

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

Priscila Batista da Rosa

**Efeitos tipo-antidepressivos do ácido ascórbico e da
cetamina envolvem a modulação de receptores
GABAérgicos**

**Florianópolis
Agosto de 2016**

Priscila Batista da Rosa

**Efeitos tipo-antidepressivos do ácido ascórbico e da cetamina
envolvem a modulação de receptores GABAérgicos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Severo
Rodrigues

Florianópolis
Agosto de 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa , Priscila Batista

Efeitos tipo-antidepressivos do ácido ascórbico e da
cetamina envolvem a modulação de receptores GABAérgicos /
Priscila Batista Rosa ; orientadora, Ana Lúcia Severo
Rodrigues - Florianópolis, SC, 2016.

89 p.

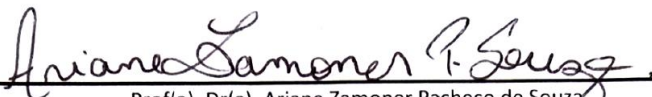
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Depressão. 3. Ácido ascórbico. 4.
Cetamina. 5. GABA. I. Severo Rodrigues, Ana Lúcia. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. III. Título.

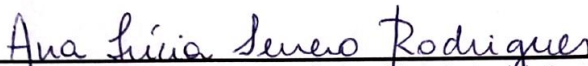
Priscila Batista da Rosa

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (23/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

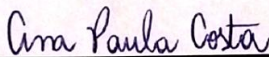
Banca examinadora:



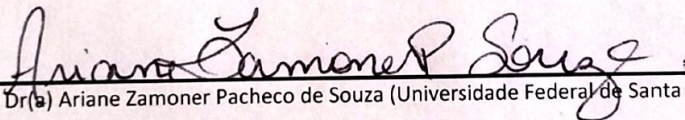
Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Débora Kurrle Rieger Venske (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ana Paula Costa (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 03 de Agosto de 2016.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo
mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos aos meus pais, Nerivane e Pedro, os quais são os responsáveis por eu estar aqui hoje, essa conquista não é minha, é nossa! Obrigada por todo apoio, carinho e dedicação incondicional para que eu alcançasse meus objetivos. Serei eternamente grata!

Ao meu amor, Fabricio, aquele que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos sempre acreditando em mim, mais do que eu mesma, seu apoio e seu amor foram fundamentais para essa conquista!

À Professora Ana Lúcia, pela oportunidade, pelo apoio e orientação. Seus ensinamentos são valiosos e me motivam a aprender sempre mais e mais, sua confiança me motivou a aceitar os novos desafios.

Aos amigos que o laboratório me deu: Morgs, Vivi, Camis e Luis vocês foram especiais dentro do laboratório, me passando todos os ensinamentos possíveis e contribuindo diretamente para o meu trabalho, e foram ainda mais especiais fora dele, onde eu descobri amizades verdadeiras que quero levar pra sempre comigo.

Aos meus amigos de sempre e para sempre: Alexandre, Karol, Mari e Sara, mesmo de longe vocês sempre me motivaram mesmo não entendendo o que eu faço, vocês são peças chaves na minha conquista.

Aos colegas do LANED que de alguma forma contribuíram para a viabilização deste trabalho e também aos colegas e professores dos laboratórios da bioquímica em geral, os quais sempre nos ajudam da melhor maneira possível.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica e da Neuro, meus sinceros agradecimentos por todo conhecimento repassado por vocês!

A todas as pessoas da minha família e amigos que torceram por mim, muito obrigada!

Aos animais utilizados nesse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

RESUMO

O transtorno depressivo maior (depressão) é um transtorno de humor e o principal responsável pelos casos de incapacitação no mundo, além de estar relacionado a uma série de comorbidades, sendo também uma das principais causas de morte relacionadas ao suicídio. Estudos têm sugerido que uma desregulação dos níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA), o principal aminoácido neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), pode estar envolvido na fisiopatologia da depressão. Adicionalmente, tem sido postulado que o óxido nítrico (NO), o qual é produzido de forma enzimática pela óxido nítrico sintase (NOS) ou de modo não enzimático a partir da redução do nitrito a NO pelo ascorbato liberado das células neuronais durante a captação de glutamato, está relacionado com patologias do SNC, incluindo a depressão, e a modulação da atividade da NOS pode ser importante no mecanismo de ação de antidepressivos, pois essa molécula parece exercer tanto efeitos pró-depressivos como antidepressivos. Estudos sugerem ainda, que uma inibição da via nitrérgica estaria relacionada com a ativação dos receptores GABAérgicos (subtipo GABA_A), podendo ser esse um dos mecanismos responsáveis pela ação tipo-antidepressiva de compostos que modulam a atividade desses receptores. O tratamento da depressão disponível atualmente apresenta várias limitações, o que tem levado à investigação de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, estudos têm apontado que o ácido ascórbico (vitamina C) possui efeitos tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico em testes comportamentais e supostamente compartilha de mecanismos de ação similares ao da cetamina (antagonista de receptores NMDA, considerado um antidepressivo de ação rápida). Assim objetivo desse estudo foi investigar o envolvimento dos receptores GABA_A e GABA_B no efeito-tipo antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina no teste da suspensão pela cauda (TSC), bem como sua relação com o sistema nitrérgico. Para investigar o envolvimento do sistema GABAérgico no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina no TSC, os camundongos foram tratados com uma dose subativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo e 30 minutos após receberam uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, i.p., agonista de receptor GABA_A). Em outro protocolo experimental, os camundongos foram tratados com uma dose ativa de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou veículo e 30 minutos depois receberam baclofen (1 mg/kg, i.p., agonista de receptor GABA_B). Os resultados mostraram que a administração de ácido

ascórbico ou cetamina combinados com a administração de muscimol produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC. Além disso, os efeitos tipo-antidepressivos do ácido ascórbico e da cetamina foram prevenidos pelo tratamento com baclofen. Nenhuma alteração locomotora foi observada nos diferentes grupos experimentais. Esses resultados indicam que o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico e da cetamina no TSC pode envolver uma ativação de receptores GABA_A e uma possível inibição de receptores GABA_B. Ainda, resultados adicionais mostraram que o tratamento com ácido ascórbico na dose de 0,1 mg/kg e a cetamina na dose de 1 mg/kg promoveram um aumento no conteúdo de NOx (derivados de NO, nitrito e nitrato) no córtex cerebral, e o efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada do ácido ascórbico ou cetamina com muscimol foi revertida pela administração da L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor de NO). Também foi observado um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC no grupo de animais que recebeu a combinação L-arginina + ácido ascórbico ou cetamina. Adicionalmente foi observado um aumento do conteúdo de NOx no grupo tratado com ácido ascórbico + muscimol. No grupo tratado com muscimol isoladamente houve uma redução no conteúdo de NOx. Concluímos que o efeito antidepressivo do ácido ascórbico e a cetamina envolve uma modulação do sistema GABAérgico e dos níveis de NO no córtex cerebral.

Palavras chave: Depressão, ácido ascórbico, cetamina, GABA, óxido nítrico.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD; depression) is a mood disorder primarily responsible for the cases of disability in the world, besides being related to a number of comorbidities, also being one of the leading causes of death related to suicide. It has been suggested that dysregulation of γ -aminobutyric acid (GABA)-mediated neurotransmission is involved in the etiology of MDD. In addition, it has been proposed that nitric oxide is implicated in several brain disorders, including MDD and that modulation of nitric oxide synthase is involved in the mechanisms underlying the antidepressant effects of several compounds. NO is produced enzymatically by nitric oxide synthase (NOS) or non-enzymatically through reduction of nitrite to NO by ascorbate released from neuronal cells during glutamate uptake. It has been also suggested that antidepressant responses may be related to the activation of GABA_A receptors with the consequent inhibition of nitrergic system. The currently available treatment of MDD has several limitations, which has led to the investigation of new therapeutic strategies. In this context, several studies have shown that ascorbic acid, (vitamin C) has antidepressant-like and anxiolytic-like effects in behavioral tests, and presumably shares similar mechanisms of action to those elicited by ketamine (NMDA receptor antagonist, considered a fast-acting antidepressant). Therefore, this study sought to evaluate the involvement of GABA_A and GABA_B receptors in the antidepressant-like effect of ascorbic acid and ketamine in the tail suspension test (TST) and the possible role of the nitrergic system in the effects of these compounds. To investigate the involvement of GABA_A in the antidepressant-like effect of ascorbic acid and ketamine in the TST, mice were treated with a sub-effective dose of ascorbic acid (0.1 mg/kg, p.o.), ketamine (0.1 mg/kg, i.p.) or vehicle and 30 minutes later, a sub-effective dose of muscimol (0.1 mg/kg, i.p., GABA_A receptor agonist) or vehicle was administered. In another set of experiments, mice were treated with ascorbic acid (1 mg/kg, p.o., active dose in the TST) or vehicle and 30 minutes later, baclofen (1 mg/kg, i.p., GABA_B receptor agonist) was administered. A similar experimental protocol was performed with ketamine (1 mg/kg, i.p.). The administration of muscimol combined with ascorbic acid or ketamine produced a synergistic antidepressant-like effect in the TST. Moreover, the antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine were abolished by baclofen. There was no alteration in spontaneous locomotion in any experimental group. Results indicate that the anti-immobility effect of

ascorbic acid and ketamine in TST may involve an activation of GABA_A receptors and a possible inhibition of GABA_B receptors. Further results showed that treatment with ascorbic acid (0.1 mg/kg) and ketamine (1 mg/kg) caused an increase in cerebrocortical NO_x content (total amount of NO metabolites). The synergistic antidepressant-like effect induced by combined administration of ascorbic acid or ketamine with muscimol was reversed by the administration of L-arginine (750 mg/kg, i.p., precursor of NO). Finally a synergistic antidepressant-like effect in the TST was observed in the group of animals that received L-arginine + ascorbic acid or ketamine. Additionally an increased NO_x content was observed in the group treated with ascorbic acid + muscimol. In the group treated with muscimol alone, a reduction in NO_x content was shown. Altogether, the results suggest that the antidepressant-like effect of ascorbic acid and ketamine are dependent, at least in part, on the modulation of either GABAergic system and cerebrocortical NO levels.

Keywords: Depression, ascorbic acid, ketamine, GABA, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teoria monoaminérgica da depressão	25
Figura 2 - Sistema GABAérgico	28
Figura 3 - Via da L-arginina-óxido nítrico (NO)	30
Figura 4 - Formação do NO via redução do nitrito	32
Figura 5 - Bioquímica do ácido ascórbico	35
Figura 6 - Captação e metabolismo do ascorbato no SNC.....	36
Figura 7 - Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	46
Figura 8 - Teste do campo aberto (TCA).....	46
Figura 9 - Protocolos experimentais para avaliação do envolvimento dos receptores GABAérgicos no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico	51
Figura 10 - Protocolos experimentais para avaliação dos níveis de NO _x no efeito antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina.....	52
Figura 11 - Protocolos experimentais para avaliação dos níveis de NO _x e sua relação com a modulação de receptores GABA _A em animais tratados com L-arginina	52
Figura 12 - Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico e cetamina em doses subativas e ativas no TSC e TCA	54
Figura 13 - Avaliação dos níveis de NO _x em animais tratados agudamente com ácido ascórbico e cetamina.....	55
Figura 14 - Correlação μM de nitrito/mg proteína x tempo de imobilidade (TSC).....	56
Figura 15 - Uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina combinada com uma dose subativa de muscimol (agonista de receptor GABA _A) promove um efeito tipo-antidepressivo no TSC	58
Figura 16 - A ativação de receptores GABA _B reverte o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina no TSC.....	60
Figura 17 - Efeito do tratamento agudo com L-arginina em animais tratados com uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina com uma dose subativa de muscimol no TSC e TCA	63
Figura 18 - Principais mecanismos responsáveis pelo efeito antidepressivo do ácido ascórbico.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela utilizada para o diagnóstico da depressão	24
Tabela 2 - Valores de F e p do experimento com L-arginina x muscimol x ácido ascórbico.....	62
Tabela 3 - Valores de F e p do experimento com L-arginina x muscimol x cetamina	62
Tabela 4 - Valores de F e p sobre avaliação do conteúdo de NOx no experimento com L-arginina x muscimol x ácido ascórbico	65
Tabela 5 - Valores de F e p sobre avaliação do conteúdo de NOx no experimento com L-arginina x muscimol x cetamina.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** - hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA - análise de variância
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP - Adenosina trifosfato
ASC - Ascorbato
CREB - Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc
DHA - Ácido desidroascórbico
EE2 - 17 α -etinilestradiol
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GAD - Glutamato descarboxilase
GAT - Transportadores específicos de GABA
GABA-T - GABA transaminase
SSA - Semi-aldeído succínico
VGAT - Transportador de GABA
GCs - Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc - guanosina 5'-monofosfato cíclico
GTP - guanosina 5'-trifosfato
GLUT - Transportadores de glicose
I.c.v. - Intracerebroventricular
I.p. - Intraperitoneal
NADPH - Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMA - N-Metil-D,L-aspartato
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
OMS - Organização Mundial de Saúde
P.o. - Per oral (via oral)
PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase
SNC - Sistema Nervoso Central
SVCT - Transportadores de vitamina C dependentes de sódio
SVTC2 - Transportadores de vitamina C dependentes de sódio tipo 2
TNF - Teste do nado forçado
TrkB - Receptor de tropomiosina cinase B
TSC - Teste da suspensão da cauda

LISTA DE PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DA DISSERTAÇÃO:

Publicações relacionadas à dissertação:

PRISCILA B. ROSA, VIVIAN B. NEIS, CAMILLE M. RIBEIRO, MORGANA MORETTI, ANA LÚCIA S. RODRIGUES. Antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine involve modulation of GABAA and GABAB receptors. **Pharmacological Reports**, v.68 p. 996–1001, 2016.

Publicações como co-autor durante o período do mestrado:

MORETTI M., NEIS, V. B., MATHEUS, F. C., CUNHA, M. P., ROSA, P. B., RIBEIRO, C. M., RODRIGUES, A. L. S, PREDIGER, R. D. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). **Neurotox Res**, v.28 p. 222-31, 2015.

NEIS, V. B., MORETTI, M, BETTIO, L. E., RIBEIRO, C. M, ROSA, P. B., GONÇALVES, F. M., LOPES, M. W., LEAL, R. B., RODRIGUES, A. L. S. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **European Neuropsychopharmacology**. v.26 p.959-71 , 2016.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	23
1.1 Transtorno depressivo maior	23
1.2 Sistema GABAérgico	26
1.2.1 Sistema GABAérgico e depressão.....	29
1.3 Via da L-arginina-óxido nítrico (NO).....	29
1.3.1 Via da L-arginina-NO e a depressão.....	32
1.4 Ácido ascórbico	34
1.4.1 Ácido ascórbico e depressão.....	37
1.5 Cetamina	39
2 JUSTIFICATIVA.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Animais.....	45
4.2 Testes comportamentais.....	45
4.2.1 Teste da suspensão pela cauda (TSC).....	45
4.2.2 Teste do campo aberto (TCA)	45
4.3 Análises bioquímicas	47
4.3.1 Análise de NOx.....	47
4.4 Análise estatística	47
4.5 Protocolos experimentais	48
4.5.1 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA _A no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e cetamina.....	48
4.5.2 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA _B no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e cetamina.....	48
4.5.3 Avaliação do conteúdo de NOx no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina.....	49
4.5.4 Avaliação dos níveis de NOx e sua relação com a modulação de receptores GABA _A em animais tratados com L-arginina.....	49
5 Resultados.....	53

5.1 Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico e cetamina em doses subativas e ativas no TSC e TCA	53
5.2 Avaliação do conteúdo cerebrocortical de NO _x em animais tratados agudamente com ácido ascórbico e cetamina.	54
5.3 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA _A na atividade antidepressiva do ácido ascórbico ou cetamina	57
5.4 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA _B na atividade antidepressiva do ácido ascórbico ou cetamina	59
5.5 Influência do tratamento com L-arginina sobre o tempo de imobilidade no TSC e a atividade locomotora de camundongos tratados com a combinação de doses sub-ativas ácido ascórbico ou cetamina	61
5.6 Avaliação do conteúdo de NO _x em animais tratados com L-arginina que receberam uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina em combinação com uma dose subativa de muscimol.....	64
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÕES.....	75
8 PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno depressivo maior

O transtorno depressivo maior, que nesse trabalho será tratado como depressão, é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um transtorno de humor caracterizado por uma desregulação das funções afetivas e motivacionais, tendo como principais sintomas o humor deprimido e comportamento anedônico (diminuição da capacidade de sentir prazer em atividades antes consideradas prazerosas). Essas alterações de humor estão comumente associadas a outras características, como: irritabilidade, tristeza, sentimento de culpa ou baixa autoestima, distúrbios do sono ou apetite, sensação de cansaço, falta de concentração, disfunção cognitiva, alterações metabólicas, endócrinas e inflamatórias (NESTLER et al., 2002; LANG E BORGWARDT, 2013). O diagnóstico da depressão é realizado mediante a observação clínica do paciente e seguindo as diretrizes da Associação Americana de Psiquiatria. Para caracterizar o diagnóstico de depressão, o indivíduo deve apresentar no mínimo cinco dos sintomas listados na Tabela 1, por um período de pelo menos duas semanas, sendo necessário que pelo menos um dos sintomas do paciente seja humor deprimido ou anedonia.

A depressão é a principal responsável pelos casos de incapacitação no mundo, está diretamente relacionada a uma série de comorbidades, sendo também uma das principais causas de morte relacionadas ao suicídio (COLLINS et al., 2011; ISOMETSA et al., 2014). Estima-se que cerca de 17 % da população mundial possa desenvolver depressão ao longo da vida (KIECOLT-GLASER E GLASER, 2002; KESSLER et al., 2012) e segundo a OMS, esse transtorno afeta em torno de 350 milhões de pessoas ao redor do mundo atualmente.

Em um estudo recente realizado por MUNHOZ e colaboradores (2016) foi estimado que no Brasil cerca de 4,1% da população apresenta risco de desenvolver depressão, o que resultaria em cerca de 6,5 milhões de brasileiros com risco de desenvolver esse transtorno. Esse é um dado preocupante, pois este elevado risco indica uma sobrecarga para os serviços de saúde e uma diminuição na produtividade, podendo acarretar um grande impacto socioeconômico (MUNHOZ et al., 2016). Apesar do alto impacto social e consequências que este transtorno promove, a neurobiologia da depressão está longe de ser elucidada, pois já se sabe que anormalidades celulares e moleculares interagem com

predisposições genéticas e fatores ambientais, fazendo com que as características dessa doença se manifestem de forma heterogênea, dificultando a definição de sua fisiopatologia, diagnóstico e tratamento (KRISHNAN E NESTLER, 2008).

Tabela 1 - Tabela utilizada para o diagnóstico da depressão

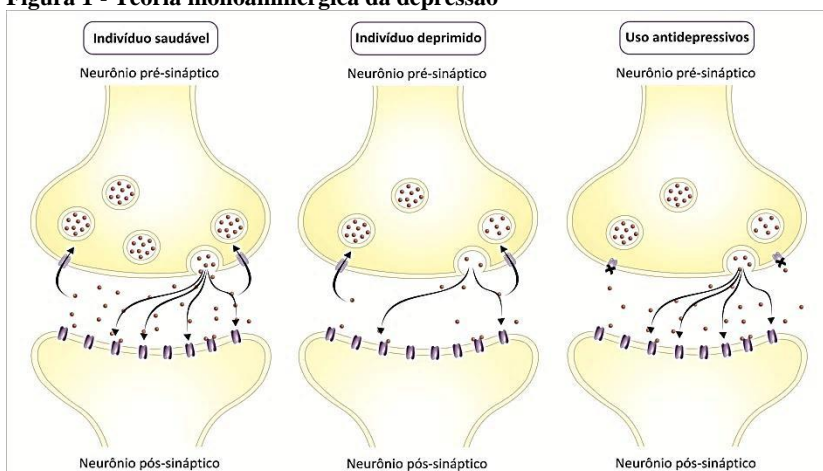
Sumário dos sintomas para o diagnóstico da depressão
1. Humor deprimido
2. Anedonia (Perda de interesse ou prazer)
3. Alteração significativa no peso
4. Alteração significativa no apetite
5. Agitação ou retardo psicomotor
6. Fadiga excessiva
7. Sentimento de culpa ou desvalia excessivos
8. Dificuldade de concentração, pensamento e tomada de decisões
9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

Fonte: Adaptado de *American Psychiatric Association* (2013).

Uma das primeiras teorias que tenta explicar as bases etiológicas da depressão é a teoria monoaminérgica (Figura 1), que postula que essa doença está relacionada a uma deficiência de monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) na fenda sináptica e que o restabelecimento dessas está associado à melhora dos sintomas depressivos (HIRSCHFELD, 2000). Nos últimos 50 anos, fármacos que aumentam a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica têm sido

empregados no tratamento deste transtorno, porém esses medicamentos possuem diversas limitações (THASE, 2003). Tais fármacos apresentam efeitos tardios, sendo necessário em torno de três a quatro semanas para que seja observada a remissão ou melhora parcial dos sintomas em pacientes depressivos (JACOBS et al., 2000; BERTON E NESTLER, 2006). Adicionalmente, esses antidepressivos clássicos podem provocar uma série de efeitos adversos, que incluem: sedação, alterações de peso, indigestão, disfunção sexual e alteração da pressão sanguínea, estando esses efeitos estritamente relacionados à baixa adesão ao tratamento por parte dos pacientes (KELLER et al., 2002).

Figura 1 - Teoria monoaminérgica da depressão



Em um indivíduo saudável, neurotransmissores monoaminérgicos (vermelho) são liberados pelo neurônio pré-sináptico e podem se ligar a receptores específicos no neurônio pós-sináptico. Segundo a teoria monoaminérgica da depressão, no indivíduo deprimido há uma concentração reduzida de monoaminas na fenda sináptica. Os fármacos antidepressivos restabelecem os níveis de monoaminas, como ocorre, por exemplo, no caso dos inibidores seletivos de recaptação de monoaminas, que promovem um aumento da concentração de neurotransmissores monoaminérgicos disponíveis nas sinapses, promovendo uma remissão dos sintomas depressivos. **Fonte:** Adaptado de CASTRÉN (2005).

É importante considerar que a teoria monoaminérgica não explica completamente a etiologia da depressão, sendo que o próprio tratamento com antidepressivos que modulam o sistema monoaminérgico não é eficaz em todos os pacientes; em alguns casos, apenas cerca de 50 % dos usuários respondem a este tipo de terapia (RUSH et al., 2006). Portanto,

considerando que o aumento nos níveis de monoaminas na fenda sináptica promove uma série de alterações em vias de sinalização intracelulares e também na atividade de outros sistemas de neurotransmissores, novos estudos têm sido propostos para elucidar outros mecanismos associados ao efeito terapêutico dos antidepressivos convencionais.

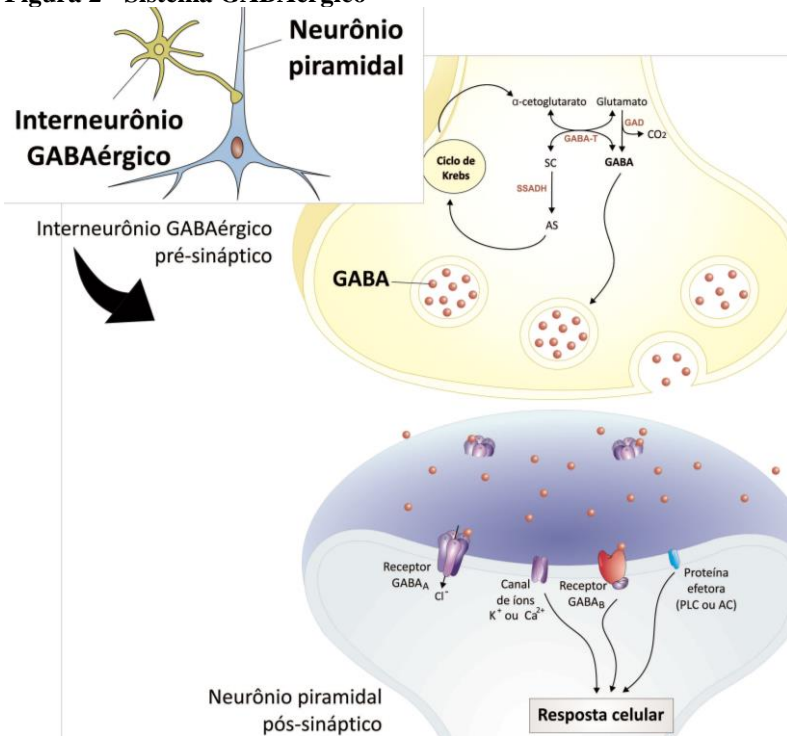
1.2 Sistema GABAérgico

Em mamíferos, o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, de modo que a maioria das membranas celulares dos neurônios e astrócitos expressam receptores para esse neurotransmissor (SIVILOTTI E NISTRINI, 1991). Por causa de sua ampla distribuição, os receptores GABAérgicos participam da modulação de diversos circuitos e funções neurais inclusive nas etapas chave do desenvolvimento e da proliferação celular. A síntese de GABA é realizada pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a qual catalisa a descarboxilação do glutamato a GABA nos interneurônios GABAérgicos (MARTIN E RIMVALL, 1993) (Figura 2). A GAD necessita de fosfato de piridoxal (forma ativa da vitamina B6) como coenzima, sendo a atividade desta enzima regulada de duas formas: pelos níveis de expressão da enzima ou pelo grau de associação com o fosfato de piridoxal (SOGHOMONIAN E MARTIN, 1998). A liberação de GABA na fenda sináptica ocorre em resposta a um potencial de ação, por fusão das vesículas contendo GABA com a membrana pré-sináptica. O término da ação do GABA na sinapse depende de sua remoção do espaço extracelular, assim os neurônios e as células da glia captam o GABA através de transportadores específicos de GABA (GAT). No interior das células, a enzima mitocondrial GABA-transaminase (GABA-T), catalisa a conversão do GABA em semi-aldeído succínico (SSA), que por sua vez é oxidado a ácido succínico pela SSA desidrogenase (SSADH), podendo ser utilizado como intermediário no ciclo de Krebs, onde é transformado em α -cetoglutarato. Por fim, a GABA-T regenera glutamato a partir de α -cetoglutarato (ROWLEY et al., 2012) (Figura 2).

O GABA exerce seus efeitos modulando atividade de dois tipos de receptores: os ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) e os metabotrópicos (GABA_B) (BORMANN, 1986). Os receptores ionotrópicos são constituídos por múltiplas subunidades de proteínas de membrana que se ligam ao GABA e abrem um canal iônico permeável ao cloreto. Por outro lado, os receptores GABAérgicos metabotrópicos são estruturas

heterodiméricas acopladas à proteína G, que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros (PEHRSON E SANCHEZ, 2015) (Figura 2).

Figura 2 - Sistema GABAérgico



A síntese de GABA é mediada pela GAD, que catalisa a descarboxilação do glutamato a GABA nas terminações nervosas GABAérgicas. A GAD necessita de fosfato de piridoxal como coenzima. No interior das células, a GABA-T, catalisa a conversão do GABA em SSA, que é oxidado subsequentemente a AS pela SSADH, entrando, a seguir, no ciclo de Krebs, onde é transformado em α -cetoglutarato. A seguir, a GABA-T regenera glutamato a partir de α -cetoglutarato. O GABA é estocado em vesículas pré-sinápticas por um transportador (VGAT), que é o mesmo transportador expresso nas terminações nervosas que liberam glicina, outro neurotransmissor inibitório. Em resposta a um potencial de ação, ocorre a liberação de GABA na fenda sináptica por fusão das vesículas contendo GABA com a membrana pré-sináptica. O GABA medeia seus efeitos neurofisiológicos através de sua ligação com seus receptores. Existem dois sub-tipos de receptores GABAérgicos. Os receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) que consistem em proteínas de membrana de múltiplas subunidades que se ligam ao GABA e abrem um canal iônico permeável ao cloro e os receptores metabotrópicos (GABA_B), que são heterodiméricos acoplados à proteína G que afetam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros. GABA:ácido gama-aminobutírico, GAD: glutamato descarboxilase, GABA-T:GABA-transaminase, SSA: semi-aldeído succínico, AS:ácido succínico, SSADH: SSA desidrogenase, VGAT:transportador de GABA. **Fonte:** Desenvolvida pelo autor.

1.2.1 Sistema GABAérgico e depressão

Dados da literatura sugerem que uma desregulação dos níveis de GABA pode estar envolvida na fisiopatologia da depressão (PEHRSON E SANCHEZ, 2015). Nesse contexto, foi relatado que indivíduos depressivos podem apresentar uma diminuição nos níveis de GABA em diferentes regiões encefálicas e tratamentos com fármacos antidepressivos (SANACORA et al., 2002), ou a eletroconvulsoterapia, que se constitui em um eficaz tratamento para a depressão (SANACORA et al., 2003), aumentam os níveis desse neurotransmissor no córtex occipital desses pacientes.

É importante ressaltar que interneurônios GABAérgicos exercem uma influência significativa nas redes neurais responsáveis pelo controle do humor e função cognitiva, de modo que a normalização da neurotransmissão GABAérgica promove uma melhora dos déficits cognitivos observados em indivíduos com depressão (PEHRSON E SANCHEZ, 2015). Porém, é importante ressaltar que a participação dos receptores GABAérgicos na depressão não é totalmente esclarecida, mas há evidências que a modulação da atividade de receptores GABA_A esteja relacionada com efeito antidepressivo, uma vez que a falta da expressão de subunidades $\alpha 2$ de receptores subtipo GABA_A estão relacionados com fenótipo tipo depressivo em roedores (VOLLENWEIDER et al., 2011), e o tratamento com antidepressivos que são moduladores positivos desses receptores são capazes de promover efeitos tipo-antidepressivos (HILAKIVI-CLARKE et al., 1990).

Os receptores GABAérgicos do subtipo GABA_B também parecem estar relacionados com a fisiopatologia da depressão, visto que estudos pré-clínicos mostram que a supressão da expressão de receptores GABA_B funcionais faz com que os roedores apresentem um fenótipo tipo-antidepressivo (MOMBEREAU et al., 2004; MOMBEREAU et al., 2005). Além disso, a inibição dos receptores GABA_B é capaz de promover uma resposta antidepressiva em ensaios pré-clínicos (NOWAK et al., 2006; FELICE et al., 2012).

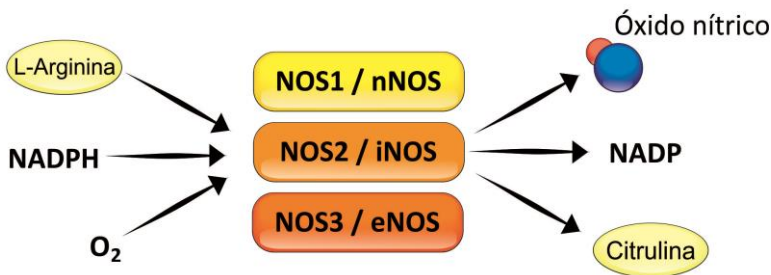
Além disso, evidências mostram que o sistema GABAérgico está implicado no efeito antidepressivo rápido da cetamina (antagonista de receptores NMDA), a qual é muito eficaz para o tratamento da depressão de pacientes refratários a farmacoterapia com antidepressivos clássicos (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006). Adicionalmente, a administração de cetamina promove um aumento nos níveis de GABA no giro cingulado anterior em ratos submetidos ao

estresse crônico imprevisível (PERRINE et al., 2014) e também no córtex pré-frontal medial de pacientes depressivos (MILAK et al., 2016).

1.3 Via da L-arginina-óxido nítrico (NO)

A maioria das células estudadas até o momento em humanos possuem a capacidade de produzir NO, o qual é sintetizado a partir da transformação do aminoácido catiônico L-arginina em L-citrulina necessitando da presença de oxigênio e da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Figura 3). Essa reação é realizada por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), que existem em três diferentes isoformas: a neuronal (NOS 1), a induzível (NOS 2) e a endotelial (NOS 3), de modo que no encéfalo de mamíferos, mais de 90% da produção de NO é catalisada pela NOS 1 (MAGARINOS E MCEWEN, 1995). A NOS 3 ou endotelial recebe esta denominação por ter sido inicialmente descoberta no endotélio vascular, NOS 2 ou neuronal assim se classifica por ser encontrada no cérebro e a NOS 3 ou induzível foi classificada com essa nomenclatura, pois sua síntese é induzida por estímulos imunológicos ou inflamatórios.

Figura 3 - Via da L-arginina-óxido nítrico (NO)



O NO é sintetizado a partir da transformação do aminoácido catiônico L-arginina em L-citrulina necessitando da presença de oxigênio e de NADPH. NO: óxido nítrico, NADPH: forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, NOS1/nNOS: óxido nítrico sintase neuronal, NOS2/iNOS: óxido nítrico sintase induzível, NOS3/eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. **Fonte:** Adaptada de Phil Dash (Website).

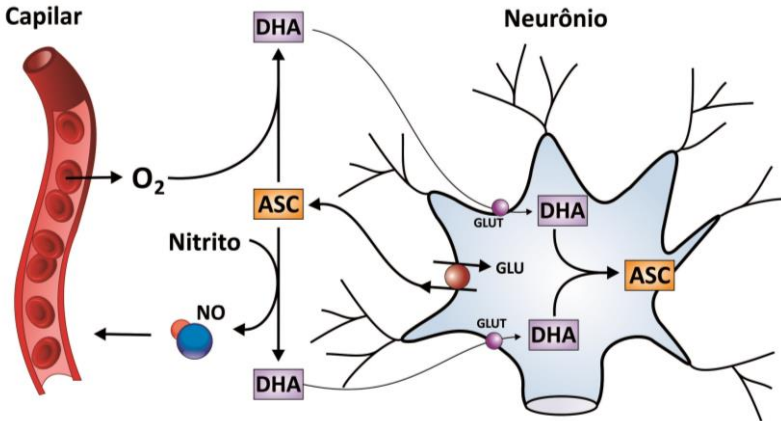
Essa molécula gasosa está envolvida em diversos mecanismos fisiológicos, tais como a regulação do tônus vascular, a aprendizagem e

formação da memória (MONCADA, 1999). Devido às suas propriedades hidrofóbicas e seu baixo peso molecular, o NO atravessa facilmente a membrana das celulares podendo se difundir pelo organismo.

As isoformas 3 e 1 da NOS, ditas constitutivas, são dependentes de calmodulina. Na presença de elevadas concentrações de cálcio, a calmodulina se liga na NOS promovendo sua ativação. Porém, no caso da NOS 2, a atividade da enzima independe da presença de cálcio e da calmodulina (NATHAN, 1992). A formação contínua de NO pelas células endoteliais nos vasos sanguíneos promove o relaxamento da musculatura lisa, produzindo vasodilatação (IGNARRO, 2002). No sistema imune, os macrófagos quando são estimulados, produzem grandes quantidades de NO, que funciona como uma molécula destruidora de células-alvo (cancerosas) e micro-organismos.

Adicionalmente há evidências que apontam para uma produção de NO por um mecanismo completamente independente da atividade da NOS no encéfalo. Essa produção alternativa ocorre através da redução de nitrito no meio extracelular mediada pelo ascorbato liberado de neurônios, esta produção também ocorre no compartimento gastrointestinal onde o pH gástrico permite condições necessárias para a redução de nitrito promovida por ascorbato e polifenóis (MILLAR et al., 1995). O resultado final é que as ações vasodilatadoras benéficas do NO nos vasos sanguíneos podem ser alcançadas no cérebro sem depender do processo lento e que requer oxigênio pela síntese enzimática realizada pela NOS a partir de L-arginina e O_2 (MIRVISH et al., 1972). Existem muitos trabalhos que evidenciam que o ascorbato está presente no meio extracelular pelo fato de existir uma liberação controlada desse composto que está relacionada à captação de glutamato, sendo que a liberação de ascorbato ocorre através de um mecanismo antiporte no qual os neurônios glutamatérgicos seriam capazes de liberar o ascorbato ao mesmo tempo em que captam o glutamato, por meio de transportadores de glutamato (EAAT1 e EAAT2) (GRÜNEWALD e FILLENZ, 1984).

Figura 4 - Formação do NO via redução do nitrito



O NO pode ser formado por uma via não enzimática através da redução do nitrito pelo ASC. Nesse processo o ASC é oxidado a DHA que pode ser transportado para o neurônio onde é reduzido novamente a ASC. O ASC está presente no meio extracelular por meio do processo da captação de GLU, no qual a captação de uma molécula de GLU está associada com a liberação de uma molécula de ASC para o meio extracelular, onde este pode participar da reação de redução do nitrito a NO, devido ao seu alto poder redutor. ASC: ascorbato, DHA ácido desidroascórbico, NO: óxido nítrico, GLUT: transportador de glicose, GLU: glutamato. **Fonte:** Adaptada de MILLAR et al. (1995).

1.3.1 Via da L-arginina-NO e a depressão

O entendimento e a descoberta da função do NO como molécula sinalizadora revolucionou a definição de comunicação neural (ESPUGLES, 2002). Tem sido sugerido que o NO esteja relacionado com patologias do SNC como, por exemplo, epilepsia, esquizofrenia, ansiedade e depressão (DHIR E KULKARNI, 2011). Essa molécula parece também estar envolvida na morte neuronal induzida por glutamato e no estresse oxidativo em condições patológicas como isquemia e doenças neurodegenerativas (GUIX et al., 2005; SHAHANI E SAWA, 2012). Em relação ao envolvimento do NO na depressão, estudos clínicos demonstraram que pacientes deprimidos apresentam um aumento na produção de NO (LEE et al., 2006), e que substâncias capazes de inibir a NOS ou a guanilato ciclase solúvel (GCs, alvo intracelular do NO, catalisa a conversão de GTP em GMPc) promovem efeitos tipo-antidepressivos em modelos animais de depressão (YILDIZ et al., 2000; HARKIN et al., 2003; KASTER et al., 2005). Além disso, o

NO parece estar envolvido no mecanismo de ação de antidepressivos clássicos. Nesse contexto, um estudo constatou que a paroxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) era também inibidor da NOS (FINKEL et al., 1996). Esse estudo foi precursor de uma série de outros trabalhos que apresentaram evidências de que o NO está envolvido na fisiopatologia da depressão.

Entretanto, alguns estudos mostram um possível papel dual do NO em modelos animais utilizados para avaliar o efeito tipo-antidepressivo de compostos. Um estudo demonstrou, por exemplo, que a administração de L-arginina no núcleo dorsal da rafe produz um efeito tipo-ansiolítico no labirinto em cruz elevado, e tipo antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em ratos (SPIACCI et al., 2008). Outro estudo mostrou também que o efeito tipo-antidepressivo promovido pela L-arginina administrada via intraperitoneal poderia ser dose-dependente, uma vez que em altas doses foi observado um aumento no tempo de imobilidade no TNF em camundongos e em doses baixas foi observado um efeito tipo-antidepressivo no TNF (INAN et al., 2004). Por fim, a administração de L-arginina, além de promover efeito antidepressivo no TNF, também diminui o tempo de imobilidade no TSC (DA SILVA et al., 2000), sugerindo que tanto o estímulo como a inibição da síntese de NO podem produzir efeitos tipo-antidepressivos no TNF e TSC. Os mecanismos exatos ainda não estão completamente elucidados, porém, baseados nos estudos previamente mencionados, é possível sugerir que o NO apresenta um papel dual como molécula sinalizadora do SNC.

Nosso grupo demonstrou recentemente que a administração de cetamina em uma dose considerada antidepressiva no TSC, pode promover um aumento moderado no conteúdo de NO_x tanto no hipocampo como no córtex cerebral de camundongos (CUNHA et al., 2015), o que reforça a ideia de que agentes antidepressivos possam ter uma ação moduladora sobre o sistema nitrérgico.

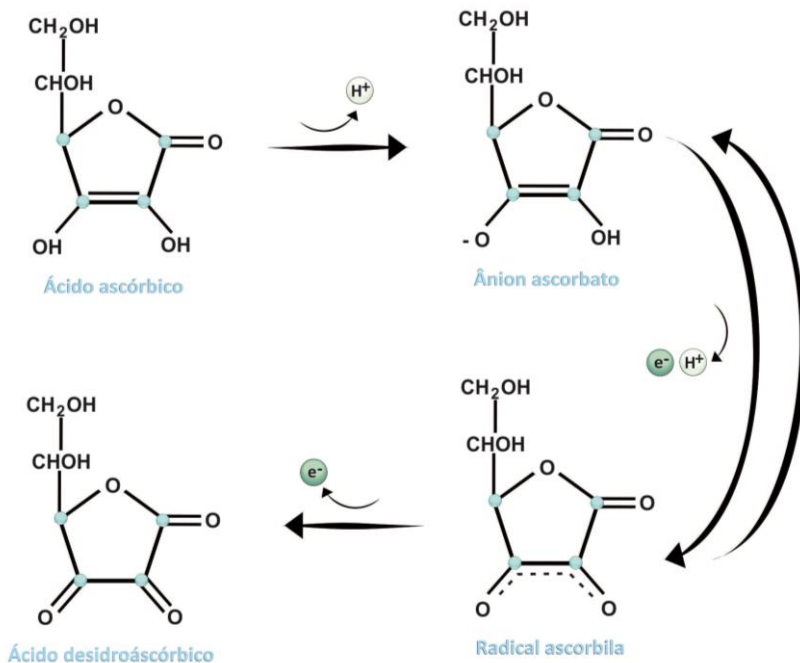
Um estudo recente mostrou que o 17 α -etinilestradiol (EE₂) apresenta atividade tipo-antidepressiva no TNF e TSC em camundongos fêmeas ovariectomizadas, e que essa propriedade pode estar relacionada a uma ativação do sistema GABAérgico juntamente com inibição da via nitrérgica (SARAVI et al., 2016). Esses resultados sugerem que uma inibição da via nitrérgica estaria relacionada com a ativação dos receptores GABAérgicos do subtipo GABA_A, podendo ser esse o mecanismo responsável pela atividade tipo-antidepressiva do EE₂ (SARAVI et al., 2016). Essa hipótese já havia sido sugerida quando alguns trabalhos mostraram que a ativação de receptores GABA_A promove a inibição da produção de NO (YU E ELDERED, 2005) e que

a inibição dos receptores GABA_A aumenta a produção de NO via ativação da nNOS (SALEH et al., 2003). Esses dados levantam a hipótese de que a ativação de receptores GABA_A possa estar modulando a atividade da via nitrérgica, sendo este um possível mecanismo de ação de compostos com potencial tipo-antidepressivo. Contudo mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

1.4 Ácido ascórbico

O ácido L-ascórbico, uma vitamina hidrossolúvel comumente conhecida como vitamina C, é cofator em diversas reações enzimáticas biológicas (REBEC E PIERCE, 1994), tendo com uma de suas principais características seu poder redutor (NAIDU, 2003). Essa vitamina é estável em sua forma seca, oxidando-se rapidamente em solução ou quando submetida ao calor. Em pH fisiológico, se ioniza liberando um próton, passando a se chamar ascorbato (REBEC E PIERCE, 1994) (Figura 5). Alguns animais são capazes de sintetizar ascorbato a partir de D-glicose e D-galactose, como no caso de alguns mamíferos, répteis e aves. No entanto, outros animais, como por exemplo, morcegos frugívoros, macacos, cobaias, peixes, invertebrados e humanos não são capazes de sintetizar essa vitamina devido à ausência de uma enzima essencial para a conversão de 2-ceto-gulono- γ -lactona em ácido L-ascórbico, última reação na biossíntese da vitamina C (RICE, 2000).

Figura 5 - Bioquímica do ácido ascórbico

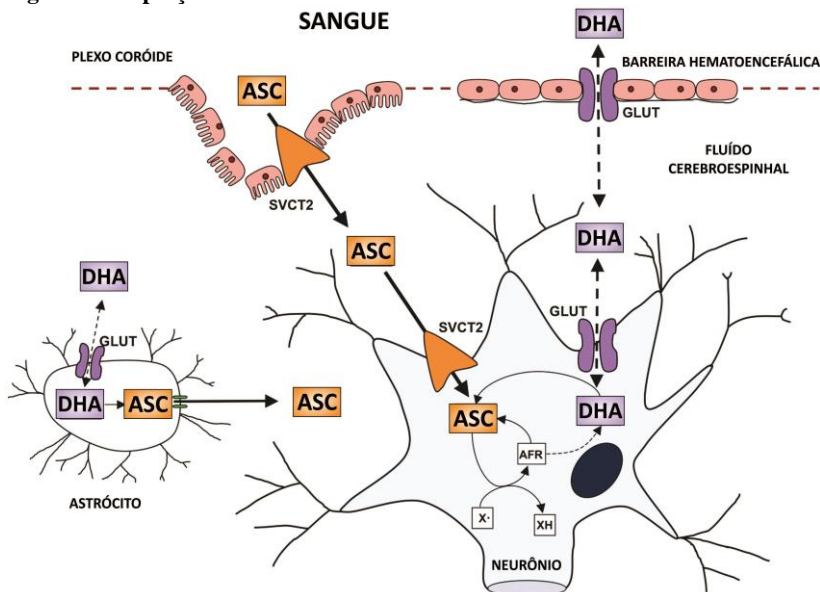


Em mamíferos, quando em pH fisiológico, o ácido ascórbico é encontrado sob a forma de ânion ascorbato. Esta estrutura permite a perda de elétrons e sua oxidação. O ascorbato é oxidado através da perda de um elétron, formando um radical intermediário chamado de radical ascorbila. Em seguida, através da perda de um segundo elétron, este radical é oxidado a ácido desidroascórbico. **Fonte:** Desenvolvida pelo autor.

O ácido ascórbico é facilmente obtido através da alimentação e a sua captação é realizada no intestino por uma família de transportadores dependentes de sódio, denominada SVCT1 (RICE, 2000). Após sua absorção, o ascorbato é direcionado para a corrente sanguínea e amplamente distribuído pelo organismo, de modo que maiores concentrações desta vitamina são observadas nas glândulas supra-renais, medula espinhal e encéfalo (REBEC E PIERCE, 1994; RICE, 2000). O ácido ascórbico pode ser captado pelo SNC de duas maneiras: na forma de ascorbato, podendo ser captado da corrente sanguínea para o líquido celoforraquidiano através do plexo coróide, via transportadores dependentes de sódio (SVCT2), ou pode ser captado sob a forma de ácido desidroascórbico, o qual atravessa a barreira hematoencefálica via

transportadores de glicose, sendo que apenas as isoformas 1, 3 e 4 são capazes de captar o ácido desidroascórbico (HARRISON E MAY, 2009). As células gliais captam o ácido ascórbico na sua forma oxidada e obtém ascorbato a partir da redução de ácido desidroascórbico (HARRISON E MAY, 2009) (Figura 6).

Figura 6 - Captação e metabolismo do ascorbato no SNC



Neurônios podem captar ASC ou DHA através dos transportadores SVCT2 ou através dos transportadores GLUT, respectivamente. As células gliais captam DHA através dos GLUTs, sendo este posteriormente reduzido a ASC, o qual é armazenado ou liberado. ASC: ascorbato, DHA: ácido desidroascórbico, GLUT: transportador de glicose, SVCT2: transportador de vitamina C dependente de sódio tipo 2. **Fonte:** Adaptado de HARRISON; MAY, 2009.

Além da sua função como vitamina, o ácido ascórbico também possui propriedades neuroprotetoras e antioxidantes (RICE, 2000). A concentração de ascorbato no cérebro pode variar de acordo com a região cerebral (GRUNEWALD., 1993). Estruturas que fazem parte da região anterior do encéfalo, como o hipocampo, neocórtex, amígdala, neocórtex, núcleo accumbens e hipotálamo, apresentam concentrações elevadas de ascorbato, ao contrário do que se observa em regiões mediais e posteriores, onde a concentração de ascorbato é menor (MILBY et al., 1982), exceto o cerebelo, que apesar de estar localizado

na região posterior do encéfalo, apresenta altas concentrações de ascorbato (OELRICHS et al., 1988).

O ácido ascórbico pode realizar diversas funções no SNC, como por exemplo, exerce influência sobre a formação da bainha de mielina por células de Schwann (na ausência de ascorbato não ocorre a formação da lâmina basal, essencial para mielinização dos axônios, pela falta da síntese do colágeno tipo IV) (CAREY E TODD, 1987; ELDRIDGE et al., 1987), possui ação coenzimática sobre a enzima essencial para a síntese de catecolaminas dopamina beta-hidroxilase (TAYLOR et al., 2005) e também apresenta uma importante ação neuromoduladora, tanto na transmissão dopaminérgica como na glutamatérgica (GRUNEWALD, 1993; REBEC E PIERCE, 1994; RICE, 2000). Já foi demonstrado, por exemplo, que a administração de agonista dopaminérgicos, como a meta-anfetamina, é capaz de aumentar a liberação de ascorbato no estriado e no núcleo acumbens de ratos (DAI et al., 2006; GU et al., 2006). No que diz respeito à relação do ácido ascórbico com o sistema glutamatérgico, foi descrito que o ácido ascórbico possui um papel importante no desenvolvimento e maturação neuronal, por exibir propriedades contra a excitotoxicidade mediada pela estimulação excessiva dos receptores NMDA (QIU et al., 2007), além disso ele pode inibir receptores NMDA através de um fenômeno redox (MAJEWSKA et al., 1990).

1.4.1 Ácido ascórbico e depressão

Os primeiros relatos sugerindo o ácido ascórbico como modulador de humor ocorreram ainda na época das grandes navegações, quando os tripulantes desenvolviam uma doença conhecida como escorbuto (GRUNEWALD, 1993; NAIDU, 2003). A doença é caracterizada por apresentar sintomas como fadiga, dificuldade de cicatrização, sangramentos na gengiva, perda de dentes, dores musculares (HALLIGAN et al., 2005) e humor deprimido (NGUYEN et al. 2003). Então, um médico escocês (James Lind) correlacionou à alta morbidade e mortalidade dos marinheiros ingleses com a falta de vegetais e frutas frescas na dieta dos marinheiros (NAIDU, 2003). Anos depois foi isolado um agente redutor presente no suco de limão, caracterizado como fator anti-escorbuto, que mais tarde seria caracterizado como ácido ascórbico (GRUNEWALD, 1993).

No decorrer dos anos foi sugerido o papel do ácido ascórbico para o tratamento de transtornos de humor em decorrência da melhora das observações clínicas de pacientes com depressão idiopática (causa

desconhecida) que foram tratados com ácido ascórbico (50 mg/kg por duas semanas), como foi observada no caso do tratamento de indivíduos com depressão associada ao uso de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (COCCHI et al., 1980). Estudos apontam ainda para uma diminuição nos níveis de ácido ascórbico no plasma de pacientes deprimidos (KHANZODE et al., 2003). Além disso, o tratamento com essa vitamina durante 14 dias promoveu a melhora do humor em indivíduos saudáveis avaliados pelo inventário Beck de depressão (*Beck Anxiety Inventory*) (BRODY et al., 2002), o qual é um questionário de auto-relato de múltipla escolha que é um dos instrumentos mais utilizados para medir a severidade de episódios depressivos. Também foi reportado que um paciente com depressão desenvolveu escorbuto (CHANG et al., 2007) e que o ácido ascórbico apresentou eficácia ao ser utilizado como adjuvante com a fluoxetina no tratamento da depressão em crianças (AMR et al., 2013). Esses achados reforçam o fato de que a deficiência de ácido ascórbico pode estar envolvida na fisiopatologia da depressão.

Consistente com os estudos clínicos mencionados, nosso grupo demonstrou previamente, que o ácido ascórbico produz efeito tipo-antidepressivo no TSC em camundongos e apresenta efeito sinérgico quando administrado juntamente com antidepressivos convencionais (BINFARE et al., 2009; MORETTI et al., 2014; MORETTI et al., 2015). O efeito tipo-antidepressivo desta vitamina foi observado também em dois modelos animais de depressão induzida por estresse, o estresse de contenção e o estresse crônico imprevisível. Nesses estudos, observou-se que o efeito desta vitamina parece ser dependente do bloqueio de receptores NMDA e inibição dos canais de K⁺ (MORETTI et al., 2012; MORETTI et al., 2012b), além de estar acompanhado por uma diminuição da peroxidação lipídica e de uma melhora das defesas antioxidantes endógenas (MORETTI et al., 2012b). Mais recentemente nosso grupo demonstrou que essa vitamina exerce efeito antidepressivo modulando alvos moleculares semelhante aos que sofrem ação modulatória da cetamina (MORETTI et al., 2014), a qual é considerada um antidepressivo de resposta rápida.

Nos últimos anos muitos estudos clínicos têm relatado os benefícios da suplementação do ácido ascórbico em patologias associadas a transtornos de humor. Um estudo reportou que um indivíduo jovem (18 anos) diagnosticado com depressão e apresentando dificuldade de cicatrização de feridas apresentava baixas concentrações de ascorbato no sangue, de modo que a suplementação com ácido ascórbico promoveu uma melhora nos sintomas depressivos (CARR E

VISSERS, 2012). Outro trabalho mostrou que trabalhadores de uma refinaria de óleo que receberam suplementação de ácido ascórbico concomitante ou não com vitamina E durante 60 dias melhoraram os escores de depressão avaliados pela escala Beck (KHAJEHNASIRI et al., 2013). Adicionalmente um estudo recente realizado com estudantes universitários saudáveis, mostrou que aqueles que receberam 500 mg de ascorbato durante o período de 14 dias apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de ascorbato e uma redução nos escores de ansiedade avaliados pela escala Beck quando comparados ao grupo de estudantes que recebeu placebo (DE OLIVEIRA et al., 2015). Esses dados clínicos reafirmam o potencial do ácido ascórbico de promover efeitos benéficos sobre os transtornos de humor e de ansiedade, sendo necessário ainda elucidar alguns mecanismos envolvidos no seu efeito.

1.5 Cetamina

A cetamina (2-(σ -clorofenil)-2-(metilamino)-cicloexanona) é uma arilciclo-alkilamina derivada da fenciclidina (PCP), inicialmente sintetizada por Calvin Stevens, em 1962. É utilizada principalmente como anestésico em doses acima de 65 mg/kg em camundongos, ou seja, em torno de seis vezes maior que a dose considerada antidepressiva (GARCIA et al., 2008; GLUE et al., 2011). A cetamina é metabolizada através de reações de oxidação pelas enzimas microssomais hepáticas em três metabólitos ativos: norcetamina, 5-OH-cetamina e 4-OH-cetamina, sendo a norcetamina o principal metabólito ativo, apresentando de 30% a 20% da potência do fármaco original. Todos os metabólitos são hidroxilados a hidroxinorcetina e em seguida conjugados a derivados glicuronídeos hidrossolúveis e excretados na urina (GARCIA et al., 2008). A cetamina apresenta alta lipossolubilidade e fraca ligação às proteínas plasmáticas (10 a 30%), resultando em grande volume de distribuição, e ação muito rápida, ultrapassando facilmente a barreira hematoencefálica. Seu clearance de eliminação é relativamente alto (1000 a 1600 mL/min), o que confere uma meia-vida curta, em torno de 2 a 3 horas (GARCIA et al., 2008).

Diversos estudos clínicos realizados nos últimos anos mostraram que a cetamina possui um significativo potencial antidepressivo quando administrada em doses sub-anestésicas. Inicialmente foi demonstrado que indivíduos resistentes ao tratamento com antidepressivos clássicos mostraram uma melhora nos sintomas depressivos, até 72 horas após receberem uma infusão de cetamina (BERMAN, 2000). Outro estudo mostrou que duas horas após sua administração, a cetamina foi efetiva

em reverter os sintomas depressivos de pacientes resistentes ao tratamento convencional, de modo que esse efeito perdurou por até duas semanas (ZARATE et al., 2006). Foi postulado que o efeito rápido da cetamina ocorre por meio do antagonismo dos receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, que estão tonicamente ativos. A cetamina por sua vez, inibe a atividade desses interneurônios GABAérgicos, os quais deixam de inibir os neurônios glutamatérgicos, e, como consequência, promovem a exocitose de vesículas contendo glutamato na fenda sináptica (DUMAN et al., 2012; DUMAN E VOLETI, 2012). No entanto, seus mecanismos não estão completamente elucidados. A cada estudo se observa a ampla abrangência de mecanismos associados aos efeitos da cetamina, se fazendo necessário a continuação dos trabalhos acerca desse composto, com objetivo de identificar seus alvos moleculares.

2 JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno de humor, altamente prevalente, heterogêneo e de etiologia multifatorial, sendo um dos transtornos de humor que ocorre com maior frequência no mundo e o responsável mais comum por casos de incapacitação em adultos (NESTLER et al., 2002; OLESEN E LEONARDI, 2003; KESSLER et al. 2012). No Brasil estima-se que existem em torno 54 milhões de pessoas que irão desenvolver episódios depressivo em algum momento ao longo de suas vidas, e dessas 7,5 milhões podem vir a apresentar quadros agudos e graves, alguns inclusive com alto risco de suicídio (SILVA et al., 2014). Porém apesar do alto impacto social e consequências que o transtorno promove, a neurobiologia da depressão está longe de ser elucidada (KRISHNAN E NESTLER, 2008) e levando em consideração que as opções terapêuticas para o tratamento da depressão possuem eficácia limitada e efeitos adversos, existe a necessidade do desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para controle e/ou remissão dos sintomas associados a este transtorno.

Nesse contexto o ácido ascórbico tem sido proposto como terapia adjuvante para o tratamento dos transtornos de humor, como sugerem estudos publicados há muitos anos que confirmaram os benefícios da suplementação do ácido ascórbico no tratamento de transtornos de humor (CARR E VISSERS, 2012). Assim no decorrer dos anos muitos estudos foram realizados para compreender o mecanismo de ação dessa vitamina, e estudos prévios sugerem que o efeito antidepressivo do ácido ascórbico pode envolver modulação em vários sistemas de neurotransmissores, como por exemplo, a modulação monoaminérgica envolvendo uma interação com receptores de serotonina (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃), receptores α 1-, α 2- e β -adrenérgicos, assim como receptores de dopamina D2 (BINFARE et al., 2009). Adicionalmente o ácido ascórbico tem ação neuromoduladora sendo capaz de inibir receptores NMDA (MORETTI et al., 2014) além de promover um aumento da sinalização da via mTOR similar à cetamina, considerada um antidepressivo de ação rápida (MORETTI et al., 2014). Recentemente, estudos clínicos mostraram que a suplementação com ácido ascórbico promove uma redução nos escores de ansiedade avaliados pela escala Beck (DE OLIVEIRA et al., 2015). Considerando o envolvimento do sistema GABAérgico na ansiedade (PEHRSON E SANCHEZ, 2015), estes dados levantaram a hipótese que o ácido ascórbico pode modular esse sistema. Dados ainda não publicados do

grupo mostraram também que além do efeito tipo-antidepressivo já bem caracterizado do ácido ascórbico, esse composto promove também efeito tipo-ansiolítico em testes de ansiedade em camundongos, o que reforça a hipótese que essa vitamina possa envolver em seu mecanismo de ação uma modulação do sistema GABAérgico.

Portanto, se torna interessante investigar o envolvimento dos receptores GABAérgicos no efeito-tipo antidepressivo do ácido ascórbico no TSC, com intuito de compreender melhor seu mecanismo de ação e efeito tipo-antidepressivo modulando esse sistema de neurotransmissão. Ainda, considerando o papel do sistema nitrérgico na depressão e sua relação com o sistema GABAérgico (SARAVI et al., 2016), também é relevante investigar o papel do mesmo no efeito do ácido ascórbico.

A cetamina é um antidepressivo de ação rápida capaz de promover um aumento nos níveis de GABA no giro cingulado anterior em ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (PERRINE et al., 2014) e também no córtex pré-frontal medial de pacientes depressivos (MILAK et al., 2016), torna-se relevante investigar o envolvimento dos receptores GABAérgicos no efeito-tipo antidepressivo desse composto, assim como averiguar se essa modulação é capaz de afetar a atividade da via nitrérgica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento dos receptores GABA_A e GABA_B no efeito-tipo antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina no TSC e a relação desse efeito com o sistema nitrérgico.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a participação dos receptores GABA_A no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina no TSC em camundongos.
- Investigar a participação dos receptores GABA_B no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina no TSC em camundongos.
- Investigar o efeito do ácido ascórbico e da cetamina sobre os níveis de NOx no córtex cerebral de camundongos.
- Investigar a relação dos sistemas GABAérgico e nitrérgico no efeito tipo- antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30-40 g), mantidos em condições normais de biotério, temperatura entre 20-22° com água e comida *ad libitum* e ciclo claro/escuro 12/12horas (luzes acesas às 07:00 h). Os animais foram ambientados no local onde o experimento foi realizado 24 horas antes dos testes comportamentais, sendo que todos os procedimentos comportamentais foram realizados entre 9:00 e 16:00h. Foram mantidos em caixas com dimensões 41x34x16 cm. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA – Protocolo PP00795).

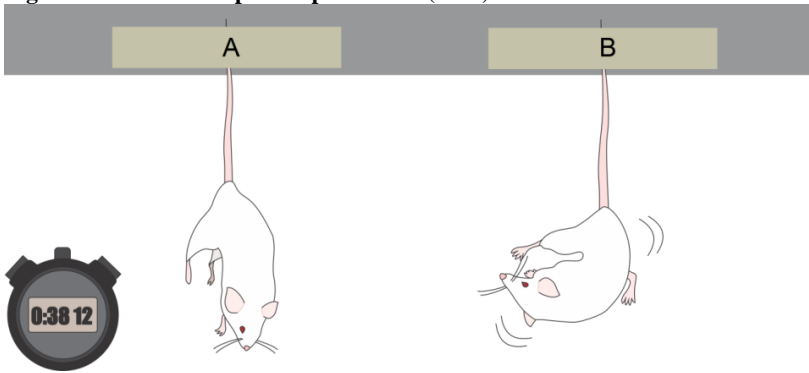
4.2 Testes comportamentais

4.2.1 *Teste da suspensão pela cauda (TSC)*

Este teste é baseado no princípio de que animais submetidos ao estresse inescapável desenvolvem uma postura de imobilidade, a qual é reduzida por intervenções como o tratamento com antidepressivos. Nesse teste, os camundongos, foram suspensos pela cauda 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 minutos (Figura 7), conforme descrito anteriormente (MORETTI et al., 2012b). Vale destacar que os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (STERU et al., 1985).

4.2.2 *Teste do campo aberto (TCA)*

A fim de excluir a possibilidade de que a redução da imobilidade no TSC seja devido a um aumento na atividade locomotora dos animais causada pelos compostos, os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto, 60 minutos após a administração dos compostos. O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de cruzamentos realizados com as quatro patas foi registrado em uma sessão de 6 minutos (Figura 8).

Figura 7 - Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC é um teste preditivo para atividade antidepressiva, no qual os camundongos quando suspensos pela cauda adotam uma postura de imobilidade frente a essa situação inescapável. O tempo de imobilidade é mensurado durante um período de 6 minutos, de modo que uma redução no mesmo é considerada como um efeito tipo-antidepressivo. **Fonte:** Adaptado de OLIVEIRA, 2014.

Figura 8 - Teste do campo aberto (TCA)

No teste do campo aberto avalia-se a atividade locomotora dos animais com base no número de quadrantes cruzados pelos mesmos (com as quatro patas) durante um período de 6 minutos. **Fonte:** Adaptado de OLIVEIRA, 2014.

4.3 Análises bioquímicas

4.3.1 Análise de NOx

O NO é instável e rapidamente oxidado a nitrato e nitrito após sua produção. Após a realização dos testes comportamentais (TSC e TCA), os animais foram decapitados para retirada do córtex cerebral, estrutura utilizada para mensurar os níveis de NOx. Os metabólitos foram determinados utilizando a análise de NOx conforme descrito previamente (HEVEL E MARLETTA., 1994). Em síntese, os homogenatos de córtex cerebral obtidos de camundongos tratados com ácido ascórbico e cetamina, bem como com doses subativas destes compostos em combinação com muscimol, foram misturados com 25% de ácido tricloroacético e centrifugados a 1800 g durante 10 min, e os sobrenadantes foram imediatamente neutralizados com bicarbonato de potássio 2 M. Após conversão enzimática pela nitrato redutase, o nitrito foi mensurado utilizando a reação colorimétrica de Griess em um leitor de microplacas no comprimento de onda 540 nm (ZOMKOWSKI et al., 2012; LUDKA et al., 2013). Os valores obtidos (% NOx) por este procedimento correspondem à soma de nitrito e nitrato derivados do NO. Uma curva padrão foi realizada com nitrato de sódio (0-80 µM). Os resultados foram expressos em relação aos níveis de NOx do grupo controle, os quais foram considerados como 100%.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de ANOVA de uma, duas ou três vias, conforme o protocolo experimental, seguido do teste *post hoc* de Newman Keuls ou Duncan, quando apropriado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Regressões lineares univariadas foram realizadas para investigar a associação independente entre os níveis de NOx e o tempo de imobilidade no TSC. O nível aceitável de significância para os testes foi de $p < 0,05$. Os testes foram realizados usando o software SPSS 17.

4.5 Protocolos experimentais

4.5.1 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA_A no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e cetamina

Os compostos utilizados neste experimento foram: ácido ascórbico, muscimol, cetamina e baclofen. Todos os compostos são da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O ácido ascórbico foi dissolvido em água destilada e administrado por gavagem (p.o.). Muscimol, baclofen e cetamina foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl) e administrados via intraperitoneal (i.p.). Todos os grupos controle receberam veículo apropriado.

Os protocolos experimentais descritos nesta sessão estão ilustrados na figura 9. Com objetivo de avaliar o envolvimento dos receptores GABA_A na ação tipo-antidepressiva do ácido ascórbico, os camundongos foram tratados com uma dose subativa (sem efeito tipo antidepressivo *per se*) da vitamina (0,1 mg/kg) ou veículo. Após 30 minutos os animais foram tratados com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg; agonista de receptores GABA_A) ou veículo, sendo submetidos ao TSC ou TCA 30 minutos após essa administração (Figura 9A).

Um protocolo similar foi realizado com um antidepressivo de ação rápida, a cetamina, pois já foi demonstrado que esse composto pode ter interação com o sistema GABAérgico (PERRINE, et al., 2014; MILAK, et al., 2016). Nesse experimento foram co-administrados uma dose subativa da cetamina (0,1 mg/kg) ou veículo com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg) ou veículo. Após 30 minutos a administração desses compostos os animais foram avaliados no TSC e TCA (Figura 9B).

4.5.2 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA_B no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e cetamina

Os protocolos experimentais descritos nesta sessão estão ilustrados na figura 9. Para investigar o possível envolvimento dos receptores GABA_B no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico, os animais foram tratados com uma dose ativa da vitamina (1 mg/kg) ou veículo e após 30 minutos, receberam baclofen (1 mg/kg; agonista de receptores GABA_B) ou veículo. Após 30 minutos dessa administração, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (Figura 9C).

Em um protocolo similar, os camundongos foram tratados com uma dose ativa de cetamina (1 mg/kg) ou veículo 45 minutos antes dos testes comportamentais. Posteriormente, 30 minutos antes dos testes os animais foram tratados com uma dose ativa do baclofen (1 mg/kg) ou veículo (Figura 9D).

4.5.3 Avaliação do conteúdo de NOx no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina

Os protocolos experimentais descritos nesta sessão estão ilustrados na figura 10. Após a realização dos testes comportamentais (TSC e TCA), os animais foram decapitados para retirada do córtex cerebral, estrutura utilizada para mensurar os níveis de NOx. Os metabólitos derivados do NO (nitrito e nitrato) foram determinados utilizando a análise de NOx, conforme descrito anteriormente (HEVEL E MARLETTA, 1994). Desse modo, para investigar o efeito do ácido ascórbico sobre o conteúdo de NOx no córtex cerebral os animais foram tratados com doses ativas (1 mg/kg) e subativas (0,1 mg/kg) de ácido ascórbico ou veículo. Após 60 minutos dessa administração, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e posterior análise do conteúdo de NOx (Figura 10A). Em um protocolo similar os animais foram tratados com doses ativas (1 mg/kg) e subativas (0,1 mg/kg) da cetamina ou veículo. Após 30 minutos dessa administração, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e posterior análise do conteúdo de NOx (Figura 10B).

4.5.4 Avaliação dos níveis de NOx e sua relação com a modulação de receptores GABA_A em animais tratados com L-arginina

Os protocolos experimentais descritos nesta sessão estão ilustrados na figura 11. Do mesmo modo, como previamente citado, após a realização dos testes comportamentais (TSC e TCA), os animais foram decapitados para retirada do córtex cerebral, estrutura utilizada para mensurar o conteúdo de NOx. Assim, para investigar a relação entre o sistema GABAérgico e nitrérgico no efeito tipo- antidepressivo do ácido ascórbico e da cetamina, mais especificamente a participação dos receptores GABA_A nessa interação, os camundongos foram tratados com uma dose subativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg) ou veículo. Após 30 minutos os animais foram tratados com L-arginina (precursor de NO via L-arginina/NO; 750 mg/kg, i.p.), e posteriormente com uma

dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg; agonista de receptores GABA_A, ip) ou veículo, sendo submetidos ao TSC ou teste do campo aberto 30 minutos após essa administração, seguindo com a análise do conteúdo de NOx (Figura 11A).

Um protocolo similar foi realizado com a cetamina. Os camundongos foram tratados com uma dose subativa de cetamina (0,1 mg/kg) ou veículo trinta minutos antes dos testes comportamentais. Concomitante a administração da cetamina os animais foram tratados intraperitonealmente com L-arginina e com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, agonista de receptores GABA_A) ou veículo, sendo submetidos ao TSC ou teste do campo aberto 30 minutos após essa administração. Imediatamente após o córtex cerebral foi removido para a realização da dosagem do conteúdo de NOx (Figura 11B).

Figura 9 - Protocolos experimentais para avaliação do envolvimento dos receptores GABAérgicos no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico

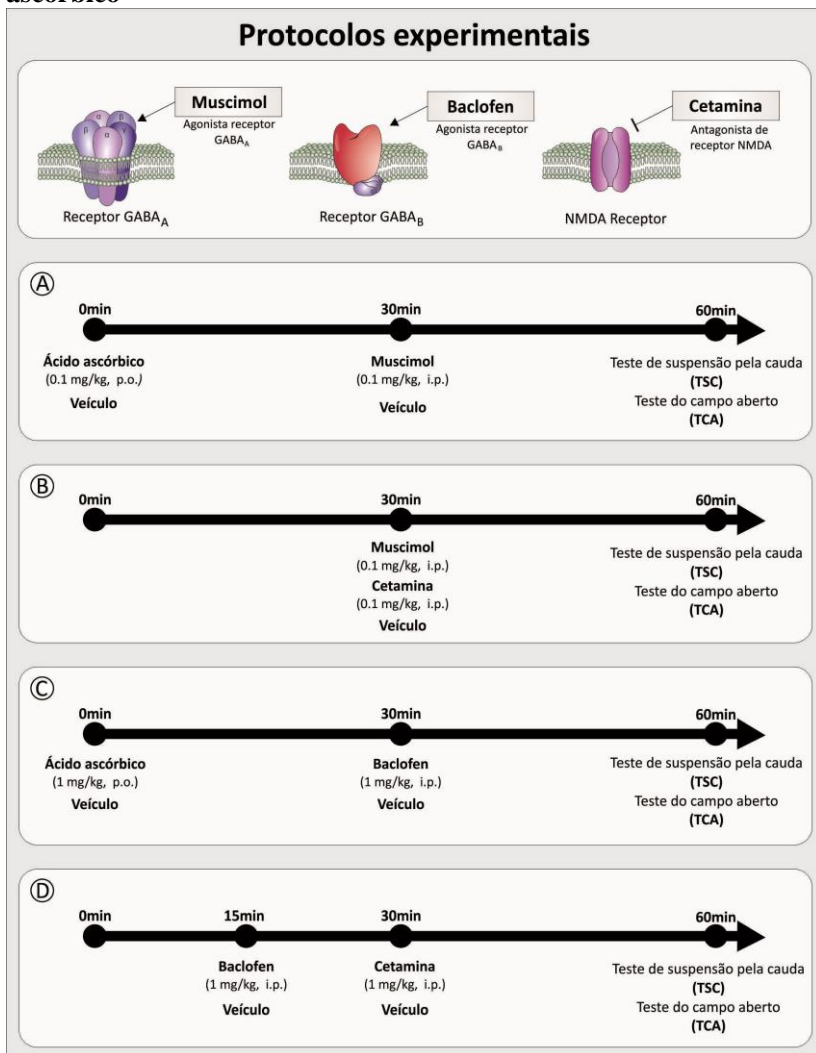


Figura 10 - Protocolos experimentais para avaliação dos níveis de NOx no efeito antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina

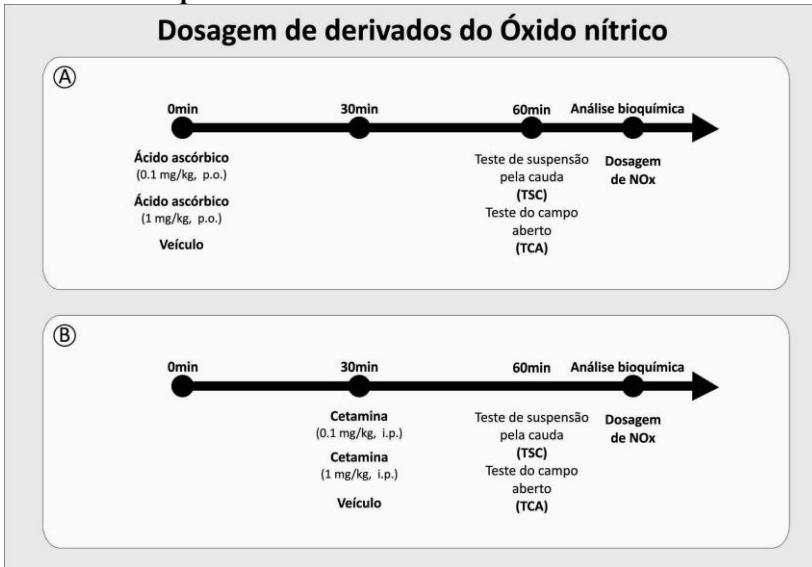
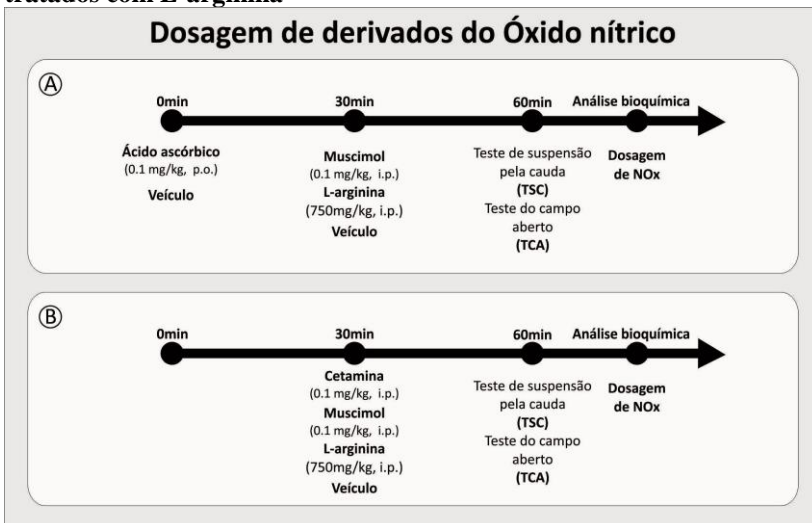


Figura 11 - Protocolos experimentais para avaliação dos níveis de NOx e sua relação com a modulação de receptores GABA_A em animais tratados com L-arginina



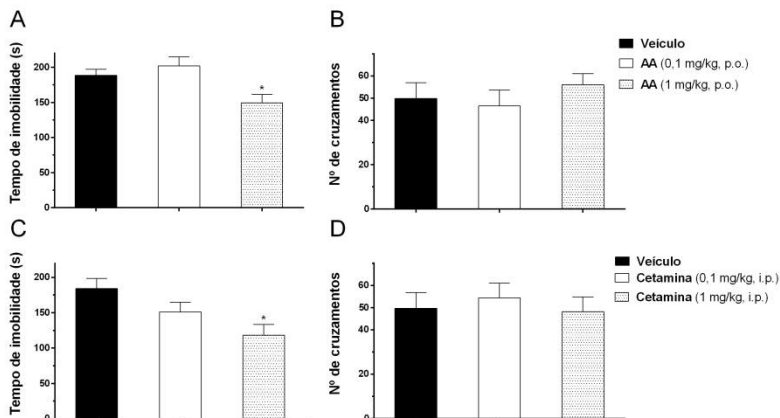
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico e cetamina em doses subativas e ativas no TSC e TCA

Os resultados demonstrados na figura 12A mostram o efeito da administração de do ácido ascórbico sobre o tempo de imobilidade no TSC. A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa no tratamento com ácido ascórbico [(F(2,20)=5,624)]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que a administração do ácido ascórbico na dose de 1 mg/kg reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC em relação ao grupo controle. Não foi observada alteração locomotora em nenhum grupo experimental no TCA (figura 12B). Em relação à atividade locomotora, a ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas do tratamento com ácido ascórbico sobre este parâmetro.

A figura 12C ilustra o efeito da administração de cetamina sobre a resposta comportamental de camundongos no TSC. A ANOVA de uma via revelou que a administração de cetamina produziu um efeito significativo no TSC (F(2,23)=5,120). O teste *post hoc* revelou que a cetamina administrada na dose de 1 mg/kg, mas não de 0,1 mg/kg, foi efetiva em reduzir o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC. Não foi observada alteração locomotora em nenhum grupo experimental no TCA (figura 12D). Em relação à atividade locomotora, a ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas do tratamento com cetamina.

Figura 12 - Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico e cetamina em doses subativas e ativas no TSC e TCA

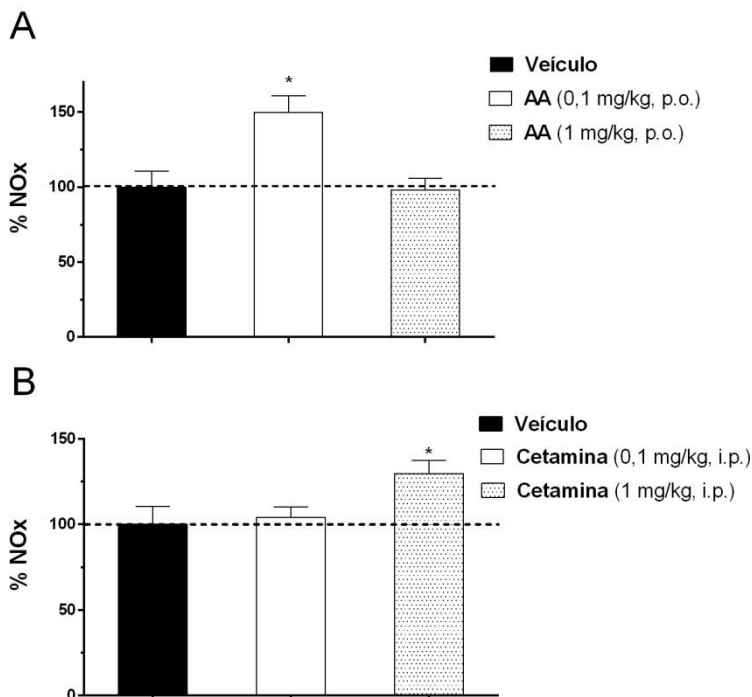


Efeito do tratamento com uma dose subativa (0,1 mg/kg, p.o.) e uma dose ativa de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) no tempo total de imobilidade de camundongos no TSC (Painel A) e atividade locomotora (Painel B). Efeito do tratamento de uma dose subativa (0,1 mg/kg, i.p.) e uma dose ativa de cetamina (1 mg/kg, i.p.) no tempo total de imobilidade de camundongos no TSC (Painel C) e atividade locomotora (Painel D). Cada coluna representa a média \pm EPM (n=7-8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls).

5.2 Avaliação do conteúdo cerebrocortical de NOx em animais tratados agudamente com ácido ascórbico e cetamina

Os resultados ilustrados na figura 13A e 13B mostram o efeito da administração de ácido ascórbico e da cetamina, respectivamente, em relação ao conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos. A ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa no tratamento tanto com ácido ascórbico ($F(2,20)=8,752$) como no tratamento com cetamina ($F(2,19)=3,51$). O teste *post hoc* revelou um aumento na % NOx em animais tratados com ácido ascórbico na dose de 0,1 mg/kg e na dose de 1 mg/kg de cetamina.

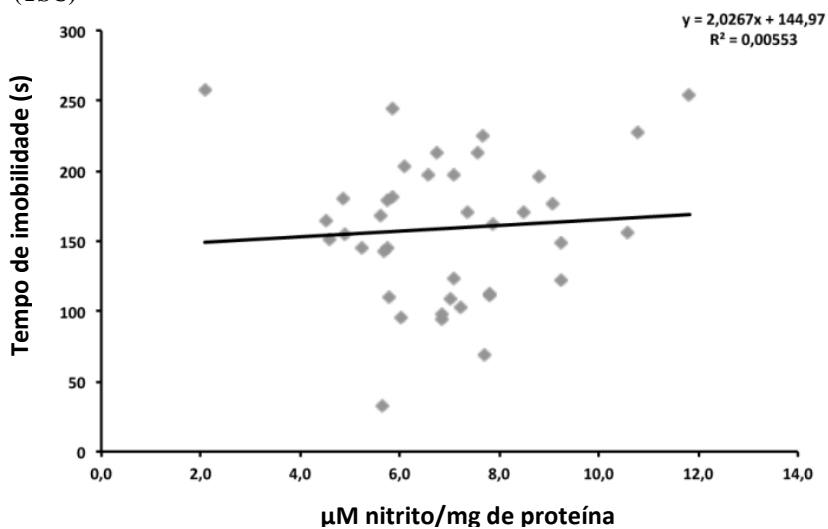
Figura 13 - Avaliação dos níveis de NOx em animais tratados agudamente com ácido ascórbico e cetamina



Efeito de uma dose subativa (0,1 mg/kg, p.o.) e uma dose ativa de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) no conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos (Painel A). Efeito de uma dose subativa (0,1 mg/kg, i.p.) e uma dose ativa de cetamina (1 mg/kg, i.p.) no conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos (Painel B). A média do conteúdo de NOx do grupo controle (100%) é de 5,99 μ M de nitrito por mg de proteína. Cada coluna representa a média + EPM (n=7-8). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls).

Adicionalmente a avaliação da distribuição dos dados (Figura 14), mostrou que a concentração de NOx não está diretamente relacionada com o tempo de imobilidade no TSC, visto que o valor de correlação foi significativamente baixo ($R^2=0,00553$) e o valor de $p=0,653$.

Figura 14 - Correlação μM de nitrito/mg proteína x tempo de imobilidade (TSC)



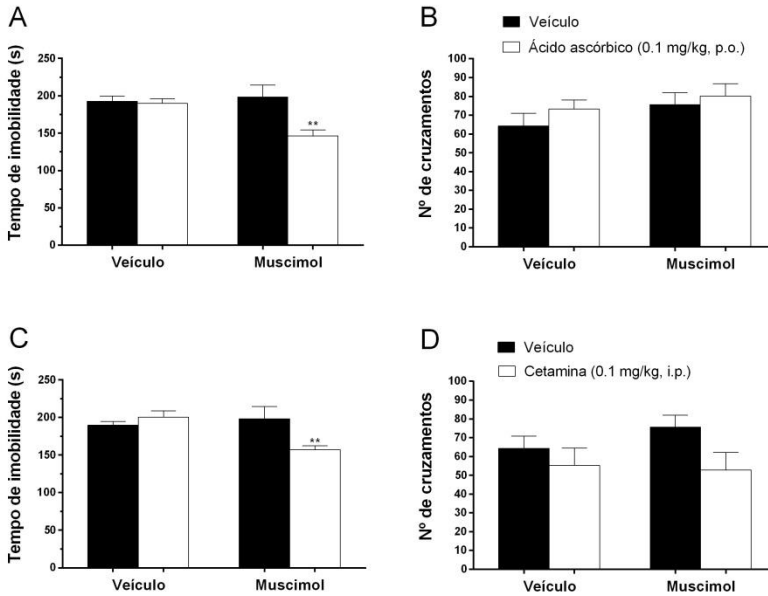
Avaliação da distribuição dos dados considerados apenas uma relação entre μM de nitrito/mg proteína X tempo de Imobilidade no TSC.

5.3 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA_A na atividade antidepressiva do ácido ascórbico ou cetamina

Os resultados demonstrados na figura 15A mostram o efeito da administração de uma dose subativa do ácido ascórbico com uma dose subativa do muscimol no TSC. A ANOVA de duas vias revela uma diferença significativa entre o tratamento com ácido ascórbico [$F(1,25)=7,573$, $p < 0,05$] e a interação ácido ascórbico x muscimol [$F(1,25)=6,056$, $p < 0,05$], mas não mostra efeito significativo do tratamento com muscimol [$F(1,25)=3,591$, $p > 0,05$]. O teste *post hoc* revelou um efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada do ácido ascórbico e muscimol. Não foi observada alteração locomotora em nenhum grupo experimental no TCA. Os resultados estão demonstrados na figura 15B. Em relação à atividade locomotora, a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas no tratamento com muscimol [$F(1,25)=2,107$, $p > 0,05$], ácido ascórbico [$F(1,25)=1,180$, $p > 0,05$], ou a interação ácido ascórbico x muscimol [$F(1,25)=0,127$, $p > 0,05$].

A figura 15C mostra o efeito da co-administração de uma dose subativa de cetamina com uma dose subativa de muscimol no TSC. ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa no tratamento com cetamina x muscimol [$F(1,25)=7,511$, $p < 0,05$], mas não no tratamento apenas com muscimol [$F(1,25)=3,297$, $p > 0,05$], ou com cetamina [$F(1,25)=2,529$, $p > 0,05$]. O teste *post hoc* indicou que a combinação de doses subativas de cetamina e muscimol produzem um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC. Nenhuma alteração locomotora foi observada no TCA, os resultados estão demonstrados na figura 15D. A ANOVA de duas vias revelou que não houve diferenças significativas no tratamento com muscimol [$F(1,25)=0,306$, $p > 0,05$], ácido ascórbico [$F(1,25)=4,021$, $p > 0,05$], ou interação ácido ascórbico x muscimol [$F(1,25)=0,738$, $p > 0,05$] neste parâmetro.

Figura 15- Uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina combinada com uma dose subativa de muscimol (agonista de receptor GABA_A) promove um efeito tipo-antidepressivo no TSC



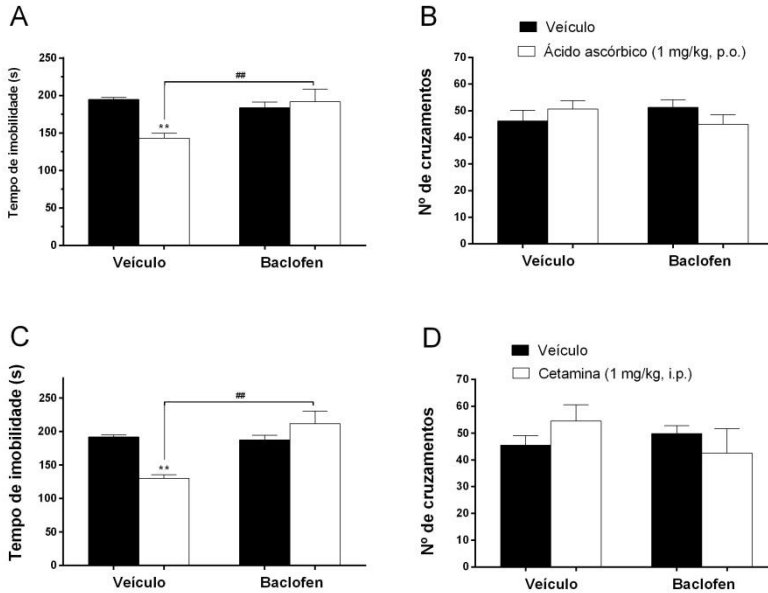
Efeito de uma dose subativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) em combinação com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (Painel A) e atividade locomotora (Painel B). Efeito de uma dose subativa de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em combinação com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (Painel C) e atividade locomotora (Painel D). Cada coluna representa a média \pm EPM (n=7-8). ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls).

5.4 Avaliação do envolvimento dos receptores GABA_B na atividade antidepressiva do ácido ascórbico ou cetamina

A figura 16A mostra o efeito do tratamento com baclofen no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas no tratamento com ácido ascórbico [$F(1,29)=5,097, p < 0,05$], interação ácido ascórbico x baclofen [$F(1,29)=9,314, p < 0,05$], mas não do tratamento apenas com baclofen [$F(1,29)=3,749, p > 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que a administração de baclofen reverteu o efeito tipo-antidepressivo apresentado pelo ácido ascórbico no TSC. Nenhuma alteração locomotora foi observada em nenhum dos grupos experimentais no TCA, conforme ilustrado na figura 16B. Em relação à atividade locomotora dos animais, a ANOVA de duas vias revelou que não houve diferenças significativas no tratamento com baclofen [$F(1,29)=0,009, p > 0,05$], ácido ascórbico [$F(1,29)=0,07, p > 0,05$], ou interação ácido ascórbico x baclofen [$F(1,29)=2,518, p > 0,05$].

Os resultados ilustrados na figura 16C mostram a influência do tratamento com baclofen sobre o efeito tipo-antidepressivo da cetamina no TSC em camundongos. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do tratamento com cetamina [$F(1,27)=12,548, p < 0,05$] e da interação cetamina x baclofen [$F(1,27)=15,563, p < 0,05$], mas não do tratamento apenas com baclofen [$F(1,27)=2,934, p > 0,05$]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o efeito anti-imobilidade da cetamina foi revertido completamente pela administração do baclofen. Em relação a atividade locomotora, ANOVA de duas vias revelou que não houve diferenças significativas do tratamento com baclofen [$F(1,27)=0,397, p > 0,05$], cetamina [$F(1,27)=0,017, p > 0,05$], ou interação cetamina x baclofen [$F(1,27)=0,850, p > 0,05$], como ilustrado na figura 16D.

Figura 16 - A ativação de receptores GABA_B reverte o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico ou da cetamina no TSC



Efeito de uma dose ativa de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) em combinação com uma dose ativa de baclofen (1 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (Painel A) e atividade locomotora (Painel B). Efeito de uma dose ativa de cetamina (1 mg/kg, i.p.) em combinação com uma dose ativa de baclofen (1 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (Painel C) e atividade locomotora (Painel D). Cada coluna representa a média \pm EPM (n=7-8). ** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle, ## $p < 0.01$ em relação ao grupo tratado com grupo ácido ascórbico ou cetamina (ANOVA de duas vias, seguida de teste *post hoc* de Newman-Keuls).

5.5 Influência do tratamento com L-arginina sobre o tempo de imobilidade no TSC e a atividade locomotora de camundongos tratados com a combinação de doses sub-ativas ácido ascórbico ou cetamina

Os resultados demonstrados na figura 17A mostram o efeito da administração de uma dose subativa do ácido ascórbico com uma dose subativa do muscimol em animais tratados com L-arginina no TSC. Os valores da ANOVA de três vias para os diferentes tratamentos e interações entre os tratamentos encontram-se na Tabela 2. O teste *post hoc* de Duncan revelou um efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada do ácido ascórbico e muscimol, a qual foi revertida pela administração da L-arginina. Também houve um efeito significativo sobre o tempo de imobilidade no TSC no grupo de animais que recebeu a combinação L-arginina + ácido ascórbico, em relação ao grupo controle. Não foi observada alteração locomotora em nenhum grupo experimental no TCA (figura 17B). Em relação à atividade locomotora, a ANOVA de três vias não revelou diferenças significativas no tratamento com ácido ascórbico, muscimol, interação ácido ascórbico x muscimol ou a interação ácido ascórbico x muscimol e L-arginina.

Os resultados demonstrados na figura 17C mostram o efeito da administração de uma dose subativa de cetamina com uma dose subativa do muscimol em animais tratados com L-arginina no TSC. Os valores da ANOVA de três vias para os diferentes tratamentos e interações entre os tratamentos encontram-se na Tabela 3. O teste *post hoc* de Duncan revelou um efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada da cetamina e muscimol, o qual foi revertida pela L-arginina. Também houve um efeito significativo sobre o tempo de imobilidade no TSC no grupo de animais que recebeu a combinação L-arginina + cetamina, em relação ao grupo controle. Não foi observada alteração locomotora em nenhum grupo experimental no TCA. Os resultados estão demonstrados na figura 17D. Em relação à atividade locomotora, a ANOVA de três vias não revelou diferenças significativas no tratamento com cetamina, muscimol, interação cetamina x muscimol ou a interação ácido ascórbico x muscimol e L-arginina.

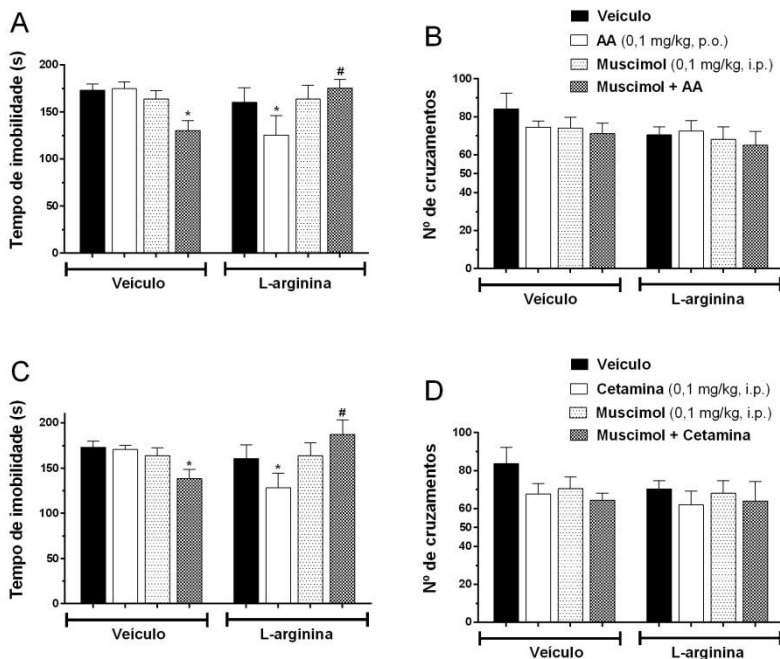
Tabela 2 - Valores de F e p do experimento com L-arginina x muscimol x ácido ascórbico

TSC		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L- arginina	F(1,49)=0,249	$p>0,05$
Tratamento Ácido ascórbico	F(1,49)=0,001	$p>0,05$
Tratamento Muscimol	F(1,49)=2,725	$p>0,05$
Interação Muscimol x AA	F(1,49)=6,014	$p<0,05^*$
Interação L-arginina x Ácido ascórbico	F(1,49)=10,203	$p<0,05^*$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,49)=0,070	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Ácido ascórbico	F(1,49)=0,118	$p>0,05$
TCA		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L- arginina	F(1,51)=2,674	$p>0,05$
Tratamento Ácido ascórbico	F(1,51)=1,835	$p>0,05$
Tratamento Muscimol	F(1,51)=0,626	$p>0,05$
Interação Muscimol x AA	F(1,51)=0,455	$p>0,05$
Interação L-arginina x Ácido ascórbico	F(1,51)=0,040	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,51)=0,455	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Ácido ascórbico	F(1,51)=0,008	$p>0,05$

Tabela 3 - Valores de F e p do experimento com L-arginina x muscimol x cetamina

TSC		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L- arginina	F(1,51)=0,030	$p>0,05$
Tratamento Cetamina	F(1,51)=1,176	$p>0,05$
Tratamento Muscimol	F(1,51)=0,382	$p>0,05$
Interação Muscimol x Cetamina	F(1,51)=9,477	$p<0,05^*$
Interação L-arginina x Cetamina	F(1,51)=5,464	$p<0,05^*$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,51)= 0,342	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Cetamina	F(1,51)=0,962	$p>0,05$
TCA		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L- arginina	F(1,49)=1,287	$p>0,05$
Tratamento Cetamina	F(1,49)=3,238	$p>0,05$
Tratamento Muscimol	F(1,49)=0,7633	$p>0,05$
Interação Muscimol x Cetamina	F(1,49)=0,687	$p>0,05$
Interação L-arginina x Cetamina	F(1,49)=0,253	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,49)=0,0823	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Cetamina	F(1,49)=0,560	$p>0,05$

Figura 17 - Efeito do tratamento agudo com L-arginina em animais tratados com uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina com uma dose subativa de muscimol no TSC e TCA



Efeito de uma dose subativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) em combinação com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com veículo ou L-arginina (750 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade no TSC (Painel A) e atividade locomotora (Painel B). Efeito de uma dose subativa de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em combinação com uma dose subativa de muscimol (0,1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com veículo ou L-arginina (750 mg/kg, ip) no tempo de imobilidade no TSC (Painel C) e atividade locomotora (Painel D). Cada coluna representa a média + EPM (n=7-8). * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle, \$ $p < 0.05$ em relação ao grupo tratado com ácido ascórbico ou Muscimol + Ácido ascórbico (ANOVA de três vias, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

5.6 Avaliação do conteúdo de NOx em animais tratados com L-arginina que receberam uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina em combinação com uma dose subativa de muscimol

Os resultados mostrados na figura 17A mostram o conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos que foram submetidos aos tratamentos com L-arginina ou veículo em combinação com doses subativas de ácido ascórbico e/ou muscimol. Os valores da ANOVA de três vias para os diferentes tratamentos e interações entre os tratamentos encontram-se na Tabela 4. O teste *post hoc* de Duncan mostrou um aumento do conteúdo de NOx no grupo tratado com ácido ascórbico ou com ácido ascórbico + muscimol, mas no grupo tratado com muscimol isoladamente houve uma redução no conteúdo de NOx. Além disso, foi observada uma redução no conteúdo de NOx nos grupos tratados, L-arginina + ácido ascórbico e L-arginina + muscimol quando comparados ao grupo tratado com ácido ascórbico, assim como no grupo tratado apenas com L-arginina.

Os resultados mostrados na figura 17B mostram o conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos que foram submetidos aos tratamentos com L-arginina ou veículo em combinação com doses subativas de cetamina e/ou muscimol. Os valores da ANOVA de três vias para os diferentes tratamentos e interações entre os tratamentos encontram-se na Tabela 5. O teste *post hoc* de Duncan mostrou um aumento do conteúdo de NOx no grupo tratado com cetamina + muscimol em relação ao grupo controle. Por outro lado, foi observada uma redução no conteúdo de NOx nos grupos tratados com muscimol isoladamente e com L-arginina + cetamina e L-arginina + muscimol.

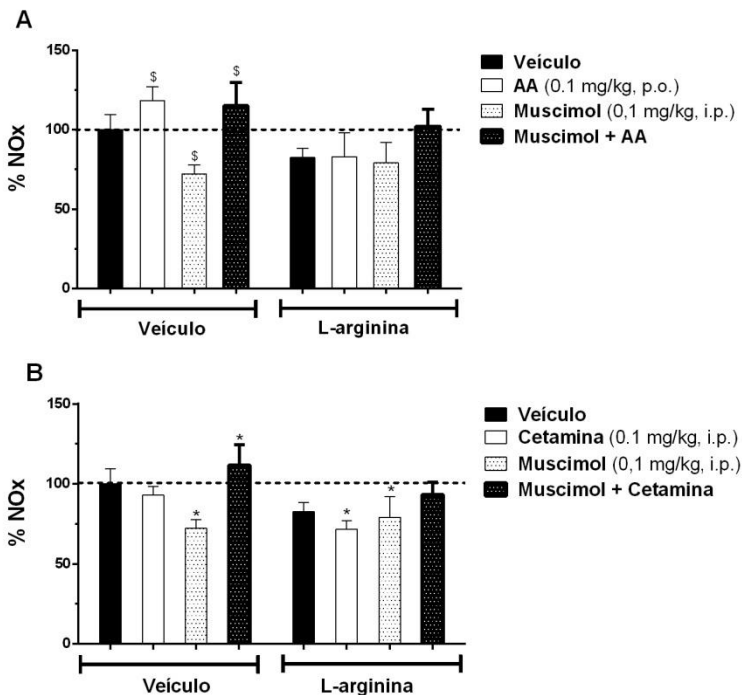
Tabela 4 - Valores de F e p sobre avaliação do conteúdo de NOx no experimento com L-arginina x muscimol x ácido ascórbico

Conteúdo de NOx		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L-arginina	F(1,48)=3,641	$p>0,05$
Tratamento Ácido ascórbico	F(1,48)=7,62	$p<0,05^*$
Tratamento Muscimol	F(1,48)=0,245	$p>0,05$
Interação Muscimol x AA	F(1,48)=2,393	$p>0,05$
Interação L-arginina x Ácido ascórbico	F(1,48)=2,343	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,48)=1,501	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Ácido ascórbico	F(1,48)=0,062	$p>0,05$

Tabela 5 - Valores de F e p sobre avaliação do conteúdo de NOx no experimento com L-arginina x muscimol x cetamina

Conteúdo de NOx		
	Valor de F	Valor de p
Tratamento L-arginina	F(1,50)=4,135	$p<0,05^*$
Tratamento Cetamina	F(1,50)=0,136	$p>0,05$
Tratamento Muscimol	F(1,50)=2,115	$p>0,05$
Interação Muscimol x Cetamina	F(1,50)=8,49	$p<0,05^*$
Interação L-arginina x Cetamina	F(1,50)=1,264	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol	F(1,50)=1,388	$p>0,05$
Interação L-arginina x Muscimol x Cetamina	F(1,50)=0,774	$p>0,05$

Figura 17. Avaliação do conteúdo de NOx em animais tratados com L-arginina que receberam uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina e/ou uma dose subativa de muscimol



Efeito de uma dose subativa de ácido ascórbico (0.1 mg/kg, p.o., painel A) ou de cetamina (0.1 mg/kg, i.p., painel B) em combinação com uma dose subativa de muscimol (0.1 mg/kg, i.p.) em animais tratados com veículo ou L-arginina (750 mg/kg, i.p.) sobre o conteúdo de NOx do córtex cerebral de camundongos. A média do conteúdo de NOx do grupo controle (100%) é de 4,90 μ M de nitrito por mg de proteína. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=7-8). * p <0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA de três vias, seguida do teste *post hoc* de Duncan).

6 DISCUSSÃO

Os primeiros relatos sobre o suposto efeito antidepressivo do ácido ascórbico foram publicados há muitos anos (COCCHI et al., 1980), e ao longo do tempo outros trabalhos relataram que esta vitamina possui a capacidade de melhorar o humor de pacientes saudáveis (BRODY et al., 2002), assim como melhorar sintomas depressivos em pacientes idosos (OISHI et al., 2009) e crianças (AMR et al., 2013). Nossos resultados confirmam dados anteriores que demonstraram que o ácido ascórbico tem um efeito tipo-antidepressivo no TSC (BINFARE et al., 2009; MORETTI et al., 2011). Além disso, forneceu evidências que o sistema GABAérgico está implicado no efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico assim como modulação da atividade da via nitrérgica, de forma semelhante à cetamina, um antidepressivo de ação rápida, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos implicados no seu efeito tipo-antidepressivo.

Foi observado um efeito do tipo-antidepressivo sinérgico quando uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina foi administrada juntamente com uma dose subativa do agonista de receptor GABA_A, o muscimol, em camundongos submetidos ao TSC, sugerindo que o efeito antidepressivo desses compostos pode estar relacionado com a ativação de receptores GABA_A. Grande parte da neurotransmissão inibitória rápida no SNC é mediada por receptores GABA_A, os quais também estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (PEHRSON E SANCHEZ., 2015). Estudos em camundongos *knockout* revelaram que a ausência da subunidade α_2 do receptor GABA_A está associado com o comportamento tipo-depressivo no TNF e no TSC (VOLLENWEIDER et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que o clonazepam, um modulador positivo do receptor GABA_A, reverte o aumento no tempo de imobilidade em roedores diabéticos avaliados no TNF (HILAKIVI-CLARKE et al., 1990). Corroborando com estes dados, outro estudo mostrou que uma dose considerada antidepressiva da taurina foi capaz de modular a função do sistema GABAérgico, aumentando a expressão da subunidade α_2 do receptor GABA_A no hipocampo de ratos diabéticos (CALETTI et al., 2015). Por outro lado, a infusão de muscimol no córtex pré-frontal infralímbico bloqueou completamente o efeito antidepressivo da cetamina no TNF (FUCHIKAMI et al., 2015). Um estudo recente demonstrou também que uma dose baixa de cetamina combinada com propofol melhora a eficácia antidepressiva da eletroconvulsoterapia em ratos, um efeito associado ao aumento da fosforilação de receptores GABA_A e GluA1 no hipocampo de ratos

estressados (CHEN et al., 2015). Entretanto, é importante ressaltar que a participação dos receptores GABAérgicos na depressão não é totalmente esclarecida. Alguns estudos mostram que os pacientes com depressão ou vítimas de suicídio tinham uma supra regulação da expressão do gene do das subunidades GABA_{A α 1} and GABA_{A β 3} do receptor de GABA_A no córtex frontal (CHOUDARY et al., 2005), bem como algumas subunidades que compõem receptores GABA no córtex dorsolateral pré-frontal e o córtex temporal inferior (SEQUEIRA et al., 2009). Além disso, a administração sistêmica de moduladores alostéricos negativos da subunidade α 5 de receptores GABA_A, L-655,708 e MRK-016 rapidamente reverteu a diminuição na preferência por sacarose (comportamento anedônico) e a redução da interação social reduzida induzida por dois diferentes protocolos de estresse crônico em ratos, um efeito associado a restauração da força sináptica excitatória no hipocampo (FISCHELL et al., 2015).

Em um segundo conjunto de experimentos, foi observado que o efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico no TSC, semelhante à cetamina, foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com o agonista de receptor GABA_B baclofen, sugerindo que o efeito anti-imobilidade destes compostos no TSC pode estar associado com o antagonismo de receptores GABA_B. Os receptores GABA_B são heterodímeros compostos por subunidades GABA_{B1} e GABA_{B2} (GASSMANN E BETTLER, 2012), e são altamente presentes em células neuronais, incluindo populações de interneurônios, algumas células gliais (CRYAN E KAUPMANN, 2005) e as células do sistema límbico, as quais estão associadas à regulação do comportamento emocional (MCDONALD et al., 2004). Receptores GABA_B são acoplados a proteínas G e atuam promovendo hiperpolarização neuronal (FERNANDEZ-ALACID et al., 2009; PINARD, et al., 2010). Eles estão localizados pré- e pós-sinápticamente e regulam a liberação de neurotransmissores e os canais sensíveis à voltagem Ca²⁺ e Kir3 - K⁺ (GHOSE et al., 2011). Devido à sua larga distribuição e efeitos, estudos pré-clínicos e clínicos indicam que as alterações nos receptores GABA_B contribuem para os sintomas de uma série de condições clínicas, incluindo convulsões, déficits cognitivos, depressão, ansiedade, abuso de drogas, esquizofrenia, dor e doenças relacionadas ao refluxo gastroesofágico (ENNA., 2001; BOWERY et al., 2004; FROESTL., 2010).

Estudos pré-clínicos demonstraram que camundongos sem a expressão de receptores GABA_B funcionais exibem um fenótipo tipo-antidepressivo (MOMBEREAU et al., 2004; MOMBEREAU et al.,

2005), e o bloqueio farmacológico desses receptores resulta em uma resposta tipo-antidepressiva (NOWAK et al., 2006; FELICE et al., 2012). Em concordância com esses achados, recentemente foi demonstrado que a administração perinatal crônica de citalopram, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, resulta em uma diminuição da regulação de receptores GABA_B (WANG et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que antagonistas de receptores GABA_B aumentam a proliferação de células no hipocampo adulto (FELICE et al., 2012), o qual é um importante regulador do estresse e da neuroplasticidade na resposta antidepressiva. Finalmente, O'LEARY e colaboradores (O'LEARY et al., 2014) mostraram que diferentes isoformas de subunidades de receptores GABA_{B1} regulam a resiliência a anedonia induzida pelo estresse. Camundongos que não expressam a subunidade GABA_{B1a} são resilientes a anedonia e ao retraimento psicossocial induzido pelo estresse e apresentam um comportamento tipo-antidepressivo, de modo que camundongos *knockout* para GABA_{B1b} são mais suscetíveis a anedonia e retraimento psicossocial induzida pelo estresse.

Apesar de diversos estudos pré-clínicos e clínicos terem demonstrado e reforçado a hipótese que o ácido ascórbico possui propriedades antidepressivas (KHANZODE et al., 2003; CHANG et al., 2007) os mecanismos de ação responsáveis por seu efeito antidepressivo não se encontram totalmente esclarecidos. Um trabalho realizado recentemente sugeriu que a ativação de receptores GABA_A poderia envolver uma inibição da via nitrérgica (SARAVI et al., 2016). Considerando que o conjunto de dados iniciais deste trabalho indica que o efeito do ácido ascórbico parece envolver a ativação de receptores GABAérgicos do subtipos GABA_A, um experimento independente foi realizado a fim de avaliar se esse mecanismo promovido pelo ácido ascórbico envolveria também a modulação da via nitrérgica. Um estudo realizado previamente sugeriu que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC envolve uma modulação da via L-arginina-NO-GMPc, pois foi demonstrado que a administração de L-arginina foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC, assim como o tratamento com doses subativas desta vitamina em combinação com inibidores da NOS promoveram efeitos sinérgicos diminuindo o tempo de imobilidade no TSC (MORETTI et al., 2011). Os dados obtidos neste trabalho mostraram adicionalmente que a administração de uma dose de ácido ascórbico que foi efetiva em reduzir o tempo de imobilidade no TSC (1 mg/kg), ou seja, uma dose ativa neste teste, não promoveu alteração no conteúdo de NOx quando comparada

ao grupo controle. Em contrapartida, a administração de uma dose muito baixa desta vitamina (0,1 mg/kg), a qual não causa nenhum efeito comportamental no TSC foi capaz de promover um aumento no conteúdo de NOx no córtex cerebral de camundongos. Adicionalmente, foi observado a administração de cetamina em dose ativa no TSC (1 mg/kg) promoveu um aumento no conteúdo de NOx no córtex cerebral, em comparação ao grupo controle, mas quando administrada em dose subativa o tratamento não foi capaz de promover um aumento nos níveis de NOx, sugerindo que o aumento moderado nos níveis de NOx pode contribuir para o efeito tipo-antidepressivo deste composto. Este resultado está de acordo com um resultado prévio do nosso grupo que mostra que nesta mesma dose e via de administração a cetamina foi efetiva em aumentar o conteúdo de NOx no córtex cerebral e no hipocampo de camundongos (CUNHA et al., 2015). A cetamina é um antidepressivo de efeito rápido que promove seu efeito pelo menos em parte por causar inibição de receptores NMDA. De forma semelhante, o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC parece ser dependente pelo menos em parte da inibição de receptores NMDA, uma vez que a administração de NMDA foi capaz de promover uma reversão do efeito anti-imobilidade do ácido ascórbico no TSC assim como a administração combinada de doses sub-efetivas de ácido ascórbico e MK-801 foi efetiva em produzir um efeito tipo-antidepressivo no TSC (MORETTI et al., 2011). A produção de NO no cérebro está relacionada com a atividade glutamatérgica, e envolve a ativação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA, essa ativação promove um influxo de Ca^{2+} que por sua vez ativa o complexo calmodulina que ativa a isoforma neuronal da NOS (nNOS), promovendo assim a conversão de L-arginina para L-citrulina e NO, sendo essa reação dependente de oxigênio (BREDET et al., 1991; GARTHWAITE E BOULTON, 1995). Após sua produção o NO pode ativar a GCs (EAST E GARTHWAITE, 1991), desencadeando respostas fisiológicas específicas que incluem a excitabilidade neuronal, plasticidade sináptica, a modulação da liberação do neurotransmissor, aprendizagem e processos de memória (GARTHWAITE E BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008; STEINERT et al., 2010). Por outro lado, há evidências que apontam para a produção não enzimática de NO no encéfalo, através da redução de nitrito no meio extracelular mediada pelo ascorbato liberado de neurônios (MILLAR et al., 1995). Esta produção também ocorre no compartimento gastrointestinal onde o pH gástrico permite condições necessárias para a redução de nitrito promovida por ascorbato e polifenóis. Desta forma, podemos levantar a hipótese de que o

ascorbato possa influenciar o conteúdo de NO cerebral por dois mecanismos distintos: a) ao inibir receptores NMDA poderia promover a redução da síntese enzimática (via NOS) de NO; b) ao atuar como agente redutor no trato gastrointestinal e no cérebro poderia aumentar a produção não enzimática de NO a partir de nitrito. Desta forma, ao determinarmos o conteúdo de NOx no córtex cerebral estaríamos determinando indiretamente o saldo líquido de NO que gerou NOx através destes dois mecanismos. Por esta razão os níveis de NOx podem ser influenciados pela dose de ácido ascórbico administrada. Em um estudo prévio a dose de ácido ascórbico de 1 mg/kg ao inibidor receptores NMDA (MORETTI et al., 2011), provoca uma conseqüente redução do influxo de cálcio e redução da atividade da NOS neuronal, podendo estar promovendo uma redução da síntese de NO, embora paralelamente poderia estar causando um aumento da produção de NO não enzimática, de forma que o conteúdo de NOx seria semelhante ao encontrado no grupo controle. Por outro lado, a dose 10 vezes inferior a esta não está provavelmente associada à inibição de receptores NMDA, não influenciando, portanto a síntese enzimática de NO, mas poderia promover o aumento da síntese não enzimática, de tal forma que ao dosarmos o conteúdo de NOx nos animais tratados com esta dose muito baixa de ácido ascórbico observamos um aumento do seu conteúdo no córtex cerebral. Entretanto, esta hipótese necessita de experimentos futuros para ser confirmada.

Em relação à cetamina, o mecanismo responsável pelo aumento de NOx necessita ser futuramente investigado. É interessante mencionar que o aumento do conteúdo de NOx observado no córtex cerebral de animais tratados com cetamina na dose que produz efeito antidepressivo é semelhante ao resultado observado em animais tratados com creatina em doses ativas capazes de promover uma diminuição no tempo de imobilidade no TSC (CUNHA et al., 2015). Esses dados estão de acordo com trabalhos que sugerem um efeito dual do NO sobre a regulação do humor, uma vez que tanto o precursor de NO como inibidores da NOS, em doses baixas, podem promover efeitos antidepressivos (DA SILVA et al., 2000; INAN et al. 2004). Assim é possível sugerir que o NO exerce efeitos benéficos sobre o humor, quando presente em níveis moderados, visto que o excesso da produção de NOx promovida pela administração de L-arginina promove uma reversão do efeito tipo-antidepressivo promovido pela creatina, por exemplo, no TSC (CUNHA et al., 2015). Ainda, a análise de correlação não mostrou uma relação direta entre o aumento de NOx e o tempo de imobilidade no TSC, reforçando a hipótese que o NO possui um papel dual, na modulação de

humor. Assim já foi demonstrando que o efeitos na modulação de humor podem envolver tanto uma diminuição quanto o aumento no conteúdo de NOx em regiões cerebrais. Corroborando essa hipótese já foi visto que o efeito tipo-antidepressivo da atorvastatina envolve uma inibição da ativação de receptores NMDA e uma posterior diminuição do conteúdo de nitrito (LUDKA et al., 2013), assim como o tratamento da creatina ou cetamina possuem um efeito anti-imobilidade no TSC promovendo um aumento no conteúdo de NOx tanto no hipocampo como no córtex cerebral de camundongos (CUNHA et al., 2015).

Inicialmente foi observado um efeito do tipo-antidepressivo sinérgico quando uma dose subativa de ácido ascórbico ou cetamina foi administrada juntamente com uma dose subativa do agonista de receptor GABA_A, o muscimol, em camundongos submetidos ao TSC, esses dados sugerem que o efeito antidepressivo desses compostos pode estar relacionado com a ativação de receptores GABA_A. Dados publicados recentemente sugerem que a inibição da via nitrérgica estaria relacionada com a ativação dos receptores GABAérgicos do subtipo GABA_A, podendo ser esse o mecanismo responsável pela atividade tipo-antidepressiva do EE₂ em camundongos (SARAVI et al., 2016). Desse modo foi observado que o pré-tratamento dos animais com L-arginina reverteu o efeito sinérgico promovido pela administração de doses subativas de muscimol com cetamina ou ácido ascórbico. Foi observado que administração de doses subativas de muscimol em ambos os experimentos foi capaz de diminuir os níveis de NOx no córtex total dos camundongos, mesmo não promovendo efeito anti-imobilidade no TSC, reafirmando a hipótese previamente sugerida por SARAVI (2016). Assim, levando em consideração que o muscimol em doses subativas já é capaz de promover uma diminuição nos níveis de NOx, acredita-se então que o aumento nos níveis de NOx, observados na interação ácido ascórbico x muscimol possa estar ocorrendo por outro mecanismo, diferente da via L-argininina/NO/GCs. É possível sugerir que parte do aumento de NOx observado neste grupo de animais poderia ser pela formação de NO não enzimática, mas esta hipótese necessita ser futuramente investigada.

Ainda foi observado um efeito tipo-antidepressivo sinérgico decorrente da administração de L-arginina com ácido ascórbico ou cetamina, promovendo uma diminuição no tempo de imobilidade no TSC. Esses dados são similares aos trabalhos que mostraram que administração de doses baixas de precursores de NO e doses subativas de inibidores da NO são capazes de promover atividade tipo-antidepressiva (HEINZEN E POLLACK, 2002). Um resultado

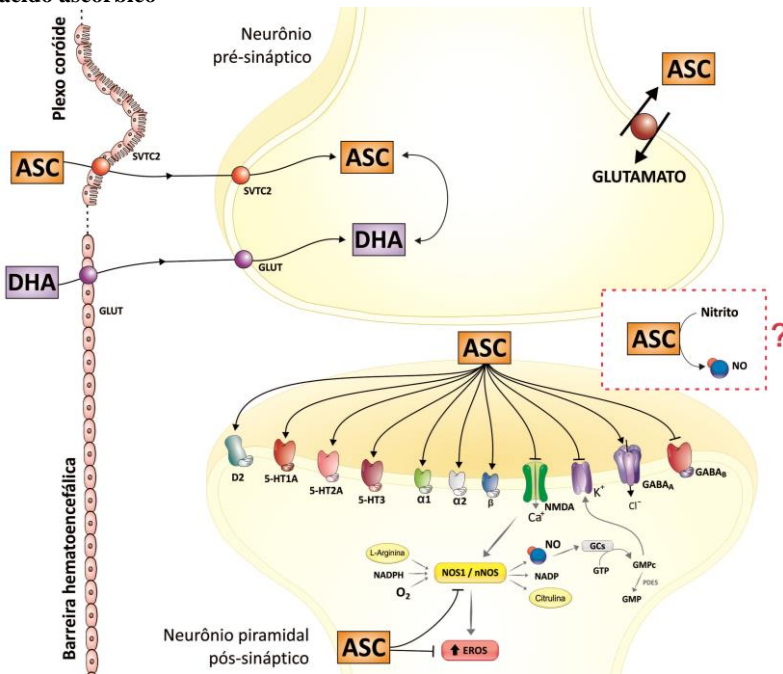
semelhante também foi observado no estudo de KORDJAZI e colaboradores (2015), no qual foi administrado L-arginina na mesma dose utilizada no presente estudo em associação com cloreto de rubídio. Neste estudo o cloreto de rubídio, de forma semelhante ao ácido ascórbico e à cetamina também aumentou os níveis de NOx, mas, ao contrário do nosso estudo, a dosagem foi realizada no hipocampo. Porém mais estudos são necessários para compreender melhor qual o mecanismo de ação envolvido nesse efeito sinérgico, principalmente pelo fato que o tratamento combinado promoveu uma diminuição dos níveis de NOx, tanto no caso do ácido ascórbico como no da cetamina, além de promover uma diminuição no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC.

Os animais que foram pré-tratados com L-arginina, não demonstraram um aumento nos níveis de NOx. É necessária a realização de novos experimentos para confirmação desses resultados, visto que já foi demonstrado que a administração de L-arginina nesta mesma dose promove um aumento nos níveis de NOx (CUNHA et al., 2015). Contudo, de forma semelhante aos nossos resultados, já foi demonstrado que a administração de L-arginina nesta mesma dose não foi capaz de alterar os níveis de nitrito no hipocampo de ratos na ausência do tratamento com cloreto de rubídio, e que o aumento no conteúdo de nitrito só foi observado quando L-arginina foi administrada juntamente com cloreto de rubídio (KORDJAZY et al., 2015).

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, os dados da literatura que tratam sobre o sistema GABAérgico na depressão apontam para uma ativação dos receptores GABA_A e o bloqueio dos receptores GABA_B como um mecanismo implicado nos efeitos tipo-antidepressivos, como recentemente foi demonstrado por uma revisão realizada por PYTKA e colaboradores (PYTKA et al., 2016). Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura. Além disso, foi demonstrado anteriormente que o ácido ascórbico e a cetamina compartilham mecanismos antidepressivos, incluindo o aumento da sinalização da via mTOR (MORETTI et al., 2014). O presente estudo reforça o sistema GABAérgico como um alvo para os agentes antidepressivos em desenvolvimento e amplia dados da literatura em relação aos mecanismos subjacentes a ação antidepressiva de ácido ascórbico e cetamina, sugerindo que seus efeitos no TSC podem ser dependente da ativação de receptores GABA_A e uma possível inibição de receptores GABA_B. Adicionalmente, foi possível confirmar que a ativação de receptores GABA_A está associada com modulação e diminuição da atividade nitrérgica. Considerando estudos anteriores, sugerimos que o efeito antidepressivo do ácido ascórbico pode ser dependente do seu papel modulador em vários sistemas de neurotransmissores, conforme indicado na figura 18. Além do possível papel do sistema GABAérgico que foi demonstrado nesse trabalho, o ácido ascórbico, possivelmente inibe receptores NMDA (MORETTI et al., 2014) e modula sistemas monoaminérgicos. Os resultados de estudos farmacológicos prévios indicam que a modulação monoaminérgica do ácido ascórbico envolve uma interação com receptores de serotonina (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃), receptores α 1-, α 2- e β -adrenérgicos, assim como receptores de dopamina D2 (BINFARE et al., 2009). Além disso, este trabalho levanta a hipótese de que o ácido ascórbico possa contribuir para formação de NO por uma via não enzimática, através da redução do nitrito, mas possivelmente modula também a NOS.

Figura 18 - Principais mecanismos responsáveis pelo efeito antidepressivo do ácido ascórbico



Em pH fisiológico o ácido ascórbico se ioniza liberando um próton e passa a se chamar ascorbato (ASC), que pode ser oxidado formando o ácido desidroascórbico (DHA). Ambos podem ser captados pelo sistema nervoso central (SNC), sendo o ASC via transportadores dependentes de sódio tipo 2 (SVTC2) no plexo coróide e o DHA através transportadores de glicose (GLUT) presentes na barreira hematoencefálica (BHE). Estudos farmacológicos prévios indicam que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico envolve uma interação com receptores de receptores dopaminérgicos D2, receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃), assim como receptores α₁-, α₂- e β-adrenérgicos (BINFARE et al., 2009). Foi demonstrado também que o ácido ascórbico é capaz de modular a neurotransmissão glutamatérgica, de duas formas: a) inibindo receptores NMDA através de um fenômeno redox; b) Participando do processo de captação de glutamato (pelos receptores EAAT1 e EAAT2) por um sistema que capta uma molécula de glutamato e libera uma molécula de ASC (MORETTI et al., 2014). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo desta vitamina pode ser dependente da ativação de receptores GABA_A e uma possível inibição de receptores GABA_B (ROSA ET AL., 2016), além de envolver uma modulação do sistema nitérgico. O ASC possivelmente pode promover tanto uma inibição da via L-arginina-NO-GMPc, como pode contribuir para formação de NO por uma via não enzimática, através da redução do nitrito. O efeito tipo antidepressivo do ASC envolve também o bloqueio dos canais de K⁺ dependentes de voltagem, bem como uma diminuição do estresse oxidativo (MORETTI et al, 2011; MORETTI et al., 2012).

8 PERSPECTIVAS

- Investigar detalhadamente o envolvimento do ácido ascórbico com a via não enzimática alternativa de produção de NO no cérebro e o papel da mesma na modulação do humor.
- Investigar o conteúdo de NOx em outras estruturas cerebrais relacionadas aos transtornos de humor.
- Avaliar por quais mecanismos ocorre um sinergismo entre o tratamento de L-arginina com cetamina ou ácido ascórbico.
- Dosar o conteúdo de GABA em diferentes regiões encefálicas relacionadas à depressão em animais tratados com ácido ascórbico e cetamina.
- Investigar se o tratamento com cetamina é capaz de aumentar o conteúdo encefálico de ácido ascórbico.
- Investigar se o tratamento com ácido ascórbico e cetamina inibem a atividade da enzima NOS.

REFERÊNCIAS

- AMR, M., A. EL-MOGY, ET AL. Efficacy of vitamin C as an adjunct to fluoxetine therapy in pediatric major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Nutr J**, v.12, p.31, 2013.
- BERMAN, R. M., A. CAPPIELLO, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v.47, n.4 p. 351-354, 2000.
- BERTON, O. AND E. J. NESTLER. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v.7, n.2, p137-151, 2006.
- BINFARE, R. W., A. O. ROSA, et al. 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.
- BORMANN, J. Electrophysiology of single GABA receptor chloride channels. **Clin Neuropharmacol**, v.9, n.4, p.386-388, 1986.
- BOWERY, N., S. J. ENNA, et al. Six decades of GABA. **Biochem Pharmacol**, v.68, n.8, p.1477-1478, 2004.
- BREDT, D. S., C. E. GLATT, et al. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**, v.7, n.4, p.615-624, 1991.
- BRODY, S., R. PREUT, et al. A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. **Psychopharmacology (Berl)**, v.159, p.319-324, 2002.
- CALETTI, G., F. B. ALMEIDA, et al. Antidepressant dose of taurine increases mRNA expression of GABAA receptor alpha2 subunit and BDNF in the hippocampus of diabetic rats. **Behav Brain Res**, v.283, p.11-15, 2015.

CAREY, D. J. e M. S. TODD. 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.

CARR, A. C. e M. C. VISSERS. Good nutrition matters: hypovitaminosis C associated with depressed mood and poor wound healing. **N Z Med J**, v.125, n.1362, p.107-109, 2012.

CHANG, C. W., M. J. CHEN, et al. Scurvy in a patient with depression. **Dig Dis Sci**, v.52, n.5, p.1259-1261, 2007.

CHENG, C., M. KOBAYASHI, et al. Evidence for Epigenetic Regulation of Gene Expression and Function in Chronic Experimental Diabetic Neuropathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.74, n.8, p.804-817, 2015.

CHOUDARY, P. V., M. MOLNAR, et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.43, p. 15653-15658, 2005.

COCCHI, P., M. SILENZI, et al. Antidepressant effect of vitamin C. **Pediatrics**, v.65, n.4, p.862-863, 1980.

COLLINS, P. Y., V. PATEL, et al. Grand challenges in global mental health. **Nature**, v.475, n.7354, p. 27-30, 2011.

CRYAN, J. F. e K. KAUPMANN. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. **Trends Pharmacol Sci**, v.26, n.1, p.36-43, 2005.

CUNHA, M. P., F. L. PAZINI, et al. The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is implicated in the anti-immobility effect of creatine in the tail suspension test. **Amino Acids**, v.47, n.4, p.795-811.

DA SILVA, G. D., A. S. MATTEUSSI, et al. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **Neuroreport**, v.11, n.7, p.3699-3702, 2000.

DE OLIVEIRA, I. J., V. V. DE SOUZA, et al. Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Anxiety in Students: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. **Pak J Biol Sci**, v.18, n.1, p.11-18.

DHIR, A. E S. K. KULKARNI. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v.24, n.3, p.125-131, 2015.

DUMAN, R. S., N. LI, et al. (2012). Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine." **Neuropharmacology**, v.62, n 1, p.35-41, 2012.

DUMAN, R. S. E B. VOLETI. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends Neurosci**, v.35, n 1, p.47-56, 2012.

EAST, S. J. E J. GARTHWAITE. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett**, v.123, n 1, p.17-19, 1991.

ELDRIDGE, C. F., M. B. BUNGE, et al. 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.

ENNA, S. J. A GABA(B) mystery: the search for pharmacologically distinct GABA(B) receptors. **Mol Interv**, v.1, n.4, p.208-218, 2001.

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

FELICE, D., O. F. O'LEARY, et al. Blockade of the GABA(B) receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: relevance to antidepressant action. **Neuropharmacology**, v.63, n.8, p.1380-1388, 2012.

FERNANDEZ-ALACID, L., C. AGUADO, et al. Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. **J Neurochem**, v.110, n.4, p.1363-1376, 2009.

FINKEL, M. S., F. LAGHRISSE-THODE, et al. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacol Bull**, v.32, n.4, p. 653-658, 1996.

FISCHELL, J., A. M. VAN DYKE, et al. Rapid Antidepressant Action and Restoration of Excitatory Synaptic Strength After Chronic Stress by Negative Modulators of Alpha5-Containing GABAA Receptors. **Neuropsychopharmacology**, v.40, n.11, p.2499-2509, 2015.

FROESTL, W. Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands. **Adv Pharmacol**, v.58, p.19-62, 2010.

FUCHIKAMI, M., A. THOMAS, et al. Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.112, n.26, p.8106-8111, 2015.

GARCIA, L. S., C. M. COMIM, et al. 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, 2008.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci**, v.27, n.11, p.2783-2802, 2008.

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

GASSMANN, M. E. B. BETTLER. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. **Nat Rev Neurosci**, v.13, n.6, p.380-394, 2012.

GHOSE, S., M. K. WINTER, et al. The GABA receptor as a target for antidepressant drug action. **Br J Pharmacol**, v.162, n.1, p.1-17, 2011.

GLUEA, P., GULATIB, A., NEDELECC M. L., DUFFULLB, S. Dose- and Exposure-Response to Ketamine in Depression. **Biol psychiatry**, v.70, p.9 – 10, 2011.

- GRUNEWALD, R. A. E M. FILLENZ. Release of ascorbate from a synaptosomal fraction of rat brain. **Neurochem Int**, v.6, n.4, p.491-500, 1984.
- GRUNEWALD, R. A. Ascorbic acid in the brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v.18, n.1, p.123-133, 1933.
- GUIX, F. X., I. URIBESALGO, et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v.76, n.2, p.126-152, 2005.
- HALLIGAN, T. J., N. G. RUSSELL, et al. 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.
- HARKIN, A., T. J. CONNOR, et al. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v.44, n.5, p.616-623, 2003.
- HARRISON, F. E. AND J. M. MAY. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radic Biol Med**, v.46, n.6, p.719-730, 2009.
- HEINZEN, E. L. E G. M. POLLACK. Use of an electrochemical nitric oxide sensor to detect neuronal nitric oxide production in conscious, unrestrained rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.48, n.3, p.139-146, 2002.
- HEVEL, J. M. E M. A. MARLETTA. Nitric-oxide synthase assays. **Methods Enzymol**, v.233, p.250-258, 1994.
- HILAKIVI-CLARKE, L. A., K. M. WOZNIAK, et al. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. **Physiol Behav**, v.48, n.3, p.429-433, 1990.
- HIRSCHFELD, R. M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry**, v.61, n.6, p.4-6, 2000.
- IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **J Physiol Pharmacol**, v.53, n.4, p.503-514, 2002.

INAN, S. Y., I. YALCIN, et al. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. **Pharmacol Biochem Behav**, v.77, n.3, p.457-464, 2004.

ISOMETSA, E. Suicidal behaviour in mood disorders--who, when, and why? **Can J Psychiatry**, v.59, n.3, p.120-130, 2014.

JACOBS, B. L., H. VAN PRAAG, et al. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol Psychiatry**, v.5, n.3, p. 262-269, 2000.

KASTER, M. P., A. O. ROSA, et al. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.8, n.4, p.601-606, 2005.

KELLER, M. B., R. M. HIRSCHFELD, et al. Optimizing outcomes in depression: focus on antidepressant compliance. **Int Clin Psychopharmacol**, v.17, n.6, p.265-271, 2002.

KESSLER, R. C., M. PETUKHOVA, et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, v.21, n.3, p.169-184, 2012.

KHAJEHNASIRI, F., S. B. MORTAZAVI, et al. Effect of omega-3 and ascorbic acid on inflammation markers in depressed shift workers in Shahid Tondgoyan Oil Refinery, Iran: a randomized double-blind placebo-controlled study. **J Clin Biochem Nutr**, v.53, n.1, p.36-40, 2013.

KHANZODE, S. D., G. N. DAKHALE, et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Rep**, v.8, n.6, p.365-370, 2003.

KIECOLT-GLASER, J. K. E. R. GLASER. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. **J Psychosom Res**, v.53, n.4, p.873-876, 2002.

KORDJAZY, N., A. HAJ-MIRZAIAN, et al. Elevated level of nitric oxide mediates the anti-depressant effect of rubidium chloride in mice. **Eur J Pharmacol**, v.762, p. 411-418, 2015.

KRISHNAN, V. E E. J. NESTLER. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v.455. n.7215, p.894-902, 2008

LANG, U. E. AND S. BORGWARDT. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. **Cell Physiol Biochem**, v.31, n.6, p.761-777, 2013.

LEE, B. H., S. W. LEE, et al. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology**, v.53, n.3, p.127-132, 2006.

LI, N., B. LEE, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v.329, n.5994, p.959-964, 2010.

LI, N., R. J. LIU, et al. 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.

LUDKA, F. K., A. D. ZOMKOWSKI, et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.23, n.5, p.400-412, 2013.

MAGARINOS, A. M. AND B. S. MCEWEN. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. **Neuroscience**, v.69, n.1, p.89-98, 1995.

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

MARTIN, D. L. E K. RIMVALL. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. **J Neurochem**, v.60, n.2, p.395-407, 1993.

MCDONALD, A. J., F. MASCAGNI, et al. Immunocytochemical localization of GABABR1 receptor subunits in the basolateral amygdala. **Brain Res**, v.1018, n.2, p.147-158, 2004.

MILAK, M. S., C. J. PROPER, et al. A pilot in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study of amino acid neurotransmitter response to ketamine treatment of major depressive disorder. **Mol Psychiatry**, v.21, n.3, p.320-327, 2016.

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

MIRVISH S S, WALLCAVE L, EAGEN M, SHUBIK P. Ascorbate nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. **Science**, v.177, p.65-68, 1972.

MOMBEREAU, C., K. KAUPMANN, et al. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. **Neuropsychopharmacology**, v.29, n.6, p.1050-1062, 2004.

MOMBEREAU, C., K. KAUPMANN, et al. Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits. **Neuroreport**, v.16, n.3, p.307-310, 2005.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J R Soc Med**, v.92, n.4, p.164-169, 1999.

MORETTI, M., J. BUDNI, et al. TNF-alpha-induced depressive-like phenotype and p38(MAPK) activation are abolished by ascorbic acid treatment. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.25, n.6, p.902-912, 2015.

MORETTI, M., J. BUDNI, et al. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v.48, n.1, p.16-24, 2014.

MORETTI, M., J. BUDNI, et al. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test. **Eur J Pharmacol**, v.687, n.1-3, p.21-27, 2012.

MORETTI, M., A. COLLA, et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v.46, n.3, p.331-340, 2012.

MORETTI, M., A. E. FREITAS, et al. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behav Brain Res**, v.225, n.1, p.328-333, 2011.

MUNHOZ, T. N., B. P. NUNES, et al. A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J Affect Disord**, v.192, p.226-233, 2016.

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

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb J**, v.6, n.12, p.3051-3064, 1992.

NESTLER, E. J., M. BARROT, et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, n.1, p.13-25, 2002.

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

NOWAK, G., A. PARTYKA, et al. Antidepressant-like activity of CGP 36742 and CGP 51176, selective GABAB receptor antagonists, in rodents. **Br J Pharmacol**, v.149, n.5, p.581-590, 2006.

O'LEARY, O. F., D. FELICE, et al. GABAB(1) receptor subunit isoforms differentially regulate stress resilience. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, n.42, p.15232-15237, 2014.

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

OISHI, J., H. DOI, et al. Nutrition and depressive symptoms in community-dwelling elderly persons in Japan. **Acta Med Okayama**, v.63, n.1, p.9-17, 2009.

PEHRSON, A. L. AND C. SANCHEZ. Altered gamma-aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of

the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants. **Drug Des Devel Ther**, v.9, p.603-624, 2015.

PERRINE, S. A., F. GHODDOUSSI, et al. Ketamine reverses stress-induced depression-like behavior and increased GABA levels in the anterior cingulate: an 11.7 T 1H-MRS study in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.51, p.9-15, 2014.

PINARD, A., R. SEDDIK, et al. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. **Adv Pharmacol**, v.58, p.231-255, 2010.

PYTKA, K., A. DZIUBINA, et al. The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect. **Pharmacol Rep**, v.68, n.2, p.443-450, 2016.

QIU, S., L. LI, et al. Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. **J Neurosci Res**, v.85, n.5, p.1046-1056, 2007.

REBEC, G. V. AND R. C. PIERCE. 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.

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

ROSA, P. B., NEIS, V. B. RIBEIRO, C. M., MORETTI, M., RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine involve modulation of GABAA and GABAB receptors. **Pharmacological Reports**, v.68 p. 996–1001, 2016.

ROWLEY, N. M., K. K. MADSEN, et al. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochem Int**, v.61, n.4, p.546-558, 2012.

RUSH, A. J., M. H. TRIVEDI, et al. Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. **N Engl J Med**, v.354, n.12, p.1231-1242, 2006.

SALEH TM, CONNELL BJ, MCQUAID T, CRIBB AE. Estrogen-induced neurochemical and electrophysiological changes in the parabrachial nucleus of the male rat. **Brain Res**, v.990, p.58–65, 2003.

SANACORA, G., G. F. MASON, et al. Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT. **Am J Psychiatry**, v.160, n.3, p.577-579, 2003.

SANACORA, G., G. F. MASON, et al. Increased occipital cortex GABA concentrations in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. **Am J Psychiatry**, v.159, n.4, p.663-665, 2002.

SARAVI, S. S. S. (2016). "17 α -ethinyl estradiol attenuates depressive-like behavior through GABAA receptor activation/nitroergic pathway blockade in ovariectomized mice. **Psychopharmacology**, v.233, p.1467–1485, 2016.

SEQUEIRA, A., F. MAMDANI, et al. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. **PLoS One**, v.4, n.8, p.6585, 2009.

SHAHANI, N. AND A. SAWA. Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. **Biochim Biophys Acta**, v.1820, n.6, p.736-742, 2012.

SIVILOTTI, L. AND A. NISTRÌ (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Prog Neurobiol**, v.36, n.1, p.35-92, 1991.

SOGHOMONIAN, J. J. AND D. L. MARTIN. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **Trends Pharmacol Sci**, v.19, n.12, p.500-505, 1998.

SPIACCI, A., JR., F. KANAMARU, et al. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v.88, n.3, p.247-255, 2008.

STEINERT, J. R., T. CHERNOVA, et al. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**, v.16, n.4, p.435-452, 2010.

STERU, L., R. CHERMAT, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v.85, n.3, p.367-370, 1985.

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

THASE, M. E. Effectiveness of antidepressants: comparative remission rates." *J Clin Psychiatry* 64 Suppl 2: 3-7, 2003.

VOLLENWEIDER, I., K. S. SMITH, et al. Antidepressant-like properties of alpha2-containing GABA(A) receptors. **Behav Brain Res**, v.217, n.1, p.77-80, 2011.

WANG, H. Y., Z. C. KUO, et al. GABAB receptor-mediated tonic inhibition regulates the spontaneous firing of locus coeruleus neurons in developing rats and in citalopram-treated rats. **J Physiol**, 2014.

YILDIZ, F., B. F. ERDEN, et al. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.149, n.1, p.41-44, 2000.

YU D, ELDERED WD. Glycine and GABA interact to regulate the nitric oxide/cGMP signaling pathway in the turtle retina. **Vis Neurosci**, v.22, p.825-838, 2005.

ZARATE, C. A., JR., J. B. SINGH, et al. 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.

ZHOU, W., N. WANG, et al. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **Eur Psychiatry**, v.29, n.7, p.419-423, 2014.

ZOMKOWSKI, A. D., D. ENGEL, et al. The role of the NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. **Pharmacol Biochem Behav**, v.103, v.2, p.408-417, 2012.