

Camille Mertins Ribeiro

**ENVOLVIMENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CANAIS DE
POTÁSSIO NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO
ASCÓRBICO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA**

Florianópolis
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DA DEPRESSÃO**

Camille Mertins Ribeiro

**ENVOLVIMENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CANAIS DE
POTÁSSIO NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO
ASCÓRBICO NO TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA**

Trabalho apresentado como requisito
para o cumprimento da disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso (BIO
7016) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina..

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis
2013

AGRADECIMENTOS

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA onde pude realizar a minha graduação.

Ao CNPQ e à FAPESC pelo apoio financeiro durante a graduação.

À minha orientadora Prof^{ra} Ana Lúcia, por ter me acolhido em seu laboratório e depositado sua confiança em mim. Muito obrigada pelo conhecimento transmitido!

À Josi, por ter me selecionado para o lab, se não fosse por ti eu talvez não tivesse conhecido toda essa área maravilhosa, e à Morgana pela imensurável ajuda durante esse ano. Vocês são minhas mentoras, muito obrigada por terem me ensinado tanta coisa!

À Ju, Vivi, Andi e Luana pela ajuda e cooperação na nossa saga pelos blottings perfeitos.

À todo o pessoal do lab, pela troca de conhecimentos, além dos momentos de reflexão e descontração.

Às minhas xuxus queridas, Amanda, Chê, Gabi, Leili, May, Rafa e ao Bidu que fizeram a minha alegria na graduação, obrigada por terem me ajudado muito nas horas de aperto e por tornar mesmo os momentos mais tensos em diversão. Quero levar a amizade de vocês pra onde quer que eu vá!

À minha amiga-irmã Ju, que desde pequeninha me acompanha, obrigada pela amizade!

Às gurias de Porto que, mesmo longe á alguns anos já, continuam sendo uma parte muito importante da minha vida: Fê, Jú, Cris, Rô, Téfi, Nessão vocês são inesquecíveis!

Ao meu namorado Lai, que sempre me apoiou nesses 3 anos e meio, obrigada por me aconselhar durante as minhas crises existenciais e de desespero, por saber enfrentar o meu mau-humor, por sempre me animar e nunca me deixar desistir. Te amo!

À minha família (meu pai Walmir, minha mãe Anita, meus irmãos Diego e Tiago, e a minha cachorrinha Mel, a integrante mais animada da família) pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, e por sempre acreditarem no meu potencial, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Considerando que a administração de ácido ascórbico causa um efeito tipo-antidepressivo em camundongos por um mecanismo que envolve uma interação com receptores N-metil-D-aspartato e a via L-arginina-óxido nítrico- GMPC e levando em conta que a estimulação dessa via está associada com a ativação de canais de potássio (K^+), este estudo investigou o envolvimento de diferentes tipos de canais de K^+ no efeito do ácido ascórbico no teste de suspensão pela cauda (TSC). A administração intracerebroventricular de tetraetilamônio (TEA, um inibidor de canais de K^+ não específico, 0,5 pg/sítio), glibenclamida (um bloqueador de canais de K^+ sensíveis a ATP, 0,5 pg/sítio), caribdotoxina (um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de larga e intermediária condutância, 25 pg/sítio) ou apamina (um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância, 10 pg/sítio) foi capaz de produzir um efeito sinérgico com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg) administrada oralmente (p.o.). O efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) no TSC foi prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com os ativadores de canais de K^+ cromacalim (10 μ g/sítio, i.c.v.) e minoxidil (10 μ g/sítio, i.c.v.). Além disso, o tratamento com cromacalim aboliu o efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela administração combinada de doses sub-ativas de ácido ascórbico e 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.). A administração de moduladores de canais de K^+ sozinhos, ou em combinação com ácido ascórbico não afetou a locomoção dos animais. Em conjunto, nossos resultados mostram que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC pode envolver, ao menos em parte, a modulação da excitabilidade neuronal, via inibição de canais de K^+ .

Palavras-chave: Antidepressivo; Ácido ascórbico; Canais de K^+ ; Teste da suspensão pela cauda.

ABSTRACT

Considering that the administration of ascorbic acid elicits an antidepressant-effect in mice by a mechanism which involves an interaction with N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway and taking into account that the stimulation of this pathway is associated with the activation of potassium (K⁺) channels, this study investigated the involvement of different types of K⁺ channels on the effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test (TST). Intracerebroventricular administration of tetraethylammonium (TEA, a non-specific blocker of K⁺ channels, 25 µg/site), glibenclamide (an ATP-sensitive K⁺ channel blocker, 0.5 µg/site), charybdotoxin (a large- and intermediate conductance calcium activated K⁺ channel blocker, 25 µg/site) or apamin (a small-conductance calcium-activated K⁺ channel blocker, 10 µg/site) was able to produce a synergistic effect with a sub-effective dose of ascorbic acid (0.1 mg/kg) given orally (p.o.). The antidepressant-like effect of ascorbic acid (1 mg/kg, p.o.) in the TST was prevented by the pre-treatment of mice with the K⁺ channel openers cromakalim (10 µg/site, i.c.v.) and minoxidil (10 µg/site, i.c.v.). Moreover, cromakalim abolished the synergistic effect elicited by the combined treatment with sub-effective doses of ascorbic acid and 7-nitroindazole (25 mg/kg, i.p.). The administration of the K⁺ channel modulators alone or in combination with ascorbic acid did not affect the locomotion of mice. Together, our results show that the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the TST may involve, at least in part, the modulation of neuronal excitability, via inhibition of K⁺ channels.

Keywords: Antidepressant; Ascorbic acid; K⁺ channel; Tail suspension test.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Critérios Diagnósticos do DSM-IV..... | 18 |
| Figura 1. Teoria monoaminérgica da depressão..... | 19 |
| Figura 2. Bioquímica do ácido ascórbico..... | 22 |
| Figura 3. Cronograma do tratamento farmacológico..... | 31 |
| Figura 4. Efeito do tratamento dos camundongos com TEA ou glibenclamida em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico..... | 35 |
| Figura 5. Efeito do tratamento dos camundongos com caribdotoxina ou apamina em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico.. | 36 |
| Figura 6. Efeito do tratamento dos camundongos com cromacalim ou minoxidil em combinação com uma dose de ácido ascórbico..... | 37 |
| Figura 7. Efeito do tratamento de camundongos com cromacalim no efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol..... | 39 |
| Figura 8. Envolvimento de canais de K ⁺ no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

DMR-IV-TR – Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais

eNOS – NOS endotelial

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

GSH - Glutathione

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

i.c.v. – intracerebroventricular

iNOS – NOS induzida

i.p. - intraperitoneal

NMDA – N-metil-D-aspartato

nNOS – NOS neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

p.o. – *per oral* (via oral)

SNC – Sistema nervoso central

TCA – Teste do campo aberto

TEA - Tetraetilamônio

TNF – Teste do nado forçado

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TSC – Teste de suspensão pela cauda

5-HT - 5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 27 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 27 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 29 |
| 4.1 ANIMAIS..... | 29 |
| 4.2 DROGAS..... | 29 |
| 4.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO..... | 30 |
| 4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS..... | 31 |
| 4.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)..... | 31 |
| 4.4.2 Teste do campo aberto (TCA)..... | 32 |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 32 |
| 5. RESULTADOS..... | 33 |
| 5.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE DOSES SUB-ATIVAS DE INIBIDORES DE CANAIS DE K ⁺ E ÁCIDO ASCÓRBICO NO TSC E TCA..... | 33 |
| 5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ATIVADORES DE CANAIS DE K ⁺ SOBRE A LOCOMOÇÃO E O COMPORTAMENTO TIPO-ANTIDEPRESSIVO INDUZIDO PELO ÁCIDO ASCÓRBICO..... | 35 |
| 5.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CROMACALIM SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANTIDEPRESSIVO SINÉRGICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 7-NITROINDAZOL..... | 37 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 41 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 47 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 49 |

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno debilitante e altamente prevalente, acometendo mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (Organização Mundial de Saúde, 2012). Atualmente, é considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial, especialmente no ocidente (Nestler e Carlezon, 2006; Nakajima *et al.*, 2010; Olesen e Leonardi, 2003). Nos piores casos, a depressão pode levar ao suicídio, que, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a causa da morte de aproximadamente um milhão de pessoas todos os anos, sendo que para cada pessoa que comete suicídio, 20 outras devem tentar acabar com a sua vida (Marcus *et al.*, 2012).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV-TR), a depressão é caracterizada pela manifestação de 5 ou mais sintomas especificados na tabela 1, durante um período superior à duas semanas, sendo que pelo menos um deve ser humor deprimido ou anedonia durante a maior parte do tempo.

Apesar de todos os mecanismos biológicos deste transtorno não terem sido ainda totalmente elucidados, já foi possível a identificação do envolvimento de diversos alvos moleculares na fisiopatologia deste transtorno. Sabe-se que a depressão pode ser o resultado, pelo menos em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo (Elhwuegi, 2004). Essa hipótese postula que a depressão ocorreria devido a uma redução nos níveis de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) na fenda sináptica. Essa preposição é apoiada pelo mecanismo de ação da maioria dos antidepressivos clássicos, que aumentam os níveis de monoaminas disponíveis na fenda sináptica (Figura 1) (Cumplings, 1993; Elhwuegi, 2004; Prins *et al.*, 2011).

Mesmo bem estabelecida, a hipótese monoaminérgica não é capaz de explicar o complexo mecanismo deste transtorno. Diversos outros sistemas neurais e mecanismos de transdução de sinal estão implicados na fisiopatologia da depressão. Entre eles estão, os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e a via L-arginina-óxido nítrico (NO) (Harkin *et al.*, 1999; Sanacora *et al.*, 2008; Zombowski *et al.*, 2010), o sistema opióide (Brocardo *et al.*, 2009; Negus *et al.*, 2011), o sistema GABAérgico (Nakagawa *et al.*, 1996; Cryan e Slattery, 2010), canais de cálcio (Galeotti *et al.*, 2006), aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticoides e desregulação no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Perera *et al.*, 2007; Pittenger

Tabela1. Critérios Diagnósticos do DSM-IV

| |
|---|
| CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DA DEPRESSÃO DE ACORDO COM O DSM-IV |
|---|

- A. Cinco (ou mais) dos seguintes sintomas presentes durante um período de no mínimo duas semanas; pelo menos um dos dois primeiros sintomas deve estar presentes (1) humor deprimido ou (2) anedonia;
- (1) *Humor deprimido a maior parte do tempo, relatado pelo paciente ou por observação de outrem;*
 - (2) *Diminuição marcante no prazer ou interesse em todas, ou quase todas as atividades (anedonia);*
 - (3) *Perda significativa de peso (quando o paciente não estiver em dieta) ou ganho de peso, ou aumento ou perda de apetite;*
 - (4) *Insônia ou hipersônia;*
 - (5) *Agitação ou retardo psicomotor;*
 - (6) *Fadiga ou falta de energia;*
 - (7) *Sentimentos de culpa ou desvalia excessivos ou impróprios;*
 - (8) *Diminuição na capacidade de concentração e pensamento;*
 - (9) *Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida sem um plano específico ou tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.*
- A. Os sintomas não devem preencher os critérios para um episódio misto (transtorno bipolar);
- B. Os sintomas são causa de um sofrimento ou deterioração significativa do funcionamento social, ocupacional ou em outras importantes áreas de vida;
- C. Os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (p.ex., uma droga de abuso) ou um problema médico de ordem geral (p.ex. hipotireoidismo);
- D. Os sintomas não têm relação com o luto (pelo período de 2 meses após o falecimento de alguém próximo).

Adaptado de DSM-IV-R = Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais, Quarta Edição, Revisão de texto, Associação Americana de Psiquiatria, Washington, DC: 2000

e Duman, 2008; Kunugi *et al.*, 2010). A depressão também pode ser desencadeada por um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), as

interleucinas -1 e 6 e o interferon- α (Maes *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Kaster *et al.*, 2012), por exposição a eventos estressantes durante a vida do indivíduo (Henn e Vollmayre, 2005; Mann e Currier, 2010) ou ainda por alterações em vias de sinalização celular que regulam a sobrevivência e a neuroplasticidade celular (Picchini *et al.*; 2004; Perera *et al.*, 2007; Beaulieu *et al.*, 2009; Numakawa *et al.*, 2010).

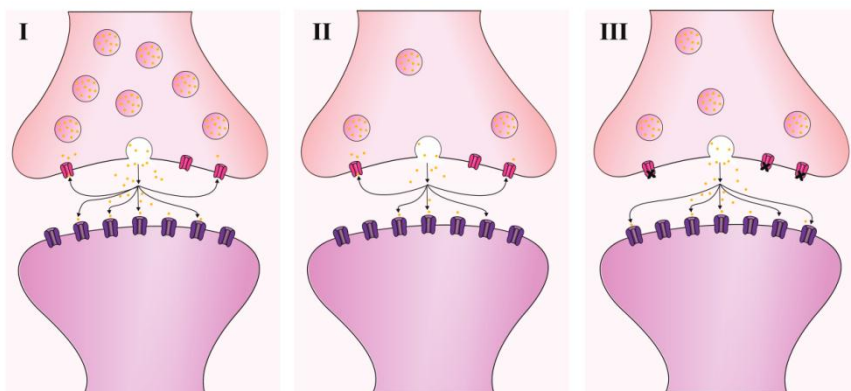


Figura 1. Teoria monoaminérgica da depressão. A. No cérebro normal os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados e ativam receptores pós-sinápticos. A neurotransmissão é terminada pela recaptação do neurotransmissor no neurônio pré-sináptico. B. Na depressão, a concentração de monoaminas na fenda sináptica está diminuída, acarretando o transtorno de humor. C. O bloqueio dos sítios de recaptação aumenta a disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos para ativarem seus receptores pós-sinápticos, e o humor é restabelecido. (Castren, 2005).

Diversos estudos pré-clínicos sugerem ainda uma associação entre os canais de K^+ e a fisiopatologia da depressão (Guo *et al.*, 1995; 1996; Galeotti *et al.*, 1999; Kaster *et al.*, 2005). Os canais de K^+ são proteínas transmembrana que formam poros iônicos seletivos à K^+ e que se mantêm abertos no repouso (Choe, 2002; Honoré, 2007). potencial de membrana através da promoção da hiperpolarização (Honoré, 2007).

Esses canais são importantes reguladores de processos fisiológicos que incluem a excitabilidade neuronal e a propagação do sinal (Shieh *et al.*, 2000; MacKinnon, 2003), reestabelecendo o

potencial de membrana através da promoção da hiperpolarização (Honoré, 2007).

Em animais, foi reportado que a administração de vários bloqueadores de canais de K^+ , como tetraetilamônio (TEA), apamina, caribdotoxina, gliquidona e glibenclamida, produz um efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) (Galeotti *et al.*, 1999; Kaster *et al.*, 2005), enquanto que o tratamento com ativadores de canais de K^+ , como minoxidil ou cromacalim, aumentou o tempo de imobilidade neste teste, indicando um efeito tipo-depressivo (Galeotti *et al.*, 1999). Além disso, dados da literatura sugerem que diferentes classes de antidepressivos, incluindo fluoxetina, venfalaxina, clomipramina, maprotilina, citalopram e paroxetina, podem modular a excitabilidade neuronal através da inibição de canais de K^+ e essa pode ser a via final comum da ação farmacológica dessas drogas (Tytgat *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004, 2006; Bortolatto *et al.*, 2010).

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, tem um papel proeminente na plasticidade sináptica, aprendizado e memória, no entanto, um aumento da atividade glutamatérgica leva à excitotoxicidade, frequentemente associada a doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo a depressão (Skolnick, 1999; Zarate *et al.*, 2010; Calabrese *et al.*, 2012). Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que antagonistas de receptores NMDA, um sub-tipo de receptores para o glutamato, apresentam propriedades antidepressivas e que o tratamento com antidepressivos pode ter um efeito sobre a função destes receptores (Skolnick, 1999; Mathew *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2008 a e b; Chung, 2012; Sanacora *et al.*, 2012).

A ativação de receptores NMDA leva ao aumento da produção de NO (Liu *et al.*, 1997), outra importante molécula sinalizadora do SNC que é produzida através da ativação de uma família de enzimas, as NO sintases (NOS). Essa síntese pode ocorrer mediante a ação de três diferentes isoformas da NOS: neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial (eNOS) (Magarinos e Mcewen, 1995). No encéfalo de mamíferos, mais de 90% da produção é realizada pela nNOS (Joca *et al.*, 2007). Por sua vez, o NO é responsável pela produção de guanosina^{3',5'}-monofosfato cíclico (GMPc), através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Denninger e Marletta, 1999).

É importante destacar que alguns estudos reportaram que tanto o NO quanto a guanosina^{3'}, 5'-monofosfato cíclico (GMPc) podem ativar diferentes tipos de canais de K⁺ em diversos tecidos (Bolotina *et al.*, 1994; Jeong *et al.*, 2001a, b). Além disso, doadores de NO também são capazes de ativar esses canais (Fujino *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1988). De fato, a inibição dos receptores NMDA, e consequente redução dos níveis de NO, previne a ativação dos canais de K⁺, evitando a hiperpolarização neuronal (Christie, 1995).

Atualmente, existem várias classes de antidepressivos disponíveis para o tratamento da depressão, incluindo os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os inibidores mistos da recaptação de serotonina e noradrenalina (Berton e Nestler, 2006; Nemeroff, 2007). Apesar da diversidade de fármacos, ainda existe uma lacuna entre o início do tratamento farmacológico e o efeito terapêutico, mesmo que parcial, desses medicamentos. Levando em consideração que apenas cerca de 60 % dos pacientes são responsivos ao tratamento (Gareri *et al.*, 2000; Berton e Nestler, 2006), e que os fármacos atuais possuem muitos efeitos colaterais, o que causa um abandono do tratamento em muitos casos (Nestler *et al.*, 2002a), há uma forte necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos para o tratamento da depressão.

O L-ácido ascórbico (Fig. 2), popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel com propriedades neuroprotetoras e antioxidantes (Rice, 2000). Em 1928 foi encontrado pela primeira vez como um agente redutor na glândula adrenal, por Szent-Gyorgy (Grunewald, 1993).

O ácido ascórbico teve seu nome originado devido ao fato de conferir proteção contra o escorbuto, doença causada devido à grave carência de vitamina C (Schanderl, 1970). Nos mamíferos, em pH fisiológico, essa molécula se ioniza liberando um próton, passando a se chamar ascorbato (Figura 2) (Rebec e Pierce, 1994).

Muitos mamíferos possuem a capacidade de sintetizar o ascorbato diretamente no fígado, mas tanto cobaias quanto humanos não são capazes de fazer essa síntese, devido à falta da enzima L-gulonolactona oxidase, necessária para o último passo da biossíntese do ascorbato. Esse fato não é prejudicial, pois esta vitamina pode ser facilmente encontrada na dieta, e subsequentemente captada no intestino por uma família de transportadores específicos (Rice, 2000). Após a sua captação, ela

entra na corrente sanguínea e é amplamente distribuída pelo organismo. Vale ressaltar que os níveis de ascorbato no encéfalo e na adrenal são muito maiores do que no sangue e em outros órgãos (Agus *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 2009), e que a sua concentração no encéfalo muda rapidamente em resposta a atividade neuronal (Grunewald, 1993). O ascorbato e a glutathiona (GSH) são os dois antioxidantes de baixo peso molecular mais abundantes em tecidos encefálicos de mamíferos (Zarebkohan e Naini, 2011).

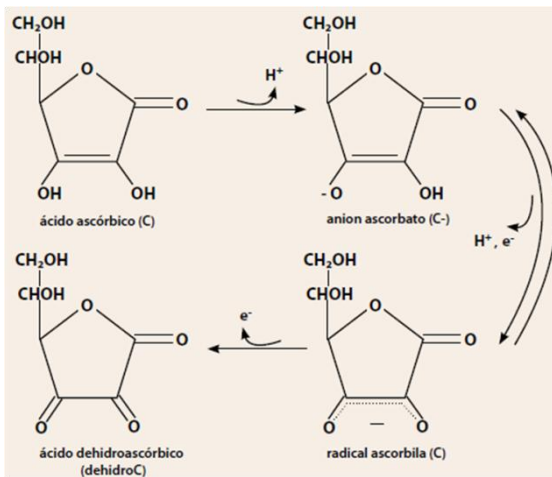


Figura 2. Bioquímica do ácido ascórbico. Em pH fisiológico de mamíferos, o ácido ascórbico é encontrado sob a forma de ânion ascorbato. A estrutura do ascorbato permite a perda de elétrons e assim sua oxidação em um processo reversível de duas etapas. Inicialmente o ascorbato é oxidado através da perda de um elétron, formando um radical intermediário chamado de radical ascorbila ou semi-dehidroascorbato. Através da perda de um segundo elétron e desprotonação, este é oxidado a ácido dehidroascórbico ou dehidroascorbato.

O ascorbato atua como antioxidante endógeno (Schreiber e Trojan, 1991; Naidu, 2003), podendo reagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) e estabilizar radicais livres produzidos durante o metabolismo celular (Padayatty *et al.*, 2003). Existem relatos, ainda de que esta vitamina pode ter efeitos benéficos sobre a memória (Harrison *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009), ação antitumoral (Chen *et al.*, 2008), antinociceptiva (Rosa *et al.*, 2005) e

efeito neuroprotetor contra isquemia (Stamford *et al.*, 1999) e convulsões (Freitas e Tomé, 2010). O ácido ascórbico apresenta ainda uma importante ação neuromoduladora, tanto sobre a neurotransmissão dopaminérgica como glutamatérgica (Grünewald, 1993; Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). O ânion ascorbato é liberado dos neurônios glutamatérgicos como parte do processo de recaptação do glutamato, no qual o transportador de glutamato de alta afinidade troca ascorbato por glutamato. Este processo pode ocorrer também em células gliais, garantindo um elevado nível de ascorbato extracelular em muitas regiões do encéfalo (Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). Foi demonstrado ainda que o ascorbato inibe o receptor NMDA através de um fenômeno redox (Majewska *et al.*, 1990). Considerando os estudos que implicam os receptores NMDA na fisiopatologia da depressão (Chung *et al.*, 2012) e o efeito inibitório que ácido ascórbico possui sobre a função estes receptores (Majewska *et al.*, 1990), pode-se sugerir que tal vitamina pode apresentar um efeito antidepressivo dependente desta propriedade, hipótese que foi reforçada por um estudo do nosso grupo (Moretti *et al.*, 2011).

Em estudos clínicos, já foi reportado que a administração de ácido ascórbico aliviou a depressão induzida pelo hormônio adrenocorticotrófico em uma criança (Cocchi *et al.*, 1980) e diminuiu escores no inventário Beck de depressão em indivíduos saudáveis (Brody, 2002), indicando uma melhora no humor. Outro estudo verificou uma diminuição dos níveis de ácido ascórbico no plasma de pacientes com depressão maior (Khanzode *et al.*, 2003), e foi relatado ainda o caso de um paciente com depressão maior que desenvolveu escorbuto (Chang *et al.* 2007), o que sugere que uma baixa ingestão de ácido ascórbico, e consequente diminuição dos níveis endógenos do mesmo, pode estar relacionada com a patogênese da depressão. Ainda há relatos de que a ingestão de ácido ascórbico está associada à redução de sintomas depressivos em uma comunidade de idosos no Japão (Oishi *et al.*, 2009).

Em camundongos, a administração de ácido ascórbico produziu um efeito tipo-antidepressivo no teste da suspensão pela cauda (TSC) por um mecanismo dependente da interação desta vitamina com os sistemas monoaminérgicos (Binfaré *et al.*, 2009), com receptores NMDA e com a via L-arginina-NO-GMPc (Moretti *et al.*, 2011). Reforçando a ideia de que essa vitamina pode ser uma alternativa no manejo dos sintomas da depressão, nosso grupo recentemente demonstrou que o tratamento repetido com ácido

ascórbico, semelhante à fluoxetina, reverteu o comportamento tipo-depressivo e o dano oxidativo cerebral, induzido pelo estresse crônico em camundongos (Moretti *et al.*, 2012).

Para investigar a fisiopatologia da depressão, e poder então desenvolver novas drogas antidepressivas que atuem em distintos alvos farmacológicos, é imprescindível a utilização de modelos animais de depressão. Entre estes modelos estão o teste do nado forçado (TNF) (Porsolt *et al.*, 1977), utilizado em ratos e camundongos, e o TSC, utilizado em camundongos e primeiramente descrito por Steru *et al.* (1985). Estes dois são modelos animais preditivos para a ação antidepressiva de um composto ou fármaco. Nestes testes comportamentais o tempo de imobilidade dos animais é mensurado, sendo que compostos que exibem um efeito tipo-depressivo aumentam esse tempo, enquanto que antidepressivos clássicos ou compostos com potencial tipo-antidepressivo causam uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais nestes testes.

2. JUSTIFICATIVA

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, causa uma considerável morbidade psiquiátrica, perda de produtividade e possui um grande impacto econômico (Ebmeier *et al.*, 2006), além de ser o principal fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral, e de estar associada com risco de suicídio (Nemeroff e Owens, 2002).

A terapia para a depressão não tem sido totalmente eficaz e, em muitos casos, está associada a efeitos colaterais indesejados, o que prejudica a adesão do paciente ao tratamento (Nestler *et al.*, 2002a). Além disso, os tratamentos atuais possuem uma grande janela de resposta terapêutica (cerca de 3 a 5 semanas) e apenas cerca de 60% dos pacientes são responsivos a esses tratamentos (Gareri *et al.*, 2000; Berton e Nestler, 2006). Sendo assim, há uma grande demanda por novos fármacos com ação rápida, segura e efetiva para a depressão (Berton e Nestler, 2006).

Considerando-se os relatos existentes de que o ácido ascórbico possui efeito antidepressivo em estudos pré-clínicos (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011) e clínicos (Coochi *et al.*, 1980; Brody, 2002), faz-se necessário a melhor compreensão dos mecanismos moleculares de ação dessa vitamina. Tendo em vista que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC é dependente da inibição, ou de receptores NMDA, ou da síntese de NO e GMPc, este estudo visa elucidar se o efeito tipo-antidepressivo desta vitamina no TSC pode ser também dependente da inibição de canais de K⁺.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar o envolvimento de diferentes tipos de canais de K^+ no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no teste do campo aberto (TCA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da administração combinada de doses sub-ativa de ácido ascórbico e diferentes inibidores de canais de K^+ (TEA, um bloqueador de canais de K^+ não específico; glibenclâmida, um inibidor de canais de K^+ sensível à ATP; caribdotoxina, um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de alta e média condutância; apamina, um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância) no TCA em camundongos.
- Verificar o efeito da administração de minoxidil ou cromacalim, ativadores de canais de K^+ , sobre o efeito tipo antidepressivo produzido pela administração de uma dose ativa de ácido ascórbico em camundongos no TCA.
- Verificar o efeito da administração de cromacalim sobre o comportamento tipo antidepressivo produzido pela administração combinada de doses sub-ativas de ácido ascórbico e 7-nitroindazol, um inibidor específico de NOS neuronal, no TCA em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos comportamentais foram conduzidos utilizando camundongos Swiss adultos, com aproximadamente 60 dias de idade e pesando entre 30 e 40 g, animais de ambos os sexos foram distribuídos homogeneamente entre os diferentes grupos, mantidos à 20-22 °C com acesso livre à água e comida, sob um ciclo 12:12 claro/escuro, com luzes sendo ligadas às 7:00. Os animais foram separados em grupos de 15 animais em caixas medindo 41x34x16 cm e foram colocados na sala de experimento 24 h antes do teste para aclimação. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 09:00 e 16:00h.

Os animais foram utilizados após a aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética da instituição (CEUA-UFSC – PP00795). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e reduzir o número de animais usado nos experimentos.

4.2 DROGAS

As seguintes drogas foram utilizadas: ácido ascórbico, tetraetilamônio (TEA), 7-nitroindazol (Sigma Chemical Co, USA), apamina, caribdotoxina, cromacalim, minoxidil e glibenclamida (Tocris Cookson, Ballwin, MO, USA).

Cromacalim, minoxidil e 7-nitroindazol foram dissolvidos em salina com 10% de Tween 80, o ácido ascórbico foi dissolvido em água destilada e todas as outras drogas foram dissolvidas em solução salina isotônica (NaCl 0,9%) imediatamente antes do uso. Os grupos tratados com veículo foram avaliados simultaneamente. A maioria das drogas foram administrados via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume de 5 µl por camundongo, exceto ácido ascórbico, administrado oralmente (p.o.) via gavagem, e 7-nitroindazol, que foi administrado intraperitonealmente (i.p.) em um volume constante de 10 ml/kg de peso do animal.

As injeções i.c.v. foram realizadas a mão livre sob leve anestesia com éter, de acordo com o procedimento descrito anteriormente (Brocardo *et al.*, 2008; Kaster *et al.*, 2012). Rapidamente, uma agulha hipodérmica com diâmetro externo de 0,4mm conectada a uma cânula, que estava ligada a uma seringa Hamilton de 25 µl, foi inserida perpendicularmente através do crânio e não mais que 2 mm dentro do

encéfalo de cada camundongo. Um volume de 5 μ l foi então administrado no ventrículo lateral esquerdo. A injeção foi feita em 30s, e a agulha permaneceu no lugar por mais 30s para evitar o refluxo das substâncias injetadas. O local da injeção foi 1 mm para a esquerda do ponto mediano em uma linha desenhada através da base anterior das orelhas. Resultados de camundongos que apresentaram erro na localização da injeção i.c.v. ou sinais de hemorragia (<5%) foram retirados da análise estatística.

4.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Para testar a hipótese de que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico é mediado pela inibição de canais de K^+ , grupos distintos de camundongos foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.), ou veículo, 45 minutos antes da administração via i.c.v de TEA (um inibidor não-específico de canais de K^+ , 25 pg/sítio), glibenclamida (um inibidor de canais de K^+ sensível à adenosina trifosfato (ATP), 0,5 pg/sítio), caribdotoxina (um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de alta e média condutância, 0,5 pg/sítio), apamina (um inibidor de canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância, 10 pg/sítio) ou veículo. Foram aguardados 15 minutos antes que os animais fossem testados no TSC (Figura 3A). Em outra série de experimentos, os camundongos foram administrados via i.c.v. com cromacalim (um ativador de canais de K^+ , 10 μ g/sítio) ou minoxidil (um ativador de canais de K^+ , 10 μ g/sítio) 45 minutos após a administração de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.). Quinze minutos depois, o TSC foi executado (Figura 3B).

Em outro experimento (Figura 3C), foi avaliado o efeito da administração de um ativador de canais de K^+ no efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela administração combinada de doses sub-ativas de ácido ascórbico e 7-nitroindazol (um inibidor específico da NOS neuronal, 25 mg/kg, i.p.). Para esse propósito, ácido ascórbico ou veículo foram administrados 30 minutos antes do tratamento com 7-nitroindazol ou veículo. Após 15 minutos, os camundongos foram administrados com cromacalim (um ativador de canais de K^+ , 10 μ g/sítio, via i.c.v.) ou veículo e, 15 minutos depois foram testados no TSC.

As doses de ácido ascórbico foram selecionadas de acordo com estudos anteriores conduzidos em nosso laboratório (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011). As doses e o cronograma de administração dos moduladores de canais de K^+ foram escolhidos com base em dados

da literatura (Galeotti *et al.*, 1999; Kaster *et al.*, 2005; Budni *et al.*, 2007, 2012; Jesse *et al.*, 2009; Bortolatto *et al.*, 2010).

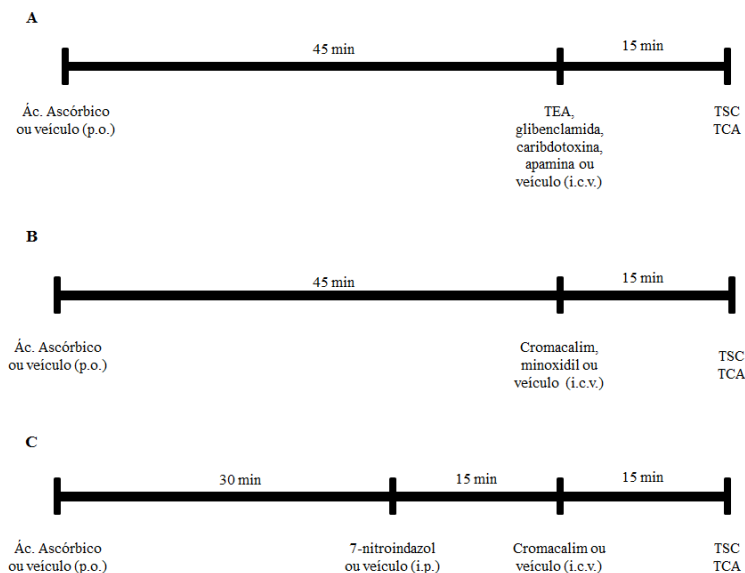


Figura 3. Protocolo do tratamento farmacológico. **A.** Para verificar o efeito da administração combinada de uma dose sub-ativa de ácido ascórbico com diferentes bloqueadores de canais de K^+ no TSC e no TCA. **B.** Para verificar os efeitos da administração dos ativadores de canais de K^+ sobre o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico. **C.** Para verificar os efeitos da administração de cromacalim sobre o comportamento tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

A duração total da imobilidade induzida pela suspensão da cauda foi medida de acordo com o método descrito por Steru *et al.*(1995). Camundongos tanto acústica quanto visualmente isolados foram suspensos a 50 cm do chão por uma fita adesiva, colada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda do animal. Os camundongos foram considerados imóveis apenas quando ficaram pendurados passivamente e completamente sem se movimentar. O tempo de

imobilidade foi contabilizado manualmente, durante um período de 6 minutos.

4.4.2 Teste do campo aberto (TCA)

Dez minutos após o TSC, a atividade locomotora foi avaliada no TCA como descrito previamente (Moretti *et al.*, 2011). O aparato consistia em uma caixa de madeira medindo 40x60x50cm de altura, o chão era dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com todas as patas (crossings) foi contado manualmente em uma sessão de 6 min. A luz foi mantida em uma intensidade mínima para evitar comportamento ansioso. O aparato foi limpo entre cada teste com uma solução de álcool 10% de modo a ocultar pistas dos animais.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média + erro padrão da média. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por ANOVA de duas ou três vias, seguido por post hoc de Newman-Keuls. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE DOSES SUB-ATIVAS DE INIBIDORES DE CANAIS DE K^+ E ÁCIDO ASCÓRBICO NO TSC E TCA

Os efeitos da administração de doses sub-ativas de ácido ascórbico e TEA (um inibidor de canais de K^+ não específico, 25 pg/sítio) no TSC são mostrados na Figura 4A. A análise ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o ácido ascórbico [F(1,24)=10,85; P<0,01], TEA [F(1,24)=5,11; P=0,03] e na interação ácido ascórbico \times TEA [F(1,24)5,33;P=0,02]. A análise *post hoc* indicou que o tratamento com ácido ascórbico e TEA produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico. Quanto à atividade locomotora, a análise ANOVA de duas vias revelou que não houve diferenças estatisticamente significativas para o ácido ascórbico [F(1,25)=0,80; P=0,37], TEA [F(1,25)=0,46; P=0,50] e na interação ácido ascórbico \times TEA [F(1,25)=2,39;P=0,13] (Figura 4C).

Os resultados mostrados na Figura 4B demonstram que a glibenclamida (um inibidor de canais de K^+ sensíveis ao ATP, 0,5 pg/sítio) também foi capaz de produzir uma ação sinérgica com a dose sub-ativa de ácido ascórbico no TSC. Uma ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o ácido ascórbico [F(1,27)=12,28; P<0,01], para a glibenclamida [F(1,27)=7,67; P<0,01] e para a interação ácido ascórbico \times glibenclamida [F(1,27)=11,71; P<0,01]. A análise *post hoc* indicou que o tratamento com ácido ascórbico produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico com a glibenclamida no TSC. Além disso, a administração de ácido ascórbico ou glibenclamida, sozinhos ou em combinação, não apresentou efeito na locomoção dos camundongos (Figura 4 D). A análise ANOVA de duas vias revelou nenhuma diferença para o ácido ascórbico [F(1,27)=1,04; P=0,31], para a glibenclamida [F(1,27)=0,49;P=0,48], e para a interação ácido ascórbico \times glibenclamida [F(1,27)=0,42;P=0,51] na atividade locomotora. Como foi apresentado na Figura 5.

A, a administração de caribdotoxina (um bloqueador de canais de K^+ de alta e intermediária condutância, 25 pg/sítio, via i.c.v.) produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico quando combinado com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico no TSC. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o ácido ascórbico [F(1,24)=6,46; P=0,01], caribdotoxina [F(1,24)=14,76; P<0,01] e para a interação ácido ascórbico \times caribdotoxina [F(1,24)=11,05; P<0,01]. O

teste *post hoc* indicou que o pré-tratamento com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico com a caribdotoxina no TSC. Adicionalmente, nenhum dos compostos utilizados modificou significativamente a atividade locomotora dos animais no TCA (Figura 5C), (ácido ascórbico [F(1,23)=0,51; P=0,48], caribdotoxina [F(1,23)=0,83; P>0,26], interação ácido ascórbico × caribdotoxina [F(1,23)=1,27; P=0,26]).

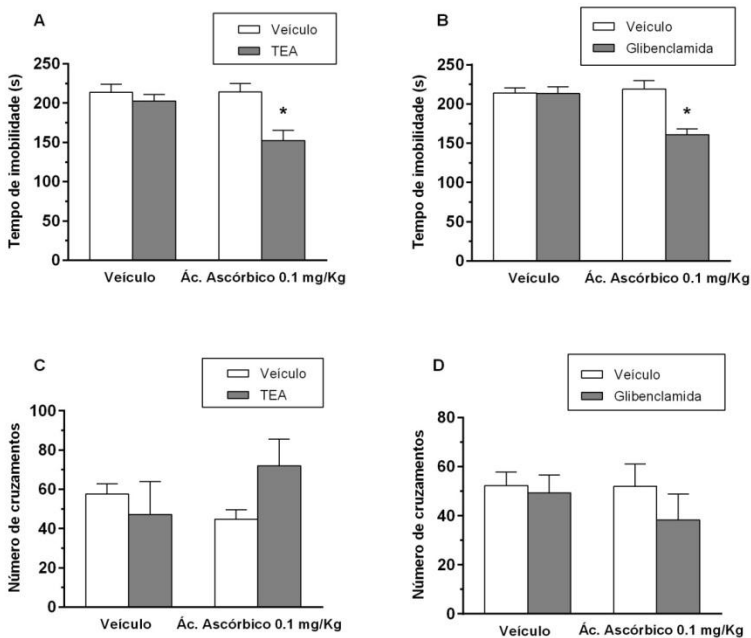


Figura 4. Efeito do tratamento de camundongos com TEA (25 pg/sítio, i.c.v.) ou glibenclamide (0,5 pg/sítio, i.c.v.) em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (painéis A e B) e no TCA (painéis C e D). Valores expressos como média ± erro padrão da média. (n = 7-8). *P<0,01 quando comparado com o grupo controle tratado com veículo.

Os resultados apresentados na Figura 5B mostram o efeito da administração combinada de doses sub-ativas de apamina (um bloqueador de canais de K⁺ ativados por cálcio de baixa condutância, 10 pg/sítio, i.c.v.) e ácido ascórbico no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o ácido ascórbico [F(1,28)=6,94;

P=0,01], apamina [F(1,28)=7,01; P=0,01] e interação ácido ascórbico × apamina [F(1,28)=21,21; P<0,01]. Como revelado pela análise *post hoc*, a administração de uma dose de apamina que não produz efeito tipo-antidepressivo no TSC, produziu um efeito sinérgico quando combinada com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico no TSC. Nenhum dos compostos utilizados neste experimento apresentou uma mudança na atividade locomotora dos animais no TCA (Figura 5D). A ANOVA de duas vias mostrou que não houve nenhuma diferença significativa para o ácido ascórbico F(1,27)=2,90; P=0,09], apamina [F(1,27)=2,77; P=0,10] ou para a interação ácido ascórbico × apamina [F(1,27)=0,37; P=0,54].

5.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE ATIVADORES DE CANAIS DE K⁺ SOBRE A LOCOMOÇÃO E O COMPORTAMENTO TIPO-ANTIDEPRESSIVO INDUZIDO PELO ÁCIDO ASCÓRBICO.

A Figura 6A mostra que o tratamento dos camundongos com cromacalim (um ativador de canais de K⁺, 10 µg/sítio, via i.c.v.) foi capaz de reverter o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) no TSC. A análise ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para a cromacalim [F(1,25)=6,50; P=0,01] e para a interação ácido ascórbico × cromacalim [F(1,25)=13,58; P<0,01], mas não um efeito principal do ácido ascórbico [F(1,25)=1,31; P=0,26]. A análise *post hoc* indicou que o tratamento com cromacalim aboliu a diminuição no tempo de imobilidade produzido pelo ácido ascórbico no TSC. Em relação à atividade locomotora, como mostrado na Figura 6C, a administração de cromacalim sozinha ou em combinação com o ácido ascórbico não produziu nenhuma mudança no comportamento locomotor dos camundongos, já que a ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença significativa para o ácido ascórbico [F(1,26)=0,06; P=0,80], cromacalim [F(1,26)=0,11; P=0,73], ou para a interação ácido ascórbico × cromacalim [F(1,26)=2,32; P=0,13].

A Figura 6B mostra que o tratamento com minoxidil (um ativador de canais de K⁺, 10 µg/sítio, via i.c.v) também reverteu o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico (1mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o ácido ascórbico [F(1,26)=5,61; P=0,02], para o minoxidil [F(1,26)=8,63; P<0,01] e para a interação minoxidil × ácido ascórbico [F(1,26)=7,38; P=0,01]. O teste *post hoc* indicou que o tratamento com minoxidil aboliu a redução no tempo de imobilidade produzido pelo ácido ascórbico no TSC. A Figura 6D mostra que a administração de

minoxidil sozinha ou em combinação com o ácido ascórbico não modificou a atividade locomotora dos animais, uma vez que a ANOVA de duas vias não mostrou nenhuma diferença significativa para o ácido ascórbico [$F(1,26)=0,42$; $P=0,52$], para o minoxidil [$F(1,26)=1,04$; $P=0,31$] e para a interação ácido ascórbico \times minoxidil [$F(1,26)=3,42$; $P=0,07$].

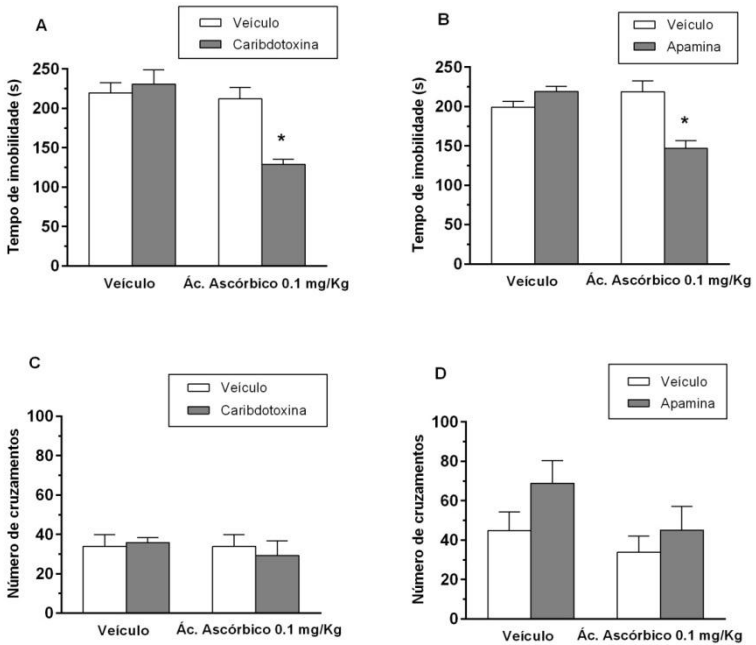


Figura 5. Efeito do tratamento de camundongos com caribdotoxina (25 pg/sítio, i.c.v.) ou apamina (10 pg/sítio, i.c.v.) em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC (painéis A e B) e no TCA (painéis C e D). Valores foram expressos como média \pm erro da média. ($n = 7-8$). * $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo.

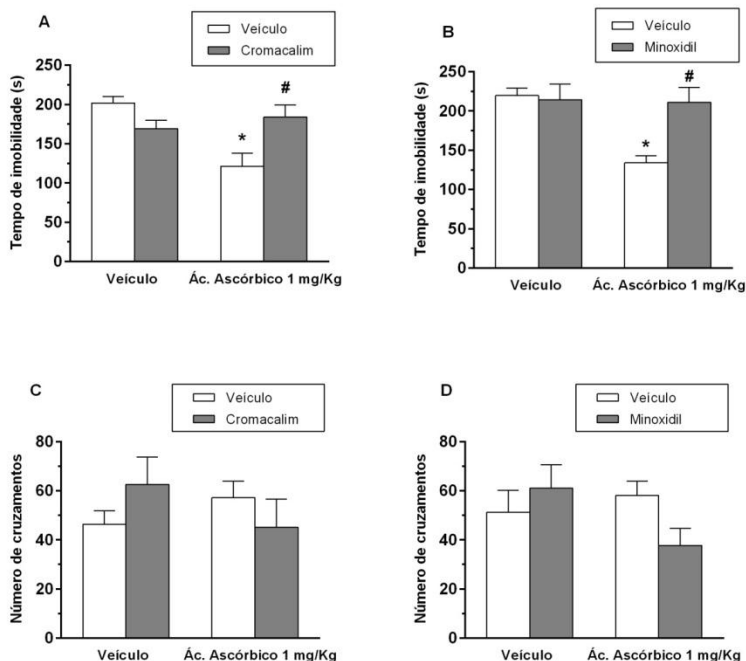


Figura 6. Efeitos do tratamento de camundongos com cromacalim (10 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) ou minoxidil (10 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) no efeito tipo-antidepressivo induzido pelo ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) no TSC (painéis A e B) e na atividade locomotora no TCA (painéis C e D). Valores foram expressos como média \pm erro da média. * $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo. # $P < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

5.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CROMACALIM SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-ANTIDEPRESSIVO SINÉRGICO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 7-NITROINDAZOL

Como mostrado na Figura 7A, a administração de 7-nitroindazol (um inibidor específico de NOS neuronal, 25 mg/kg, i.p.) em combinação com ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC. A administração de cromacalim (um ativador de canais de K^+ , 10 $\mu\text{g/sítio}$, via i.c.v.) foi capaz de anular o

efeito tipo-antidepressivo sinérgico eliciado pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol. A análise ANOVA de três vias mostrou diferenças significantes para a interação ácido ascórbico \times cromacalim \times 7-nitroindazol [$F(1,49)=22,07$; $P<0,01$]. A análise *post hoc* indicou que o tratamento com cromacalim bloqueou a diminuição do tempo de imobilidade no TSC produzido pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol. Além disso, a administração de ácido ascórbico, 7-nitroindazol e cromacalim sozinhas ou em combinação não modificaram a atividade locomotora no TCA (Figura 7B). A ANOVA de três vias não revelou nenhuma diferença significativa para a interação ácido ascórbico \times cromacalim \times 7-nitroindazol [$F(1,49)=0,87$; $P=0,35$].

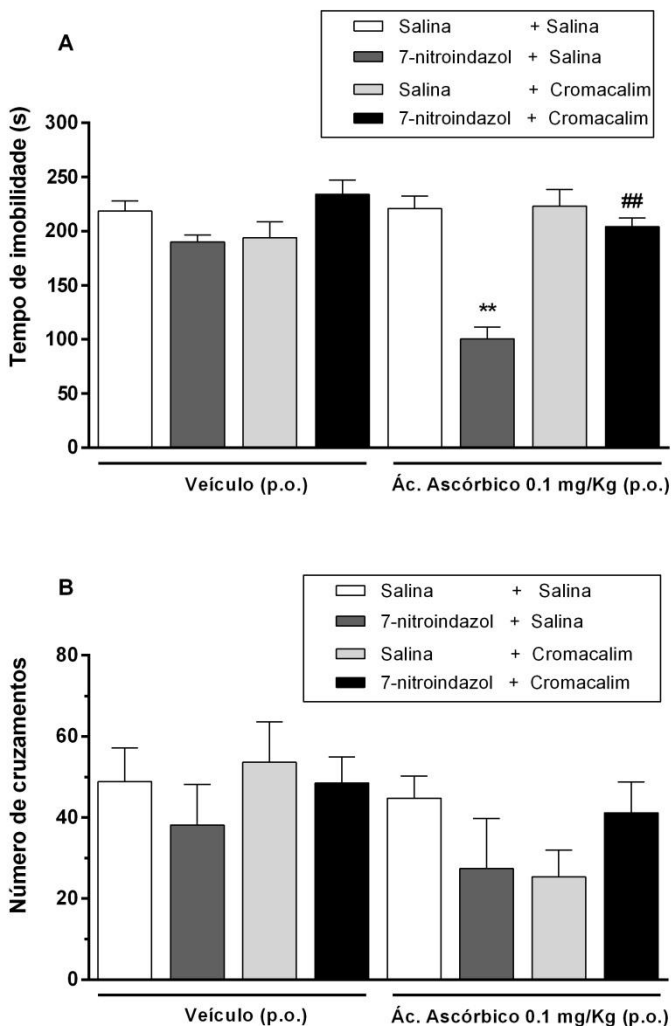


Figura 7. Efeito do tratamento de camundongos com cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v.) no efeito tipo-antidepressivo sinérgico induzido pela administração combinada de ácido ascórbico (0,1 mg/kg, p.o.) e 7-nitroindazol (25 mg/kg, i.p.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Valores foram expressos como média ± erro da média. (n = 7-8). *P<0,01 quando comparado com grupo controle tratado com veículo. ##P<0,05 quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, através do uso de diversas ferramentas farmacológicas, foi evidenciado que a modulação de canais de K^+ contribui para o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. O tratamento de camundongos com doses sub-ativas de diferentes bloqueadores de canais de K^+ foi capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo sinérgico com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico no TSC, enquanto que o tratamento dos animais com cromacalim e minoxidil, compostos farmacológicos capazes de ativar canais de K^+ , aboliu o efeito tipo-antidepressivo produzido pela administração de uma dose ativa de ácido ascórbico (Figura 8). Além disso, a administração de cromacalim reverteu o efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela administração combinada de doses sub-ativas de ácido ascórbico e 7-nitroindazol, um inibidor da atividade da NOS neuronal. É importante notar que nem o ácido ascórbico, nem os moduladores de canais de K^+ e o 7-nitroindazol, administrados sozinhos ou em combinação, afetaram a locomoção espontânea, excluindo a hipótese que os resultados observados no TSC pudessem ser influenciados pelas diferenças no comportamento locomotor dos animais.

Os mecanismos moleculares precisos responsáveis pela ação antidepressiva do ácido ascórbico ainda não são totalmente entendidos, contudo, o nosso grupo demonstrou previamente que esta vitamina possui propriedades antidepressivas em camundongos, como evidenciado pela sua capacidade de diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TSC (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011), e de anular o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível em camundongos (Moretti *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que o mecanismo pelo qual o ácido ascórbico exerce seu efeito anti-imobilidade no TSC, em camundongos, envolve uma interação com sistemas monoaminérgicos (Binfaré *et al.*, 2009), e uma inibição da via L-arginina-NO-GMPc e de receptores NMDA (Moretti *et al.*, 2011). É notável que esses alvos têm sido progressivamente reportados como implicados na fisiopatologia da depressão (Elhwuegi, 2004; Harkin *et al.*, 1999). Nesse estudo, nós estendemos nossos achados anteriores indicando que o efeito tipo-antidepressivo observado após uma administração aguda de ácido ascórbico no TSC talvez possa estar relacionado também a uma regulação da excitabilidade neuronal via modulação de diferentes tipos de canais de K^+ .

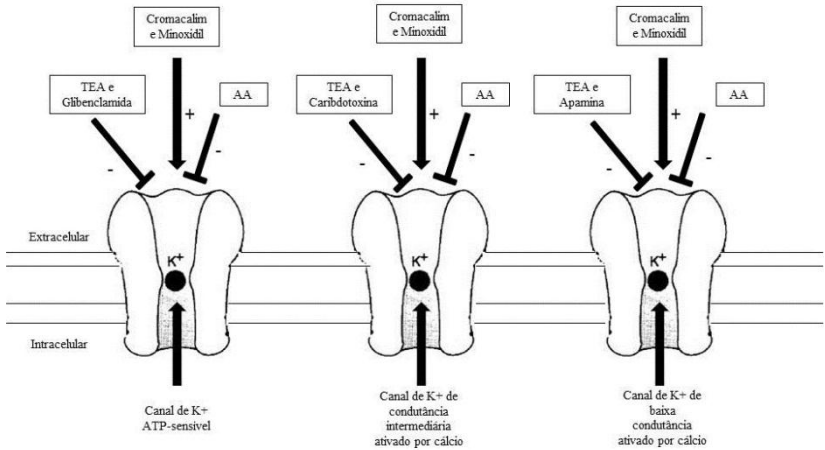


Figura 8. Envolvimento de canais de K⁺ no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. O efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico (AA) envolve a inibição dos canais de K⁺. Doses sub-ativas de TEA (inibidor de canais de K⁺ dependentes de voltagem), glibenclamida (bloqueador de canais de K⁺ sensível ao ATP), caribdotoxina (bloqueador de canais de K⁺ ativados por cálcio de alta e intermediária condutância) e apamina (bloqueador de canais de K⁺ ativados por cálcio de baixa condutância) combinadas com uma dose subativa de ácido ascórbico produziram um efeito tipo-antidepressivo no TSC. Adicionalmente, o pré-tratamento dos animais com ativadores de canais de K⁺ (cromacalim e minoxidil) reverteu o efeito antiimobilidade do ácido ascórbico no TSC.

Os canais de K⁺ podem ser classificados pelo seu mecanismo de ativação/inativação. Os bloqueadores de canais de K⁺, glibenclamida, caribdotoxina e apamina, são conhecidos por bloquear seletivamente canais de K⁺ sensíveis ao ATP, ativados por cálcio de larga e intermediária condutância e ativados por cálcio de baixa condutância, respectivamente (Gehlertand e Gackenheimer, 1993). A apamina, um peptídeo contido no veneno da abelha *Apis mellifera* (Stocker, 2004), bloqueia seletivamente a condutância de K⁺ dependente de cálcio (Huges *et al.*, 1982). O TEA é classificado como um bloqueador de canais de K⁺ não seletivo, já que bloqueia diferentes tipos de canais de K⁺ em neurônios, incluindo canais ativados por cálcio ou voltagem-dependentes (Cook e Quast, 1990; Halliwell, 1990). Estudos prévios demonstraram que a funcionalidade dos canais de K⁺ parece ser fundamental na modulação do tempo de imobilidade de camundongos

no TNF, um teste largamente utilizado para prever a ação antidepressiva de drogas em humanos. Em camundongos, um efeito tipo-antidepressivo foi produzido através do bloqueio de canais de K^+ , enquanto que um efeito tipo-depressivo foi obtido pela ativação destes canais (Galeotti *et al.*, 1999; Kaster *et al.*, 2005). Além disso, um efeito antidepressivo sinérgico decorrente da administração combinada de antidepressivos com bloqueadores de canais de K^+ também já foi descrito (Guo *et al.*, 1995; 1996; Inan *et al.*, 2004; Kaster *et al.*, 2007; Bortolatto *et al.*, 2010).

Apesar do fato de a modulação de canais de K^+ ter implicações consideráveis na função neuronal, as ações do ácido ascórbico nesses canais ainda não foram estudadas completamente. Foi previamente mostrado que o ácido ascórbico reverte a inibição do influxo de correntes de K^+ induzida por peróxido de hidrogênio em células guarda de *Vicia faba*, uma planta da família Fabaceae, conhecida popularmente como fava (Zhang *et al.*, 2001). Além disso, foi reportado que o ácido ascórbico reduz as correntes de K^+ em neurônios de *Drosophila*, o que poderia aumentar a excitabilidade neuronal (Alshuaib e Mathew, 2006), além de diminuir as correntes de K^+ dependentes de voltagem nas células bipolares da retina de peixe dourado (Fan e Yazulla, 1999).

Neste estudo, foi demonstrado um importante papel desempenhado por canais de K^+ sensíveis à ATP ou ativados por cálcio no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC. Essa conclusão é derivada do fato de que a administração de doses sub-ativas de TEA, apamina, caribdotoxina e glibenclamida, em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico provocou uma robusta redução no tempo de imobilidade nos camundongos submetidos ao TSC, indicativo de um perfil comportamental tipo-antidepressivo. Juntos, esses resultados sugerem que o bloqueio de canais de K^+ sensíveis ao ATP e canais de K^+ ativados por cálcio contribui para o efeito tipo-antidepressivo desta vitamina no TSC.

Rosati *et al.* (1998) mostraram que a glibenclamida, um inibidor de canais de K^+ sensível à ATP, bloqueia correntes neurais retificadoras tardias de K^+ . Por outro lado, a condutância de K^+ dependente de Ca^{++} tem um papel principal na regulação da frequência de descargas neuronais repetitivas e acelerando a repolarização após o potencial de ação (Szente *et al.*, 1988). A caribdotoxina bloqueia o movimento de K^+ ocluindo o poro do canal de K^+ ativado por Ca^{++} , prolongando significativamente a duração do potencial de ação. Adicionalmente, enquanto há menos efluxo de K^+ o potencial de membrana cresce e, portanto, a probabilidade do início de um potencial de ação aumenta,

causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso. Foi demonstrado que o TEA aumenta o potencial limiar ventricular, prolonga o potencial de ação e, em alta concentração (3 mM), aumenta a sua amplitude (Doggrell e Bishop, 1996), efeitos que podem ser devido ao bloqueio de canais de K^+ de retificação interior ou de canais de K^+ de retificação tardia (4rCook e Quast, 1990). Tendo em vista essas considerações e levando em conta que bloqueadores de canais de K^+ podem aumentar a excitabilidade dos circuitos centrais, é plausível propor que a potencialização do efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico induzida pelos inibidores de canais de K^+ (TEA, apamina, caribdotoxina e glibenclamida) observados no presente estudo podem ser decorrentes da inibição da hiperpolarização eliciada por esta vitamina, levando, então, a uma resposta excitatória aumentada. Contudo, ainda não está completamente estabelecido se o ácido ascórbico compartilha com os inibidores de canais de K^+ os mecanismos acima mencionados.

Foi reportado que a estimulação de receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT) pode afetar diferentes tipos de canais de K^+ em neurônios centrais (Bobkerand Williams, 1990) e, consistente com esta noção, existem evidências substanciais indicando a associação entre canais de K^+ e o mecanismo de ação de antidepressivos, especialmente aqueles relacionados com o sistema 5-HT, incluindo fluoxetina, sertralina e venfalaxina (Bortolatto *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2004; Inan *et al.*, 2004). Achados recentes indicam que esses fármacos antidepressivos são potentes inibidores de canais de K^+ , afetando a excitabilidade neuronal (Choi *et al.*, 2004). Além disso, tem sido sugerido que o bloqueio de canais de K^+ aumenta a liberação basal de 5-HT em fatias hipocámpais de ratos (Schechter, 1997). Por isso, a ação sinérgica de inibidores de canais de K^+ com o ácido ascórbico no TSC pode ainda ser dependente da ativação do sistema serotoninérgico. Essa hipótese está de acordo com os dados apresentados por Binfaré *et al.* (2009), que demonstram que a administração de NAN-190 (um antagonista de receptores 5-HT_{1A}), quetanserina (um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) e MDL72222 (um antagonista de receptores 5-HT₃) preveniu o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC em camundongos.

A via L-arginina-NO-GMPc também tem sido extensivamente reportada como envolvida na fisiopatologia da depressão (Dhir e Kulkarni, 2001). Diversas drogas conhecidas por produzirem ação tipo-antidepressiva em modelos animais de desespero comportamental são reconhecidas por modular essa via de sinalização (Rosa *et al.*, 2003; Brocardo *et al.*, 2008; Zomkowski *et al.*, 2010). Muitos estudos indicam

que NO e GMPc podem ativar diferentes tipos de canais de K^+ (Bolotina *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1997S.Y.; Jeong *et al.*, 2001) e a inibição destes canais pode representar um importante papel nos mecanismos envolvidos em transtornos depressivos (Fernandes *et al.*, 2002; Inan *et al.*, 2004; Kaster *et al.*, 2005). Um achado interessante do presente estudo é que a administração de cromacalim (um ativador de canais de K^+ , 10 $\mu\text{g/sítio}$, via i.c.v.) foi capaz de anular o efeito tipo-antidepressivo sinérgico eliciado pela administração combinada de ácido ascórbico e 7-nitroindazol, um inibidor da atividade da NOS neuronal. Esse resultado sugere que um bloqueio indireto de canais de K^+ pelo ácido ascórbico através da via NMDA-L-arginina-NO poderia explicar os resultados comportamentais observados neste estudo. Tendo em vista esses e resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico é mediado pela inibição de receptores NMDA e síntese de NO (Moretti *et al.*, 2011), podemos sugerir que o bloqueio de canais de K^+ talvez seja uma consequência da inibição de receptores NMDA e da produção de NO induzida pelo ácido ascórbico. Entretanto, a possibilidade de que ácido ascórbico também cause uma inibição direta desses canais não pode ser desconsiderada.

Reforçando ainda mais a ideia de que o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico envolve a inibição de canais de K^+ , o tratamento de camundongos com ativadores de canais de K^+ , cromacalim e minoxidil, aboliu a diminuição no tempo de imobilidade (efeito tipo-antidepressivo) induzida por uma dose ativa de ácido ascórbico no TSC. Esses resultados apoiam o envolvimento dos canais de K^+ no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC em camundongos e estão de acordo com estudos que mostram que ativadores de canais de K^+ antagonizam o efeito anti-imobilidade de antidepressivos como imipramina, amitriptilina, desipramina, paroxetina e venlafaxina no TSC (Redrobe *et al.*, 1996; Bortolatto *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o pré-tratamento de camundongos com diferentes tipos de inibidores de canais de K^+ produz uma ação tipo-antidepressiva em combinação com uma dose sub-ativa de ácido ascórbico, enquanto que o tratamento com ativadores de canais de K^+ aboliu o efeito tipo-antidepressivo produzido por uma dose ativa desta vitamina. Considerando que a modulação farmacológica desses canais pode ser uma nova estratégia no controle de transtornos do sistema nervoso central, incluindo a depressão, e os resultados deste estudo indicando os efeitos modulatórios do ácido ascórbico na excitabilidade neuronal, via inibição de canais de K^+ , podemos sugerir que esta vitamina pode ser um agente promissor para auxiliar no tratamento da depressão. No entanto, estudos adicionais com o objetivo de investigar outros mecanismos pelos quais o ácido ascórbico induz efeito tipo-antidepressivo são essenciais.

8. REFERÊNCIAS

AGUS, D.B.; GAMBHIR, S. S.; PARDRIDGE, W.M.; SPIELHOLZ, C.; BASELGA, J.; VERA, J.C.; GOLDE, D.W. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 11, p. 2842-2848, 1997.

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

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC. 4th ed., 1994.

ARONSON, J. K. Potassium channels in nervous tissue. **Biochem. Pharmacol.**, v.43, n. 1, p. 11-14, 1992.

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

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

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

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

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

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

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

BROCARDO, P. S.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. S. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. **Behav. Brain Res.**, v. 200, n. 1, p. 122-127, 2009.

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

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

BUDNI, J.; FREITAS, A. E.; BINFARÉ, R. W.; RODRIGUES, A. L. S. Role of potassium channels in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 101, n. 1, p. 148-154, 2012.

CALABRESE, F.; GUIDOTTI, G.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; MANCINI, M.; RIVA, M. A. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 37916, 2012.

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

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C.; KHOSK, D. B.; DRISKO, J.; LEVINE, M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease

growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.

CHOE, S. Potassium channel structures. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, n. 2, p. 115-121, 2002.

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

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

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

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

COOK, N. S.; QUAST, U. Potassium channel pharmacology. In: COOK, N. S. (Ed.), Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential. Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 181-255, 1990.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. GABAB receptors and depression. Current status. **Adv. Pharmacol.**, v. 58, p. 427-451, 2010.

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

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

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 3, p. 125-131, 2001.

DOGGRELL, S. A.; BISHOP, B. E. Effects of potassium channel blockers on the action potentials and contractility of the rat right ventricle. **Gen. Pharmacol**, v. 27, n. 2, p. 379-385, 1996.

EBMEIER, K. P.; DONAGHEY, C.; STEELE, J.C. Recent developments and current controversies in depression. **Lancet**, v. 367, n. 9505, p. 153-167, 2006.

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

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

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflamm. Res.**, 51, n. 8, p. 377-384, 2002.

FREITAS, R. M. DE; TOMÉ, A. DA R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Revista de psiquiatria clínica**, v. 37, n. 3, p. 105-108, 2010.

FUJINO, K.; NAKAYA, S.; WAKATSUKI, T.; MIYOSHI, Y.; NAKAYA, Y.; MORI, H. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca⁺⁺-mobilization, Ca⁺⁺-activated K⁺ channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 256, n. 1, p. 371-377, 1991.

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

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S.; REUS, G. Z.; ANDREAZZA, A. C.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; GAVIOLI, E. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal

brain-derived neurotrophic factor protein levels. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 103, n. 6, p. 502-506, 2008b.

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

GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 3, p. 309-316, 2006.

GARERI, P.; FALCONI, U.; DE FAZIO, P.; DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. **Prog Neurobiol.**, v. 61, n. 4, p. 353-396, 2000.

GEHLERT, D. R.; GACKENHEIMER, S. L. Comparison of the distribution of binding sites for the potassium channel ligands [125I]apamin, [125I]charybdotoxin and [125I]iodoglyburide in the rat brain. **Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 191-205, 1993.

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

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

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

HALLIWELL, J. V. K⁺ channels in the central nervous system. In: Cook, N.S. (Ed.), *Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential*. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 348-381, 1990.

HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P.; MAY, J. M. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 93, n. 4, p. 443-450, 2009.

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

HENN, F. A.; VOLLMAYR, B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 29, n. 4-5, p. 799-804, 2005.

HONORÉ, E. The neuronal background K₂P channels: focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.8, n. 4, p. 251-261, 2007.

HUGUES, M.; ROMÉY, G.; DUVAL, D.; VINCENT, J. P.; LAZDUNSKI, M. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 79, n. 4, p. 1308-1312, 1982.

INAN, S. Y.; YALCIN, I.; AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 77, n. 3, p. 457-464, 2004.

JEONG, H. J.; HAN, S. H.; MIN, B. I.; CHO, Y. W. 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology*, 41, p. 175-185, 2001a.

JEONG, S. Y.; HA, T. S.; PARK, C. S.; UHM, D. Y.; CHUNG, S. W. Nitric oxide directly activates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (rSlo). *Molecules and Cells*, v. 12, n. 1, p. 97-102, 2001b.

JESSE, C. R.; WILHELM, E. A.; BARBOSA, N. B.; NOGUEIRA, C. W. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of tramadol in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 613, n. 1-3, p. 74-78, 2009.

JOCA, S. R. L.; FERREIRA, F. R.; GUIMARAES, F. S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress-the International Journal on the Biology of Stress**, v. 10, n. 3, p. 227-249, 2007.

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

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

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

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

KOBAYASHI, T.; WASHIYAMA, K.; IKEDA, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 1841-1851, 2004.

KOBAYASHI, T.; WASHIYAMA, K.; IKEDA, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the antidepressant paroxetine. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 102, n. 3, p. 278-287, 2006.

KUMAR, R. S.; NARAYANAN, S. N.; NAYAK, S. Ascorbic acid protects against restraint stress-induced memory deficits in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 12, p. 1211-1217, 2009.

KUNUGI, H.; HORI, H.; ADACHI, N.; NUMAKAWA, T. Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived

neurotrophic factor in depression. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, v. 64, n. 5, p. 447-459, 2010.

LIU, D. M.; WU, J. N.; CHIOU, A. L.; LIU, J. Y., WANG, Y. NMDA induces NO release from primary cell cultures of human fetal cerebral cortex. **Neuroscience letters**, v. 223, n. 3, p. 145-148, 1997.

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

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.*, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

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

MANN, J. J.; CURRIER, D. M. Stress, genetics and epigenetic effects on the neurobiology of suicidal behavior and depression. **Eur. Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 268-271, 2010.

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

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol. Psychiatry*, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MORETTI, M.; FREITAS, A. E.; BUDNI, J.; FERNANDES, S. C.; BALEN, G. D.; RODRIGUES, A. L. S. 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.

MORETTI, M.; COLLA, A.; DE OLIVEIRA BALEN, G.; DOS SANTOS, D. B.; BUDNI, J.; DE FREITAS, A. E.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. 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.

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

NAKAGAWA, Y.; ISHIMA, T.; ISHIBASHI, Y.; YOSHII, T.; TAKASHIMA, T. Involvement of GABA(B) receptors systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. **Brain Res.**, v. 741, n. 1-2, p. 240-245, 1996.

NAKAJIMA, S.; SUZUKI, T.; WATANABE, K.; KASHIMA, H.; UCHIDA, H. Accelerating response to antidepressant treatment in depression: a review and clinical suggestions. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 34, n. 2, p.259-264, 2010.

NEGUS, S. S.; O'CONNEL, R.; MORRISSEY, E.; CHENG, K.; RICE, K. C. Effects of peripherally restricted kappa opioid receptor agonists on pain-related stimulation and depression of behavior in rats. **J. Pharmacol. Ex Ther**, in press., 2009.

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

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

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-1159, 2006.

NICHOLSON, G. M.; BLANCHE, T.; MANSFIELD, K.; TRAN, Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels

by antidepressant drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 452, n. 1, p. 35–48, 2002.

NUMAKAWA, T.; SUZUKI, S. KUMAMARU, E.; ADACHI, N.; RICHARDS, M.; KUNUGI, H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol. Histopathol.**, v. 25, n. 2, p. 237-258, 2010.

OISHI, J.; DOI, H.; KAWAKAMI, N. Nutrition and Depressive Symptoms in Community-dwelling Elderly Persons in Japan. **Acta Med. Okayama**, v. 63, n. 1, p. 9-17, 2009.

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

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

PERERA, T. D.; COPLAN, J. D.; LISANBY, S. H.; LIPIRA, C. M.; ARIF, M.; CARPIO, C.; SPITZER, G.; SANTARELLI, L.; SCHARF, B.; HEN, R.; ROSOKLIJA, G.; SACKEIM, H. A.; DWORK, A. J. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 18, p. 4894-4901, 2007.

PICCHINI, A. M.; MANJI, H. K.; GOULD, T. D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n., p. 419-428, 2004.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

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

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine

hypothesis revisited. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-1130, 2011.

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

REDROBE, J. P.; PINOT, P.; BOURIN, M. The effect of the potassium channel activator, cromakalim, on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 10, n. 6, p. 524-528., 1996.

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

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

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

ROSATI, B.; ROCCHETTI, M.; ZAZA, A.; WANKE, E. Sulfonylureas blockade of neural and cardiac HERG channels. **FEBS Lett.**, v. 440, p.125-130, 1998.

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, J. H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, n. 5, p. 426-437, 2008.

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

SCHANDERL, S.H. Vitamin assay. In: *Methods in food analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis.* Academic Press, New York, pp.845, 1970.

SCHECHTER, L. E. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [3H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 1, p. 262-270, 1997.

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

SHIEH, C. C.; MICHAEL, C.; SULLIVAN, J. P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 557-594, 2000.

SHIN, J. H.; CHUNG, S.; PARK, E. J.; UHM, D. Y.; SUH, C. K. Nitric oxide directly activates calcium-activated potassium channels from rat brain reconstituted into planar lipid bilayer. **FEBS Lett.**, v. 415, n. 3, p. 299-302, 1997.

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

STAMFORD, J. A.; ISAAC, D.; HICKS, C. A.; WARD, M. A.; OSBORNE, D. J.; ONEILL, M. J. Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. **Brain Res.**, v. 835, n. 2, p. 229-240, 1999.

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

STOCKER, M. Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 10, p. 758-770, 2004.

SZENTE, M. B.; BARANYI, A.; WOODY, C. D. Intracellular injection of apamin reduces a slow potassium current mediating after

hyperpolarizations and IPSPs in neocortical neurons of cats. **Brain Res.**, v. 461, n. 1, p. 64–74, 1988.

TYTGAT, J.; MAERTENS, C.; DAENENS, P. Effect of fuoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, n. 7, p. 1417–1424, 1997.

WILLIAMS, D. L.; KATZ, G. M.; ROY-CONTANCIN, L.; REUBEN, J. P. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 23, p. 9360–9364, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression, Fact sheet N°369
Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>
Acessado em: 07.01.2013

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

ZAREBHOKAN, A.; NAINI, J. G. Vitamin C Absorption and Transportation in the Body and its Neuroprotective Effect. In: BERHARDT, I. V. (Ed.), *Advances in Medicine and Biology*. Volume 21, pp. 167-180, 2011.

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

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