comparados com indivíduos saudáveis (OZCAN et al., 2004).

Diversas evidências têm indicado que os antidepressivos possuem efeito antioxidante, visto que o tratamento com estes fármacos foi efetivo em reverter o dano oxidativo no plasma e no soro de pacientes depressivos (BILICI et al., 2001; KHANZODE et al., 2003; HERKEN et al., 2007). Estes achados sugerem que as propriedades antioxidantes desses compostos podem, pelo menos em parte, contribuir para o seu efeito clínico. No nosso trabalho, a administração de ácido ascórbico, que preveniu o comportamento tipo-depressivo e a peroxidação lipídica induzida pelos protocolos de estresse, também foi capaz de regular a atividade das enzimas antioxidantes nas estruturas avaliadas. Estes resultados estão de acordo com o já descrito efeito do ácido ascórbico como um potente antioxidante com ações não-enzimáticas (para uma revisão ver NAIDU et al., 2003). Outros compostos com propriedades antioxidantes também exibem efeito antidepressivo. Por exemplo, o tratamento com N-acetilcisteína, um precursor da glutatona, atenuou os sintomas depressivos em pacientes avaliados através da escala de avaliação da depressão *Montgomery Asberg* (BERK et al., 2008). Além disso, já foi demonstrado que micronutrientes com propriedades antidepressivas, como o ácido fólico e o zinco (ROSA et al., 2003; BROCARDO et al., 2008) podem ser úteis na proteção contra o dano cerebral causado pelo estresse oxidativo em roedores (BROCARDO et al., 2007; BROCARDO et al., 2010).

É importante ressaltar que alguns dos nossos resultados obtidos nos trabalhos envolvendo os protocolos de estresse de contenção e estresse crônico imprevisível, foram dependentes da região encefálica avaliada. O córtex cerebral e o hipocampo representam diferentes tipos celulares e possuem, ao menos em parte, particularidades quanto as suas características fisiológicas e metabólicas, incluindo diferenças na

capacidade antioxidante e metabolismo oxidativo (PREDIGER et al., 2004). Estes são fatores importantes para explicar as diferenças regionais observadas na vulnerabilidade à peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes. Respostas distintas de diferentes estruturas encefálicas na vulnerabilidade ao estresse e ao tratamento também foram reportadas por outros autores (MANOLI et al., 2000; PREDIGER et al., 2004; DE VASCONCELLOS et al., 2006).

Encerrando a discussão sobre tema, apesar de os nossos resultados sugerirem uma possível relação entre o aumento do estresse oxidativo e o comportamento tipo-depressivo nos modelos de estresse, nossos dados e a literatura disponível não nos permitem apontar com clareza o quanto as propriedades antioxidantes do ácido ascórbico são responsáveis por provocar o efeito tipo-antidepressivo observado nos protocolos experimentais utilizados neste estudo, especialmente considerando os demais mecanismos de ação implicados no efeito tipo-antidepressivo deste composto já investigados aqui.



**Figura 7. Esquema ilustrativo do efeito do ácido ascórbico em modelos animais de depressão induzida por estresse de contenção e estresse crônico imprevisível.**

Os resultados do presente estudo mostram que o estresse de contenção e o estresse crônico imprevisível induzem um comportamento tipo-depressivo no TNF e TSC, respectivamente. Em paralelo, estes protocolos aumentam a peroxidação lipídica (evidenciado pelos níveis aumentados de TBARS no córtex cerebral e hipocampo) e promovem um desbalanço na atividade das enzimas antioxidantes, levando a um estado de estresse oxidativo. O ácido ascórbico foi

capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo, o aumento de TBARS e regular a atividade das enzimas antioxidantes, revertendo o estresse oxidativo induzido pelo estresse de contenção e estresse crônico imprevisível, sugerindo um importante papel antioxidante para este composto.

Por fim, tendo em vista que o protocolo de estresse de contenção provocou um comportamento tipo-depressivo em camundongos, acompanhado por um dano oxidativo no córtex cerebral e hipocampo e considerando que estressores celulares podem contribuir para uma modulação anormal de proteínas envolvidas na regulação da resiliência e apoptose celular (HE et al., 1998; WILKINSON et al., 2011), nós avaliamos os efeitos do estresse agudo (estresse de contenção - 7 horas) na fosforilação da GSK-3 $\beta$ , expressão da Bax e Bcl-2 no córtex cerebral e hipocampo dos camundongos.

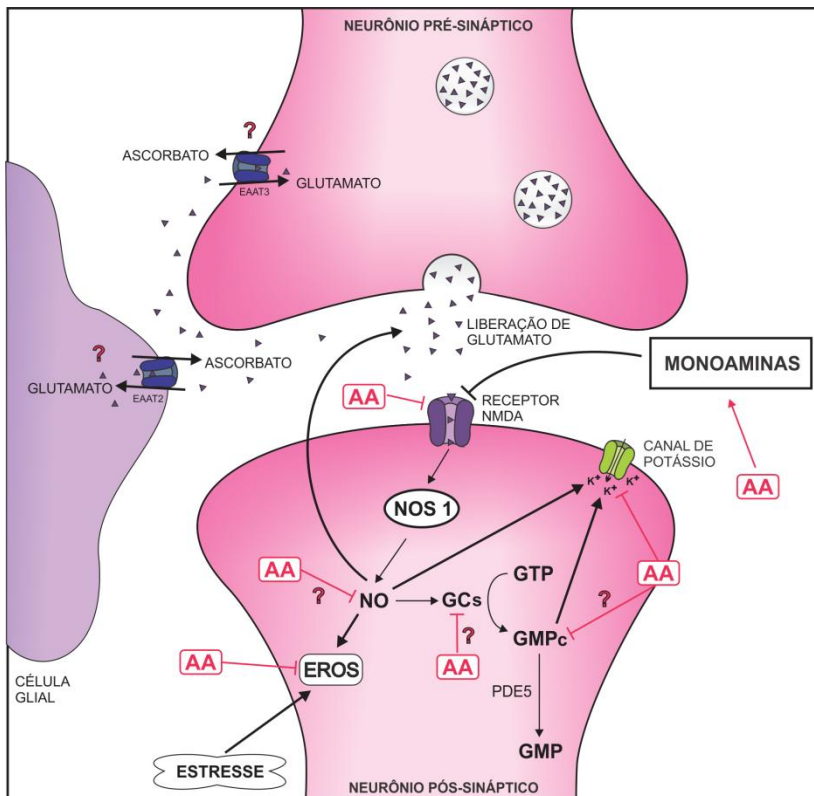
A atividade da GSK-3 $\beta$  é inibida por fosforilação em sítios de serina<sup>9</sup>, sendo que sua inibição exerce efeitos protetores, como o aumento da neuroplasticidade (GOULD; MANJI, 2005). No presente estudo, a fosforilação GSK-3 $\beta$  não foi alterada em resposta ao estresse ou ao tratamento com ácido ascórbico em ambas as estruturas avaliadas. Estes resultados estão de acordo com um estudo que mostrou que ratos expostos ao estresse agudo (um dia), subcrônico (6 dias), ou crônico (14 dias) não apresentaram alterações na fosforilação GSK-3 $\beta$  no córtex frontal (KOZLOVSKY et al., 2002). Por outro lado, um estudo recente demonstrou que ratos submetidos ao estresse de imobilização por 6 horas, durante 3 semanas, tiveram uma diminuição significativa na fosforilação GSK-3 $\beta$  no hipocampo (PARK et al., 2010). Os diferentes resultados da avaliação da fosforilação de GSK-3 $\beta$  obtidos pelos autores citados podem ser atribuídos principalmente ao diferentes protocolos experimentais utilizados e as diferentes áreas encefálicas avaliadas nos estudos.

No nosso protocolo experimental, apesar de não observarmos alterações na expressão da Bax no córtex cerebral e no hipocampo encontramos um aumento na expressão da Bcl-2 no hipocampo, independente da condição de estresse e tratamento. A expressão aumentada da Bcl-2 é geralmente associada com um aumento das defesas antioxidantes e da capacidade redox mitocondrial (RUDIN et al., 2003; KOWALTOWSKI; FISKUM, 2005). Além de diminuir a sensibilidade das mitocôndrias à transição da permeabilidade mitocondrial induzida por oxidantes, o aumento da capacidade redox pode proteger as células contra o estresse oxidativo através da detoxificação das ROS por meio dos sistemas de defesa antioxidantes

(KOWALTOWSKI; FISKUM, 2005). No presente trabalho, o aumento da expressão da Bcl-2 pode ser uma resposta compensatória em decorrência da elevada formação de radicais livres nos camundongos estressados. Esta hipótese é corroborada por achados de um estudo que mostrou que o aumento das defesas antioxidantes observado em células que superexpressavam Bcl-2 pode ser uma resposta compensatória à maior liberação de ROS mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2004).

Por fim, o aumento da expressão de Bcl-2 nos camundongos tratados com ácido ascórbico mostrado no presente estudo está de acordo com um estudo que demonstrou que a administração desse composto mantém a sobrevivência e aumenta a proliferação celular através da ativação do sinal antiapoptótico, via Bcl-2, em cultura primária de células neuronais tratadas com pentilenetetrazol e etanol (NASEER et al., 2011). Além disso, a administração de ácido ascórbico foi capaz de reverter o aumento da expressão da Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de diabetes induzida pela administração de estreptozotocina (JAFARI ANARKOOLI et al., 2009). Consistente com esses resultados, já foi demonstrado que o tratamento com ácido ascórbico reverte a diminuição da expressão da Bcl-2 em células endoteliais humanas tratadas com lipossacarídeo bacteriano (HAENDELER et al., 1996). Juntos estes dados fornecem novas perspectivas de um mecanismo alternativo de ação do ácido ascórbico envolvendo a regulação do estado redox através da Bcl-2.

Em conclusão, baseado nos estudos desenvolvidos até o momento pelo nosso grupo de pesquisa, uma figura resumindo os principais mecanismos pelos quais o ácido ascórbico exerce seu efeito tipo-antidepressivo em camundongos é apresentada (Figura 8).



**Figura 8. Principais mecanismos responsáveis pelo efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico em camundongos.**

O efeito tipo- antidepressivo do ácido ascórbico em camundongos é dependente de uma inibição da via L-arginina-NO-GMPc, diretamente ou indiretamente através da inibição dos receptores NMDA. Os receptores NMDA, por sua vez também podem ser inibidos pelo aumento de monoaminas na fenda sináptica. Cabe ressaltar que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico também envolve a ativação dos sistemas monoaminérgicos, especificamente através dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub>,  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- e  $\beta$ -adrenoceptores e receptores dopaminérgicos do subtipo D<sub>2</sub> (BINFARÉ et al., 2009). Adicionalmente, o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico no TSC envolve o bloqueio dos canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem, sensíveis ao ATP e ativados por cálcio de baixa, alta e intermediária condutância, bem como uma diminuição do estresse oxidativo.





## 6 CONCLUSÕES

Em relação à caracterização do mecanismo de ação antidepressivo do ácido ascórbico, podemos concluir que o efeito deste composto é dependente do bloqueio da ativação de receptores NMDA, da inibição da síntese de NO/GMPc e inibição de canais de  $K^+$ , reforçando a noção de que estes são importantes alvos para a atividade antidepressiva e estendendo de maneira significativa os dados da literatura acerca da ação do tipo-antidepressiva desta vitamina.

Além disso, o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico foi confirmado em dois modelos animais de depressão induzida por estresse, o estresse de contenção e o estresse crônico imprevisível, visto que este composto reverteu o comportamento depressogênico induzido por estes protocolos com efeito comparável ao obtido com o tratamento com fluoxetina.

Finalmente o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico nos modelos de estresse foi acompanhado por uma diminuição da peroxidação lipídica e balanço das defesas antioxidantes endógenas.



## 7 PERSPECTIVAS

- Investigar o envolvimento das vias de sinalização intracelular mediadas pela PI3K/ AKT, GSK-3 $\beta$  e proteína alvo para rapamicina (mTOR) no efeito tipo-antidepressivo agudo do ácido ascórbico.
- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo de diferentes doses de ácido ascórbico após um tratamento de 21 dias, bem como verificar o imunoconteúdo de NGF, IGF, VGF e BDNF no hipocampo e córtex cerebral de camundongos.
- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico em um modelo de depressão induzida por TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, e avaliar o efeito sinérgico de doses sub-ativas de ácido ascórbico combinadas com doses sub-ativas de antidepressivos clássicos (fluoxetina, imipramina e bupropiona), um antagonista de receptores NMDA (MK-801) ou um inibidor da NOS 1 (7-nitroindazol) neste mesmo modelo. Além disso, pretendemos avaliar o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (P38, Akt, ERK1/2 e JNK1/2) no córtex cerebral e hipocampo dos animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo TNF- $\alpha$  e tratados com ácido ascórbico.



## 8 REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, B. A.; SALAMA, R. H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 1, p. 59-65, 2011.

AGUIAR, C. C.; ALMEIDA, A. B.; ARAUJO, P. V.; DE ABREU, R. N.; CHAVES, E. M.; DO VALE, O. C.; MACEDO, D. S.; WOODS, D. J.; FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, n., p. 795259, 2012.

AHMAD, A.; RASHEED, N.; ASHRAF, G. M.; KUMAR, R.; BANU, N.; KHAN, F.; AL-SHEEHA, M.; PALIT, G. Brain region specific monoamine and oxidative changes during restraint stress. **Can J Neurol Sci**, v. 39, n. 3, p. 311-318, 2012.

ALMEIDA, R. C.; FELISBINO, C. S.; LOPEZ, M. G.; RODRIGUES, A. L. S.; GABILAN, N. H. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. **Behav Brain Res**, v. 168, n. 2, p. 318-322, 2006.

ALSHUAIB, W. B.; MATHEW, M. V. Vitamins C and E modulate neuronal potassium currents. **J Membr Biol**, v. 210, n. 3, p. 193-198, 2006.

ALTAMURA, C. A.; MAURI, M. C.; FERRARA, A.; MORO, A. R.; DANDREA, G.; ZAMBERLAN, F. Plasma and Platelet Excitatory Amino-Acids in Psychiatric-Disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 11, p. 1731-1733, 1993.

ARENT, C. O.; RÉUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; RIBEIRO, K. F.; STECKERT, A. V.; MINA, F.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. **Neurochem Int**, v. 61, n. 7, p. 1072-1080, 2012.

BAI, F.; LI, X.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacol Biochem Behav**, v. 70, n. 2-3, p. 187-192, 2001.

BALK RDE, S.; BRIDI, J. C.; PORTELLA RDE, L.; CARVALHO, N. R.; DOBRACHINSKI, F.; DA SILVA, M. H.; AMARAL, G. P.; DIAS, G. R.; BARBOSA NDE, V.; SOARES, F. A. Clomipramine treatment and repeated restraint stress alter parameters of oxidative stress in brain regions of male rats. **Neurochem Res**, v. 35, n. 11, p. 1761-1770, 2010.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, n., p. 327-347, 2009.

BENDICH, A.; COHEN, M. Ascorbic acid safety: analysis of factors affecting iron absorption. **Toxicol Lett**, v. 51, n. 2, p. 189-201, 1990.

BERGSTROM, A.; JAYATISSA, M. N.; MORK, A.; WIBORG, O. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. **Brain Res**, v. 1196, n., p. 41-52, 2008.

BERK, M.; COPOLOV, D. L.; DEAN, O.; LU, K.; JEAVONS, S.; SCHAPKAITZ, I.; ANDERSON-HUNT, M.; BUSH, A. I. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder--a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 468-475, 2008.

BERMAN, R. M.; CAPIELLO, A.; ANAND, A.; OREN, D. A.; HENINGER, G. R.; CHARNEY, D. S.; KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-354, 2000.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-151, 2006.

BHAGWAGAR, Z.; HAFIZI, S.; COWEN, P. J. Increased salivary cortisol after waking in depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 1, p. 54-57, 2005.

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BINFARE, R. W.; ROSA, A. O.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530-540, 2009.

BOBKER, D. H.; WILLIAMS, J. T. Ion conductances affected by 5-HT receptor subtypes in mammalian neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 5, p. 169-173, 1990.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric-Oxide Directly Activates Calcium-Dependent Potassium Channels in Vascular Smooth-Muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BORTOLATTO, C. F.; JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; NOGUEIRA, C. W. Involvement of potassium channels in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. **Life Sciences**, v. 86, n. 9-10, p. 372-376, 2010.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D. J. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res**, v. 164, n. 2, p. 266-269, 2005.

BROCARDO, P. S.; ASSINI, F.; FRANCO, J. L.; PANDOLFO, P.; MULLER, Y. M.; TAKAHASHI, R. N.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 140-148, 2007.

BROCARDO, P. S.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; KASTER, M. P.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 598, n. 1-3, p. 37-42, 2008.

BROCARDO, P. S.; BUDNI, J.; PAVESI, E.; FRANCO, J. L.; ULIANO-SILVA, M.; TREVISAN, R.; TERENCE, M. G.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. **Bipolar Disord**, v. 12, n. 4, p. 414-424, 2010.

BRODY, S. High-dose ascorbic acid increases intercourse frequency and improves mood: a randomized controlled clinical trial. **Biol Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 371-374, 2002.

BRUNELLO, N.; MENDLEWICZ, J.; KASPER, S.; LEONARD, B.; MONTGOMERY, S.; NELSON, J.; PAYKEL, E.; VERSIANI, M.; RACAGNI, G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 5, p. 461-475, 2002.

BUDNI, J.; GADOTTI, V. M.; KASTER, M. P.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, v. 575, n. 1-3, p. 87-93, 2007.

BUDNI, J.; ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D.; SANTOS, D. B.; DOS SANTOS, A. A.; MORETTI, M.; VALVASSORI, S. S.; ORNELL, F.; QUEVEDO, J.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**, v. n., p., 2012.

BURKE, H. M.; DAVIS, M. C.; OTTE, C.; MOHR, D. C. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 9, p. 846-856, 2005.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 7, p. 1089-1098, 2009.

CALABRESE, F.; GUIDOTTI, G.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; MANCINI, M.; RIVA, M. A. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37916, 2012.

CAPRA, J. C.; CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; ZOMKOWSKI, A. D.; MENDES, B. G.; SANTOS, A. R.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 232-238, 2010.

CAREY, D. J.; TODD, M. S. Schwann cell myelination in a chemically defined medium: demonstration of a requirement for additives that promote Schwann cell extracellular matrix formation. **Brain Res**, v. 429, n. 1, p. 95-102, 1987.

CARRASCO, G. A.; DE KAR, L. D. V. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-272, 2003.

CASTREN, E. Opinion - Is mood chemistry? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 241-246, 2005.

CHANG, C. W.; CHEN, M. J.; WANG, T. E.; CHANG, W. H.; LIN, C. C.; LIU, C. Y. Scurvy in a patient with depression. **Dig Dis Sci**, v. 52, n. 5, p. 1259-1261, 2007.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annu Rev Physiol**, v. 67, n., p. 259-284, 2005.

CHARNEY, D. S.; DEJESUS, G.; MANJI, H. K. Cellular plasticity and resilience and the pathophysiology of severe mood disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 217-225, 2004.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C.; KHOSH, D. S.; DRISKO, J.; LEVINE, M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.

CHOI, J. S.; CHOI, B. H.; AHN, H. S.; KIM, M. J.; HAN, T. H.; RHIE, D. J.; YOON, S. H.; JO, Y. H.; KIM, M. S.; HAHN, S. J. Fluoxetine inhibits A-type potassium currents in primary cultured rat hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 1018, n. 2, p. 201-207, 2004.

CHOI, Y. B.; LIPTON, S. A. Redox modulation of the NMDA receptor. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n. 11, p. 1535-1541, 2000.

CHOURBAJI, S.; URANI, A.; INTA, I.; SANCHIS-SEGURA, C.; BRANDWEIN, C.; ZINK, M.; SCHWANINGER, M.; GASS, P. IL-6 knockout mice exhibit



resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 3, p. 587-594, 2006.

CHRISTIE, M. J. Molecular and functional diversity of K<sup>+</sup> channels. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 22, n. 12, p. 944-951, 1995.

CHUNG, C. New perspectives on glutamate receptor antagonists as antidepressants. **Arch Pharm Res**, v. 35, n. 4, p. 573-577, 2012.

COCCHI, P.; SILENZI, M.; CALABRI, G.; SALVI, G. Antidepressant effect of vitamin C. **Pediatrics**, v. 65, n. 4, p. 862-863, 1980.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-695, 1993.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J. F.; HOYER, D.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 49-58, 2003.

CRYAN, J. F.; MOMBEBEAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CUMMINGS, J. L. The neuroanatomy of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 54 Suppl, n., p. 14-20, 1993.

D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 3, p. 183-194, 2002.

DAI, F.; YANG, J. Y.; GU, P. F.; HOU, Y.; WU, C. F. Effect of drug-induced ascorbic acid release in the striatum and the nucleus accumbens in hippocampus-lesioned rats. **Brain Res**, v. 1125, n. 1, p. 163-170, 2006.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DE OLIVEIRA, R. M.; APARECIDA DEL BEL, E.; MAMEDE-ROSA, M. L.; PADOVAN, C. M.; DEAKIN, J. F.; GUIMARAES, F. S. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 2, p. 123-126, 2000.

DE VASCONCELLOS, A. P.; NIETO, F. B.; CREMA, L. M.; DIEHL, L. A.; DE ALMEIDA, L. M.; PREDIGER, M. E.; DA ROCHA, E. R.; DALMAZ, C. Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. **Neurochem Res**, v. 31, n. 9, p. 1141-1151, 2006.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-350, 1999.

DESANTIS, J. Scurvy and psychiatric symptoms. **Perspect Psychiatr Care**, v. 29, n. 1, p. 18-22, 1993.

DEUSCHLE, M.; SCHWEIGER, U.; WEBER, B.; GOTTHARDT, U.; KORNER, A.; SCHMIDER, J.; STANDHARDT, H.; LAMMERS, C. H.; HEUSER, I. Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 1, p. 234-238, 1997.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 921-925, 2007a.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. **Eur J Pharmacol**, v. 568, n. 1-3, p. 177-185, 2007b.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-801(dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. **Indian J Exp Biol**, v. 46, n. 3, p. 164-170, 2008.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 125-131, 2011.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 7, p. 1175-1186, 2003.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 3, p. 688-693, 2005.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of acute and chronic stressors and CRF in rat and mouse tests for depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1148, n., p. 118-126, 2008.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; TEPPEN, T.; ZHANG, H.; MONDAL, A.; ROBERTS, R. C.; CONLEY, R. R.; PANDEY, G. N. Lower phosphoinositide 3-

kinase (PI 3-kinase) activity and differential expression levels of selective catalytic and regulatory PI 3-kinase subunit isoforms in prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2324-2340, 2008.

ELDRIDGE, C. F.; BUNGE, M. B.; BUNGE, R. P.; WOOD, P. M. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. **J Cell Biol**, v. 105, n. 2, p. 1023-1034, 1987.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

ERDELJAN, P.; MACDONALD, J. F.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor (GR) but not mineralocorticoid receptor (MR) mRNA levels in fetal mouse hippocampal neurons, in vitro. **Brain Res**, v. 896, n. 1-2, p. 130-136, 2001.

EREN, I.; NAZIROGLU, M.; DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem Res**, v. 32, n. 7, p. 1188-1195, 2007.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 5, p. 1079-1095, 2002.

FAN, S. F.; YAZULLA, S. Modulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> currents (IK(V)) in retinal bipolar cells by ascorbate is mediated by dopamine D1 receptors. **Vis Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 923-931, 1999.

FARAH, J. M., JR.; RAO, T. S.; MICK, S. J.; COYNE, K. E.; IYENGAR, S. N-methyl-D-aspartate treatment increases circulating adrenocorticotropin and luteinizing hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1875-1880, 1991.

FERGUSON, J. M.; SHINGLETON, R. N. An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder. **Clin Neuropharmacol**, v. 30, n. 3, p. 136-144, 2007.

FINK, K.; SCHMITZ, V.; BOING, C.; GOTHERT, M. Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 352, n. 4, p. 394-401, 1995.

FINKEL, M. S.; LAGHRISITHODE, F.; POLLOCK, B. G.; RONG, J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 32, n. 4, p. 653-658, 1996.

FLOHE, L. [Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects]. **Klin Wochenschr**, v. 49, n. 12, p. 669-683, 1971.

FLUGGE, G. Dynamics of Central Nervous 5-Ht1a-Receptors under Psychosocial Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7132-7140, 1995.

FONTELLA, F. U.; SIQUEIRA, I. R.; VASCONCELLOS, A. P.; TABAJARA, A. S.; NETTO, C. A.; DALMAZ, C. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 105-111, 2005.

FRYE, M. A.; TSAI, G. E.; HUGGINS, T.; COYLE, J. T.; POST, R. M. Low cerebrospinal fluid glutamate and glycine in refractory affective disorder. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 162-166, 2007.

GALECKI, P.; SZEMRAJ, J.; BIENKIEWICZ, M.; FLORKOWSKI, A.; GALECKA, E. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 3, p. 436-447, 2009.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; CALDARI, B.; BARTOLINI, A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 7, p. 1653-1659, 1999.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, n., p. 428010, 2012.

GARCIA-FERNANDEZ, M.; CASTILLA-ORTEGA, E.; PEDRAZA, C.; BLANCO, E.; HURTADO-GUERRERO, I.; BARBANCHO, M. A.; CHUN, J.; RODRIGUEZ-DE-FONSECA, F.; ESTIVILL-TORRUS, G.; SANTIN NUNEZ, L. J. Chronic immobilization in the malpar1 knockout mice increases oxidative stress in the hippocampus. **Int J Neurosci**, v. 122, n. 10, p. 583-589, 2012.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; BARBOSA, L. M.; ANDREAZZA, A. C.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140-144, 2008a.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; ANDREAZZA, A. C.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 103, n. 6, p. 502-506, 2008b.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-455, 2009.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol**, v. 57, n., p. 683-706, 1995.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 67, n., p. S26-S28, 2005.

GOTO, K.; TANAKA, R. Ascorbic acid inhibition of Na,K-adenosine triphosphatase of rat forebrain without peroxidation of membrane lipids. **Brain Res**, v. 207, n. 1, p. 239-244, 1981.

GOULD, T. D.; EINAT, H.; BHAT, R.; MANJI, H. K. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 4, p. 387-390, 2004.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1223-1237, 2005.

GRAHAM, Y. P.; HEIM, C.; GOODMAN, S. H.; MILLER, A. H.; NEMEROFF, C. B. The effects of neonatal stress on brain development: implications for psychopathology. **Dev Psychopathol**, v. 11, n. 3, p. 545-565, 1999.

GRIFFITHS, B. B.; SCHOONHEIM, P. J.; ZIV, L.; VOELKER, L.; BAIER, H.; GAHTAN, E. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Front Behav Neurosci**, v. 6, n., p. 68, 2012.

GRUNEWALD, R. A. Ascorbic acid in the brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 18, n. 1, p. 123-133, 1993.

GU, P. F.; WU, C. F.; YANG, J. Y.; SHANG, Y.; HOU, Y.; BI, X. L.; DAI, F. Differential effects of drug-induced ascorbic acid release in the striatum and nucleus accumbens of freely moving rats. **Neurosci Lett**, v. 399, n. 1-2, p. 79-84, 2006.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

GUO, W. Y.; TODD, K. G.; BOURIN, M.; HASCOET, M. The Additive Effects of Quinine on Antidepressant Drugs in the Forced Swimming Test in Mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, n. 2, p. 173-179, 1995.

GUO, W. Y.; TODD, K.; BOURIN, M.; HASCOET, M.; KOUADIO, F. Additive effects of glyburide and antidepressants in the forced swimming test: Evidence for the involvement of potassium channel blockade. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 725-730, 1996.

GUTIERREZ-GARCIA, A. G.; CONTRERAS, C. M. Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 542-548, 2009.

HABIB, S.; ALI, A. Biochemistry of nitric oxide. **Indian J Clin Biochem**, v. 26, n. 1, p. 3-17, 2011.

HAENDELER, J.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S. Vitamin C and E prevent lipopolysaccharide-induced apoptosis in human endothelial cells by modulation of Bcl-2 and Bax. **Eur J Pharmacol**, v. 317, n. 2-3, p. 407-411, 1996.

HALLIGAN, T. J.; RUSSELL, N. G.; DUNN, W. J.; CALDRONEY, S. J.; SKELTON, T. B. Identification and treatment of scurvy: a case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 100, n. 6, p. 688-692, 2005.

HALLIWELL, B. Oxidants and Human-Disease - Some New Concepts. **Faseb Journal**, v. 1, n. 5, p. 358-364, 1987.

HARKIN, A.; CONNOR, T. J.; WALSH, A.; ST JOHN, N.; KELLY, J. P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 5, p. 616-623, 2003.

HARKIN, A. J.; BRUCE, K. H.; CRAFT, B.; PAUL, I. A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur J Pharmacol**, v. 372, n. 3, p. 207-213, 1999.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 6, p. 719-730, 2009.

HARRO, J.; TONISSAAR, M.; ELLER, M.; KASK, A.; ORELAND, L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. **Brain Res**, v. 899, n. 1-2, p. 227-239, 2001.

HARRO, J.; ORELAND, L. Depression as a spreading adjustment disorder of monoaminergic neurons: a case for primary implication of the locus coeruleus. **Brain Res Rev**, v. 38, n. 1-2, p. 79-128, 2001.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310-1316, 2007.

HE, B.; MENG, Y. H.; MIVECHI, N. F. Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 11, p. 6624-6633, 1998.

- HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; ARMUTCU, F.; OZEN, M. E.; BULUT, M.; KAP, O.; YUMRU, M.; SAVAS, H. A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Arch Med Res**, v. 38, n. 2, p. 247-252, 2007.
- HO, Y. J.; CHANG, Y. C.; LIU, T. M.; TAI, M. Y.; WONG, C. S.; TSAI, Y. F. Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats. **Neurosci Lett**, v. 287, n. 2, p. 117-120, 2000.
- HOLSBOER, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477-501, 2000.
- HOWELL, K. R.; KUTIYANAWALLA, A.; PILLAI, A. Long-Term Continuous Corticosterone Treatment Decreases VEGF Receptor-2 Expression in Frontal Cortex. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p., 2011.
- HUETHER, G.; DOERING, S.; RUGER, U.; RUTHER, E.; SCHUSSLER, G. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Res**, v. 87, n. 1, p. 83-95, 1999.
- HYDE, J. S.; MEZULIS, A. H.; ABRAMSON, L. Y. The ABCs of depression: integrating affective, biological, and cognitive models to explain the emergence of the gender difference in depression. **Psychol Rev**, v. 115, n. 2, p. 291-313, 2008.
- INAN, S. Y.; YALCIN, I.; AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide mediated serotonin release and potassium channel modulation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 77, n. 3, p. 457-464, 2004.
- JACOBS, B. L.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 262-269, 2000.
- JAFARI ANARKOOL, I.; SANKIAN, M.; VAHEDI, F.; BONAKDARAN, S.; VARASTE, A. R.; HAGHIR, H. Evaluation of insulin and ascorbic acid effects on expression of Bcl-2 family proteins and caspase-3 activity in hippocampus of STZ-induced diabetic rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, n. 1, p. 133-140, 2009.
- JEONG, S. Y.; HA, T. S.; PARK, C. S.; UHM, D. Y.; CHUNG, S. W. Nitric oxide directly activates large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (rSlo). **Molecules and Cells**, v. 12, n. 1, p. 97-102, 2001.
- JEZOVA, D.; OLIVER, C.; JURCOVICOVA, J. Stimulation of Adrenocorticotropin but Not Prolactin and Catecholamine Release by N-Methyl-Aspartic Acid. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 5, p. 488-492, 1991.

JOCA, S. R. L.; GUIMARAES, F. S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 185, n. 3, p. 298-305, 2006.

JOELS, M.; KARST, H.; ALFAREZ, D.; HEINE, V. M.; QIN, Y.; VAN RIEL, E.; VERKUYL, M.; LUCASSEN, P. J.; KRUGERS, H. J. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 221-231, 2004.

KASTER, M. P.; ROSA, A. O.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 601-606, 2005a.

KASTER, M. P.; FERREIRA, P. K.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: Possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. **Behav Brain Res**, v. 165, n. 2, p. 204-209, 2005b.

KASTER, M. P.; BUDNI, J.; BINFARE, R. W.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 690-696, 2007.

KASTER, M. P.; GADOTTI, V. M.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-426, 2012.

KELLY, A.; LYNCH, M. A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 4, p. 643-651, 2000.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 499-503, 2003.

KENNEDY, S. G.; WAGNER, A. J.; CONZEN, S. D.; JORDAN, J.; BELLACOSA, A.; TSICHLIS, P. N.; HAY, N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. **Genes Dev**, v. 11, n. 6, p. 701-713, 1997.

KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N.; KHANZODE, S. S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report**, v. 8, n. 6, p. 365-370, 2003.



KHOVRIAKOV, A. V.; PODREZOVA, E. P.; KRUGLIAKOV, P. P.; SHIKHANOV, N. P.; BALYKOVA, M. N.; SEMIBRATOVA, N. V.; SOSUNOV, A. A.; MCKHANN, I. G.; AIRAPETIANTS, M. G. [Participation of NO-synthase system in the stress-mediated reactions of the brain]. **Morfologija**, v. 135, n. 2, p. 7-11, 2009.

KIERAN, N.; OU, X. M.; IYO, A. H. Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 469, n. 3, p. 380-384, 2010.

KIM, J. S.; SCHMID-BURGK, W.; CLAUS, D.; KORNHUBER, H. H. Increased serum glutamate in depressed patients. **Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten** v. 23, n., p. 299-304, 1982.

KIM, S. T.; CHOI, J. H.; CHANG, J. W.; KIM, S. W.; HWANG, O. Immobilization stress causes increases in tetrahydrobiopterin, dopamine, and neuromelanin and oxidative damage in the nigrostriatal system. **J Neurochem**, v. 95, n. 1, p. 89-98, 2005.

KIM, Y. K.; PAIK, J. W.; LEE, S. W.; YOON, D.; HAN, C.; LEE, B. H. Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1091-1096, 2006.

KOLB, E. [Some recent discoveries of metabolism and function of ascorbic acid]. **Z Gesamte Inn Med**, v. 45, n. 8, p. 205-210, 1990.

KONARSKA, M.; STEWART, R. E.; MCCARTY, R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. **Behav Neural Biol**, v. 53, n. 2, p. 231-243, 1990.

KOTAN, V. O.; SARANDOL, E.; KIRHAN, E.; OZKAYA, G.; KIRLI, S. Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 5, p. 1284-1290, 2011.

KOVACHICH, G. B.; MISHRA, O. P. The effect of ascorbic acid on malonaldehyde formation, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and water content of brain slices. **Exp Brain Res**, v. 50, n. 1, p. 62-68, 1983.

KOWALTOWSKI, A. J.; FENTON, R. G.; FISKUM, G. Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 11, p. 1845-1853, 2004.

KOWALTOWSKI, A. J.; FISKUM, G. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 3-4, p. 508-514, 2005.

KOZLOVSKY, N.; BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Lack of effect of acute, subchronic, or chronic stress on glycogen synthase kinase-3beta protein levels in rat frontal cortex. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, n. 7-8, p. 1309-1312, 2002.

KRASS, M.; WEGENER, G.; VASAR, E.; VOLKE, V. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behav Brain Res**, v. 218, n. 1, p. 57-63, 2011.

KUBERA, M.; MAES, M.; HOLAN, V.; BASTA-KAIM, A.; ROMAN, A.; SHANI, J. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. **J Affect Disord**, v. 63, n. 1-3, p. 171-178, 2001.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectr**, v. 10, n. 10, p. 808-819, 2005.

KUMAR, A.; GOYAL, R. Quercetin protects against acute immobilization stress-induced behaviors and biochemical alterations in mice. **J Med Food**, v. 11, n. 3, p. 469-473, 2008.

KUMAR, A.; GARG, R.; PRAKASH, A. K. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **BMC Complement Altern Med**, v. 10, n., p. 18, 2010.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 214, n. 4, p. 819-828, 2011.

KUMARI, B.; KUMAR, A.; DHIR, A. Protective effect of non-selective and selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations. **Pharmacological Reports**, v. 59, n. 6, p. 699-707, 2007.

KUO, C. H.; YOSHIDA, H. Ascorbic acid, an endogenous factor required for acetylcholine release from the synaptic vesicles. **Jpn J Pharmacol**, v. 30, n. 4, p. 481-492, 1980.

LARSEN, M. H.; MIKKELSEN, J. D.; HAY-SCHMIDT, A.; SANDI, C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 13, p. 808-816, 2010.

LEE, B. H.; LEE, S. W.; YOON, D.; LEE, H. J.; YANG, J. C.; SHIM, S. H.; KIM, D. H.; RYU, S. H.; HAN, C.; KIM, Y. K. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology**, v. 53, n. 3, p. 127-132, 2006.

LEE, C. H.; PARK, J. H.; YOO, K. Y.; CHOI, J. H.; HWANG, I. K.; RYU, P. D.; KIM, D. H.; KWON, Y. G.; KIM, Y. M.; WON, M. H. Pre- and post-treatments with escitalopram protect against experimental ischemic neuronal damage via regulation of BDNF expression and oxidative stress. **Exp Neurol**, v. 229, n. 2, p. 450-459, 2011.

LEE, H. J.; KIM, J. W.; YIM, S. V.; KIM, M. J.; KIM, S. A.; KIM, Y. J.; KIM, C. J.; CHUNG, J. H. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. **Mol Psychiatry**, v. 6, n. 6, p. 610, 725-618, 2001.

LEVENTOPOULOS, M.; RUSSIG, H.; FELDON, J.; PRYCE, C. R.; OPACKA-JUFFRY, J. Early deprivation leads to long-term reductions in motivation for reward and 5-HT1A binding and both effects are reversed by fluoxetine. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 3, p. 692-701, 2009.

LEVINE, J.; PANCHALINGAM, K.; RAPOPORT, A.; GERSHON, S.; MCCLURE, R. J.; PETTEGREW, J. W. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 7, p. 586-593, 2000.

LEVINE, M.; ASHER, A.; POLLARD, H.; ZINDER, O. Ascorbic acid and catecholamine secretion from cultured chromaffin cells. **J Biol Chem**, v. 258, n. 21, p. 13111-13115, 1983.

LI, N.; LEE, B.; LIU, R. J.; BANASR, M.; DWYER, J. M.; IWATA, M.; LI, X. Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R. S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-964, 2010.

LI, N.; LIU, R. J.; DWYER, J. M.; BANASR, M.; LEE, B.; SON, H.; LI, X. Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R. S. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-761, 2011.

LIN, Y. H.; LIU, A. H.; XU, Y.; TIE, L.; YU, H. M.; LI, X. J. Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas relative protein in rat brain and pancreas. **Behav Brain Res**, v. 165, n. 1, p. 63-71, 2005.

LOCKRIDGE, A.; SU, J.; YUAN, L. L. Abnormal 5-Ht Modulation of Stress Behaviors in the Kv4.2 Knockout Mouse. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1086-1097, 2010.

LODGE, N. J.; LI, Y. W. Ion channels as potential targets for the treatment of depression. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 11, n. 5, p. 633-641, 2008.

LOSCHER, W.; HONACK, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 215, n. 2-3, p. 199-208, 1992.

LU, X. Y.; KIM, C. S.; FRAZER, A.; ZHANG, W. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1593-1598, 2006.

LUCASSEN, P. J.; FUCHS, E.; CZECH, B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 8, p. 789-796, 2004.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; PEREIRA, J. G.; STERTZ, L.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic Mild Stress Paradigm Reduces Sweet Food Intake in Rats without Affecting Brain Derived Neurotrophic Factor Protein Levels. **Current Neurovascular Research**, v. 5, n. 4, p. 207-213, 2008.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 54, n. 5-6, p. 358-362, 2009a.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochem Int**, v. 54, n. 5-6, p. 358-362, 2009b.

LUCCA, G.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; GAVIOLI, E. C.; DAL PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. **J Psychiatr Res**, v. 43, n. 9, p. 864-869, 2009c.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Lett**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.

MADRIGAL, J. L. M.; OLIVENZA, R.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; RODRIGO, J.; LEZA, J. C. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 420-429, 2001.

MAES, M.; VERKERK, R.; VANDOOOLAEGHE, E.; LIN, A.; SCHARPE, S. Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsiveness. **Acta Psychiatr Scand**, v. 97, n. 4, p. 302-308, 1998.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible

contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-692, 2011.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-Induced Atrophy of Apical Dendrites of Hippocampal Ca<sup>3c</sup> Neurons - Involvement of Glucocorticoid Secretion and Excitatory Amino-Acid Receptors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 89-98, 1995.

MAJ, J.; ROGOZ, Z.; SKUZA, G.; SOWINSKA, H. Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 2, n. 1, p. 37-41, 1992.

MAJEWSKA, M. D.; BELL, J. A.; LONDON, E. D. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Res**, v. 537, n. 1-2, p. 328-332, 1990.

MAKINO, M.; KITANO, Y.; HIROHASHI, M.; TAKASUNA, K. Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. **Eur J Pharmacol**, v. 356, n. 1, p. 1-7, 1998.

MAKINO, M.; KITANO, Y.; KOMIYAMA, C.; HIROHASHI, M.; TAKASUNA, K. Involvement of central opioid systems in human interferon-alpha induced immobility in the mouse forced swimming test. **Br J Pharmacol**, v. 130, n. 6, p. 1269-1274, 2000.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 541-547, 2001.

MANJI, H. K.; QUIROZ, J. A.; SPORN, J.; PAYNE, J. L.; DENICOFF, K.; N, A. G.; ZARATE, C. A., JR.; CHARNEY, D. S. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8, p. 707-742, 2003.

MANOLI, L. P.; GAMARO, G. D.; SILVEIRA, P. P.; DALMAZ, C. Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. **Neurochem Res**, v. 25, n. 7, p. 915-921, 2000.

MANTOVANI, M.; PERTILE, R.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett**, v. 343, n. 1, p. 1-4, 2003.

MARTINO, J. C.; YOULE, R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Dev Cell**, v. 21, n. 1, p. 92-101, 2011.

MATHEW, S. J.; KEEGAN, K.; SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. **Revista Brasileira De Psiquiatria**, v. 27, n. 3, p. 243-248, 2005.

MAURI, M. C.; FERRARA, A.; BOSCATI, L.; BRAVIN, S.; ZAMBERLAN, F.; ALECCI, M.; INVERNIZZI, G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 3, p. 124-129, 1998.

MAYER, A.; SZASZ, B. K.; KISS, J. P. Inhibitory effect of antidepressants on the NMDA-evoked [(3)H]noradrenaline release from rat hippocampal slices. **Neurochem Int**, v. 55, n. 6, p. 383-388, 2009.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**, v. 133 Suppl 3, n., p. 933S-940S, 2003.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 3, p. 436-452, 2006.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radic Biol Med**, v. 5, n. 5-6, p. 363-369, 1988.

MICHEL, T. M.; FRANGOU, S.; THIEMEYER, D.; CAMARA, S.; JECHEL, J.; NARA, K.; BRUNKLAUS, A.; ZOECHLING, R.; RIEDERER, P. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder--a postmortem study. **Psychiatry Res**, v. 151, n. 1-2, p. 145-150, 2007.

MILBY, K.; OKE, A.; ADAMS, R. N. Detailed mapping of ascorbate distribution in rat brain. **Neurosci Lett**, v. 28, n. 1, p. 15-20, 1982.

MINEUR, Y. S.; BELZUNG, C.; CRUSIO, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 1, p. 43-50, 2006.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; MAEDA, K.; ASHBY, C. R., JR.; KAWAHARA, R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1155-1158, 2006.

MOGHADDAM, B. Stress Preferentially Increases Extraneuronal Levels of Excitatory Amino-Acids in the Prefrontal Cortex - Comparison to Hippocampus and Basal Ganglia. **J Neurochem**, v. 60, n. 5, p. 1650-1657, 1993.

MUIR, K. W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 53-60, 2006.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 115-127, 2008.

MUTLU, O.; GUMUSLU, E.; ULAK, G.; CELIKYURT, I. K.; KOKTURK, S.; KIR, H. M.; AKAR, F.; ERDEN, F. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. **Life Sciences**, v., n., p., 2012.

NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutr J**, v. 2, n., p. 7, 2003.

NASEER, M. I.; ULLAH, N.; ULLAH, I.; KOH, P. O.; LEE, H. Y.; PARK, M. S.; KIM, M. O. Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons. **Synapse**, v. 65, n. 7, p. 562-571, 2011.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336-342, 1996.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, v. 5, n., p. 1068-1070, 2002.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008.

NG, Y. C.; AKERA, T.; HAN, C. S.; BRASELTON, W. E.; KENNEDY, R. H.; TEMMA, K.; BRODY, T. M.; SATO, P. H. Ascorbic acid: an endogenous inhibitor of isolated Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, n. 14, p. 2525-2530, 1985.

NGUYEN, R. T.; COWLEY, D. M.; MUIR, J. B. Scurvy: a cutaneous clinical diagnosis. **Australas J Dermatol**, v. 44, n. 1, p. 48-51, 2003.

OELRICHS, B. A.; KELLY, J. D.; KRATZING, C. C.; WINZOR, D. J. Accumulation of ascorbate in rat cerebellum. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 58, n. 2, p. 213-217, 1988.

OLESEN, J.; LEONARDI, M. The burden of brain diseases in Europe. **Eur J Neurol**, v. 10, n. 5, p. 471-477, 2003.

OLIVEIRA, R. M.; GUIMARAES, F. S.; DEAKIN, J. F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 4, p. 333-341, 2008.

OZCAN, M. E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 19, n. 2, p. 89-95, 2004.

PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J. H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **J Am Coll Nutr**, v. 22, n. 1, p. 18-35, 2003.

PADAYATTY, S. J.; SUN, H.; WANG, Y.; RIORDAN, H. D.; HEWITT, S. M.; KATZ, A.; WESLEY, R. A.; LEVINE, M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 7, p. 533-537, 2004.

PADAYATTY, S. J.; RIORDAN, H. D.; HEWITT, S. M.; KATZ, A.; HOFFER, L. J.; LEVINE, M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n. 7, p. 937-942, 2006.

PAPP, M.; MORYL, E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. **Eur J Pharmacol**, v. 263, n. 1-2, p. 1-7, 1994.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biol Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 391-404, 2001.

PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, 2012.

PARK, S. H.; SIM, Y. B.; HAN, P. L.; LEE, J. K.; SUH, H. W. Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercitrin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Exp Neurobiol**, v. 19, n. 1, p. 30-38, 2010.

PEETERS, B. W. M. M.; BROEKKAMP, C. L. E. Involvement of Corticosteroids in the Processing of Stressful Life-Events - a Possible Implication for the



Development of Depression. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 4-6, p. 417-427, 1994.

PETERKOFISKY, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. **Am J Clin Nutr**, v. 54, n. 6 Suppl, p. 1135S-1140S, 1991.

POLESZAK, E.; WLAZ, P.; KEDZIERSKA, E.; NIEOCZYM, D.; WYSKA, E.; SZYMURA-OLEKSIK, J.; FIDECKA, S.; RADZIWON-ZALESKA, M.; NOWAK, G. Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 5, p. 746-752, 2006.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PREDIGER, M. E.; GAMARO, G. D.; CREMA, L. M.; FONTELLA, F. U.; DALMAZ, C. Estradiol protects against oxidative stress induced by chronic variate stress. **Neurochem Res**, v. 29, n. 10, p. 1923-1930, 2004.

PREHN, J. H.; BINDOKAS, V. P.; MARCUCCILLI, C. J.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; MILLER, R. J. Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 26, p. 12599-12603, 1994.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-1130, 2011.

PRUUS, K.; RUDISSAAR, R.; ALLIKMETS, L.; HARRO, J. The effect of the NMDA receptor antagonist dizocilpine on behavioral manifestations of serotonin and adrenergic antidepressants in rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 32, n. 2, p. 123-128, 2010.

QIU, S.; LI, L.; WEEBER, E. J.; MAY, J. M. Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 5, p. 1046-1056, 2007.

REAGAN, L. P.; ROSELL, D. R.; WOOD, G. E.; SPEDDING, M.; MUNOZ, C.; ROTHSTEIN, J.; MCEWEN, B. S. Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: Reversal by tianeptine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2179-2184, 2004.

REBEC, G. V.; PIERCE, R. C. A Vitamin as Neuromodulator - Ascorbate Release into the Extracellular Fluid of the Brain Regulates Dopaminergic and Glutamatergic Transmission. **Prog Neurobiol**, v. 43, n. 6, p. 537-565, 1994.

REBOUCHE, C. J. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. **Am J Clin Nutr**, v. 54, n. 6 Suppl, p. 1147S-1152S, 1991.

REUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; KIRSCH, T. R.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F.; ROESLER, R.; QUEVEDO, J. Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 6, p. 585-589, 2010.

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 5, p. 209-216, 2000.

ROGOZ, Z.; SKUZA, G.; MAJ, J.; DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p. 1024-1030, 2002.

ROSA, A. O.; LIN, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav Brain Res**, v. 144, n. 1-2, p. 87-93, 2003.

ROSA, K. A.; GADOTTI, V. M.; ROSA, A. O.; RODRIGUES, A. L.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neurosci Lett**, v. 381, n. 1-2, p. 185-188, 2005.

RUDIN, C. M.; YANG, Z.; SCHUMAKER, L. M.; VANDERWEELE, D. J.; NEWKIRK, K.; EGORIN, M. J.; ZUHOWSKI, E. G.; CULLEN, K. J. Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. **Cancer Res**, v. 63, n. 2, p. 312-318, 2003.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63-77, 2012.

SANTOS, I. M.; TOME ADA, R.; SALDANHA, G. B.; FERREIRA, P. M.; MILITAO, G. C.; FREITAS, R. M. Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 4, p. 214-221, 2009.

SCHECHTER, L. E. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [3H]5-

hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 1, p. 262-270, 1997.

SCHREIBER, M.; TROJAN, S. Ascorbic-Acid in the Brain. **Physiological Research**, v. 40, n. 4, p. 413-418, 1991.

SEREGI, A.; SCHAEFER, A.; KOMLOS, M. Protective role of brain ascorbic acid content against lipid peroxidation. **Experientia**, v. 34, n. 8, p. 1056-1057, 1978.

SHAHANI, N.; SAWA, A. Protein S-nitrosylation: Role for nitric oxide signaling in neuronal death. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1820, n. 6, p. 736-742, 2012.

SIES, H. Strategies of Antioxidant Defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILBERMAN, D. M.; AYELLI-EDGAR, V.; ZORRILLA-ZUBILETE, M.; ZIEHER, L. M.; GENARO, A. M. Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. **Brain Behavior and Immunity**, v. 18, n. 1, p. 81-90, 2004.

SKOLNICK, P.; MILLER, R.; YOUNG, A.; BOJE, K.; TRULLAS, R. Chronic Treatment with 1-Aminocyclopropanecarboxylic Acid Desensitizes Behavioral-Responses to Compounds Acting at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Complex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 107, n. 4, p. 489-496, 1992.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.

SKUZA, G.; ROGOZ, Z. Signal receptor antagonists attenuate antidepressant-like effect induced by co-administration of 1,3 di-o-tolylguanidine (DTG) and memantine in the forced swimming test in rats. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 1149-1152, 2003.

SOROLLA, M. A.; RODRIGUEZ-COLMAN, M. J.; VALL-LLAURA, N.; TAMARIT, J.; ROS, J.; CABISCOL, E. Protein oxidation in Huntington disease. **Biofactors**, v. 38, n. 3, p. 173-185, 2012.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The Tail Suspension Test - a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STOGER, H.; WILDERS-TRUSCHNIG, M.; SCHMID, M.; PETEK, W.; SAMONIGG, H. [Scurvy after a suicide attempt by starvation]. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 119, n. 16, p. 589-592, 1994.

STRICKLAND, P. L.; DEAKIN, J. F.; PERCIVAL, C.; DIXON, J.; GATER, R. A.; GOLDBERG, D. P. Bio-social origins of depression in the community. Interactions between social adversity, cortisol and serotonin neurotransmission. **Br J Psychiatry**, v. 180, n., p. 168-173, 2002.

STRIJBOS, P. J. L. M.; LEACH, M. J.; GARTHWAITE, J. Vicious cycle involving Na<sup>+</sup> channels, glutamate release, and NMDA receptors mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 16, p. 5004-5013, 1996.

SU, Z.; LIMBERIS, J.; MARTIN, R. L.; XU, R.; KOLBE, K.; HEINEMANN, S. H.; HOSHI, T.; COX, B. F.; GINTANT, G. A. Functional consequences of methionine oxidation of hERG potassium channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 702-711, 2007.

SUNG, Y. H.; SHIN, M. S.; CHO, S.; BAIK, H. H.; JIN, B. K.; CHANG, H. K.; LEE, E. K.; KIM, C. J. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 470, n. 1, p. 86-90, 2010.

SUTTON, G.; CHANDLER, L. J. Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. **J Neurochem**, v. 82, n. 5, p. 1097-1105, 2002.

SZASZ, B. K.; MIKE, A.; KAROLY, R.; GEREVICH, Z.; ILLES, P.; VIZI, E. S.; KISS, J. P. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1303-1309, 2007.

TAGLIARI, B.; NOSCHANG, C. G.; FERREIRA, A. G.; FERRARI, O. A.; FEKSA, L. R.; WANNMACHER, C. M.; DALMAZ, C.; WYSE, A. T. Chronic variable stress impairs energy metabolism in prefrontal cortex and hippocampus of rats: prevention by chronic antioxidant treatment. **Metab Brain Dis**, v. 25, n. 2, p. 169-176, 2010.

TARDITO, D.; MILANESE, M.; BONIFACINO, T.; MUSAZZI, L.; GRILLI, M.; MALLEI, A.; MOCAER, E.; GABRIEL-GRACIA, C.; RACAGNI, G.; POPOLI, M.; BONANNO, G. Blockade of stress-induced increase of glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex by agomelatine involves synergy between melatonergic and 5-HT<sub>2C</sub> receptor-dependent pathways. **BMC Neurosci**, v. 11, n., p. 68, 2010.

TAYLOR, C.; FRICKER, A. D.; DEVI, L. A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, n. 5, p. 549-557, 2005.

TENNANT, C. Life events, stress and depression: a review of recent findings. **Aust N Z J Psychiatry**, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2002.

TOKER, A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. **Mol Pharmacol**, v. 57, n. 4, p. 652-658, 2000.

TOUMA, C. Stress and affective disorders: animal models elucidating the molecular basis of neuroendocrine-behavior interactions. **Pharmacopsychiatry**, v. 44 Suppl 1, n., p. S15-26, 2011.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional Antagonists at the Nmda Receptor Complex Exhibit Antidepressant Actions. **Eur J Pharmacol**, v. 185, n. 1, p. 1-10, 1990.

TRULLAS, R.; FOLIO, T.; YOUNG, A.; MILLER, R.; BOJE, K.; SKOLNICK, P. 1-aminocyclopropanecarboxylates exhibit antidepressant and anxiolytic actions in animal models. **Eur J Pharmacol**, v. 203, n. 3, p. 379-385, 1991.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VAN RIEL, E.; MEIJER, O. C.; STEENBERGEN, P. J.; JOELS, M. Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 649-658, 2003.

VOLETI, B.; DUMAN, R. S. The roles of neurotrophic factor and Wnt signaling in depression. **Clin Pharmacol Ther**, v. 91, n. 2, p. 333-338, 2012.

VREEBURG, S. A.; HOOGENDIJK, W. J.; VAN PELT, J.; DERIJK, R. H.; VERHAGEN, J. C.; VAN DYCK, R.; SMIT, J. H.; ZITMAN, F. G.; PENNING, B. W. Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 617-626, 2009.

WEGENER, G.; VOLKE, V.; HARVEY, B. H.; ROSENBERG, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Res**, v. 959, n. 1, p. 128-134, 2003.

WILKINSON, M. B.; DIAS, C.; MAGIDA, J.; MAZEI-ROBISON, M.; LOBO, M.; KENNEDY, P.; DIETZ, D.; COVINGTON, H., 3RD; RUSSO, S.; NEVE, R.; GHOSE, S.; TAMMINGA, C.; NESTLER, E. J. A novel role of the WNT-dishevelled-GSK3beta signaling cascade in the mouse nucleus accumbens in a social defeat model of depression. **J Neurosci**, v. 31, n. 25, p. 9084-9092, 2011.

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, n. 3, p. 358-364, 1987.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-534, 1992.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-329, 1997.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-351, 2001.

WU, G.; MORRIS, S. M., JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336 ( Pt 1), n., p. 1-17, 1998.

YANG, C. H.; HUANG, C. C.; HSU, K. S. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4288-4293, 2005.

YANG, D. Y.; LIU, X.; ZHANG, R. F.; CHENG, K.; MU, J.; FANG, L.; XIE, P. Increased apoptosis and different regulation of pro-apoptosis protein bax and anti-apoptosis protein bcl-2 in the olfactory bulb of a rat model of depression. **Neurosci Lett**, v. 504, n. 1, p. 18-22, 2011.

YANG, P. C.; YANG, C. H.; HUANG, C. C.; HSU, K. S. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2631-2643, 2008.

YAO, J. K.; KESHAVAN, M. S. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 7, p. 2011-2035, 2011.

YILDIZ, F.; ERDEN, B. F.; ULAK, G.; UTKAN, T.; GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 149, n. 1, p. 41-44, 2000.

YOUNG, L. T. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. **J Psychiatry Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 8-9, 2002.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 220-228, 2009a.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: A putative target of antidepressant action. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 220-228, 2009b.

ZAFIR, A.; BANU, N. Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. **Indian J Biochem Biophys**, v. 46, n. 1, p. 53-58, 2009.

ZARATE, C., JR.; MACHADO-VIEIRA, R.; HENTER, I.; IBRAHIM, L.; DIAZGRANADOS, N.; SALVADORE, G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harv Rev Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 293-303, 2010.

ZARATE, C. A., JR.; SINGH, J. B.; CARLSON, P. J.; BRUTSCHE, N. E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D. A.; CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-864, 2006.

ZHANG, X.; MIAO, Y. C.; AN, G. Y.; ZHOU, Y.; SHANGGUAN, Z. P.; GAO, J. F.; SONG, C. P. K<sup>+</sup> channels inhibited by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in Vicia guard cells. **Cell Res**, v. 11, n. 3, p. 195-202, 2001.

ZHAO, Y.; ALTMAN, B. J.; COLOFF, J. L.; HERMAN, C. E.; JACOBS, S. R.; WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; DIMASCIO, L. N.; ILKAYEVA, O.; KELEKAR, A.; REYA, T.; RATHMELL, J. C. Glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  and 3 $\beta$  mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 12, p. 4328-4339, 2007.

ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D.; GABILAN, N. H.; RODRIGUES, A. L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2010.





**ANEXO A****Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test**

Manuscrito completo publicado no periódico  
*Behavioural Brain Research*

Morgana Moretti, Andiará Espindola de Freitas, Josiane Budni, Sinara Castellen Pereira Fernandes, Grasiela de Oliveira Balen, Ana Lúcia Severo Rodrigues



**ANEXO B****Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test**

Manuscrito completo publicado no periódico  
*European Journal of Pharmacology*.

Morgana Moretti, Josiane Budni, Camille Mertins Ribeiro, Ana Lúcia S.  
Rodrigues



**ANEXO C****Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress**

Manuscrito completo publicado no periódico  
*Journal of Psychiatric Research*

Morgana Moretti, André Colla, Grasiela de Oliveira Balen, Danúbia Bonfanti dos Santos, Josiane Budni, Andiara Espíndola de Freitas, Marcelo Farina, Ana Lúcia Severo Rodrigues



**ANEXO D****Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status  
of restraint-stressed mice**

Manuscrito completo publicado no periódico  
*Journal of Molecular Neuroscience*

Morgana Moretti, Josiane Budni, Danubia Bonfanti dos Santos,  
Alessandra Antunes, Juliana Felipe Daufenbach, Luana Meller  
Manosso, Marcelo Farina, Ana Lúcia S. Rodrigues

