

**RICARDO WABNER BINFARÉ**

**Investigação do efeito do ácido ascórbico em modelos animais preditivos de  
ação antidepressiva**

**Florianópolis**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Investigação do efeito do ácido ascórbico em modelos animais preditivos de  
ação antidepressiva**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Neurociências

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ana Lúcia Severo Rodrigues**

**Florianópolis**

**2009**

*“(...) Emma exprimia a preocupação de que Charles Darwin estivesse tão tomado pela descoberta da verdade da natureza que deixava de considerar qualquer outro tipo de verdade. Aceitar apenas aquilo que podia ser provado o impediria de aceitar outras coisas que não podem ser provadas do mesmo modo, coisas que, se verdadeiras, estariam acima de nossa compreensão”.*

*Karl Zimmer em “O Livro de Ouro da Evolução”  
sobre carta de Emma Wedgwood para Charles Darwin*

*Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo...*

*Serei eternamente grato aos animais que possibilitaram a realização dos experimentos que constituem este estudo. Tenho certeza de que a sua ausência na pesquisa se refletiria no empobrecimento da literatura que visa melhorar a qualidade de vida das pessoas. Não existem palavras que possam transmitir a sua importância e o auxílio prestado para o Homem.*

*Gostaria de agradecer a minha namorada e companheira Kelly por me ajudar, estar sempre do meu lado, apoiando e também me acalmando nos momentos difíceis. Sem as suas sugestões e participação direta nos experimentos esse estudo não seria o mesmo. O teu amor e teu carinho são responsáveis por todas as minhas realizações passadas e futuras. Estou certo que ainda tenho muito que aprender contigo. Tive muita sorte em te encontrar nessa vida. Te amo!*

*A minha família (meu pai José, minha mãe Liane e minha irmã Paula) por me apoiar em todas as decisões que tomei até hoje. O incentivo sempre dado por vocês nas minhas escolhas torna muito mais fácil e agradável a minha caminhada. Sou grato por me fornecerem segurança, entenderem a ausência e até o mau-humor em alguns momentos. Enfim, muito obrigado por acreditar em mim e nos meus sonhos! Amo vocês!*

*À professora e orientadora Ana Lúcia que desde a graduação depositou confiança em mim e permitiu a minha entrada no seu grupo de pesquisa. Sou muito grato por todo o conhecimento que me foi passado sobre Ciência bem como sobre inúmeros outros assuntos não menos importantes. Seu profissionalismo é um exemplo a ser seguido!*

*Aos meus amigos de laboratório pelo apoio, colaboração e pela convivência que torna a nossa segunda casa durante o mestrado um local agradável. Andriara, Andréia, Chandra, Cris, Dani, Jardel, Josi, Juliano, Kelly, Luis (Trader), Manu, Maurício, Pati e Roberto: obrigado pelos inúmeros cafés, conversas, histórias engraçadas e ensinamentos das mais diversas áreas da vida (Bioquímica, Biologia, Educação física, Farmacologia, Fisioterapia, Psicologia,...).*

*Sou grato a duas pessoas importantes na sua passagem pelo laboratório: Roberto Pértile e Priscilla, vocês foram fundamentais nos meus primeiros passos na Iniciação Científica. Obrigado pelos ensinamentos! Também gostaria de agradecer ao Angelo, que mesmo de longe auxilia na elaboração dos trabalhos. Seus primeiros dados com ácido ascórbico possibilitaram o crescimento de uma boa idéia.*

*Cris, Dani, Kelly e Manu: parte desse estudo é de vocês! Sem o seu auxílio nos experimentos e idéias meus resultados demorariam a nascer.*

*Aos amigos de adolescência “e anexas” que me proporcionaram ótimos momentos fora do laboratório. André, Birigua, Ewerton, Fi, Hique e Deza, Luiz, Magu, Rafa e Tha, Rodri. Também gostaria de agradecer aos amigos da Biologia (e anexos): Anjinho e Karla, Ciça, Félix, Gi, Nakama e Mari, Rona, Van e Tati... Os momentos de lazer que vocês me proporcionaram foram inestimáveis. Obrigado pelas festas, filmes, futebol, praias, rangos, etc... Quando estou com vocês eu percebo que Ciência pode ser muito importante mas que não é tudo na vida de uma pessoa.*

*Agradeço à CAPES por ter concedido o apoio financeiro que me auxiliou durante o mestrado.*

*Ao Nivaldo, secretário da Pós, pela sua disponibilidade e pela boa vontade em ajudar.*

*Aos professores do programa que compartilharam seus conhecimentos e enriqueceram o meu conhecimento científico.*

<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. DEPRESSÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA .....	12
1.2. DEPRESSÃO: SINTOMAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	13
1.3. BASES ETIOLÓGICAS DA DEPRESSÃO .....	16
1.3.1. Hipótese monoaminérgica da depressão.....	16
1.3.2. Sistema glutamatérgico e depressão.....	18
1.3.3. Estresse e depressão.....	19
1.4. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA DEPRESSÃO: OS MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO .....	22
1.5. ÁCIDO ASCÓRBICO.....	24
1.5.1. Aspectos gerais e históricos.....	24
1.5.2. Biossíntese e metabolismo.....	26
1.5.3. Funções biológicas.....	30
1.5.4. Ácido ascórbico (AA) e depressão.....	31
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1. ANIMAIS, DROGAS E REAGENTES E TRATAMENTOS UTILIZADOS.....	39
4.2. MODELOS ANIMAIS .....	40
4.2.1. Teste do nado forçado (TNF).....	40
4.2.2. Teste da suspensão da cauda (TSC) .....	41
4.2.3. Teste do campo aberto (TCA) .....	42
4.2.4. Modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI).....	43
4.3. ANÁLISE DA AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) .....	44
4.3.1. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via intraperitoneal no TSC, TNF e TCA.....	44
4.3.1.1. Curva dose-resposta de ácido ascórbico (AA) .....	44
4.3.1.2. Investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC.....	45
4.3.2. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral ou por via intracerebroventricular no TSC, TNF e TCA.....	47

4.3.2.1. Curvas dose-resposta do ácido ascórbico (AA) .....	47
4.3.2.2. Curva tempo-resposta do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral .....	49
4.3.2.3. Investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC .....	50
4.3.2.4. Investigação do efeito do efeito do ácido ascórbico (AA) com antidepressivos no TSC e TCA .....	51
4.3.2.5. Investigação da ação antidepressiva do ácido ascórbico (AA) no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI) .....	52
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	53
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) ADMINISTRADO POR VIA INTRAPERITONEAL NO TSC, TNF E TCA .....	54
5.1.1. Curva dose-resposta de ácido ascórbico (AA) .....	54
5.1.2. Envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC.....	55
5.1.3. Envolvimento dos receptores noradrenérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC .....	56
5.1.4. Envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC .....	58
5.2. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) ADMINISTRADO POR VIA ORAL OU POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR NO TSC, TNF E TCA .....	60
5.2.1. Curvas dose-resposta do ácido ascórbico (AA) .....	60
5.2.2. Curva tempo-resposta do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral .....	63
5.2.3. Investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC.....	64
5.2.4. Investigação do efeito do efeito do ácido ascórbico (AA) com antidepressivos no TSC e TCA .....	64
5.2.5. Investigação da ação antidepressiva do ácido ascórbico (AA) no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI) .....	67
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios Diagnósticos do DSM-IV.....	14
<b>Tabela 2.</b> Agentes estressores utilizados no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI.....	42
<b>Figura 1.</b> Regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).....	21
<b>Figura 2.</b> Estrutura química do ácido ascórbico.....	25
<b>Figura 3.</b> Biossíntese do AA em animais.....	27
<b>Figura 4.</b> Bioquímica do AA em pH fisiológico.....	29
<b>Figura 5.</b> Dinâmica do ascorbato no SNC .....	32
<b>Figura 6.</b> Teste do nado forçado (TNF).....	39
<b>Figura 7.</b> Teste da suspensão da cauda (TSC).....	40
<b>Figura 8.</b> Teste do campo aberto (TCA).....	41
<b>Figura 9.</b> Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via i.p.....	44
<b>Figura 10.</b> Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no efeito do AA no TSC.....	46
<b>Figura 11.</b> Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via p.o no TSC, TNF e TCA.....	47
<b>Figura 12.</b> Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via i.c.v. no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.....	48
<b>Figura 13.</b> Protocolo utilizado para elaboração da curva tempo-resposta de AA quando administrado por via p.o no TSC.....	49
<b>Figura 14.</b> Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do AA no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.....	50
<b>Figura 15.</b> Protocolo utilizado para a investigação do efeito de dose sub-ativa de AA com doses sub-ativas de antidepressivos no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.....	51
<b>Figura 16.</b> Protocolo utilizado para a investigação da ação antidepressiva do AA no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI).....	53

<b>Figura 17.</b> Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico por via i.p. no TSC e no TNF.....	54
<b>Figura 18.</b> Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico por via i.p. no TCA.....	55
<b>Figura 19.</b> Efeito do pré-tratamento com NAN-190, cetanserina ou MDL 72222 sobre a redução do tempo de imobilidade provocada pela administração de dose ativa de ácido ascórbico no TSC.....	56
<b>Figura 20.</b> Efeito do pré-tratamento com prazosina, ioimbina ou propranolol sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido ascórbico no TSC.....	57
<b>Figura 21.</b> Efeito do pré-tratamento com haloperidol, SCH 23390 ou sulpirida sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido ascórbico no TSC.....	59
<b>Figura 22.</b> Efeito do tratamento agudo p.o. com ácido ascórbico ou fluoxetina no TSC ou no TNF .....	60
<b>Figura 23.</b> Efeito do tratamento agudo por via p.o. com ácido ascórbico no TCA.....	61
<b>Figura 24.</b> Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico por via i.c.v. no TSC e no TCA.....	62
<b>Figura 25.</b> Efeito do tratamento agudo por via p.o. com ácido ascórbico 30, 60 ou 120 minutos antes do TSC.....	63
<b>Figura 26.</b> Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico na potencialização do efeito de dose sub-ativa de MK-801 no TSC ou no TCA.....	64
<b>Figura 27.</b> Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico na potencialização do efeito de doses sub-ativas dos antidepressivos fluoxetina, imipramina ou bupropiona no TSC.....	65
<b>Figura 28.</b> Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico e de doses sub-ativas dos antidepressivos fluoxetina, imipramina ou bupropiona na avaliação da atividade locomotora dos animais no TCA.....	66
<b>Figura 29.</b> Efeito da administração por via p.o. de ácido ascórbico ou fluoxetina por 7 dias em camundongos submetidos ao modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI) no TSC ou no TCA.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético  
5-HT = serotonina  
8-OH-DPAT = (+)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)tetralina  
AA = ácido ascórbico  
ACTH = hormônio adrenocorticotrófico  
Asc = ascorbato  
ANOVA = análise de variância  
BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro  
DMSO = dimetilsulfóxido  
DSM = manual estatístico e diagnóstico de doenças mentais  
DOI = *R*(-)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropana HCl  
ECI = estresse crônico imprevisível  
ERO = espécie reativa de oxigênio  
CRF = fator liberador de corticotrofina  
GMP = guanosina 5' monofosfato  
HPA = hipotálamo-hipófise-adrenal  
ISRN = inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina  
ISRS = inibidor seletivo da recaptção de serotonina  
i.c.v. = intracerebroventricular  
i.p. = intraperitoneal  
iMAO = inibidores da enzima monoamina oxidase  
LCR= líquido cefalorraquidiano  
LEC = líquido extracelular  
MDL72222 = tropanil 3,5-diclorobenzoato  
MK-801 = maleato de dizocilpina  
NA = noradrenalina  
NAN-190 = 1-(2-metoxifenil)-4[-(2-phthalimido)butil]piperazina)  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
p.o. = per os (via oral)  
PVN = núcleos paraventriculares do hipotálamo  
Ro 60-0175 = (S)-2-(6-Cloro-5-fluoro-indol-1-il)-1-metil-etilamina fumarato  
s.c. = subcutâneo  
SCH23390 = 7-cloro-3-metil-1-fenil-1,2,4,5-tetrahidro-3-benzazepina-8-ol  
SNC = sistema nervoso central  
TCA = teste do campo aberto  
TNF = teste do nado forçado  
TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral- $\alpha$   
TSC = teste da suspensão da cauda

## RESUMO

Ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel antioxidante que participa de muitas reações fisiológicas e encontra-se em altas concentrações no cérebro, sendo considerado um neuromodulador. Este estudo investigou o efeito do ácido ascórbico no teste da suspensão da cauda (TSC) e no teste do nado forçado (TNF) em camundongos. Além disso, foi investigado o envolvimento do sistema monoaminérgico e dos receptores NMDA no efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico no TSC, bem como o efeito desta vitamina no modelo do estresse crônico imprevisível (ECI) em camundongos. Adicionalmente, o efeito dos antidepressivos fluoxetina, imipramina e bupropiona em combinação com ácido ascórbico no TSC foi investigado. O ácido ascórbico (0,1-10 mg/kg, i.p., 1-10 mg/kg p.o. ou 0,1 nmol/camundongo, i.c.v.) produziu efeito tipo-antidepressivo no TSC, mas não no TNF, sem alterar a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. O ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) produziu efeito tipo-antidepressivo no TSC 60 minutos após sua administração. O efeito do ácido ascórbico (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC foi prevenido pelo pré-tratamento i.p. com NAN-190 (0,5 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), cetanserina (5 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>), MDL72222 (0,1 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>), prazosina (62,5 µg/kg, antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), ioimbina (1 mg/kg, antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos), propranolol (2 mg/kg, antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos), haloperidol (0,2 mg/kg, antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) ou sulpirida (50 mg/kg, antagonista de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos), mas não com SCH23390 (0,05 mg/kg, s.c., antagonista de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos). Adicionalmente, o ácido ascórbico (1 mg/kg, p.o.) potencializou o efeito de doses sub-ativas (p.o.) de MK-801 (0,01 mg/kg, um antagonista de receptores NMDA) e dos antidepressivos fluoxetina (1 mg/kg), imipramina (0,1 mg/kg), ou bupropiona (1 mg/kg) no TSC. O tratamento combinado de ácido ascórbico com MK-801 e com os antidepressivos não produziu alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Além disso, a administração repetida de ácido ascórbico (10 mg/kg, p.o.) ou de fluoxetina (10 mg/kg, p.o., controle positivo) por 7 dias preveniu o fenótipo tipo-depressivo induzido pelo modelo do ECI no TSC, sem causar alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Os resultados em conjunto mostram que a administração de ácido ascórbico produz efeito tipo-antidepressivo no TSC, o qual é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com o sistema monoaminérgico e com os receptores NMDA. Além disso, o ácido ascórbico produz efeito tipo-antidepressivo sinérgico quando administrado com antidepressivos convencionais no TSC e possui efeito preventivo em relação à alteração comportamental induzida pelo estresse no TSC em camundongos. Dessa forma, os presentes dados necessitam de estudos complementares que elucidem a relevância terapêutica do ácido ascórbico para o tratamento da depressão e/ou como tratamento complementar para a farmacoterapia com antidepressivos.

**Palavras-chave:** Antidepressivos, ácido ascórbico, estresse crônico imprevisível, sistema monoaminérgico, teste da suspensão da cauda, vitamina C.

## ABSTRACT

Ascorbic acid, commonly known as vitamin C, is a water-soluble antioxidant vitamin that participates in a wide range of physiological reactions and is highly concentrated in the cerebrum, being considered as a neuromodulator. This study investigated the effect of ascorbic acid in the tail suspension test (TST) and in the forced swimming test (FST) in mice. In addition, it was investigated the contribution of the monoaminergic system and NMDA receptors to its antidepressant-like effect of ascorbic acid in the TST, as well as the effect of this vitamin in the chronic unpredictable stress model (CUS) in mice. Moreover, the effects of the antidepressants fluoxetine, imipramine and bupropion in combination with ascorbic acid in the TST were investigated. Ascorbic acid (0.1-10 mg/kg, i.p., 1-10 mg/kg p.o. or 0.1 nmol/mice i.c.v.) produced an antidepressant-like effect in the TST, but not in the FST, without altering the locomotor activity of the animals in the open-field test. Ascorbic acid (1 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect in the TST 60 minutes after its administration. The effect of ascorbic acid (0.1 mg/kg, i.p.) in the TST was prevented by i.p. pre-treatment with NAN-190 (0.5 mg/kg, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist), MDL72222 (0.1 mg/kg, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist), prazosin (62.5 µg/kg, an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist), propranolol (2 mg/kg, a  $\beta$ -adrenoceptor antagonist), haloperidol (0.2 mg/kg, a non-selective dopamine receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, a dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist), but not with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist). Additionally, ascorbic acid (1 mg/kg, p.o.) potentiated the effect of subeffective doses (administered by p.o. route) of MK-801 (0.01 mg/kg, a NMDA receptor antagonist) and the antidepressants fluoxetine (1 mg/kg), imipramine (0.1 mg/kg), or bupropion (1 mg/kg) in the TST. The combined treatment of ascorbic acid with MK-801 and the antidepressants produced no alteration in the locomotion of the animals in the open-field test. Moreover, ascorbic acid (10 mg/kg, p.o.) or fluoxetine (10 mg/kg, p.o., used for positive control) administered for 7 days prevented the depressive-like phenotype elicited by the CUS in the TST, without causing alterations on the ambulatory behavior of the animals in the open-field test. In summary, these results show that the administration of ascorbic acid produces an antidepressant-like effect in TST, which is dependent, at least in part, on its interaction with the monoaminergic system and the NMDA receptors. Moreover, ascorbic acid caused a synergistic antidepressant-like effect when administered with conventional antidepressants in the TST and elicited a preventive effect against the stress-induced depressive behavior in the TST in mice. Therefore, the present findings warrant further studies to evaluate the therapeutic relevance of ascorbic acid for the treatment of depression and as a co-adjuvant treatment with antidepressants.

**Key words:** Antidepressants, ascorbic acid, chronic unpredictable stress, monoaminergic system, tail suspension test, vitamin C.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Depressão: Considerações gerais e Epidemiologia*

Os primeiros indícios da depressão datam de cerca de 400 anos antes de Cristo, quando Hipócrates descreveu o termo “*melancolia*” (Nestler *et al.*, 2002). Essa doença apresentava sintomas como tristeza e a tendência ao suicídio (Radden *et al.*, 2002). Atualmente, a depressão é uma dos transtornos neuropsiquiátricos mais prevalentes e é reconhecida como uma doença heterogênea com manifestações fisiológicas, comportamentais e psicológicas (Nemeroff e Owens, 2002). Está classificada dentro dos transtornos de humor, que incluem os transtornos unipolares como a depressão maior e a distímia (quadro mais brando e duradouro) e os transtornos bipolares, que se caracterizam por uma alternância entre fases maníacas e depressivas (American Psychiatry Association, 2000).

A depressão é uma doença crônica e recorrente que possui grandes implicações sociais (Berton e Nestler, 2006). Os acometidos pela doença apresentam limitação da sua atividade e bem-estar, o que provoca perda de produtividade (Ebmeier *et al.*, 2006), além de uma maior utilização de serviços de saúde (Fleck *et al.*, 2003; Nemeroff, 2007). Além disso, sua prevalência de aproximadamente 17% na população mundial (Nestler *et al.*, 2002a) e o impacto que causa no cotidiano de pacientes e familiares envolvidos fazem com que a depressão seja reconhecida como um problema de saúde pública em atendimento médico primário (Simon *et al.*, 1995). Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que a depressão atinja o segundo lugar entre as causas de incapacitação em adultos até 2020, perdendo somente para as doenças isquêmicas (Murray e Lopez, 1997). No Brasil existem aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas terão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (Nardi, 2000).

Estudos epidemiológicos mostram que índices de mortalidade elevados estão

associados com a depressão, sendo que os deprimidos apresentam risco de morte 1,58 – 2,07 (95% IC) maior que indivíduos não deprimidos (Cuijpers e Smit, 2002). Apesar de ainda não esclarecido, a maior mortalidade em relação a indivíduos não deprimidos pode ser decorrente do maior risco de suicídio, que nos deprimidos atinge valores de 15% (Guze e Robins, 1970; Zalsman *et al.*, 2004).

Desta forma, além do sofrimento pessoal e familiar, a depressão gera um alto custo para o estado, decorrente dos custos com tratamento, mortalidade e improdutividade no trabalho (Greenberg *et al.*, 1993).

### ***1.2. Depressão: Sintomas, Diagnóstico e Tratamento***

Os critérios para o diagnóstico da depressão maior se baseiam na observação clínica dos sintomas (Tabela 1) e são estabelecidos pelo Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais, quarta edição (American Psychiatry Association, DSM-IV, 2000).

**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 hiperinsônia;*

*(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.*

B. Os sintomas não devem preencher os critérios para um episódio misto (transtorno bipolar);

C. Os sintomas são causa de um sofrimento ou deterioração significativa do funcionamento social, ocupacional ou em outras importantes áreas da vida;

D. 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);

E. 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

Além desses sintomas, o indivíduo deprimido pode apresentar co-morbidades com doenças clínicas como as cardiovasculares, cérebro-vasculares e metabólicas (Teng *et al.*, 2005) e também com outras doenças psiquiátricas (Nemeroff e Owens, 2002).

Existem diferentes alternativas de tratamento para a depressão, como os tratamentos psicológicos, os físicos e a farmacoterapia com antidepressivos (Ebmeier *et al.*, 2006). Dentre os psicológicos, são utilizados, por exemplo, a terapia cognitivo comportamental, a terapia interpessoal, a terapia da solução de problemas entre outras. No entanto, esses tratamentos são utilizados em casos de depressão branda e/ou utilizados em combinação com medicação. Os tratamentos físicos disponíveis são a estimulação magnética transcraniana, a estimulação profunda do cérebro e a terapia eletroconvulsiva, sendo que somente esta apresenta uso regular e é utilizada em casos de depressão associada com sintomas psicóticos. Por outro lado, fatores como o fácil acesso e mesmo a efetividade ainda inadequada para muitos indivíduos, fazem com que a farmacoterapia com antidepressivos seja o tratamento de primeira escolha para a depressão (Ebmeier *et al.*, 2006).

Existem várias classes de antidepressivos disponíveis para o tratamento da depressão como os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (antidepressivos Tricíclicos), os inibidores da monoamina oxidase (iMAO), os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) e os atípicos (como os inibidores da recaptação de dopamina e os Inibidores da Recaptação de Noradrenalina, ISRN), entre outros (Dencker, 2000; Berton e Nestler, 2006; Nemeroff, 2007). Apesar de muito utilizados, estes fármacos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 50% dos indivíduos, ainda que muito mais (mais que 80%) exibam respostas parciais (Nestler, 2002a), além de causarem efeitos colaterais (Brunello *et al.*, 2002). Além disto, a resposta terapêutica destes fármacos só ocorre no mínimo após 3 semanas

o início do tratamento (Brunello *et al.*, 2002; Páez-Pereda, 2005). Todos estes fatores, associados ou não entre si, prejudicam a adesão do paciente ao tratamento (Brunello *et al.*, 2002; Nestler *et al.*, 2002a).

### **1.3. Bases etiológicas da depressão**

#### **1.3.1. Hipótese monoaminérgica da depressão**

A etiologia da depressão ainda não é totalmente esclarecida. No entanto, a depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos e está intimamente relacionada com o sistema monoaminérgico, particularmente com os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos (Wong e Licinio, 2001).

A hipótese monoaminérgica postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina (5-HT) ou noradrenalina (NA), ou ainda de receptores deficientes para estes neurotransmissores (Schildkraut, 1965; Mann *et al.*, 1995). Esta é sustentada principalmente pelo fato de que a farmacoterapia atual se baseia nessa hipótese, uma vez que os antidepressivos aumentam a concentração de 5-HT, NA ou ainda dopamina na fenda sináptica, pois bloqueiam a recaptção destes neurotransmissores (Baldessarini, 1996; Taylor *et al.*, 2005). Além disso, níveis plasmáticos diminuídos de serotonina foram observados em pacientes com depressão maior (Coppen e Doogan, 1988), níveis reduzidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, também foi encontrado no líquido de pacientes com depressão (Ricci e Wellmen, 1990) e a reserpina, um fármaco que depleta catecolaminas, pode causar sintomas de depressão (Wong e Licinio, 2001).

Além dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, a função dopaminérgica reduzida também está implicada na fisiopatologia da depressão (D'Aquila *et al.*, 2000; Willner *et al.*, 2005; Papakostas, 2006). Tanto estudos clínicos quanto pré-clínicos

indicam que o sistema dopaminérgico está fortemente envolvido com a regulação neural do humor e há evidências relacionando anormalidades na neurotransmissão dopaminérgica com a patofisiologia da depressão (D'Aquila *et al.*, 2000; Willner *et al.*, 2005). Foi demonstrado que agonistas dopaminérgicos potencializam o efeito antidepressivo em animais no teste do nado forçado (TNF), um modelo animal amplamente utilizado para avaliação de propriedades antidepressivas de determinadas drogas (Joca *et al.*, 2000). Além disso, um inibidor seletivo da recaptação de dopamina, a bupropiona, é utilizado clinicamente como antidepressivo (Ascher *et al.*, 1995).

Apesar das várias evidências que sustentam a hipótese monoaminérgica, esta apresenta-se simplista, uma vez que falha ao não explicar a ação de alguns compostos com ação antidepressiva que não agem no sistema monoaminérgico, ou ainda antidepressivos atípicos, como a tianeptina, que aumenta a recaptação de monoaminas (Brink *et al.*, 2006). Além disso, existem fármacos que aumentam a concentração de monoaminas na fenda sináptica e não possuem ação antidepressiva, como a anfetamina. Adicionalmente, existe uma discrepância temporal entre os eventos bioquímicos envolvidos no metabolismo das monoaminas e os efeitos clínicos dos antidepressivos (Baldessarini, 1996). O melhor entendimento das vias e mecanismos responsáveis pela ação dos antidepressivos pode contribuir substancialmente para uma melhor compreensão dos transtornos depressivos e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o seu tratamento (Wong e Licinio, 2001).

Além do sistema monoaminérgico, há evidências da participação de vários outros sistemas de neurotransmissores na fisiopatologia da depressão, tais como o sistema glutamatérgico, principalmente via receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Skolnick, 1999, 2002; Petrie *et al.*, 2000; Pittenger *et al.*, 2008), a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) (da Silva *et al.*, 2000; Harkin *et al.*, 2003; Joca *et al.*, 2007) e o

sistema opióide (Gabilondo *et al.*, 1995). Além disso, a depressão pode ser relacionada com alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (Manji *et al.*, 2001; Pittenger e Duman, 2008), com aumento no estresse oxidativo (Bilici *et al.*, 2001; Forlenza e Miller, 2006), com a liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune (Mikova *et al.* 2001; Tuglu *et al.*, 2003; Dunn *et al.*, 2005) e com o aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Perera *et al.*, 2007; Pittenger e Duman, 2008).

### **1.3.2. Sistema glutamatérgico e depressão**

A literatura tem demonstrado que o sistema glutamatérgico pode estar envolvido na fisiopatologia dos transtornos de humor, sendo um alvo para a ação de compostos com propriedades antidepressivas (Zarate *et al.*, 2003). O glutamato é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e é encontrado em aproximadamente 80% dos neurônios (Kornhuber e Weller, 1997). Devido ao papel do glutamato na plasticidade neuronal, a modulação do sistema glutamatérgico tem sido investigada em estudos sobre transtornos de humor que apresentam diminuição do humor, concentração, atenção e memória (Zarate *et al.*, 2002; Kew e Kemp, 2005).

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que antagonistas NMDA apresentam propriedades antidepressivas e que o tratamento com antidepressivos pode diminuir a expressão das subunidades desses receptores (Skolnick, 1999, 2002; Petrie *et al.*, 2000; Pittenger *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que pacientes que receberam tratamento com cetamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, apresentaram uma redução significativa no escore da escala Hamilton de depressão (um maior escore indica maior severidade da doença) em relação aos pacientes deprimidos que receberam placebo (Berman *et al.*, 2000).

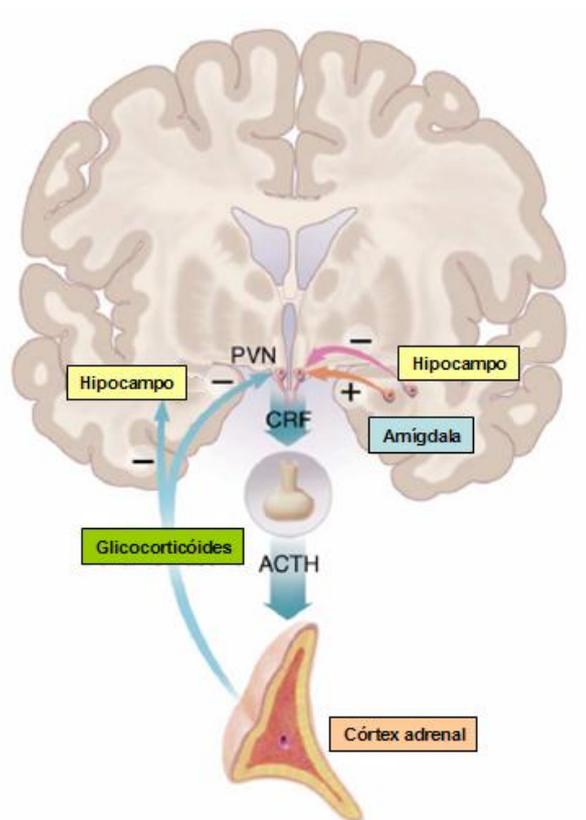
Além disso, há um papel importante dos receptores NMDA na modulação das funções serotoninérgicas. Antagonistas dos receptores NMDA podem liberar serotonina e estimular sua renovação em várias regiões do cérebro, o que pode contribuir para suas propriedades antidepressivas (Löscher e Hönack, 1992; Fink *et al.*, 1995).

### **1.3.3. Estresse e depressão**

Embora a depressão seja uma doença multifatorial e de etiologia não identificável, existem fatores associados ao transtorno depressivo. Segundo estudos epidemiológicos, o estresse crônico parece ser um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo à depressão (Nestler *et al.*, 2002a). Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (Post, 1992). Segundo a literatura, a depressão pode ser resultante de uma interação entre os efeitos do estresse e a predisposição genética. No entanto, os mecanismos implicados no surgimento da depressão após a exposição a eventos estressantes ainda permanecem pouco estabelecidos (Kloet *et al.*, 2005).

O eixo HPA corresponde ao sistema regulador primário de resposta ao estresse. Este integra as funções neurológicas e estímulos sensoriais à função endócrina e assim é um componente essencial que capacita o indivíduo a lidar com eventos estressantes (Berton e Nestler, 2006). Diante de um estímulo estressor, as células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (PVN) secretam fator liberador de corticotrofina (CRF) e vasopressina que atuam sinergicamente na ativação do eixo HPA. Na hipófise anterior, o CRF estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que por sua vez age no córtex da glândula supra-renal, promovendo a síntese e liberação de glicocorticóides como o cortisol em humanos (Nemeroff, 1996). Os glicocorticóides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvos, produzindo diversos tipos de

respostas além de modular o próprio eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição da secreção do ACTH pela pituitária e do CRF a partir do hipotálamo (Figura 1). Este controle inibitório além contribuir para a regulação da resposta ao estresse auxilia na supressão dessa resposta quando o estímulo estressor cessa (Swaab *et al.*, 2005; Aguilera *et al.*, 2007). Além disso, o hipocampo também auxilia no controle da ativação do eixo HPA, através da inibição dos neurônios hipotalâmicos secretores de CRF (Nestler *et al.*, 2002a). No entanto, a ativação excessiva do eixo HPA está relacionada com a depressão (Berton e Nestler, 2006). A literatura demonstra que a hiperatividade do eixo HPA é observada em grande parte dos pacientes com depressão, e esta ativação conseqüentemente reflete-se em níveis basais elevados de CRF no sistema nervoso central (SNC) (Sapolsky, 2000; Gillespie e Nemeroff, 2005), além de níveis elevados de cortisol no plasma e no líquido cefalorraquidiano (Gold *et al.*, 1996; Holsboer e Barden, 1996; Nemeroff, 1996). Adicionalmente, pacientes com depressão tendem a apresentar aumento da hipófise, das glândulas supra-renais e ausência de resposta ao teste de supressão com o corticosteróide sintético dexametasona (Baungartner *et al.*, 1985; Gold *et al.*, 1996; Holsboer e Barden, 1996; Nemeroff, 1996) o que indica ausência do mecanismo de controle do eixo HPA.



**Figura 1. Regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA).** Os neurônios secretores de CRF dos núcleos paraventriculares (PVN) do hipotálamo recebem aferências excitatórias da amígdala e inibitórias do hipocampo. O CRF liberado na circulação porta-hipofisária estimula a liberação de ACTH pela hipófise anterior. O ACTH liberado na corrente sanguínea age no córtex adrenal e promove a síntese e liberação de glicocorticóides. Os glicocorticóides inibem a síntese e liberação de CRF e ACTH. Em altas concentrações, eles causam danos aos neurônios hipocámpais, o que causa um estado de hipercortisolemia sustentado, além de sintomas de depressão (adaptado de Nestler *et al.*, 2002a). ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; CRF, fator liberador de corticotropina; PVN, núcleos paraventriculares.

Os elevados e prolongados níveis de glicocorticóides podem provocar a morte de neurônios hipocámpais, os quais estão relacionados às funções cognitivas e contribuem para os sintomas de depressão, além de serem essenciais para o controle inibitório do eixo HPA (Sapolsky, 1986; Nestler *et al.*, 2002a). A atrofia hipocámpal resultante da prolongada exposição aos glicocorticóides envolve prejuízo dos mecanismos de neuroplasticidade, incluindo redução da neurogênese e redução da neurotrofina BDNF

(Nestler *et al.*, 2002a; Berton e Nestler, 2006). Desta forma, o estresse pode provocar alterações neuroquímicas e morfológicas que contribuem para o risco de depressão e a normalização do funcionamento do eixo HPA parece ser uma etapa necessária para a remissão dos sintomas da doença (Berton e Nestler, 2006).

#### ***1.4. Estudo pré-clínico da depressão: os Modelos Animais de Depressão***

Modelos animais de doenças ou transtornos humanos possuem diferentes propósitos e sua utilidade é estritamente dependente dos objetivos do estudo (Willner, 1984). Alguns modelos mostram-se ferramentas úteis na elucidação dos mecanismos e processos fisiopatológicos envolvidos na doença (Guay-Woodford, 2003) enquanto outros se focam no desenvolvimento de tratamentos novos e/ou mais efetivos (Hyde *et al.*, 1993; McDonald *et al.*, 1999).

Dentre as diferentes áreas da medicina e da ciência, algumas doenças podem ser diagnosticadas ou possuem marcadores em nível molecular, o que pode contribuir para a reprodução mais fidedigna da mesma ou parte de seus sintomas em animais, conferindo assim maior validade aos seus respectivos modelos (Matthews *et al.*, 2005). Por outro lado, áreas envolvidas no estudo dos transtornos de humor como o da depressão não disponibilizam de tais marcadores para o mais fácil estudo e reprodução da condição em animais (Matthews *et al.*, 2005). Desta forma, os modelos utilizados baseiam-se em mimetizar alguns sintomas da doença em humanos, os quais são estabelecidos pelo Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais (DSM-IV, American Psychiatry Association, 2000). No entanto, muitos dos sintomas característicos da depressão como humor deprimido e sentimentos de culpa e desvalia não podem ser avaliados em laboratório. Desta forma, os modelos utilizados também se baseiam na sensibilidade aos fármacos antidepressivos utilizados na clínica, o que contribui para a validação dos modelos (Nestler *et al.*, 2002b).

Os modelos animais são ferramentas indispensáveis na pesquisa que visa identificar novos compostos com possível ação antidepressiva e para fornecer novos conhecimentos sobre as bases neurobiológicas da depressão (Cryan *et al.*, 2002). Modelos com validade preditiva, como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão da cauda (TSC) são amplamente utilizados para o estudo da depressão (Nestler *et al.*, 2002b; McArthur e Borsini, 2006). Estes modelos baseiam-se na observação do animal em estado de desespero, que se movimenta para fugir de uma situação inescapável, desenvolvendo após os primeiros minutos uma postura imóvel que pode ser revertida pela administração de antidepressivos. Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesses testes (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985). O TNF foi descrito primeiramente por Porsolt *et al.* (1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente em camundongos, enquanto o TSC foi descrito em camundongos por Steru *et al.* (1985). Estes dois modelos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (Bourin *et al.*, 2005); são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (Cryan *et al.*, 2002, 2005).

Além da validade preditiva, modelos animais de depressão com validade fenomenológica e/ou de *constructo* também são utilizados. Entre estes, destacam-se os modelos baseados na indução de estresse e os modelos farmacológicos para depressão (McArthur e Borsini, 2006).

Os modelos de indução ao estresse baseiam-se em estudos que relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental de risco para o desenvolvimento da depressão (Tennant, 2002) e nas alterações neuroquímicas e morfológicas provocadas pelo estresse que contribuem para o risco da doença (Nestler *et al.*, 2002a, 2002b). Nestes modelos, a exposição dos animais a agentes estressores induz a uma série de alterações fisiológicas e comportamentais que mimetizam o estado

depressivo. A relevância destes modelos é evidenciada tendo em vista que os déficits nos parâmetros comportamentais são revertidos pelo tratamento crônico com antidepressivos (D'Aquila, 1994; Willner *et al.*, 1992; Willner, 1997). Esses parâmetros fisiológicos e comportamentais garantem aos modelos uma alta validade preditiva e fenomenológica (Katz *et al.*, 1981; Willner *et al.*, 1987). Entre esses modelos, encontram-se o estresse crônico moderado (Willner, 1997) e o estresse crônico imprevisível (ECI) (Lu *et al.*, 2006). Desta forma, modelos baseados na exposição ao estresse são utilizados nos estudos pré-clínicos da depressão (Yalcin *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Gutiérrez-García e Contreras, 2009).

Os modelos farmacológicos induzem um comportamento tipo-depressivo através de alterações neuroquímicas semelhantes àsquelas encontradas na depressão (McArthur e Borsini, 2006). Entre estes modelos destacam-se os da administração de citocinas pró-inflamatórias como interferon- $\alpha$  (Makino *et al.*, 1998, 2000), interleucina-1 (Dunn e Swiergiel, 2005), interleucina-6 (Chourbaji *et al.*, 2006) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Gadotti *et al.*, 2007). Estes se baseiam na hipótese inflamatória da depressão que relaciona a secreção de citocinas pró-inflamatórias com o desenvolvimento de sintomas de depressão (Mikova *et al.* 2001; Tuglu *et al.*, 2003). Além, desses outros modelos como o da administração de reserpina (McArthur e Borsini, 2006) e de anfetamina (Cryan *et al.*, 2003) também são utilizados.

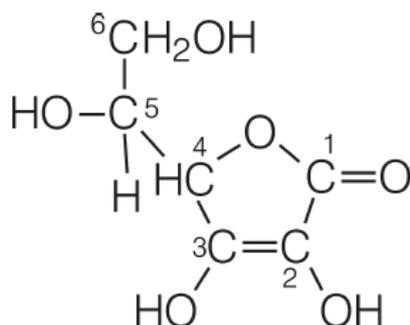
## **1.5. Ácido ascórbico**

### **1.5.1. Aspectos gerais e históricos**

O L-ácido ascórbico (AA), popularmente conhecido como vitamina C, é um micronutriente hidrossolúvel antioxidante essencial para os humanos (Rumsey e Levine, 1998; Naidu, 2003). O AA desempenha diversas funções fisiológicas como um importante co-fator enzimático em reações de hidroxilação, participando na síntese do

colágeno, carnitina e neurotransmissores (Naidu, 2003). Esta vitamina também atua como um antioxidante endógeno detoxificando radicais orgânicos (Schreiber e Trojan, 1991; Naidu, 2003), possui propriedades neuroprotetora e neuromoduladora (Grünewald, 1993; Rebec e Pierce, 1994; Padayatty *et al.*, 2003; Rice, 2000), auxilia na absorção de ferro, além de exercer diversas outras funções (Naidu, 2003).

O AA,  $C_6H_8O_6$  (Figura 1), é uma cetolactona com peso molecular de 176,13 e  $pK_a = 4,2$  (Levine, 1986; Rebec e Pierce, 1994). O nome químico desta vitamina, *ácido ascórbico* (AA), representa duas de suas propriedades: uma química e outra biológica. Em relação à primeira, a vitamina é um ácido, sendo que sua estrutura (Figura 1) contém um grupo hidróxi-enólico, tautômero da  $\alpha$ -hidroxicetona, o que lhe fornece não somente capacidade redutora, mas também um comportamento ácido. A natureza ácida em solução aquosa deriva da ionização do grupo enólico ligado ao C-3 ( $pK_a = 4,2$ ), em relação ao carbono da lactona (monoéster cíclico) (Davies *et al.*, 1991). Por outro lado, a palavra *ascórbico* refere-se ao valor biológico que tornou a vitamina conhecida, a proteção contra a doença escorbuto, do latim *scorbutus* (Schanderl, 1970).



**Figura 2. Estrutura química do ácido ascórbico (AA; vitamina C).**

Durante o período das grandes navegações marítimas os navegadores desenvolviam a doença conhecida como escorbuto (Grünewald, 1993; Naidu, 2003).

Esta é caracterizada por apresentar sintomas como fadiga, dificuldade de cicatrização, dentes soltos, dores musculares (Halligan *et al.*, 2005) e humor deprimido (DeSantis, 1993; Stöger *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 2003). Os marinheiros que permaneciam a bordo por longos períodos, sem renovar seus suprimentos alimentares, morriam de escorbuto (Rice, 2000; Manela-Azulay *et al.*, 2003). James Lind, médico escocês da Marinha Britânica, foi o primeiro a correlacionar a alta morbidade e mortalidade dos marinheiros ingleses com a falta de vegetais e frutas frescas na dieta dos marinheiros (Naidu, 2003). Em 1928 um agente redutor foi isolado a partir da glândula adrenal pelo cientista húngaro Albert von Szent-György. Posteriormente este agente foi identificado como fator anti-escorbuto presente no suco de limão (vitamina C). Em 1933 sua estrutura química foi elucidada (Figura 1) por Haworth e Hirst, que em conjunto com Szent-György sugeriram o nome de *ácido ascórbico* para a vitamina. No mesmo ano, sua síntese artificial também foi estabelecida (Grünewald, 1993; Manela-Azulay *et al.*, 2003).

### **1.5.2. Biossíntese e metabolismo**

Plantas e animais sintetizam o AA a partir da D-glicose e D-galactose (Figura 3), sendo que vários mamíferos produzem níveis elevados de AA a partir da glicose no fígado. No entanto, alguns animais como, morcegos frugívoros, macacos, cobaias e humanos não são capazes de sintetizar esta vitamina devido à ausência, geneticamente determinada, da enzima L-gulono-lactona oxidase (Figura 3), sendo necessária a sua ingestão na dieta (Nishikimi *et al.*, 1994; Naidu, 2003).



**Figura 3. Biossíntese do AA em animais.** O L-Ácido ascórbico (AA) é sintetizado principalmente a partir da glicose na maioria dos animais no fígado através de uma série de reações enzimáticas. Humanos e outros animais como macacos, morcegos frugívoros e cobaias não sintetizam AA devido a presença do gene não-funcional para a enzima *L-gulono-lactona oxidase* (adaptado de Naidu, 2003).

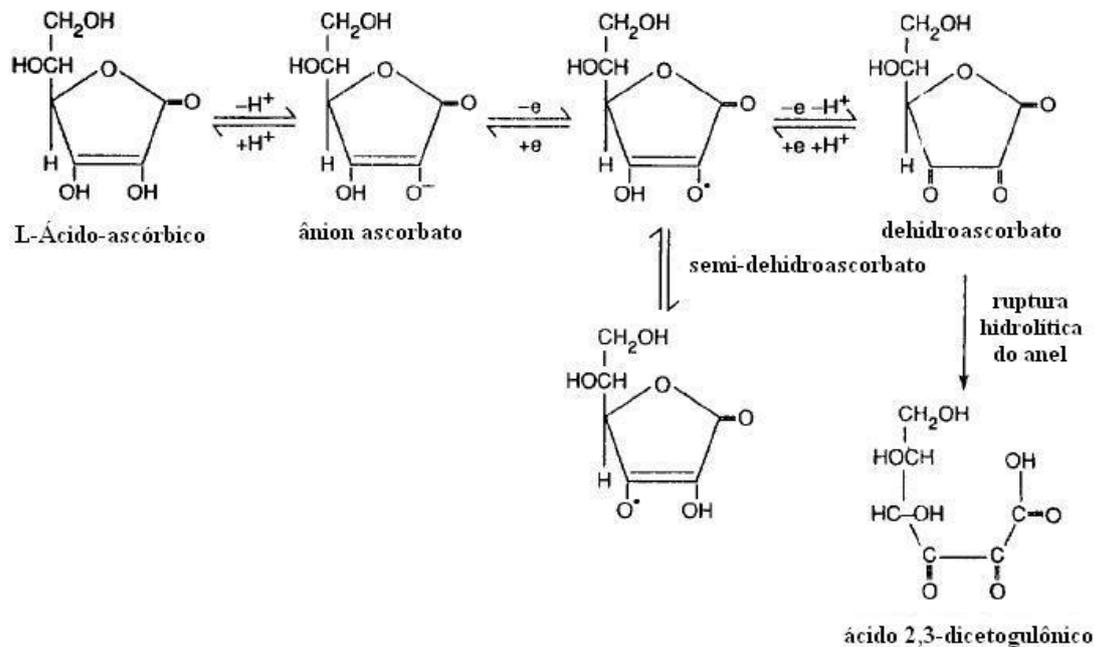
As frutas e vegetais são responsáveis por 95% das fontes de AA da alimentação humana, sendo este ácido um dos mais importantes nutrientes encontrados nestes alimentos (Henshall, 1973; Valdés, 2006). As principais fontes de AA são frutas cítricas

como laranja e limão, mamão papaia, goiaba, tomate entre outras e folhas verdes, como brócolis, couve, além de pimentas e outros vegetais (Davies *et al.*, 1991; Naidu, 2003). Atualmente o AA é utilizado como suplementação vitamínica sendo consumido sob diversas formas sólidas como cápsulas, drágeas, comprimidos efervescentes bem como em formas líquidas (Naidu, 2003).

A absorção de AA nos mamíferos ocorre de forma semelhante a dos monossacarídeos, através de um processo dependente de energia por transportadores dependentes de sódio (Rivers, 1987; Sotiriou *et al.*, 2002). O transportador SVCT1 localiza-se principalmente nos rins, fígado e intestino e além de atuar na captação da AA nestes tecidos é responsável pela absorção intestinal da vitamina (Liang *et al.*, 2001; Mackenzie *et al.*, 2008). Adicionalmente, um produto da oxidação do AA, o ácido dehidroascórbico também pode ser absorvido por difusão facilitada no intestino e convertido em ascorbato no meio intracelular (Malo e Wilson, 2000). Por outro lado, os transportadores SVCT2 localizam-se primariamente em tecidos e órgãos altamente especializados como cérebro e olhos (Tsukaguchi *et al.*, 1999) e também atuam transportando o ascorbato para o interior das células de mamíferos (Liang *et al.*, 2001; Tsukaguchi *et al.*, 1999). Após ser absorvido, o AA, sob a forma de ascorbato, é amplamente distribuído pelo organismo e os tecidos possuem mecanismos de captar e armazenar ascorbato sendo que suas concentrações apresentam-se elevadas nas glândulas supra-renais, medula espinhal e cérebro (Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000).

O AA possui dois prótons dissociáveis com valores de  $pK_a = 4,2$  e  $11,8$  e assim encontra-se sob a forma de ânion ascorbato em pH fisiológico de mamíferos (Davies *et al.*, 1991; Rebec e Pierce, 1994). O ascorbato pode ser oxidado através de um processo reversível de duas etapas, formando o produto de sua oxidação, o ácido

dehidroascórbico (Figura 4) (Rebec e Pierce, 1994; Rumsey e Levine, 1998; Rice, 2000).



**Figura 4. Bioquímica do AA em pH fisiológico.** Em pH fisiológico de mamíferos, o AA 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 ascorbil ou semi-dehidroascorbato. Através da perda de um segundo elétron e desprotonação, este é oxidado a ácido dehidroascórbico ou dehidroascorbato. O ácido dehidroascórbico pode ter sua estrutura em anel hidrolisada irreversivelmente, formando o metabólito ácido 2,3-dicetogulônico (adaptado de Rumsey e Levine, 1998).

O ácido dehidroascórbico pode ser reconvertido a ascorbato por diferentes reações enzimáticas bem como por agentes redutores presentes nos sistemas biológicos como a glutatona ou sua estrutura pode ser irreversivelmente hidrolisada formando um dos seus principais metabólitos, o ácido 2,3-dicetogulônico (Figura 4), que pode ser metabolizado a ácido oxálico, xilose, xilonato, entre outros produtos (Rumsey e Levine, 1998; Padayatty *et al.*, 2003). A principal rota de eliminação do ascorbato e de seus metabólitos é através da urina (Naidu, 2003).

### 1.5.3. Funções biológicas

O AA participa de múltiplas funções vitais, as quais estão relacionadas com a sua capacidade de atuar como um doador de elétrons, participando de inúmeras reações de óxido-redução (Rebec e Pierce, 1994; Naidu, 2003). A vitamina é conhecida como um importante co-fator enzimático de hidroxilases e monooxigenases (Naidu, 2003; Padayatty, 2003). Na síntese do colágeno, o AA é essencial para manter as enzimas prolina hidroxilase e lisina hidroxilase na sua forma ativa. As reações catalisadas por estas enzimas adicionam grupos hidroxila aos aminoácidos prolina e lisina na molécula de colágeno, o que contribui para o aumento da estabilidade da estrutura em tripla hélice da molécula (Peterkofsky, 1991). O AA é indispensável na síntese de carnitina, atuando como co-fator na hidroxilação envolvida na sua síntese. A carnitina é essencial no transporte de ácidos graxos para o interior da mitocôndria onde pode ser utilizada na produção de energia para a célula (Rebouche, 1991). Adicionalmente, a vitamina atua na síntese de neurotransmissores, como co-fator da enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase que catalisa a conversão de dopamina para noradrenalina (Naidu, 2003), a qual, dentre as suas diversas funções, atua como um regulador geral do humor em mamíferos (Taylor *et al.*, 2005). O AA também catalisa reações envolvidas na síntese de hormônios (Eipper e Mains, 1991) e no metabolismo da tirosina (Englard e Seifter, 1986).

Além de atuar como co-fator enzimático, o AA detoxifica radicais orgânicos produzidos durante o metabolismo celular, atuando como um antioxidante endógeno (Schreiber e Trojan, 1991; Naidu, 2003). Essa propriedade deriva da sua capacidade de doar elétrons, atuando como um agente redutor à custa de sua própria oxidação. Assim, este composto pode reagir com compostos com elétrons desemparelhados como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e estabilizar radicais livres produzidos durante o

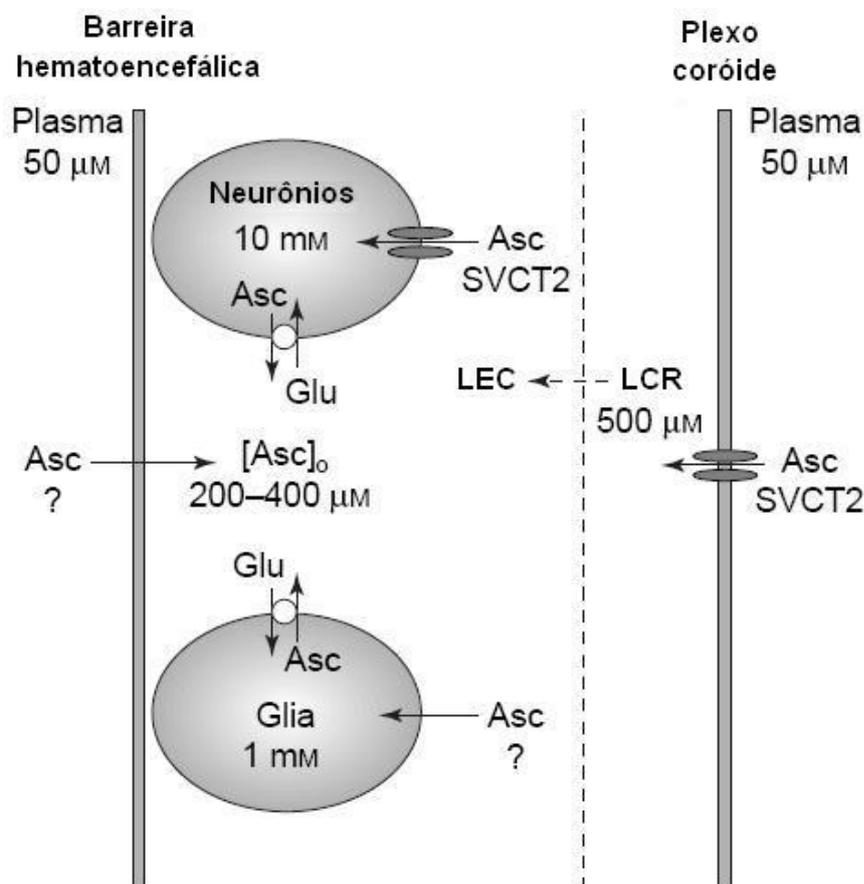
metabolismo celular (Padayatty *et al.*, 2003). As EROs possuem alta reatividade e podem oxidar biomoléculas como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, causando diferentes tipos de danos biológicos e podendo causar morte celular (Sies, 1993). Os metabólitos das ERO estão associados com processos degenerativos. No cérebro, as EROs podem estar relacionados com a doença de Parkinson, além de produzir efeitos neurotóxicos causados pela excessiva liberação de glutamato, relacionada com distúrbios como esquizofrenia (Coyle e Puttfarcken, 1993). Desta forma, o ascorbato pode ter efeito neuroprotetor, uma vez que pode proteger a célula, neutralizando as EROs (Padayatty *et al.*, 2003).

Além das funções descritas, a literatura mostra que o AA pode desempenhar outras funções biológicas como auxiliar na absorção de Ferro (Bendich e Cohen, 1990), atuar como imunomodulador, no controle da síntese de glicocorticóides pela glândula adrenal (Kolb, 1990; Naidu, 2003), possui putativa ação antitumoral (Naidu, 2003; Padayatty *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008) e antinociceptiva (Rosa *et al.*, 2005).

#### **1.5.4. Ácido ascórbico (AA) e depressão**

O ascorbato é encontrado em altas concentrações no cérebro, onde suas concentrações são dinamicamente reguladas (Schreiber e Trojan, 1991; Grünewald, 1993). O conteúdo de ascorbato pode variar de acordo com a região do encéfalo, encontrando-se em altos níveis no córtex cerebral e hipocampo e concentrações progressivamente reduzidas em áreas encefálicas mais posteriores como o tronco cerebral e medula espinhal (Milby *et al.*, 1982; 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 (Figura 5). Este processo que pode ocorrer também em células gliais,

assegura um alto nível de ascorbato extracelular em muitas regiões do encéfalo (Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000).



**Figura 5. Dinâmica do ascorbato no SNC.** O ascorbato (sintetizado ou adquirido através da dieta) é distribuído pela corrente sanguínea para todos os tecidos. Os níveis plasmáticos de ascorbato são aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ . Através de transporte ativo no plexo coróide, o ascorbato concentra-se no líquido cefalorraquidiano (LCR) onde pode atingir concentrações de 500  $\mu\text{M}$  e difundir-se para o fluido extracelular (LEC) do encéfalo. Do LEC, o ascorbato pode ser captado por neurônios através dos transportadores SVCT2 e também por células gliais, por mecanismos ainda não esclarecidos. O ascorbato também pode entrar no LEC através da barreira hemato-encefálica, embora os mecanismos ainda sejam obscuros. Além do fino controle dos níveis extracelulares de ascorbato, suas concentrações também são dinamicamente reguladas pela captação de glutamato. O transportador de glutamato aumenta os níveis de ascorbato no LEC após captar glutamato e liberar ascorbato para o meio extracelular. Assume-se que essa regulação e dinâmica do ascorbato possa ocorrer em várias regiões do SNC. Asc, ascorbato; LEC, líquido extracelular; LCR, líquido cefalorraquidiano (adaptado de Rice, 2000).

Além dos papéis já citados no sistema biológico, o ascorbato possui ação neuromoduladora, podendo modular tanto a neurotransmissão dopaminérgica como glutamatérgica (Grünewald, 1993; Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). Também foi demonstrado que o AA inibe o receptor glutamatérgico do subtipo NMDA através de um fenômeno redox (Majewska *et al.*, 1990). Como mencionado anteriormente, estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que antagonistas NMDA apresentam propriedades antidepressivas e que o tratamento com antidepressivos pode ter um efeito sobre a função destes receptores (Skolnick, 1999; Petrie *et al.*, 2000; Rada *et al.*, 2003; Kugaya e Sanacora, 2005; Dhir e Kulkarni, 2008; Pittenger *et al.*, 2008).

Apesar dos altos e regulados níveis de AA no cérebro, suas funções fisiológicas no SNC não estão bem estabelecidas (Rice, 2000). Um papel para o AA nos transtornos do humor foi sugerido a partir de observações clínicas da recuperação da depressão idiopática (sem causa conhecida) por altas doses de AA (50 mg/kg/dia), bem como da depressão associada ao uso de ACTH em uma criança com hepatite (Coochi *et al.*, 1980). Um estudo também relatou que a administração de AA por 14 dias diminuiu os escores no inventário Beck de depressão em indivíduos saudáveis, o que sugere melhora do humor (Brody, 2002). Outro estudo clínico mais recente verificou uma diminuição dos níveis de ascorbato no plasma de pacientes com depressão maior (Khanzode *et al.*, 2003). Em um estudo clínico mais recente, Chang *et al.* (2007) reportaram o caso de um paciente deprimido que desenvolveu escorbuto, o que sugere que uma ingestão inadequada desta vitamina, e conseqüentemente baixos níveis endógenos de ascorbato, pode estar relacionada à patogênese da depressão. Além disso, outros estudos relatam uma co-morbidade existente entre escorbuto e depressão (DeSantis, 1993; Stöger *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi relatado que ratos submetidos ao

modelo de depressão induzido pelo estresse crônico moderado apresentam uma redução do conteúdo de ascorbato no córtex cerebral (Eren *et al.*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, causa considerável morbidade psiquiátrica e perda de produtividade e possui grande impacto social e econômico (Greenberg *et al.*, 1993; Berton e Nestler, 2006; Ebmeier *et al.*, 2006). Além disso, é um dos principais fatores de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral e está associada ao risco de suicídio (Nemeroff e Owens, 2002). Os fármacos utilizados para o tratamento da depressão apresentam baixa eficácia clínica (Nestler *et al.*, 2002a) e causam diversos efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para o abandono do tratamento pelo paciente (Brunello *et al.*, 2002). Considerando o exposto, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam otimizar a eficácia clínica para o tratamento da depressão.

Considerando os relatos existentes de que o AA possui possível efeito antidepressivo em estudos clínicos (Coochi *et al.*, 1980; Brody, 2002) e sua relação com receptores NMDA (Majewska *et al.*, 1990) os quais estão relacionados com a patofisiologia e tratamento da depressão (Skolnick, 1999; Petrie *et al.*, 2000; Pittenger *et al.*, 2008), este estudo pretende estender e/ou fornecer novos dados para o melhor entendimento da ação do AA em modelos animais preditivos de ação antidepressiva. Vale ressaltar que inexistentes os relatos na literatura referentes ao efeito do AA em modelos animais de depressão.

No estudo pré-clínico da depressão os modelos animais têm se mostrado ferramentas indispensáveis na identificação de compostos com possível ação antidepressiva bem como na elucidação sobre as bases neurobiológicas envolvidas na depressão (Cryan *et al.*, 2002). Dessa forma, o estudo do efeito do AA em modelos amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva como

o TNF e o TSC (Bourin *et al.*, 2005) pode ser importante para identificar suas propriedades antidepressivas. Além disso, considerando-se que a depressão está classicamente relacionada com o sistema monoaminérgico (Elhwuegi, 2004) e que compostos que interagem com esse sistema possuem efeito tipo-antidepressivo nos modelos citados (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985; Cryan *et al.*, 2005), julgamos importante investigar se o efeito da vitamina é dependente de uma interação com receptores de monoaminas. Adicionalmente, a investigação do efeito do AA em um modelo que reproduz uma importante base etiológica da depressão (modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI) pode ser relevante para melhor caracterizar seu potencial antidepressivo.

Desta forma, o estudo da ação antidepressiva do AA em modelos animais poderá, em longo prazo, auxiliar no desenvolvimento de compostos de baixo custo e fácil acesso pela população, os quais poderão auxiliar na terapêutica convencional da depressão e/ou sua eventual utilização *per se* para o tratamento da doença. Além disso, nossos resultados podem contribuir futuramente para a literatura através da apresentação da propriedade antidepressiva do AA, ampliando assim o vasto acervo de dados existentes referentes aos efeitos e funções biológicas da vitamina C.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Objetivo geral*

Investigar o possível efeito tipo-antidepressivo do AA em modelos animais preditivos de ação antidepressiva, bem como o efeito de sua associação com antidepressivos e seus mecanismos de ação.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Investigar o efeito de diferentes doses de AA, administrado por via intraperitoneal (i.p.), no TNF, TSC e TCA;
- Investigar o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico na ação antidepressiva do AA (administrado por via i.p.) no TSC;
- Investigar o efeito de diferentes doses de AA, administrado por via oral (p.o.), no TNF, TSC e TCA;
- Investigar o efeito do AA em diferentes tempos de administração (p.o.) no TSC;
- Investigar o efeito da administração central por via intracerebroventricular (i.c.v.) de diferentes doses de AA no TSC e TCA;
- Investigar o efeito da administração (p.o.) de dose sub-ativa de AA com dose sub-ativa de MK-801 (antagonista de receptores NMDA) no TSC e TCA;
- Investigar o possível efeito sinérgico da administração (p.o.) de uma dose sub-ativa de AA com doses sub-ativas de antidepressivos utilizados na clínica (fluoxetina, imipramina ou bupropiona) no TSC;
- Investigar o efeito da administração (p.o.) de uma dose sub-ativa de AA com doses sub-ativas de antidepressivos utilizados na clínica (fluoxetina, imipramina ou bupropiona) sobre a atividade locomotora dos animais no TCA;
- Investigar o efeito da administração (p.o.) repetida (7 dias) de AA sobre a indução do comportamento tipo-depressivo (aumento do tempo de imobilidade

no TSC) induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI) em camundongos e comparar o efeito da vitamina com o antidepressivo fluoxetina;

- Investigar o efeito da administração (p.o.) repetida (7 dias) de AA ou fluoxetina sobre a atividade locomotora dos animais submetidos ao modelo do ECI no TCA;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais, drogas e reagentes e tratamentos utilizados

Camundongos *Swiss* adultos de ambos os sexos, homogeneamente distribuídos entre os grupos experimentais, pesando 30 a 45 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC foram utilizados. Os animais foram mantidos a 22-25°C com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro/escuro de 12 horas (7:00-19:00 h) e todos os experimentos foram realizados entre as 09:00 e 17:00. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFSC.

Os seguintes compostos e reagentes foram utilizados: ácido ascórbico (AA), bupropiona, cetanserina, DMSO (dimetilsulfóxido), fluoxetina, haloperidol, imipramina, ioimbina, MDL72222 (tropanil 3,5-diclorobenzoato), NAN-190 (1-2-metoxifenil)-4[-(2-phthalimido)butil]piperazina), prazosina, propranolol, SCH23390 ((R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepina hidrocloreto), sulpirida adquiridos da Sigma e Tween 80 (St Louis, MO, USA). MK-801 (maleato de dizocilpina) foi adquirido da Research Biochemicals International (Natick, MO, USA).

O AA foi administrado 15, 30 ou 60 minutos antes do TSC, TNF ou TCA, dependendo da via de administração. Os grupos controle foram tratados com veículo apropriado quando tratados por via i.p. ou i.c.v.(salina ou salina com 5% de DMSO, salina com 1% de Tween 80, ou salina com 5% de etanol, conforme o protocolo experimental). Todas as drogas foram dissolvidas em salina, exceto as que estão a seguir especificadas: NAN-190 e MDL 72222 foram diluídos em salina com 1% de Tween 80, sulpirida e prazosim em salina com 5% de DMSO e haloperidol em salina com 5% de etanol. Nos experimentos em que o tratamento foi por via p.o., o veículo utilizado foi água destilada.

## 4.2. Modelos animais

### 4.2.1. Teste do nado forçado (TNF)

Este modelo foi proposto por Porsolt *et al.* (1977) para o estudo de substâncias com possível ação antidepressiva. O modelo baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial eles adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando ele flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água.

O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  conforme descrito anteriormente (Zomkowski *et al.*, 2006; Brocardo *et al.*, 2008). Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (Porsolt *et al.*, 1977), enquanto que o aumento do tempo de imobilidade caracteriza um comportamento tipo-depressivo dos animais (Makino *et al.*, 1998; Dunn e Swiergiel, 2005).



**Figura 6. Teste do nado forçado (TNF)**

#### 4.2.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)

Este modelo foi proposto por Steru *et al.* (1985) como alternativa ao TNF para o estudo de compostos com possível atividade antidepressiva, uma vez que parece ser menos estressante que o TNF (Thierry *et al.*, 1986). Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (Steru *et al.*, 1985). O tempo de imobilidade foi avaliado durante um período de 6 minutos em camundongos acústica e visualmente isolados, suspensos pelo menos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda com fita adesiva (Mantovani *et al.*, 2003).

Considerando que o aumento do tempo de imobilidade caracteriza um comportamento tipo-depressivo em modelos preditivos de ação antidepressiva como o TNF e o TSC (Mineur *et al.*, 2006; Dunn e Swiergiel, 2008; Murray *et al.*, 2008; Gutiérrez-García e Contreras, 2009), também utilizaremos este parâmetro comportamental para testar a ação antidepressiva do AA após a exposição dos animais ao modelo de indução ao comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI).



**Figura 7. Teste da suspensão da cauda (TSC)**

#### 4.2.3. Teste do campo aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TNF ou no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (TCA), durante 6 minutos (Rodrigues *et al.*, 1996). Este teste é realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com todas as patas corresponde ao cruzamento e foi o parâmetro utilizado para avaliação da atividade locomotora.



**Figura 8. Teste do campo aberto (TCA)**

#### 4.2.4. Modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

Neste modelo, os animais são expostos a diversos fatores estressantes e, como resultado, podem apresentar comportamentos tipo-depressivo (McArthur e Borsini, 2006) como o aumento do tempo de imobilidade nos modelos preditivos de ação antidepressiva como o TNF e TSC (Mineur *et al.*, 2006; Gutiérrez-García e Contreras, 2009), diminuição do consumo de sacarose (medida de anedonia) e na frequência de limpeza corporal (Yalcin *et al.*, 2005; Casarotto e Andreatini, 2007). O protocolo do ECI descrito consiste em uma modificação do utilizado por Lu *et al.* (2006). Os animais são submetidos a diversos agentes estressores (Tabela 2), diariamente e em diferentes horários, por 14 dias e 24 h após a exposição ao último agente estressor são avaliados em testes comportamentais.

**Tabela 2. Agentes estressores utilizados no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI**

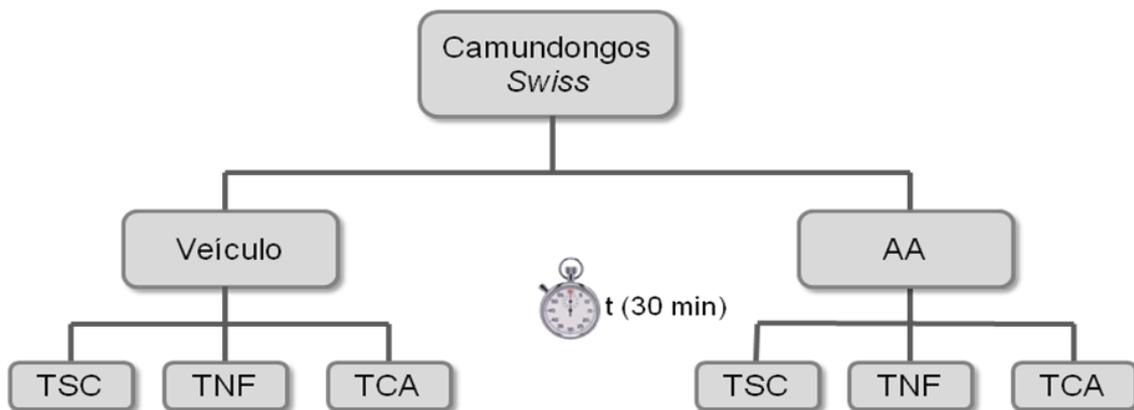
<b>Dia</b>	<b>Agente</b>	<b>Horário</b>
<b>1</b>	Confinamento (1,5h)	14h
<b>2</b>	Banho frio (15°C – 10min)	9:30h
<b>3</b>	Maravalha molhada / Caixa inclinada 45° (24h)	10:30h
<b>4</b>	Confinamento frio (8°C – 7 min)	18:30
<b>5</b>	Prendedor na cauda (10 min)	12:30
<b>6</b>	Teste do nado forçado (6 min)	14:00
<b>7</b>	Confinamento (1,5h)	9:30h
<b>8</b>	Choque (0,7 mA – 1s/30s por 3 min)	8:30h
<b>9</b>	Banho frio (15°C – 10min)	16:30
<b>10</b>	Maravalha molhada / Caixa inclinada 45° (24h)	12:30
<b>11</b>	Choque (0,7 mA – 1s/30s por 3 min)	18:30
<b>12</b>	Confinamento frio (8°C – 10 min)	14:30
<b>13</b>	Prendedor na cauda (30 min)	09:00
<b>14</b>	Choque (0,7 mA – 1s/30s por 3 min)	15:00

### 4.3. Análise da ação antidepressiva do ácido ascórbico (AA)

#### 4.3.1. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via intraperitoneal no TSC, TNF e TCA

##### 4.3.1.1. Curva dose-resposta de ácido ascórbico (AA)

Na primeira etapa de experimentos, com a finalidade de investigar o efeito do AA no TNF, no TSC e no TCA, os animais receberam injeções por via i.p. de salina (grupo controle, veículo) ou de AA 0,1-100 mg/kg quando no TNF, ou 0,01-100 mg/kg, quando no TSC, ou 0,1-100 mg/kg quando no TCA. Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF, TSC ou TCA (Mantovani *et al.*, 2003).



**Figura 9. Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via i.p.** As doses de AA utilizadas foram 0,1-100 mg/kg quando no TNF, ou 0,01-100 mg/kg, quando no TSC, ou 0,1-100 mg/kg quando no TCA. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização dos testes comportamentais após as administrações; TCA, teste do campo aberto; TNF, teste do nado forçado; TSC, teste da suspensão da cauda.

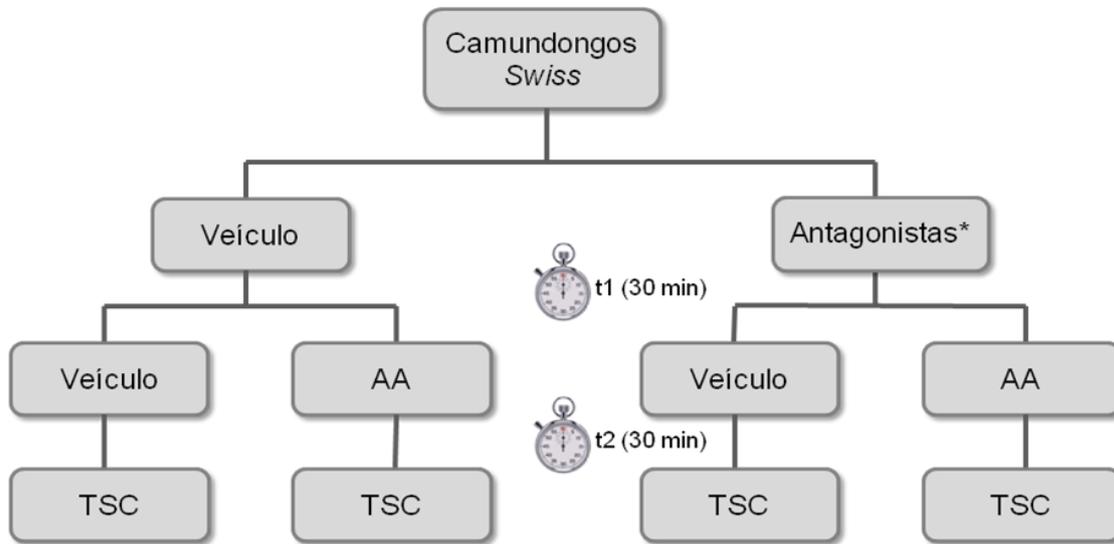
#### **4.3.1.2. Investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC**

A fim de investigar a participação dos receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo do AA, os camundongos foram pré-tratados com veículo, NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> com atividade  $\alpha_1$ -adrenérgica), cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista preferencial de receptores 5-HT<sub>2A</sub>) ou MDL 72222 (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>). Após 30 minutos foram tratados com veículo ou dose ativa de AA (0,1 mg/kg, i.p.) e 30 minutos depois foram submetidos ao TSC, conforme descrito anteriormente (Zomkowski *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2007).

Para investigar o envolvimento do sistema noradrenérgico na ação antidepressiva do AA, os camundongos foram pré-tratados via i.p. com veículo, prazosina (62,5  $\mu$ g/kg, antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), ioimbina (1 mg/kg, antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) ou propranolol (2 mg/kg, antagonista  $\beta$ -adrenérgico) e 30 minutos depois, foram administrados com AA (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo. Após 30 minutos, os camundongos foram submetidos ao TSC. O protocolo experimental e as doses dos antagonistas foram escolhidas de acordo com estudos prévios (Rodrigues *et al.*, 2002; Zomkowski *et al.*, 2002, 2004).

A fim de investigar o envolvimento do sistema dopaminérgico na ação antidepressiva do AA, os camundongos foram pré-tratados via i.p. com veículo, haloperidol (0,2 mg/kg, antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos), sulpirida (50 mg/kg, antagonista de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos) ou via subcutânea (s.c.) com SCH 23390 (0,05 mg/kg, antagonista de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos). Trinta minutos depois, os animais foram tratados com veículo ou AA (0,1 mg/kg, i.p.).

Decorridos 30 minutos, os camundongos foram submetidos ao TSC (Rodrigues *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2007).

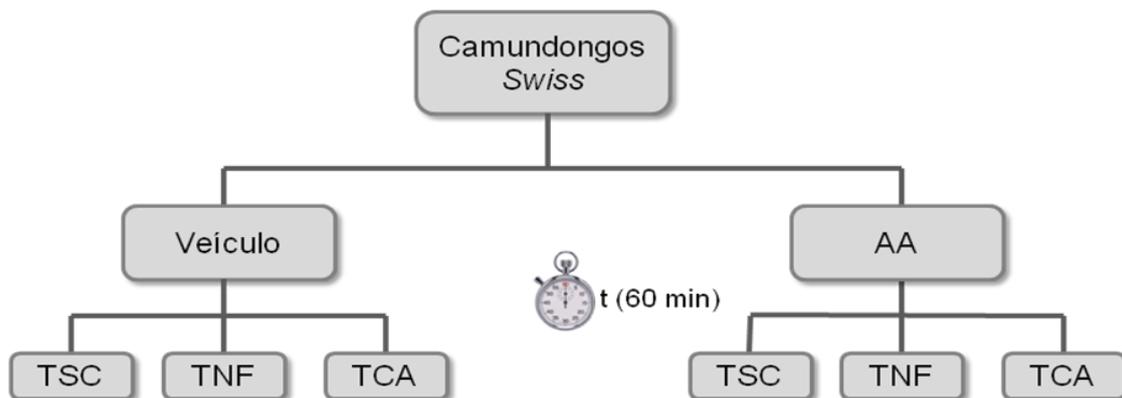


**Figura 10. Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no efeito do AA no TSC.** As administrações foram realizadas por via i.p, exceto o pré-tratamento com o antagonista SCH23390, que foi administrado por via subcutânea (s.c.). Os antagonistas foram administrados sempre em doses sub-ativas e o AA em dose ativa (0,1 mg/kg). \* Antagonistas = NAN-190 (0,5 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> com atividade  $\alpha_1$ -adrenérgica), cetanserina (5 mg/kg, antagonista preferencial de receptores 5-HT<sub>2A</sub>), MDL 72222 (0,1 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>), prazosina (62,5  $\mu$ g/kg, antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), ioimbina (1 mg/kg, antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos), propranolol (2 mg/kg, antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos), haloperidol (0,2 mg/kg, antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos), sulpirida (50 mg/kg, antagonista de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos) e SCH 23390 (0,05 mg/kg, antagonista de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos). Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t1, tempo em minutos após o pré-tratamento dos animais; t2, tempo em minutos para a realização do TSC após o tratamento dos animais; TSC, teste da suspensão da cauda.

#### 4.3.2. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral ou por via intracerebroventricular no TSC, TNF e TCA

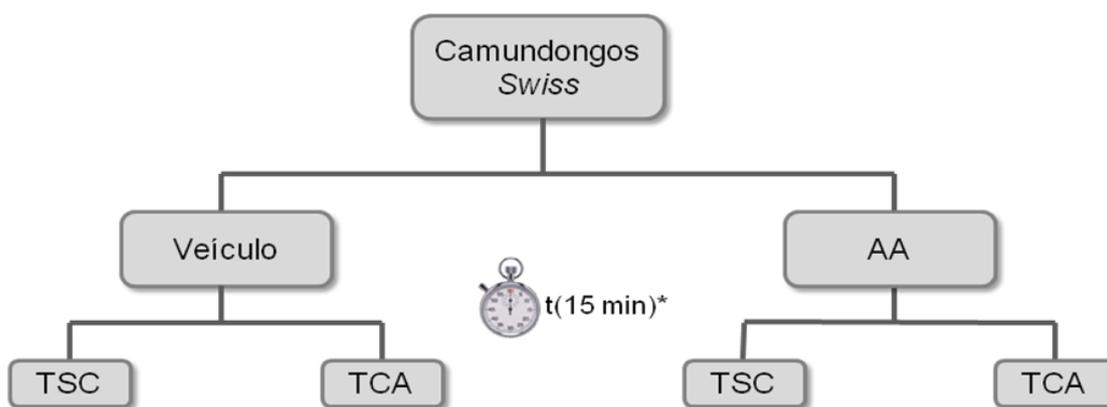
##### 4.3.2.1. Curvas dose-resposta do ácido ascórbico (AA)

A fim de investigar o efeito do AA quando administrado por via oral no TNF e no TSC, os animais foram tratados, com água destilada (grupo controle, veículo) ou AA (0,1- 100 mg/kg) 60 minutos antes do TNF ou do TSC. Os animais também foram submetidos ao TCA (segundo-se o mesmo protocolo) a fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC fosse devido a uma estimulação da atividade locomotora (Machado *et al.*, 2007).



**Figura 11. Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via p.o no TSC, TNF e TCA.** As doses de AA utilizadas foram 0,1-100 mg/kg. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização dos testes comportamentais após as administrações; TCA, teste do campo aberto; TNF, teste do nado forçado; TSC, teste da suspensão da cauda.

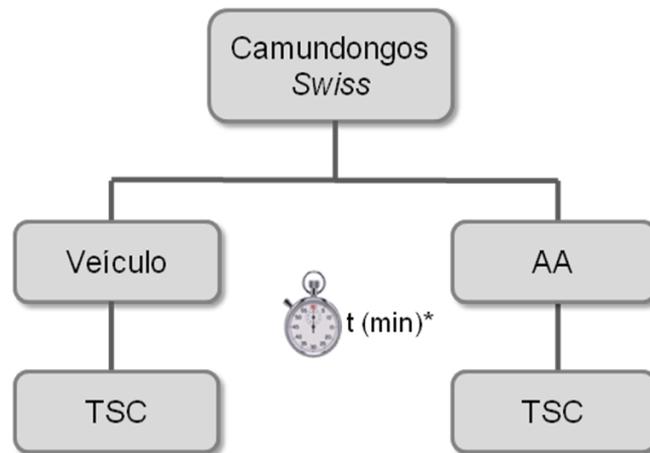
Alternativamente, a fim de investigar o efeito do AA quando administrado por via i.c.v. no TSC, os animais foram tratados com solução salina (grupo controle, veículo) ou AA (0,01- 10 nmol/camundongo) 15 minutos antes de serem submetidos ao modelo. Os animais também foram submetidos ao TCA (seguindo-se o mesmo protocolo) a fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC fosse devido a uma estimulação da atividade locomotora (Brocardo *et al.*, 2008). Para administração i.c.v. os animais foram brevemente anestesiados com éter. Uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25  $\mu$ l foi utilizada. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, com 2,4 mm de profundidade. O ventrículo lateral foi atingido através das coordenadas, 1 mm para esquerda ou direita da sutura sagital, na intersecção entre esta linha e uma linha imaginária traçada perpendicularmente, tendo como referência a base das orelhas. Todas as administrações consistiram de um volume constante de 5  $\mu$ l/camundongo (Kaster *et al.*, 2007a).



**Figura 12. Protocolo utilizado para elaboração da curva dose-resposta de AA quando administrado por via i.c.v no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.** As doses de AA utilizadas foram 0,01-100 nmol/camundongo. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização dos testes comportamentais após as administrações; TCA, teste do campo aberto; TSC, teste da suspensão da cauda.

**4.3.2.2. Curva tempo-resposta do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral**

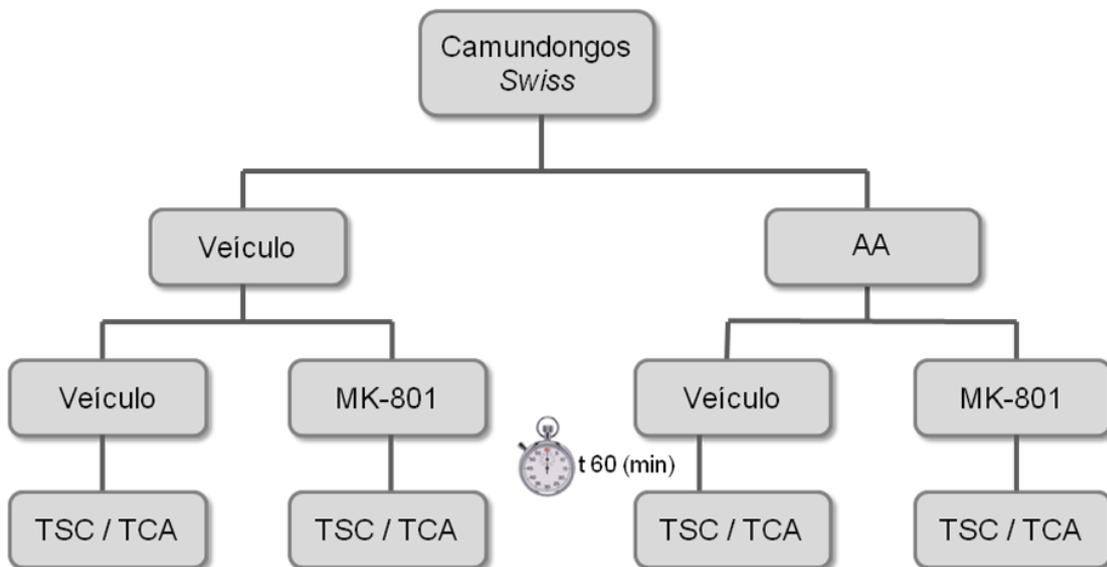
A fim de se investigar a resposta do AA a diferentes tempos de administração (elaboração da curva tempo-resposta), os animais foram tratados com água destilada (grupo controle, veículo) ou com dose ativa de AA (1 mg/kg, p.o.) 30, 60 e 120 minutos antes de submetê-los ao TSC (Posser *et al.*, 2009).



**Figura 13. Protocolo utilizado para elaboração da curva tempo-resposta de AA quando administrado por via p.o no TSC.** A dose de AA utilizada foi 1 mg/kg. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização do TSC após as administrações; TSC, teste da suspensão da cauda. \* t= diferentes tempos de administração (30, 60 e 120 min) antes da realização do TSC.

**4.3.2.3. Investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC**

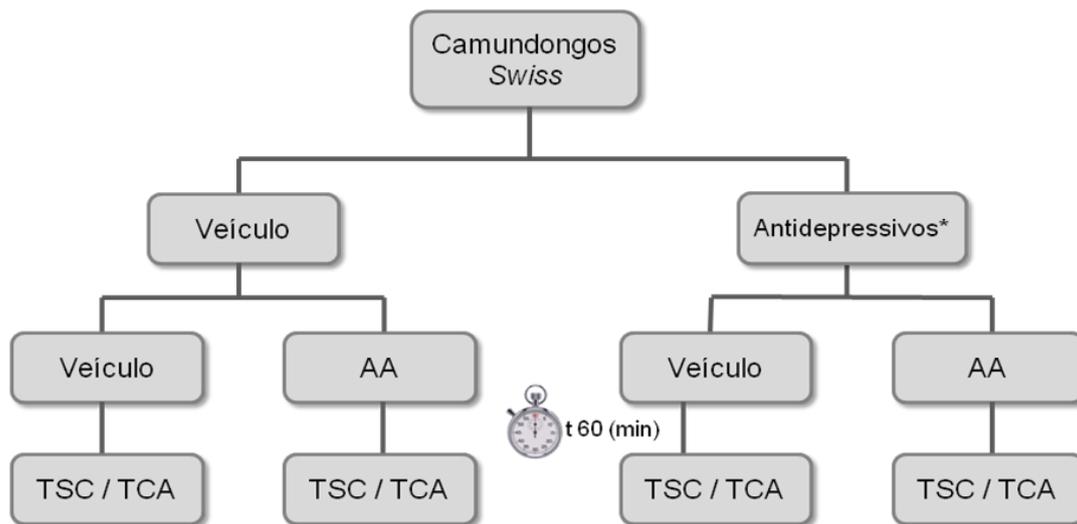
A fim de investigar o envolvimento dos receptores NMDA no efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC os animais receberam (p.o.) veículo ou dose sub-ativa (estabelecida em experimento piloto) de MK-801 (0,01 mg/kg, antagonista de receptores NMDA) e imediatamente depois receberam água destilada (veículo) ou dose sub-ativa de AA (0,1 mg/kg). Após 60 minutos foram submetidos ao TSC ou TCA (Brocardo *et al.*, 2008).



**Figura 14. Protocolo utilizado para a investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do AA no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.** Todas as administrações foram realizadas por via p.o., com doses sub-ativas de AA (0,1 mg/kg) e de MK-801 (0,01 mg/kg, antagonista de receptores NMDA). Após o pré-tratamento com AA, os animais receberam imediatamente depois o tratamento com MK-801. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização do TSC ou TCA após o tratamento dos animais; TCA, teste do campo aberto; TSC, teste da suspensão da cauda.

#### 4.3.2.4. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) com antidepressivos no TSC e TCA

Para investigar um possível efeito sinérgico entre diferentes antidepressivos e AA, os animais receberam (p.o.) veículo ou doses sub-ativas de fluoxetina (1 mg/kg, antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina), imipramina (0,1 mg/kg, antidepressivo Tricíclico) ou bupropiona (1 mg/kg, antidepressivo atípico que é um potente inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina). Imediatamente depois, os animais foram tratados com dose sub-ativa de AA (0,1 mg/kg, p.o.) ou água destilada (veículo). Decorridos 60 minutos das administrações, os animais foram submetidos ao TSC e ao TCA (Brocardo *et al.*, 2008).



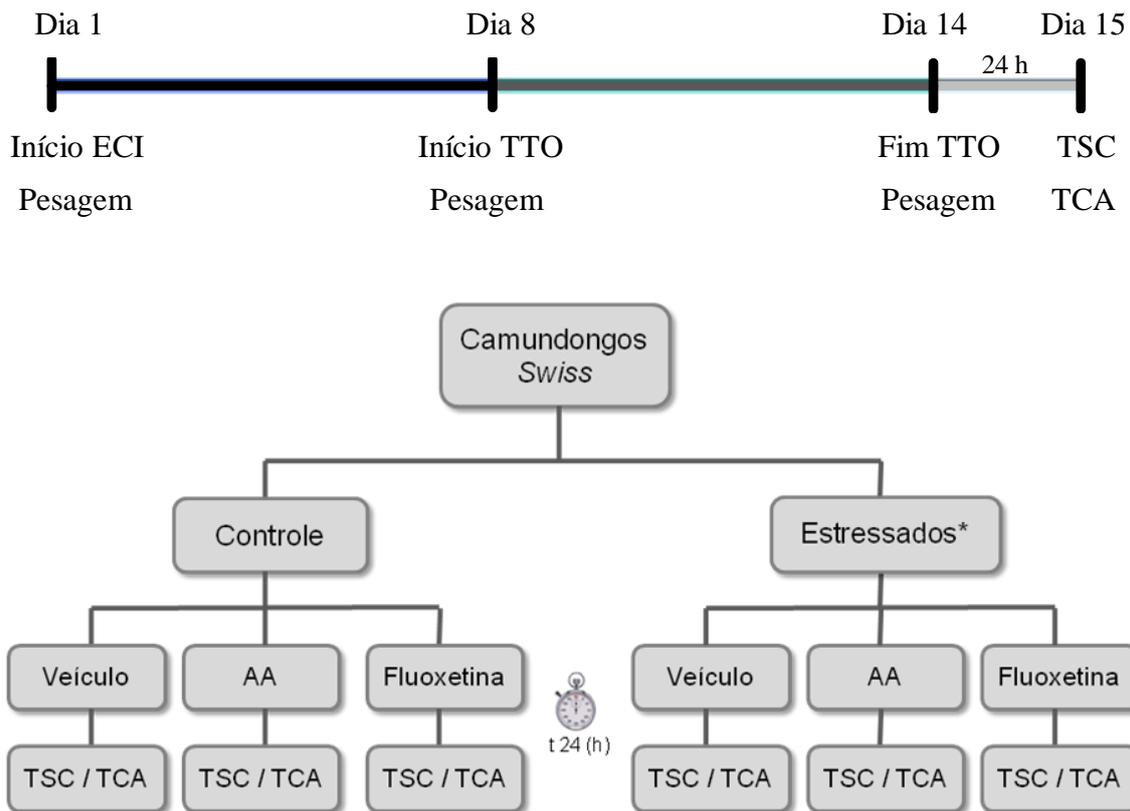
**Figura 15. Protocolo utilizado para a investigação do efeito de dose sub-ativa de AA com doses sub-ativas de antidepressivos no TSC e sobre a atividade locomotora dos animais no TCA.** Todas as administrações foram realizadas por via p.o., com doses sub-ativas de AA (0,1 mg/kg) e doses sub-ativas dos antidepressivos. \*Antidepressivos = fluoxetina (1 mg/kg, antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina), imipramina (0,1 mg/kg, antidepressivo Tricíclico) ou bupropiona (1 mg/kg, antidepressivo atípico que é um potente inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina). Após o pré-tratamento com antidepressivos, os animais receberam imediatamente depois o tratamento com AA. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização do TSC ou TCA após o tratamento dos animais; TCA, teste do campo aberto; TSC, teste da suspensão da cauda.

#### **4.3.2.5. Investigação da ação antidepressiva do ácido ascórbico (AA) no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI)**

Camundongos Swiss fêmeas, de cinquenta dias de idade no início do ECI foram utilizados. As condições experimentais foram controladas (22-25°C água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 h). Os animais foram colocados individualmente em gaiolas de residência uma semana antes do início do protocolo do ECI aclimação. O grupo controle também foi aclimatado e permaneceu em uma sala diferente dos animais dos grupos submetidos ao ECI.

O protocolo do ECI descrito consiste em uma adaptação do utilizado por Lu *et al.* (2006). Os agentes estressores foram aplicados diariamente (Tabela 2), por um período total de 14 dias. Os animais foram tratados p.o. com água destilada (veículo), AA (10 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) diariamente, a partir da segunda semana de ECI, por 7 dias consecutivos. O procedimento experimental bem como as doses utilizadas foram estabelecidos em experimentos piloto.

A fim de avaliar o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI, 24 horas após o último agente estressor os diferentes grupos animais foram submetidos ao TSC e em seguida ao TCA (para avaliação da atividade locomotora). Além disso, a fim de investigar o efeito do ECI no peso corporal dos animais, todos os grupos foram pesados antes e depois do protocolo experimental.



**Figura 16. Protocolo utilizado para a investigação da ação antidepressiva do AA no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI).** Os animais foram expostos ao protocolo de ECI por 14 dias e tratados com AA, fluoxetina ou veículo a partir do oitavo dia de protocolo. No décimo quinto dia (um dia após o último agente estressor e último tratamento) foram submetidos ao TSC e ao TCA. Os animais também foram pesados no início, meio e final do protocolo. O tratamento utilizado consistiu de dose ativa de AA (10 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.). Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado. AA, ácido ascórbico; t, tempo em minutos para a realização do TSC ou TCA após a exposição ao último agente estressor e tratamento dos animais; TCA, teste do campo aberto; TSC, teste da suspensão da cauda.

#### 4.4. Análise estatística

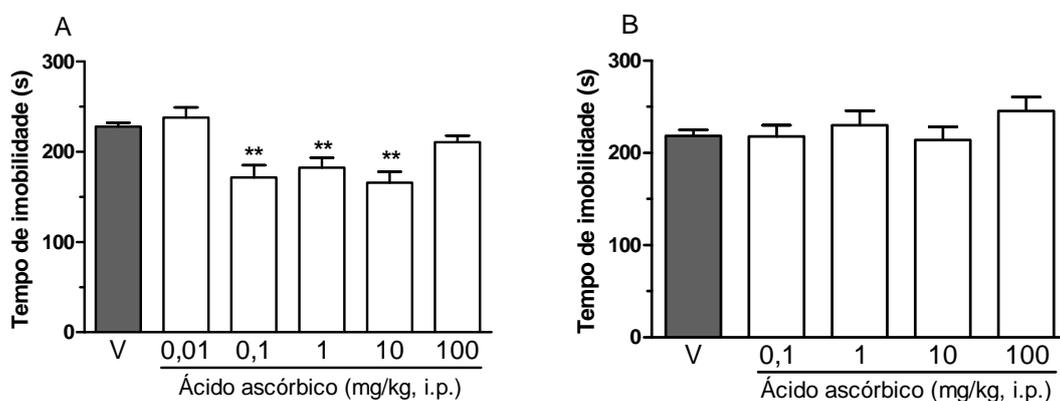
Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma (curvas dose e tempo-resposta de AA) ou de duas vias (nos demais experimentos), seguida do teste de Newman Keuls, quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via intraperitoneal no TSC, TNF e TCA

#### 5.1.1. Curva dose-resposta de ácido ascórbico (AA)

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram o efeito do tratamento dos animais com AA por via i.p. no (A) TSC (0,01- 100 mg/kg) ou (B) TNF (0,1- 100 mg/kg). Houve uma redução do tempo de imobilidade nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg somente nos animais submetidos ao TSC.

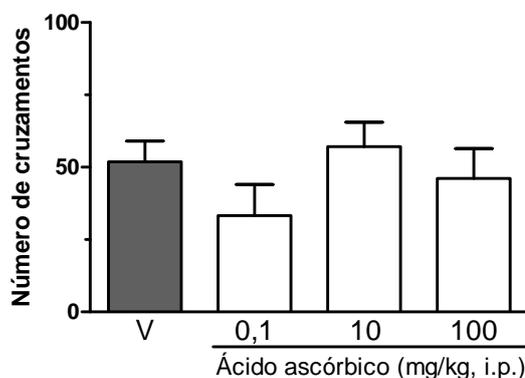


**Figura 17. Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico (AA) por via i.p. no TSC (A) e no TNF (B).** Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M.(n= 6-11), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o grupo controle (V).

(A) tratamento [ $F(5,40) = 9,48, P < 0,01$ ].

(B) tratamento [ $F(4,35) = 9,93, P = 0,45$ ].

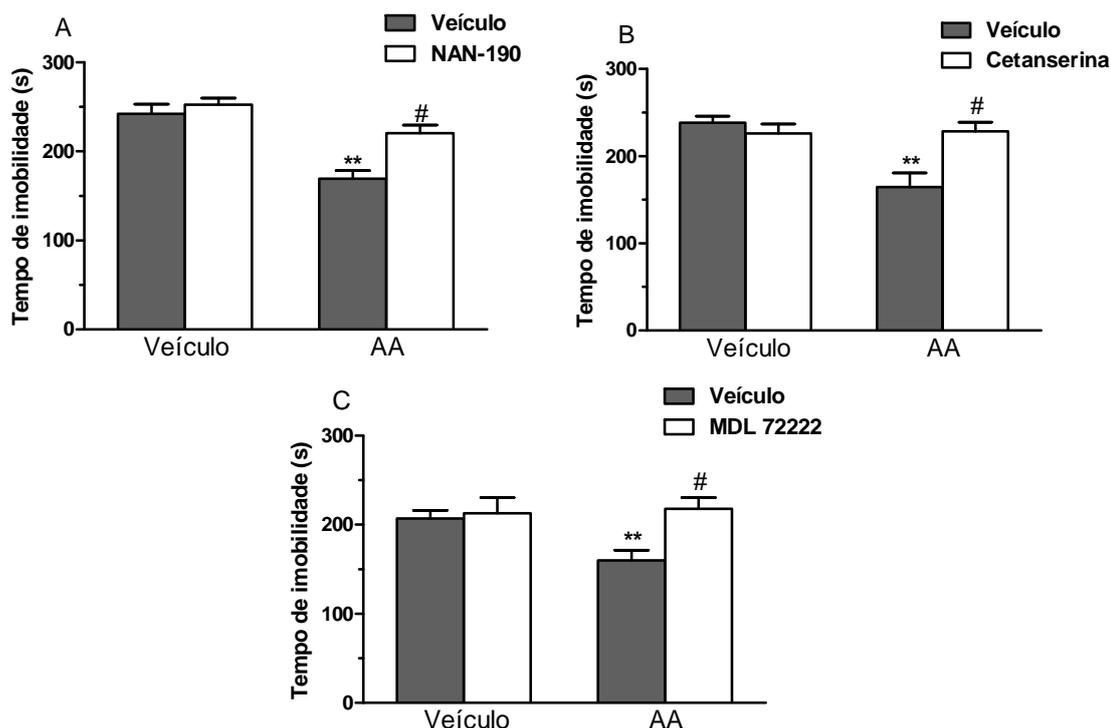
A Figura 18 mostra que nas mesmas condições experimentais, não há alteração da atividade locomotora dos animais quando tratados por via i.p nas mesmas doses ativas no TSC (0,1 e 10 mg/kg), e submetidos ao TCA.



**Figura 18. Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico (AA) por via i.p. no TCA.** Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M.(n= 8-11). [F(3,31) = 1,20, P = 0,32].

### **5.1.2. Envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC**

Os resultados apresentados na Figura 19 mostram o efeito do pré-tratamento dos animais com os antagonistas serotoninérgicos sobre o efeito do AA no TSC. O pré-tratamento dos camundongos com (A) NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), (B) cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista preferencial de receptores 5-HT<sub>2A</sub>) ou (C) MDL 72222 (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>) em doses que per se não produziram efeito no TSC preveniu significativamente a redução do tempo de imobilidade provocada pelo tratamento dos animais com uma dose ativa de AA (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC.



**Figura 19. Efeito do pré-tratamento com (A) NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), (B) cetanserina (5 mg/kg, i.p.) ou (C) MDL 72222 (0,1 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade provocada pela administração de dose ativa de ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg, i.p.) no TSC. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-9), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (veículo), #  $P < 0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.**

(A) Pré-tratamento [ $F(1,22) = 10,56, P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,22) = 30,71, P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,22) = 4,58, P < 0,05$ ].

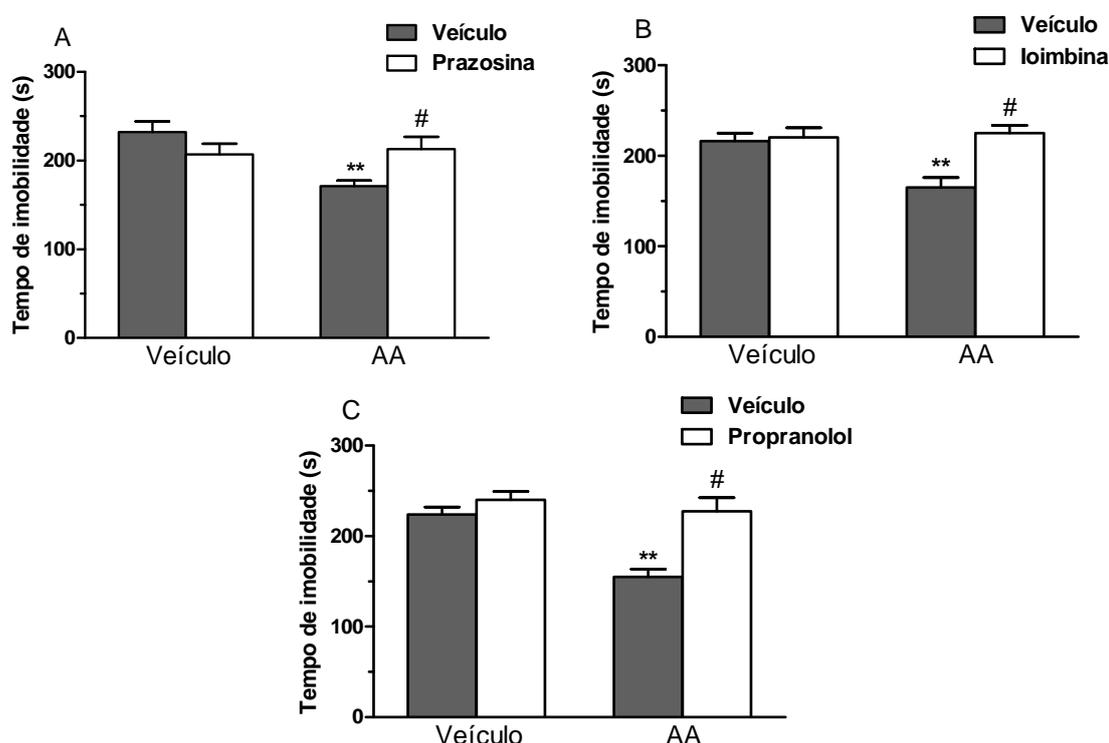
(B) Pré-tratamento [ $F(1,20) = 4,83, P < 0,05$ ], tratamento [ $F(1,20) = 9,11, P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,20) = 10,54, P < 0,01$ ].

(C) Pré-tratamento [ $F(1,28) = 6,40, P < 0,05$ ], tratamento [ $F(1,28) = 2,81, P = 0,10$ ] e interação [ $F(1,28) = 4,30, P < 0,05$ ].

### **5.1.3. Envolvimento dos receptores noradrenérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC**

Os resultados da Figura 20 mostram o efeito do pré-tratamento dos animais com antagonistas noradrenérgicos sobre o efeito do AA no TSC. O pré-tratamento com (A)

prazosina (62,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p., antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), (B) ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) ou propranolol (2 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos), em doses que *per se* não produziram efeito no TSC, foi efetivo em prevenir significativamente a redução do tempo de imobilidade provocada pelo tratamento dos animais com uma dose ativa de AA (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC.



**Figura 20.** Efeito do pré-tratamento com (A) prazosina (62,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.), (B) ioimbina (1 mg/kg, i.p.) ou (C) propranolol (2 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg, i.p.) no TSC. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. ( $n = 6-10$ ), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (veículo), #  $P < 0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

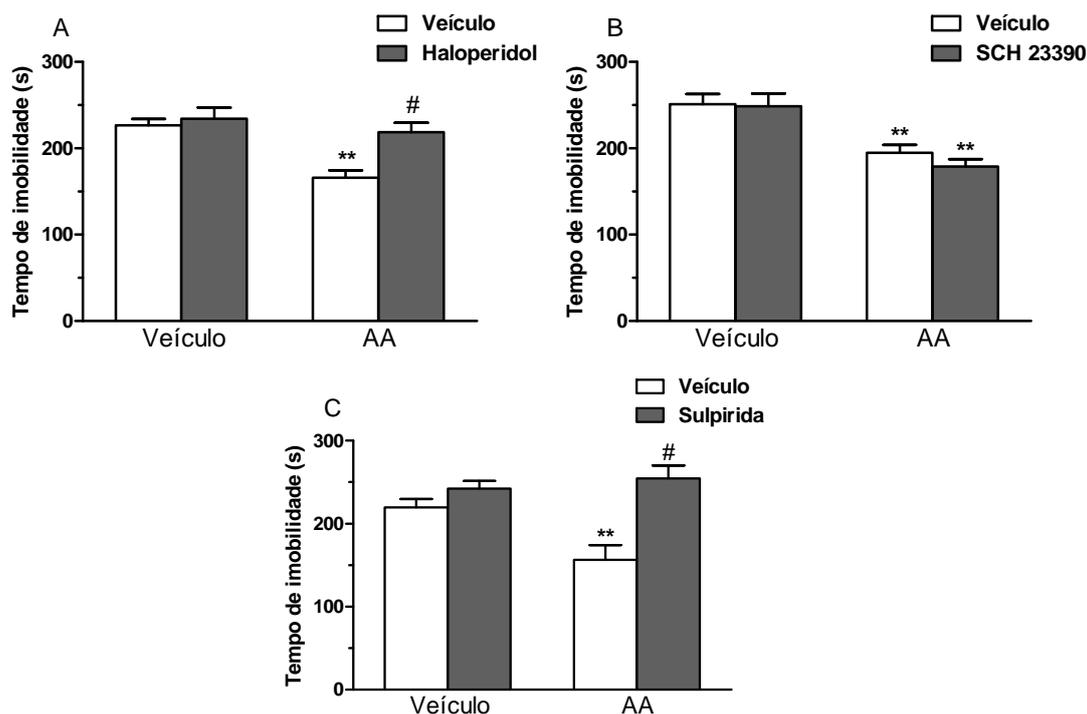
(A) Pré-tratamento [ $F(1,27) = 0,53$ ,  $P = 0,47$ ], tratamento [ $F(1,27) = 5,71$ ,  $P < 0,05$ ] e interação [ $F(1,27) = 8,39$ ,  $P < 0,01$ ].

(B) Pré-tratamento [ $F(1,31) = 10,31$ ,  $P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,31) = 5,36$ ,  $P < 0,05$ ] e interação [ $F(1,31) = 7,70$ ,  $P < 0,01$ ].

(C) Pré-tratamento [ $F(1,23) = 16,55$ ,  $P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,23) = 14,02$ ,  $P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,23) = 6,64$ ,  $P < 0,05$ ].

#### **5.1.4. Envolvimento dos receptores dopaminérgicos no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC**

Os resultados da Figura 21 mostram o efeito do pré-tratamento dos antagonistas dopaminérgicos sobre o efeito do AA no TSC. O pré-tratamento com (A) haloperidol (0,2 mg/kg, i.p., um antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) e (C) sulpirida (50 mg/kg, i.p., um antagonista de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos), em doses que *per se* não produziram efeito no TSC, foi efetivo em prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AA (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC. No entanto, o pré-tratamento com (B) SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c., antagonista de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos) não preveniu a redução do tempo de imobilidade provocada pelo tratamento dos animais com a mesma dose de AA (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC.



**Figura 21. Efeito do pré-tratamento com (A) haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.), (B) SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c.) ou (C) sulpirida (50 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pelo ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg, i.p.) no TSC.** Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-10), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (veículo), #  $P < 0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

(A) Pré-tratamento [ $F(1,26) = 8,91, P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,26) = 14,33, P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,26) = 5,06, P < 0,05$ ].

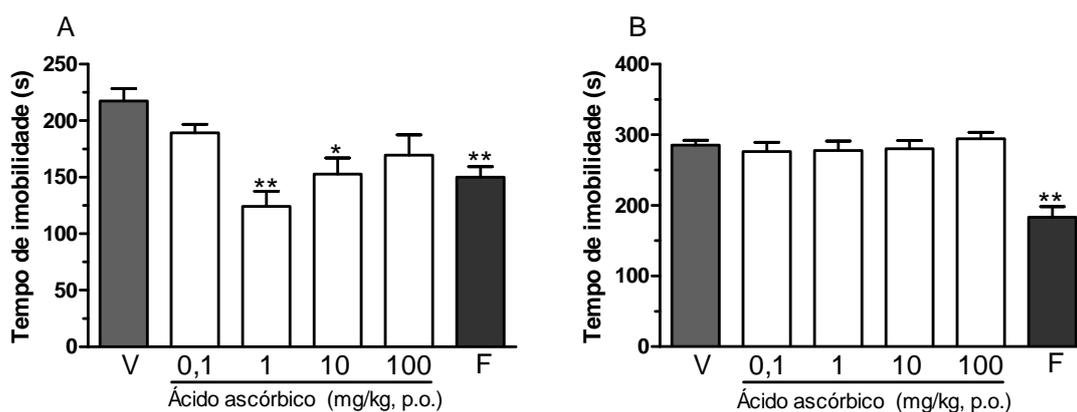
(B) Pré-tratamento [ $F(1,21) = 0,64, P = 0,43$ ], tratamento [ $F(1,21) = 31,68, P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,21) = 0,35, P = 0,55$ ].

(C) Pré-tratamento [ $F(1,21) = 18,04, P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,21) = 3,19, P = 0,08$ ] e interação [ $F(1,21) = 6,98, P < 0,05$ ].

## 5.2. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral ou por via intracerebroventricular no TSC, TNF e TCA

### 5.2.1. Curvas dose-resposta do ácido ascórbico (AA)

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram o efeito do tratamento dos animais p.o. com AA (0,1- 100 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) no (A) TSC ou com AA (0,1- 100 mg/kg) ou fluoxetina (20 mg/kg) no (B) TNF. Houve uma redução do tempo de imobilidade dos animais tratados com AA nas doses de 1 e 10 mg/kg somente nos animais submetidos ao TSC. O tratamento agudo com dose ativa de fluoxetina (10 mg/kg no TSC ou 20 mg/kg no TNF) foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC e no TNF.

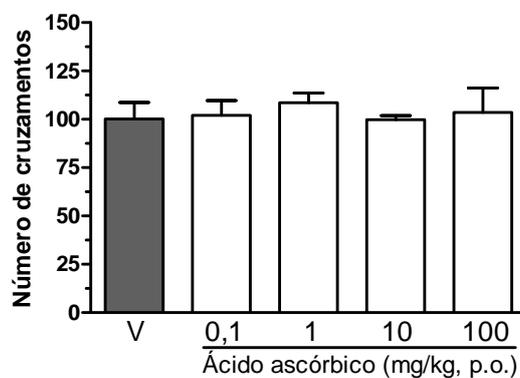


**Figura 22.** Efeito do tratamento agudo p.o. com ácido ascórbico (AA; 0,1 -100 mg/kg) ou (F) fluoxetina (10 mg/kg) no TSC (A) ou no TNF [B; (F) fluoxetina 20 mg/kg]. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M.(n= 6-10), \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o grupo controle (V).

(A) tratamento [ $F(5,40) = 7,64$ ,  $P < 0,01$ ].

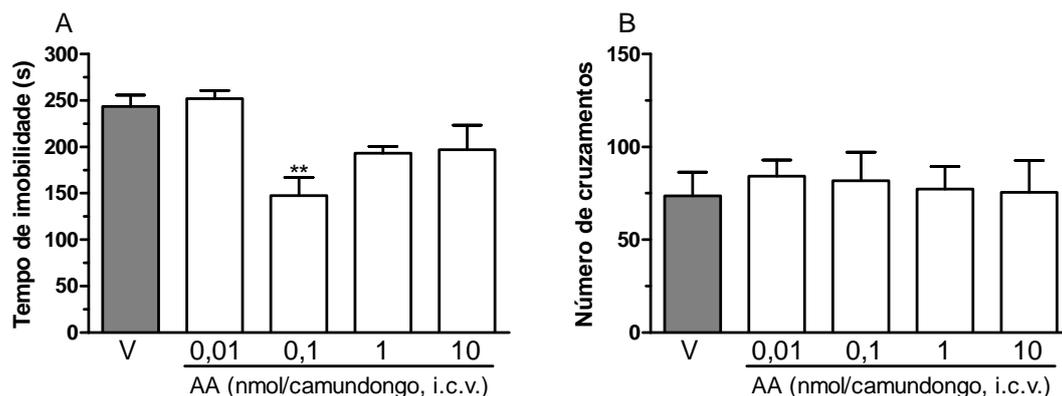
(B) tratamento [ $F(5,33) = 13,13$ ,  $P < 0,01$ ].

A Figura 23 mostra que sob as mesmas condições experimentais, não há alteração da atividade locomotora dos animais quando tratados por via p.o. com AA (0,1- 100 mg/kg ) no TCA.



**Figura 23. Efeito do tratamento agudo por via p.o. com ácido ascórbico (AA) no TCA.** Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n= 6). [ $F(4,25) = 0,19$ ,  $P = 0,94$ ].

Os resultados apresentados na Figura 24 mostram o efeito do tratamento dos animais com AA (0,01- 10 nmol/camundongo) por via i.c.v no (A) TSC ou no (B) TCA. Houve uma redução do tempo de imobilidade dos animais na dose de 0,1 nmol/camundongo no TSC e não houve alterações significativas na atividade locomotora dos animais no TCA.



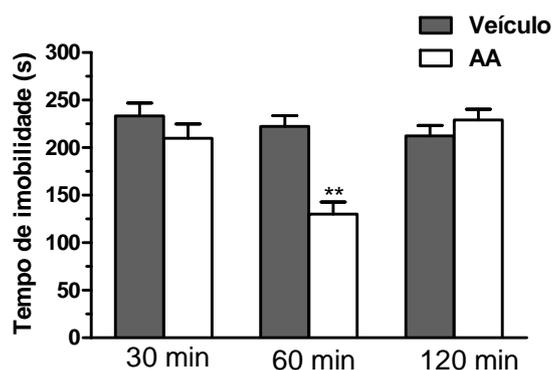
**Figura 24. Efeito do tratamento agudo com ácido ascórbico (AA; 0,01-10 nmol/camundongo) por via i.c.v. no TSC (A) e no TCA (B).** Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M.(n= 6-7), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o grupo controle (V).

(A) tratamento [ $F(4,26) = 6,85$ ,  $P < 0,01$ ].

(B) tratamento [ $F(4,25) = 0,10$ ,  $P = 0,97$ ].

### 5.2.2. Curva tempo-resposta do ácido ascórbico (AA) administrado por via oral

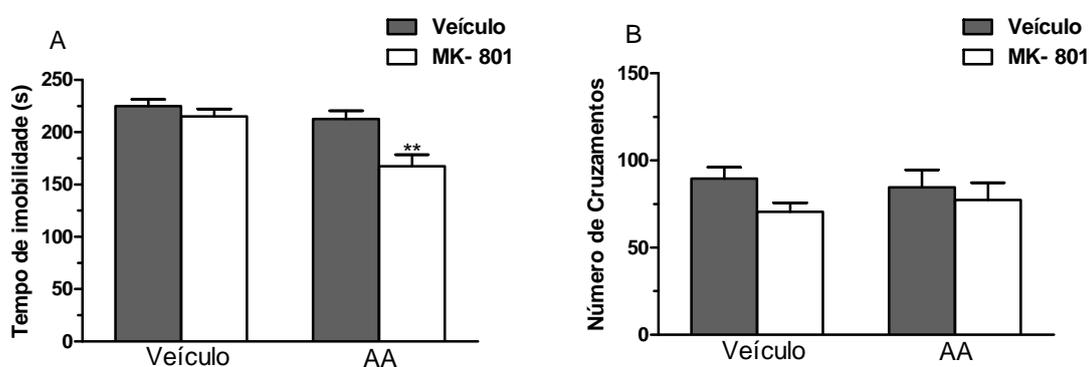
Os resultados apresentados na Figura 25 mostram o efeito do tratamento por via p.o. com dose ativa de AA (1 mg/kg) 30, 60 ou 120 minutos antes da realização do TSC (curva tempo-resposta). O tratamento com AA 60 minutos antes do TSC foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC.



**Figura 25. Efeito do tratamento agudo por via p.o. com ácido ascórbico (AA; 1 mg/kg) 30, 60 ou 120 minutos antes do TSC.** Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n= 6-7), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o grupo controle (tratado com Veículo 60 minutos antes do TSC). [ $F(5,35) = 9,28, P < 0,01$ ].

### 5.2.3. Investigação do envolvimento dos receptores NMDA no efeito do ácido ascórbico (AA) no TSC

Os resultados apresentados na Figura 26 mostram o efeito da co-administração p.o. de dose sub-ativa de AA (0,1 mg/kg) com dose sub-ativa de MK-801 (0,01 mg/kg, antagonista de receptores NMDA) no (A) TSC ou (B) TCA. Houve um efeito sinérgico advindo da co-administração de AA com MK-801 no TSC (A) sem alteração da atividade locomotora dos animais no TCA (B).



**Figura 26.** Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg) na potencialização do efeito de dose sub-ativa de MK-801 (0,01 mg/kg), no TSC (A) ou no TCA (B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-7), \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (Veículo).

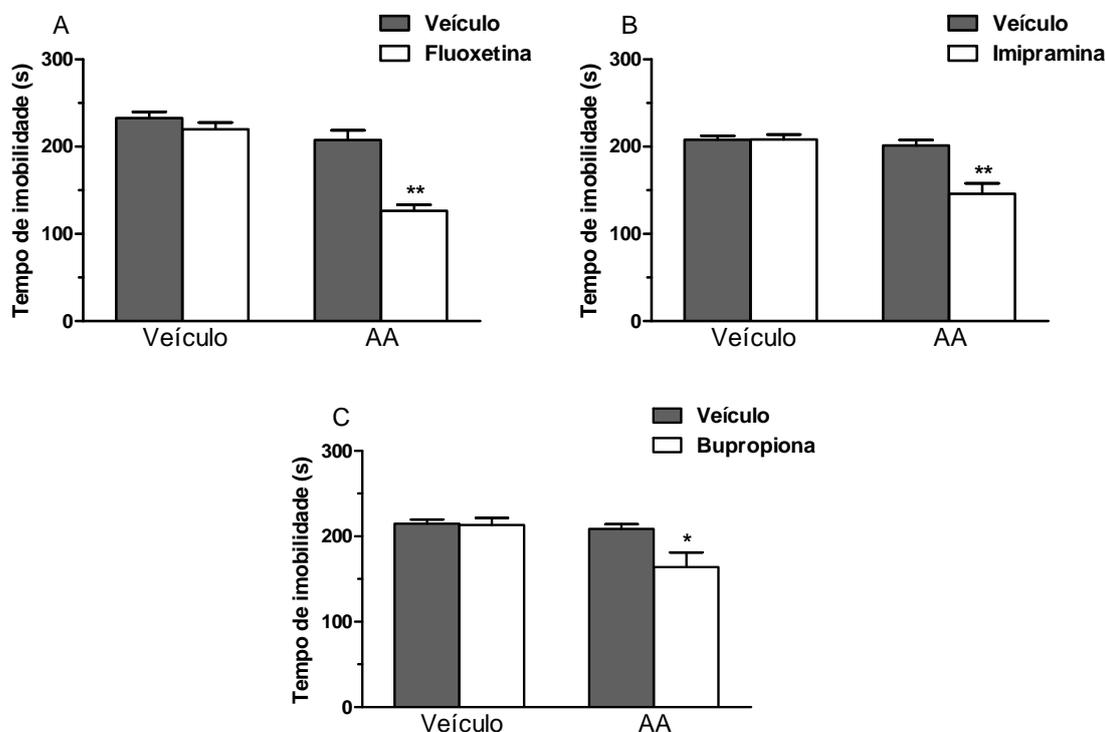
(A) Pré-tratamento [ $F(1,23) = 13,35$ ,  $P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,23) = 11,27$ ,  $P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,23) = 4,72$ ,  $P < 0,05$ ].

(B) Pré-tratamento [ $F(1,20) = 0,01$ ,  $P = 0,92$ ], tratamento [ $F(1,20) = 2,53$ ,  $P = 0,12$ ] e interação [ $F(1,20) = 0,52$ ,  $P = 0,47$ ].

### 5.2.4. Investigação do efeito do ácido ascórbico (AA) com antidepressivos no TSC e TCA

Os resultados apresentados na Figura 27 mostram o efeito da co-administração p.o. de doses sub-ativas de diferentes antidepressivos com dose sub-ativa de AA no TSC. Houve um efeito sinérgico advindo da co-administração p.o. de AA (0,1 mg/kg) com (A) fluoxetina (1 mg/kg, antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina,

ISRS), (B) imipramina (0,1 mg/kg, antidepressivo Tricíclico) ou (C) bupropiona (1 mg/kg, antidepressivo atípico que é um potente inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina).



**Figura 27.** Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg) na potencialização do efeito de doses sub-ativas dos antidepressivos (A) fluoxetina (1 mg/kg), (B) imipramina (0,1 mg/kg) ou (C) bupropiona (1 mg/kg) no TSC. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-8), \* $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (Veículo).

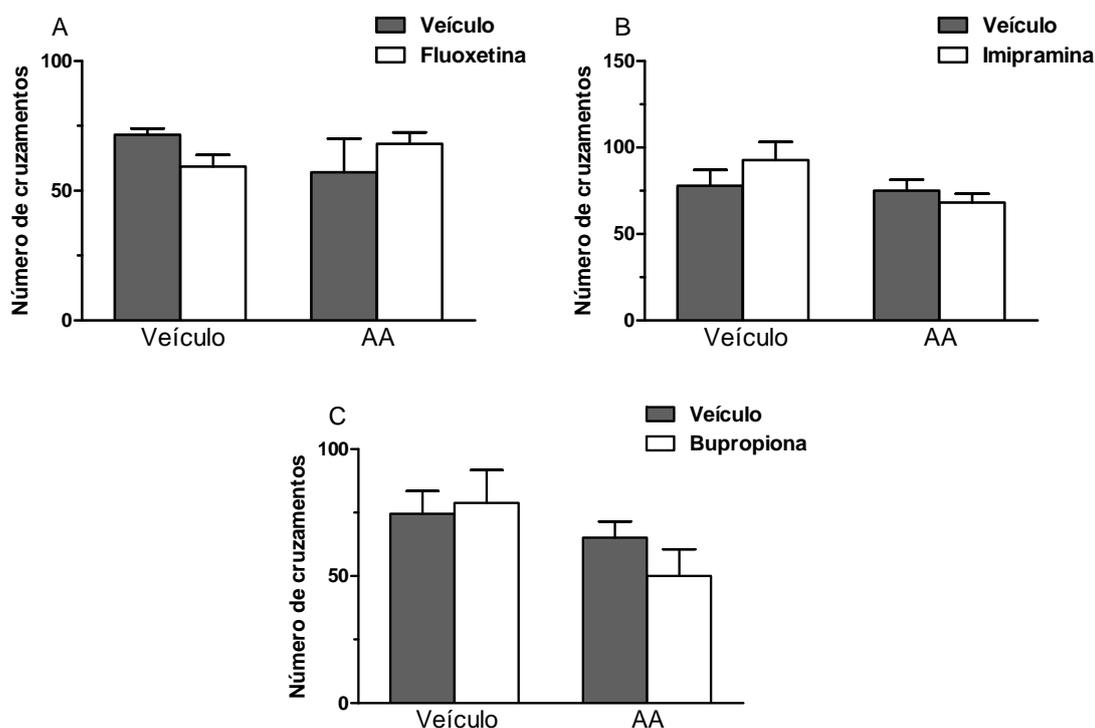
(A) Pré-tratamento [ $F(1,22) = 29,39$ ,  $P < 0,01$ ], tratamento [ $F(1,22) = 46,48$ ,  $P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,22) = 15,69$ ,  $P < 0,01$ ].

(B) Pré-tratamento [ $F(1,22) = 9,56$ ,  $P < 0,01$ ], tratamento  $F(1,22) = 15,05$ ,  $P < 0,01$ ] e interação [ $F(1,22) = 9,80$ ,  $P < 0,01$ ].

(C) Pré-tratamento [ $F(1,24) = 4,85$ ,  $P < 0,05$ ], tratamento [ $F(1,24) = 6,91$ ,  $P < 0,05$ ] e interação [ $F(1,24) = 4,26$ ,  $P < 0,05$ ].

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram que a administração por via p.o. de doses sub-ativas dos antidepressivos (A) fluoxetina (1 mg/kg, antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina, ISRS), (B) imipramina (0,1 mg/kg,

antidepressivo Tricíclico) ou (C) bupropiona (1 mg/kg, antidepressivo atípico que é um potente inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina) não altera significativamente a atividade locomotora dos animais no TCA.



**Figura 28.** Efeito da administração p.o. de dose sub-ativa de ácido ascórbico (AA; 0,1 mg/kg) e de doses sub-ativas dos antidepressivos (A) fluoxetina (1 mg/kg), (B) imipramina (0,1 mg/kg) ou (C) bupropiona (1 mg/kg) na avaliação da atividade locomotora dos animais no TCA. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6).

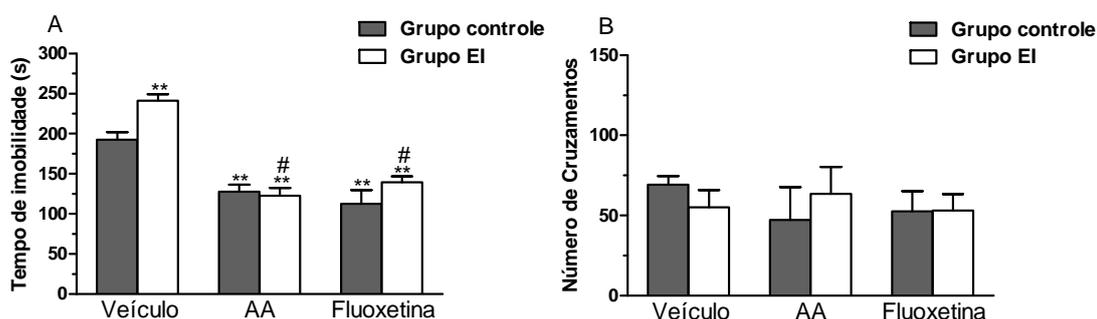
A) Pré-tratamento [ $F(1,21) = 0,01$ ,  $P = 0,93$ ], tratamento [ $F(1,21) = 0,17$ ,  $P = 0,67$ ] e interação [ $F(1,21) = 2,71$ ,  $P = 0,11$ ].

B) Pré-tratamento [ $F(1,20) = 2,81$ ,  $P = 0,10$ ], tratamento [ $F(1,20) = 0,20$ ,  $P = 0,65$ ] e interação [ $F(1,20) = 1,92$ ,  $P = 0,18$ ].

C) Pré-tratamento [ $F(1,20) = 3,64$ ,  $P = 0,07$ ], tratamento [ $F(1,20) = 0,29$ ,  $P = 0,59$ ] e interação [ $F(1,20) = 0,95$ ,  $P = 0,34$ ].

### 5.2.5. Investigação da ação antidepressiva do ácido ascórbico (AA) no modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

Os resultados ilustrados na Figura 29 mostram o efeito do tratamento por via p.o. durante 7 dias com AA (10 mg/kg) ou com fluoxetina (10 mg/kg, antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina, ISRS) em camundongos submetidos a 14 dias de ECI e testados no (A) TSC e subseqüentemente no (B) TCA. Os animais submetidos ao ECI apresentaram um aumento significativo do tempo de imobilidade no TSC em relação ao grupo controle (animais não submetidos ao ECI). O tratamento repetido com AA ou fluoxetina nas doses utilizadas foi efetivo em prevenir o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo ECI no TSC e não houve alterações significativas na atividade locomotora dos animais no TCA.



**Figura 29.** Efeito da administração por via p.o. de ácido ascórbico (AA; 10 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) por 7 dias em camundongos submetidos ao modelo do comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI) no (A) TSC ou no (B) TCA. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-9), \* $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$  quando comparado com grupo controle (tratado com Veículo), \*\*\*  $P < 0,01$  quando comparado com o grupo ECI (tratado com Veículo).

A) ECI [ $F(1,35) = 7,83, P = 0,00$ ], tratamento [ $F(2,35) = 51,87, P = 0,00$ ] e interação [ $F(2,35) = 3,55, P < 0,01$ ].

B) ECI [ $F(1,32) = 0,01, P = 0,93$ ], tratamento [ $F(2,32) = 0,23, P = 0,78$ ] e interação [ $F(2,32) = 0,63, P = 0,53$ ].

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram, ao nosso conhecimento pela primeira vez, que o AA administrado sistemicamente (por via i.p. ou p.o.) ou centralmente (i.c.v.) produz efeito tipo-antidepressivo no TSC, o qual é dependente, ao menos em parte, de uma interação com o sistema monoaminérgico e com os receptores NMDA. Além disso, o AA é capaz de potencializar a ação de antidepressivos utilizados na clínica no TSC, bem como prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI), o que corrobora com os resultados que indicam que essa vitamina possui ação antidepressiva. Apesar da falta de dados na literatura que investigam o efeito do AA em modelos animais de depressão, o efeito dessa vitamina no TSC está, de certa forma, em acordo com estudos clínicos que sugerem que o AA pode ser benéfico para o tratamento da depressão (Coochi *et al.*, 1980) e está envolvido na modulação do humor (Brody, 2002a).

O TSC e o TNF são dois modelos amplamente utilizados na pesquisa que visa identificar e caracterizar a eficácia de compostos com ação antidepressiva e são sensíveis a esses compostos após administração aguda (Cryan *et al.*, 2005). Nos dois modelos, os animais são colocados em uma situação em que não há possibilidade de escape e a ação tipo-antidepressiva é expressa pela diminuição do tempo de imobilidade dos animais (Bourin *et al.*, 2005), um efeito que é característico de antidepressivos clássicos de diferentes classes (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985). Além da ampla utilização desses modelos para identificar ação antidepressiva de novas drogas e compostos, esses também se apresentam como ferramentas importantes para o estudo dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas antidepressivas (Steru *et al.*, 1985; Bourin, 2005).

Embora o TSC e o TNF possuam validades e objetivos similares, esses apresentam diferenças em relação aos substratos biológicos responsáveis pelo comportamento apresentado em cada um dos modelos (Cryan *et al.*, 2005). A literatura propõe que TSC apresente maior sensibilidade farmacológica do que o TNF (Thierry *et al.*, 1986). Além disso, diferenças entre linhagens de animais no desempenho apresentado no TSC e TNF têm sido demonstradas e podem indicar que a circuitaria neural responsável pelo comportamento em ambos os modelos não é idêntica (Bai *et al.*, 2001; Renard *et al.*, 2003; Cryan *et al.*, 2005). Dessa forma, esses modelos podem apresentar diferentes sensibilidades aos agentes que reduzem o tempo de imobilidade dos animais como drogas ou compostos com propriedades antidepressivas. Por exemplo, Bai *et al.* (2001) demonstraram que o antidepressivo Tricíclico imipramina produziu uma curva dose-resposta em “U” no TNF, embora um efeito dose-dependente tenha sido produzido no TSC sob as mesmas doses utilizadas. Adicionalmente, tem sido postulado que o TNF não é um modelo confiável para a detecção de antidepressivos que atuam como Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), enquanto que esses antidepressivos exibem respostas mais fidedignas no TSC (Cryan *et al.*, 2005).

Neste estudo, o AA apresentou efeito tipo-antidepressivo em camundongos, no TSC, mas não no TNF. O motivo pelo qual o TNF não foi sensível ao efeito do AA é de difícil explicação e somente estudos complementares podem elucidar essa questão. No entanto, as diferenças nos substratos biológicos responsáveis pelo comportamento apresentado no TNF em comparação com o TSC podem ter sido relevantes para esse resultado. O efeito tipo-antidepressivo apresentado pelo antidepressivo convencional fluoxetina tanto no TSC quanto no TNF indica que ambos os modelos são válidos e que uma possível falha na execução do TNF deve ser descartada. Além disso, o efeito anti-imobilidade do AA no TSC não pode ser atribuído a um efeito psicoestimulante da

vitamina. Esta consideração deriva do fato de que neste estudo, quando administrado em doses que produzem efeito significativo na redução do tempo de imobilidade dos animais no TSC, o AA não altera a atividade locomotora dos animais no TCA. A administração central de AA, por via i.c.v. também foi efetiva em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC, sem causar alteração na atividade locomotora no TCA. Este resultado indica que a vitamina exerce efeito central e sugere que sua ação não é indireta e devido a atividade de possíveis moduladores periféricos que atuam no sistema nervoso central (SNC).

O efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC apresentou um padrão de curva dose-resposta em “U”. O mecanismo responsável por esse efeito permanece sem elucidação, mas alguns fatores podem ter contribuído para o estabelecimento desse resultado. Um fator potencialmente envolvido com o resultado apresentado pelo AA no TSC está relacionado com a troca de ascorbato por glutamato nos neurônios. O ascorbato é liberado dos neurônios glutamatérgicos através do transportador de glutamato, o qual troca ascorbato por glutamato (Rebec e Pierce, 1994). No entanto, a literatura sugere que intervenções que elevam os níveis de ascorbato podem potencializar a neurotransmissão glutamatérgica ao interferir com o processo de troca de ascorbato por glutamato (Rebec *et al.*, 2005). Um estudo de Sandstrom e Rebec (2007) mostrou que infusões centrais de doses relativamente altas de AA aumentam os níveis extracelulares de glutamato, enquanto que doses mais baixas não exibem esse efeito, o que sugere que a transmissão glutamatérgica pode ser modulada pelos níveis extracelulares de ascorbato. Dessa forma, as doses mais altas de AA utilizadas no presente estudo poderiam estar favorecendo o aumento da transmissão glutamatérgica e, de fato, a literatura indica que níveis elevados e/ou sustentados de glutamato estão relacionados com a fisiopatologia da depressão (Skolnick, 1999) bem como com um

fenótipo tipo-depressivo (aumento do tempo de imobilidade) no TNF (Rada *et al.*, 2003). Por outro lado, também é possível que a ausência de efeito do AA nas doses mais altas utilizadas nesse estudo seja devido a sua propriedade de atuar como um antagonista de receptores NMDA. O ascorbato atua em um sítio regulatório do receptor NMDA que altera a carga elétrica do receptor, reduzindo a sua atividade (Majewska *et al.*, 1990; Rebec e Pierce, 1994). Estudos clínicos e pré-clínicos indicam que antagonistas de receptores NMDA possuem ação antidepressiva (Skolnick, 1999). No entanto, Dhir e Kulkarni (2008) mostraram que o bem estabelecido antagonista de receptores NMDA, MK-801, produziu, de forma similar ao efeito do AA no TSC, uma curva dose-resposta em “U” no TNF. Além disso, o padrão de curva em “U” observado nesse estudo também foi evidenciado com compostos endógenos com propriedades neuromoduladoras como agmatina (Zomkowski *et al.*, 2002), putrescina (Zomkowski *et al.*, 2006) e GMP (Eckeli *et al.*, 2000), os quais produzem seus efeitos tipo-antidepressivos no TNF, pelo menos em parte, através de uma inibição dos receptores NMDA (Eckeli *et al.*, 2000; Zomkowski *et al.*, 2002, 2006). Dessa forma, compostos com propriedades antidepressivas como o AA, que exercem parte de seus efeitos através da inibição de receptores NMDA, parecem exibir um padrão de curva em “U” em modelos preditivos como o TNF e o TSC.

Considerando-se os dados da literatura apresentados, que sugerem relações paradoxais entre o AA e o sistema glutamatérgico, é possível que doses mais baixas de AA favoreçam ao efeito tipo-antidepressivo da vitamina no TSC, enquanto que doses mais altas (como a de 100 mg/kg i.p. ou p.o.) deixem de ser efetivas, por exemplo por potencializar a neurotransmissão glutamatérgica.

No presente estudo, o AA foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC somente 60 minutos após administração por via p.o. Os resultados

indicam que, de forma diferente da injeção por via i.p., o AA não é efetivo em produzir um efeito comportamental no TSC quando este é realizado 30 minutos após a administração por via p.o. da vitamina. Além disso, o AA também não exerce efeito no TSC após 120 minutos de sua administração p.o. Em um estudo em cobaias, os níveis plasmáticos de AA atingiram picos entre 60 e 90 minutos após a administração p.o. de 50 mg da vitamina e esses níveis apresentaram-se reduzidos em aproximadamente 44% após 120 minutos da ingestão de AA (Vinson e Bose, 1983). Em um estudo realizado em ratos a injeção endovenosa de AA radiomarcado produziu os picos de captação renal da vitamina 60 minutos após a sua administração, enquanto que em 120 minutos esses níveis mostraram-se significativamente reduzidos (Yigit *et al.*, 2006). Em humanos, evidências sugerem que após administrações de AA que elevam os níveis de ascorbato plasmático, a vitamina possui meia vida de aproximadamente 30 minutos (Duconge *et al.*, 2008). Deve ser considerado, no entanto, que o metabolismo e farmacocinética do AA está intimamente relacionado com a dose da vitamina (Levine *et al.*, 1996; Padayatty *et al.*, 2004), com a espécie (Hornig, 1975), bem como com a via de administração utilizada em cada investigação (Padayatty *et al.*, 2004), o que pode contribuir para a geração de resultados de difícil compreensão. No presente estudo, a ausência de efeito do AA no TSC após 120 minutos de sua administração pode ser decorrente da metabolização do ascorbato em produtos que não contribuem para o efeito tipo-antidepressivo da vitamina, independente da existência de processos que regenerem o ascorbato a partir de seus metabólitos oxidados (Rumsey e Levine, 1998; Padayatty *et al.*, 2003).

As monoaminas serotonina, noradrenalina e/ou dopamina estão envolvidas na etiologia de transtornos mentais, bem como da depressão maior (Elhwuegi, 2004). De fato, o transtorno depressivo foi primeiramente reconhecido como um fenômeno

bioquímico na década de 1960 (Schildkraut, 1965). Desde então, a hipótese monoaminérgica da depressão tornou-se bem aceita e os mecanismos de ação dos antidepressivos convencionais baseiam-se em aumentar a biodisponibilidade de monoaminas no cérebro (Blier, 2001; Brunello *et al.*, 2002). Além disso, a neurotransmissão monoaminérgica está envolvida na expressão de efeitos tipo-antidepressivos em modelos animais preditivos de ação antidepressiva (Joca *et al.*, 2000; Elhwuegi, 2004; Yamada *et al.*, 2004).

Um grande número de evidências indica que o sistema serotoninérgico está intimamente implicado na patogênese da depressão e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Duman *et al.*, 1997; Wong e Licinio, 2001). A maioria dos antidepressivos prescritos diretamente afeta o *turnover* de serotonina no cérebro (Kreiss e Lucki, 1995), inibem a recaptação de serotonina e também interagem com os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (Cryan *et al.*, 2005).

Várias evidências sugerem que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão envolvidos no mecanismo de ação de antidepressivos (Blier *et al.*, 2003), incluindo tricíclicos, ISRS e iMAO (Hensler, 2002). Em um estudo pré-clínico, foi mostrado que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo NAN-190 preveniu o efeito tipo-antidepressivo de agonistas serotoninérgicos (8-OH-DPAT e buspirona) e do antidepressivo tricíclico desipramina no TNF em ratos (Detke *et al.*, 1995). Estudos propõem que o NAN-190 é um antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos (Glennon *et al.*, 1988; Przegalinski *et al.*, 1990) e um agonista parcial de receptores pré-sinápticos (Hjorth e Sharp, 1990; Gruel *et al.*, 1992). Os resultados do presente estudo mostram que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do AA, uma vez que o NAN-190 foi efetivo em prevenir o efeito anti-imobilidade da vitamina no TSC. No entanto, vale ressaltar que o NAN-190 também possui afinidade por receptores  $\alpha_1$ - adrenérgicos,

onde atua bloqueando esses receptores (Claustre *et al.*, 1991). Dessa forma, é possível que o bloqueio do efeito do AA no TSC pelo NAN-190 seja devido a uma interação com o sistema noradrenérgico através dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mas somente experimentos complementares como com antagonistas 5-HT<sub>1A</sub> mais seletivos podem elucidar essa questão.

O efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC foi também prevenido pelo pré-tratamento dos animais com cetanserina, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>. Os receptores 5-HT<sub>2</sub> estão amplamente distribuídos ao longo do encéfalo em regiões como o córtex pré-frontal e o hipocampo, regiões intimamente relacionadas com a etiologia da depressão (Krishnan *et al.*, 1991; Ishihara and Sasa, 2001; Nestler *et al.*, 2002a) e, de fato, sugere-se que a ativação desses receptores pode estar implicada na regulação de transtornos de humor (Hoyer *et al.*, 1986; Celada *et al.*, 2004). Um papel para os receptores 5-HT<sub>2</sub> na modulação do efeito de antidepressivos, particularmente para os subtipos 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, foi sugerido em estudos que mostraram que a administração de antidepressivos causa a *down-regulation* desses receptores (Deakin, 1988). Alguns estudos também indicam que o antagonismo de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> está envolvido nas respostas tipo-antidepressivas de fármacos antidepressivos no TNF (Redrobe e Bourin, 1997; Elhwuegi, 2004). Por outro lado, foi demonstrado que o agonista preferencial de receptores 5-HT<sub>2A</sub> DOI potencializa o efeito tipo-antidepressivo de alguns compostos (Khisti e Chopde, 2000; Zomkowski *et al.*, 2004). De fato, a literatura demonstra que a administração de DOI possui ação tipo-antidepressiva tanto em ratos como em camundongos e aumenta a liberação de serotonina na região do córtex pré-frontal medial, uma região envolvida na fisiopatologia da depressão (Artigas, 2002). Além disso, um estudo mostrou que o agonista de receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Ro 60-0175) foi efetivo em potencializar doses sub-ativas de antidepressivos Tricíclicos e antidepressivos

Inibidores da Recaptação de Serotonina (ISRS) no TNF (Clenet *et al.*, 2001), o que sugere que a ativação desses receptores está envolvida na resposta de antidepressivos. Neste estudo, o bloqueio de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> através da administração do antagonista cetanserina foi efetivo em prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AA, o que indica que o efeito da vitamina é dependente de uma interação com esses receptores.

Apesar do bem estudado envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica na depressão e no efeito de antidepressivos, existem poucas evidências sobre a participação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na fisiopatologia da doença. Esses receptores localizam-se pós-sinápticamente na área postrema e no córtex (Redrobe e Bourin, 1997) e diferentemente de outros subtipos de receptores serotoninérgicos, são receptores acoplados a canais iônicos (Thompson e Lummis, 2007). O envolvimento dos receptores 5-HT<sub>3</sub> no mecanismo de ação de antidepressivos foi indicado pelo fato de que diferentes classes de antidepressivos atuam como antagonistas desses receptores, o que sugere que a inibição dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pode contribuir para a ação de fármacos antidepressivos (Eisensamer *et al.*, 2003). Por outro lado, a literatura indica que os receptores 5-HT<sub>3</sub> participam na modulação da liberação de dopamina e sugere-se que drogas ou intervenções que aumentem a liberação de dopamina mediada pelos receptores 5-HT<sub>3</sub> em áreas límbicas podem proporcionar uma ação mais rápida de antidepressivos na clínica (Dremencov *et al.*, 2006). Além disso, existem evidências de que a terapia eletroconvulsiva, clinicamente utilizada para o tratamento de depressão refratária, foi efetiva em potencializar a função dos receptores 5-HT<sub>3</sub> no hipocampo, uma região intimamente relacionada com a etiologia da depressão (Krishnan *et al.*, 1991; Ishihara e Sasa, 2001). No presente estudo, nossos resultados são mais consistentes com esta última hipótese, uma vez que o efeito do AA no TSC foi prevenido pelo pré-tratamento dos

animais com o antagonista seletivo de receptores 5-HT<sub>3</sub> MDL 72222, o que sugere que o efeito da vitamina possa ser dependente da ativação desses receptores.

O sistema noradrenérgico está classicamente implicado na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de antidepressivos (Frazer, 2000; Nutt, 2006). Compostos ou drogas que afetam a neurotransmissão noradrenérgica, como Inibidores da Recaptação de Noradrenalina (ISRN) ou os inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO, que inibem a inativação de monoaminas incluindo a noradrenalina), são utilizados para tratar depressão (Páez-Pereda, 2005). Em alguns estudos pré-clínicos, foi demonstrado que os receptores  $\alpha_1$ - e  $\alpha_2$  adrenérgicos estão envolvidos na respostas tipo-antidepressivas de drogas ou compostos em modelos animais de depressão (Kitada *et al.*, 1983; Danysz *et al.*, 1986; Masuda *et al.*, 2001). Um estudo mostrou que a ação tipo-antidepressiva de desipramina (um antidepressivo tricíclico com maior afinidade pela recaptação de noradrenalina) foi prevenida pelo pré-tratamento dos camundongos com o antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos prazosina (Danysz *et al.*, 1986). Além disso, O'Neill *et al.* (2001) demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo da clonidina (um agonista seletivo de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) no TNF foi revertido pelo pré-tratamento do antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ioimbina. Adicionalmente, foi demonstrado que a lamotrigina, um fármaco anticonvulsivante com propriedades antidepressivas, exerce efeito tipo-antidepressivo no TNF, o qual é dependente da ativação dos receptores  $\alpha_1$ - e  $\alpha_2$  - adrenérgicos e é bloqueado pelo pré-tratamento com prazosina ou ioimbina (Kaster *et al.*, 2007b). Estudos indicam que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos também estão envolvidos na ação de antidepressivos (Harkin *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007). Foi demonstrado que o número e função de receptores  $\beta$ -adrenérgicos apresentaram-se consistentemente reduzidos após a administração repetida (por 14 dias) de desipramina ou terapia eletroconvulsiva (Heal *et al.*, 1987, 1989) ou

após o tratamento com o antidepressivo reboxetina (Inibidor Seletivo da Recaptação de Noradrenalina, ISRN) (Harkin *et al.*, 2000). Além disso, a incubação de neurônios hipocâmpais com propranolol (um antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) previne o aumento da expressão da proteína de BDNF induzida por noradrenalina (Chen *et al.*, 2007), o que sugere que esses receptores estão envolvidos na expressão dessa neurotrofina que apresenta-se aumentada após a administração de antidepressivos (Nestler *et al.*, 2002a). Neste estudo, o efeito tipo-antidepressivo produzido pelo tratamento agudo com AA foi inibido pelo pré-tratamento dos animais com prazosina, ioimbina ou propranolol, o que sugere que os receptores  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - e  $\beta$ -adrenérgicos estão envolvidos, pelo menos em parte, com a ação do AA no TSC.

Em paralelo com os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, o sistema dopaminérgico está implicado na regulação do humor (D'Aquila *et al.*, 2000; Willner *et al.*, 2005). Adicionalmente, existem inúmeras evidências que indicam que antidepressivos com efeitos no sistema dopaminérgico são eficazes para o tratamento da depressão (Papakostas, 2006). Os resultados do presente estudo mostram que o sistema dopaminérgico está envolvido, através dos receptores  $D_2$  dopaminérgicos, na ação tipo-antidepressiva do AA no TSC, uma vez que o pré-tratamento dos animais com haloperidol (um antagonista não seletivo de receptores dopaminérgicos) ou sulpirida (um antagonista seletivo de receptores  $D_2$  dopaminérgicos) preveniu o efeito tipo-antidepressivo provocado pelo AA no TSC. O envolvimento dos receptores  $D_2$  dopaminérgicos na fisiopatologia da depressão foi sugerido a partir de estudos clínicos que mostraram que agonistas desses receptores são efetivos para tratar pacientes com depressão (Waehrens e Gerlach, 1981). Além disso, dados pré-clínicos indicam que os receptores  $D_2$  dopaminérgicos estão envolvidos na ação tipo-antidepressiva de antidepressivos no TNF em camundongos (Borsini *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 2004) e

do extrato da planta *Schinus molle* no TSC (Machado *et al.*, 2007). Adicionalmente, a terapia eletroconvulsiva, que é efetiva em causar uma redução do tempo de imobilidade dos animais no TSC (efeito tipo-antidepressivo), tem sua ação inibida pela administração de sulpirida, indicando que os receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos também estão implicados na resposta antidepressiva da terapia eletroconvulsiva (Teste *et al.*, 1990). Neste estudo, o pré-tratamento dos camundongos com o antagonista de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos SCH23390 não foi efetivo em prevenir o efeito anti-imobilidade provocado pela administração de uma dose ativa de AA, o que sugere que este subtipo de receptores não está implicado no efeito tipo-antidepressivo da vitamina no TSC. O papel dos receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos no mecanismo de ação de antidepressivos é controverso. Alguns estudos mostraram que o antagonismo desses receptores é efetivo em prevenir o efeito de alguns agentes com ação antidepressiva no TNF e no TSC (Yamada *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007). Por outro lado, existem evidências que sugerem que a ativação de receptores D<sub>1</sub> dopaminérgicos não está envolvida com o mecanismo de ação de antidepressivos (Borsini *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 2008).

A interação do AA com o sistema dopaminérgico tem sido investigada, mas ainda apresenta-se complexa. Estudos mostram que a ação da vitamina depende da dose utilizada, uma vez que a administração de AA (50-200 mg/kg) em ratos potencializa efeitos comportamentais mediados pela ação de dopamina (Wambebe e Sokomba, 1986; Rebec e Pierce, 1994). No entanto, doses mais altas de AA (500 mg/kg ou superiores) parecem prevenir os efeitos dos comportamentos mediados pela ação desta monoamina (Rebec e Pierce, 1994). Deve ser ressaltado que no presente estudo, as doses efetivas de AA no TSC são consideravelmente baixas (0,1-10 mg/kg, i.p e 1-10 mg/kg, p.o.) e

ossos resultados sugerem que a ativação de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos está envolvida no efeito tipo-antidepressivo da vitamina.

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, sendo encontrado em 80% dos neurônios (Kornhuber e Weller, 1997) onde participa na regulação da plasticidade sináptica, desenvolvimento neuronal e está envolvido em processos de aprendizagem, principalmente através da ativação dos receptores NMDA (Dingledine *et al.*, 1999; Petrie, 2000). No entanto, a ativação excessiva desses receptores tem sido associada à processos neurotóxicos presentes em doenças neuropsiquiátricas (Kornhuber e Weller, 1997). Estudos têm indicado que o sistema glutamatérgico está envolvido na fisiopatologia de transtornos que apresentam diminuição do humor, concentração e memória (Zarate *et al.*, 2002; Kew e Kemp, 2005), incluindo a depressão. Além dos estudos que indicam que antagonistas de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA podem ser utilizados para tratar pacientes com depressão (Berman *et al.*, 2000), um grande número de estudos pré-clínicos mostram que o bloqueio desses receptores produz ação antidepressiva em modelos animais como o estresse crônico, desamparo aprendido, TNF e TSC (Skolnick, 1999; Rada *et al.*, 2003; Kugaya e Sanacora, 2005; Dhir e Kulkarni, 2008). Além disso, antagonistas de receptores NMDA potencializam o efeito de diferentes classes de antidepressivos em modelos animais de depressão (Rogóz *et al.*, 2002).

No presente estudo, a administração de uma dose sub-ativa de AA foi efetiva em potencializar o efeito de um bem estabelecido antagonista de receptores NMDA, o MK-801 no TSC, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Este resultado está de acordo com os estudos que indicam que o AA é um putativo neuromodulador do sistema glutamatérgico, onde pode atuar como um antagonista de receptores NMDA (Majewska *et al.*, 1990; Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). Dessa forma, o presente

resultado também reforça a hipótese de que essa vitamina possui propriedades antidepressivas, uma vez que antagonistas NMDA exibem respostas antidepressivas tanto em modelos animais de depressão (Rada *et al.*, 2003; Kugaya e Sanacora, 2005; Dhir e Kulkarni, 2008) quanto em ensaios clínicos (Berman *et al.*, 2000). Além disso, antagonistas de receptores NMDA, incluindo o MK-801, podem estimular a neurotransmissão monoaminérgica em várias regiões do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal (Löschner e Hönack, 1992; Fink *et al.*, 1995; Castané *et al.*, 2008), o que pode contribuir para a ação antidepressiva desses compostos.

Um importante resultado do presente estudo é o de que a administração de AA potencializa o efeito de doses sub-ativas dos antidepressivos convencionais fluoxetina, imipramina e bupropiona, sem causar alteração na atividade locomotora dos animais. Fluoxetina (um Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina, ISRS), imipramina (um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina / antidepressivo Tricíclico) e bupropiona (um antidepressivo atípico que é um potente inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina) são comumente utilizados para tratar depressão maior (Cooper *et al.*, 1980; Holtzheimer e Nemeroff, 2006; Wilkes, 2006). Em muitos casos, esses antidepressivos são ineficazes, apresentam baixa tolerabilidade e necessitam de relativamente longos períodos de tempo para que seus efeitos terapêuticos sejam atingidos (Nemeroff e Owens, 2002; Berton e Nestler, 2006; Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Considerando-se a necessidade de tratamentos mais rápidos, toleráveis e efetivos para a depressão (Berton e Nestler, 2006), o efeito tipo-antidepressivo sinérgico entre AA e os antidepressivos citados sugerem que esta vitamina pode ser benéfica para a otimização da farmacoterapia convencional (por exemplo, diminuindo a dose dos antidepressivos prescritos e conseqüentemente

reduzindo seus efeitos colaterais). No entanto, estudos complementares pré-clínicos e/ou clínicos são necessários para melhor caracterizar esse efeito.

O estresse crônico é um fator que predispõe o transtorno depressivo em humanos (Kessler, 1997). Ratos ou camundongos expostos a modelos de estresse em laboratório desenvolvem alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas, as quais são utilizadas na pesquisa pré-clínica como fatores que mimetizam sintomas de depressão (Lu *et al.*, 2006; McArthur e Borsini, 2006). Um dos parâmetros comportamentais avaliados após a exposição de roedores aos protocolos de estresse é o tempo de imobilidade dos animais em modelos preditivos de ação antidepressiva como o TNF e o TSC. Após a exposição a agentes estressores ou administração de glicocorticóides, os animais tendem a apresentar um aumento do tempo de imobilidade nesses testes, o que é interpretado como um comportamento tipo-depressivo dos animais (Mineur *et al.*, 2006; Dunn e Swiergiel, 2008; Murray *et al.*, 2008; Gutiérrez-García e Contreras, 2009).

No presente estudo, a exposição dos animais a agentes estressores aplicados de maneira imprevisível por 14 dias foi efetiva em induzir a um aumento do tempo de imobilidade dos animais no TSC, o que é consistente com um fenótipo tipo-depressivo. Tal efeito não foi acompanhado de alterações significativas na atividade locomotora dos animais. Esse resultado está de acordo com a literatura, que mostra que modelos de estresse induzem a comportamentos tipo-depressivos no TNF ou TSC em camundongos (Mineur *et al.*, 2006; Dunn e Swiergiel, 2008; Gutiérrez-García e Contreras, 2009). Por outro lado, a exposição ao estresse não foi efetiva em reduzir o aumento de peso dos camundongos em comparação com o grupo controle que não foi submetido ao protocolo do estresse crônico imprevisível (ECI) (dados não mostrados). A literatura mostra que a exposição de roedores a agentes estressores induz a uma diminuição do aumento de

peso corporal dos animais (Levin *et al.*, 2000; Lucca *et al.*, 2008). No entanto, o protocolo utilizado neste estudo pode ser considerado curto (14 dias) se comparado a outros estudos que utilizam protocolos de 5 semanas ou mais (Levin *et al.*, 2000; Lucca *et al.*, 2008), o que pode ter contribuído para a ausência de redução de aumento de peso nos animais submetidos ao ECI.

O aumento do tempo de imobilidade induzido pelo modelo do ECI foi prevenido pelo tratamento repetido com AA ou com o antidepressivo convencional fluoxetina (antidepressivo Inibidor da Recaptação de Serotonina, ISRS), sem alterações na atividade locomotora dos animais no TCA. Estudos prévios mostram que os déficits nos parâmetros comportamentais induzidos pelo estresse são revertidos pelo tratamento com antidepressivos (Willner *et al.*, 1992; D'Aquila, 1994; Willner, 1997; Consoli *et al.*, 2005; Gutiérrez-García e Contreras, 2009). Dessa forma, o AA, de forma similar a um antidepressivo utilizado na clínica, preveniu as alterações comportamentais induzidas por um modelo que mimetiza uma das principais bases etiológicas da depressão (Tennant, 2002), o que contribui para validar a ação tipo-antidepressiva do AA.

O mecanismo pelo qual o AA exerceu um efeito protetor em relação às alterações causadas pelo estresse permanece incerto. No entanto, alguns fatores relacionados às propriedades da vitamina podem ter contribuído para o efeito observado. Evidências indicam que a exposição ao estresse induz ao aumento de glicocorticóides, bem como ao aumento da liberação da neurotransmissão glutamatérgica, o que pode contribuir para processos neurotóxicos em áreas relacionadas com a depressão como o hipocampo (Mann *et al.*, 2001; Nestler *et al.*, 2002a). Além disso, a ativação de receptores NMDA possui um papel na indução de processos degenerativos centrais sob a influência de altos níveis de glicocorticóides, contribuindo para danos neuronais (McIntosh e Sapolsky, 1996). No entanto,

antagonistas de receptores NMDA possuem putativa ação preventiva sobre os efeitos provocados pela exposição ao estresse ou administração de glicocorticóides (Papp e Moryl, 1994; Danilczuk *et al.*, 2006). Além disso, a injeção central de agonistas de receptores NMDA está envolvida com o aumento do tempo de imobilidade no TNF (Rada *et al.*, 2003). Dessa forma, o efeito preventivo do AA em relação ao aumento do tempo de imobilidade no TSC pode ser devido, pelo menos em parte, à sua possível ação neuroprotetora, através da inibição de receptores NMDA (Majewska *et al.*, 1990). Adicionalmente, Brody *et al.* 2002b mostraram que doses equivalentes a 3000mg/dia de AA por 14 dias em humanos exercem um efeito paliativo sobre alterações fisiológicas e comportamentais induzidas pela exposição aguda a um agente estressor de natureza psicológica. Esse efeito protetor do AA foi atribuído a sua propriedade de atuar como um neuromodulador (Grünewald, 1993; Rebec and Pierce, 1994; Rice, 2000), onde a neurotransmissão de resposta ao estresse pode ter sido modulada pela suplementação com a vitamina (Brody *et al.* 2002b).

Uma vez que os processos excitotóxicos induzidos pela exposição ao estresse são acompanhados de aumento do estresse oxidativo e/ou diminuição das defesas antioxidantes em modelos animais (Eren *et al.*, 2007; Lucca *et al.*, 2008), o efeito preventivo do AA após o ECI pode, em parte, ser devido as suas propriedades de atuar como um antioxidante endógeno (Schreiber e Trojan, 1991; Naidu, 2003). No cérebro, o aumento do estresse oxidativo está relacionado com a depressão (Bilici *et al.*, 2001; Forlenza e Miller, 2006) e também pode estar relacionado com processos neurodegenerativos, além de mediar parte dos efeitos neurotóxicos causados pela excessiva liberação de glutamato (Coyle e Puttfarcken, 1993). Desta forma, o AA, sob a forma de ascorbato, pode ter efeito neuroprotetor (Padayatty *et al.*, 2003), prevenindo parte dos danos induzidos pela exposição ao estresse. Eren *et al.* (2007) demonstraram

que após a exposição de ratos a um modelo animal de depressão induzida pelo estresse crônico, houve diminuição dos níveis de defesas antioxidantes no córtex, incluindo ascorbato. Uma vez que esses parâmetros foram restabelecidos após o tratamento com o antidepressivo atípico venlafaxina, foi sugerido que o aumento de defesas antioxidantes pode ser uma importante etapa do mecanismo de ação de antidepressivos (Eren *et al.*, 2007).

Além de atuar como um neuromodulador e antioxidante existem evidências de que o AA regula a secreção de glicocorticóides pelas glândulas adrenais, uma vez que a deficiência da vitamina está relacionada com aumentos dos níveis de glicocorticóides (Kolb, 1990). Considerando essa ação periférica do AA, não deve ser descartado que parte do efeito preventivo da vitamina observado após a exposição ao ECI seja devido, ao menos em parte, ao seu efeito no controle de glicocorticóides. No entanto, no presente estudo o AA foi efetivo em causar efeito tipo-antidepressivo específico no TSC após sua administração por via i.c.v., o que reforça a hipótese de um efeito central da vitamina nesse modelo preditivo de ação antidepressiva.

A finalidade primária deste estudo foi validar o efeito do AA em um modelo preditivo de ação antidepressiva. Os dados presentes indicam que a vitamina possui efeito tipo-antidepressivo específico no TSC. No entanto, deve ser considerado que o TSC não é um modelo de depressão *per se* e os resultados obtidos nesse modelo devem ser interpretados com cautela. Dessa forma, os dados deste estudo podem servir como embasamento para a execução de estudos animais complementares bem como estudos clínicos, os quais podem confirmar o efeito antidepressivo do AA.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a administração sistêmica (por via i.p. e p.o.) ou central (por via i.c.v.) de AA em camundongos é efetiva em produzir um efeito tipo-antidepressivo no TSC, o qual não é atribuído a um efeito psicoestimulante da vitamina. Os presentes dados também fornecem evidências de que esse efeito é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e glutamatérgico. Adicionalmente, o AA foi efetivo em potencializar doses sub-ativas de antidepressivos convencionais, e preveniu o fenótipo tipo-depressivo induzido por um modelo que mimetiza uma das principais bases etiológicas da depressão, o que reforça a noção de que este putativo neuromodulador possui propriedades antidepressivas. Em conjunto, os dados contribuem para o melhor entendimento do papel do AA no SNC e sugerem que essa vitamina pode constituir um novo objeto de estudo na pesquisa que visa identificar novos antidepressivos e, que em longo prazo, pode tornar-se uma atrativa estratégia para o tratamento da depressão.

**REFERÊNCIAS**

AGUILERA, G., KISS, A., LIU, Y., KAMITAKAHARA, A. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. **Stress**, 10,153-161, 2007.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Mood Disorders**. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Fourth Edition, Washington DC, 576 pp., 2000.

ARTIGAS, F. Modulation of the activity of prefrontal circuits by 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 12, 166-167, 2002.

ASCHER, J.A., COLE, J.O., COLIN J.N., FEIGHNER J.P., FERRIS R.M., FIBIGER H.C., GOLDEN R.N., MARTIN P., POTTER,W.Z., RICHELSON E., SULSER F. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **J Clin Psychiatry**, 56, 395 – 401, 1995.

BAI, F., LI, X., CLAY, M., LINDSTROM, T., SKOLNICK, P. Intra- and interstrain differences in models of ‘behavioral despair’. **Pharmacol Biochem Behav.**,70:187–192, 2001.

BALDESSARINI, R.J. Drugs and treatment of psychiatric disorders – depression and mania. In: Limird, L.E., Hardman, J.G., **Goodman & Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9,431-459, 1996.

BAUNGARTNER, A., GRAF, K.J., KURTEN, I. The dexamethasone suppression test in depression in schizophrenia, and during emotional stress. **Biol Psychiatry**, 20, 675-679, 1985.

BENDICH, A., COHEN, M. Ascorbic acid safety: analysis factors affecting iron absorption. **Toxicol Lett.**, 51, 189-190, 1990.

- BERMAN, R.M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D.A., HENINGER, G.R., CHARNEY, D.S., KRYSTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, 47, 351-354, 2000.
- BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci.**, 7, 137-151, 2006.
- BILICI, M., EFE, H., KOROGLU, M.A., UYDU, H.A., BEKAROGLU, M., DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord.**, 64, 43-51, 2001.
- BLIER, P. Possible neurobiological mechanisms underlying faster onset of antidepressant action. **J Clin Psychiatry**, 11, 62-67, 2001.
- BLIER, P., WARD, N.M. Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in the treatment of depression? **Biol Psychiatry**, 53, 193–203, 2003.
- BORSINI, F., LECCI, A., MANCINELLI, A., D'ARANNO, V., MELI, A. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. **Eur J Pharmacol.**, 148, 301-307, 1988.
- BOURIN, M., CHENU, F., RIPOLL, N., DAVID, D.J.P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res.**, 164, 266-269, 2005.
- BRINK, C.B., HARVEY, B.H., BRAND, L. Tianeptine: a novel atypical antidepressant that may provide new insights into the biomolecular basis of depression. **Recent Pat CNS Drug Discov.**, 1, 29-41, 2006.
- BROCARD, P.S., BUDNI, J., KASTER, M.P., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L.S. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice:

evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Neuropharmacology**, 54, 464-473, 2008.

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

BRODY, S., PREUT, R., SCHOMMER, K., SCHÜRMEYER, T.H. A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. **Psychopharmacology**, 159, 319–324, 2002b.

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

CASAROTTO, P.C., ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 17, 735-742, 2007.

CASTAÑÉ, A., ARTIGAS, F., BORTOLOZZI, A. The absence of 5-HT<sub>1A</sub> receptors has minor effects on dopamine but not serotonin release evoked by MK-801 in mice prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, 200, 281-290, 2008.

CELADA, P., PUIG, V.M., AMARGÓS-BOSCH, M., ADELL, A., ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in depression. **J Psychiatry Neurosci.**, 29, 252-265, 2004.

CHANG, C.W., CHEN, M.J, WANG, T.E, CHANG, W.H, LIN, C.C., LIU, CY. Scurvy in a Patient with Depression. **Dig Dis Sci.**, 52, 1259-1261, 2007.

CHEN, Q., ESPEY, M.G., SUN, A.Y., POOPUT, C., KIRK, K.L., KRISHNA, M.C., KHOSH, 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.**, 105, 11105-11109, 2008.
- CHEN, M.J., NGUYEN, T.V., PIKE, C.J., RUSSO-NEUSTADT, A.A. N. Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. **Cell Signal.**, 19, 114-128, 2007.
- CHOURBAJI, S., URANI, A., INTA, I., SANCHIS-SEGURA, C., BRANDWEIN, C., ZINK, M., SCHWANINGER, M., GASS, P. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. **Neurobiol Dis.**, 23, 587-594, 2006.
- CLAUSTRE, Y., ROUQUIER, L., SERRANO, A., BÉNAVIDÈS, J., SCATTON, B. Effect of the putative 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist NAN-190 on rat brain serotonergic transmission. **Eur J Pharmacol.**, 204, 71-77, 1991.
- CLENET, F., DE VOS, A., BOURIN, M. Involvement of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the anti-immobility effects of antidepressants in the forced swimming test in mice. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 11, 145-152, 2001.
- CONSOLI, D., FEDOTOVA, J., MICALE, V., SAPRONOV, N.S., DRAGO, F. Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). **Eur J Pharmacol.**, 520, 100-107, 2005.
- COOCHI P., SILENZI M., CALABRI G., SALVI G. Antidepressant effect of vitamin C. **Pediatrics**, 65, 862-863, 1980.
- COOPER, B.R., HESTER, T.J., MAXWELL, R.A.. Behavioral and biochemical effects of the antidepressant bupropion (Wellbutrin): evidence for selective blockade of dopamine uptake in vivo. **J Pharmacol Exp Ther.**, 215, 127-134, 1980.
- COPPEN, A.J., DOOGAN, D.P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **J Clin Psychiatry**, 49, 4-11, 1988.

- COYLE, J.T., PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, 262, 689-695, 1993.
- CRYAN, J.F., HOYER, D., MARKOU, A. Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioural effects in rodents. **Biol Psychiatry**, 54, 49-58, 2003.
- CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.**, 23, 238-245, 2002.
- CRYAN, J.F., MOMBÉREAU, C., VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev.**, 29, 571-625, 2005.
- CUIJPERS, P., SMIT, F. Excess mortality in depression: a metaanalysis of community studies. **J Affect Disord.**, 72, 227-336, 2002.
- D'AQUILA, P., BRAIN, P.F., WILLNER, P. Effects of chronic mild stress in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiol Behav.**, 56, 861-867, 1994.
- D'AQUILA P., COLLU, M., GESSA, G.L., SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressants drugs. **Eur J Pharmacol.**, 405, 365-373, 2000.
- DANILCZUK, Z., SEKITA-KRZAK, J., LUPINA, T., DANILCZUK, M., CZERNY, K. Influence of dizocilpine (MK-801) on neurotoxic effect dexamethasone: Behavioral and histological studies. **Acta Neurobiol Exp.**, 66, 215-226, 2006.
- DANYSZ, W., KOSTOWSKI, W., KOZAK, W., HAUPTMANN, M. On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. **Pol J Pharmacol Pharm.**, 38, 285-298, 1986.

- DA SILVA, G.L., MATTEUSSI, A.S., SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L.S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, 11, 3699-3702, 2000.
- DAVIES, M.B., AUSTIN, J., PARTRIDGE, D.A. Vitamin C: in chemistry and biochemistry. **Cambridge: Royal Society of Chemistry**, 154 pp., 1991.
- DEAKIN, J.F. 5HT<sub>2</sub> receptors, depression and anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.**, 29, 819-820, 1988.
- DENCKER, S.J. The need for new and better antidepressants: reboxetine a new option. **Acta Psychiatr Scand.**, 402, 6-11, 2000.
- DESANTIS, J. Scurvy and psychiatric symptoms. **Perspect Psychiatry Care**, 29, 18-22, 1993.
- DETKE, M.J., WIELAND, S., LUCKI, I. Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonists. **Psychopharmacology**, 119, 47-54, 1995.
- DHIR, A., KULKARNI, S.K. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-801(dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. **Indian J Exp Biol.**, 46, 164-170, 2008.
- DINGLELINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev.**, 51, 7-61, 1999.
- DREMENCOV, E., WEIZMANN, Y., KINOR, N., GISPAN-HERMAN, I., YADID, G. Modulation of dopamine transmission by 5HT<sub>2C</sub> and 5HT<sub>3</sub> receptors: a role in the antidepressant response. **Curr Drug Targets**, 7, 165-175, 2006.
- DUCONGE, J., MIRANDA-MASSARI, J.R., GONZALEZ, M.J., JACKSON, J.A., WARNOCK, W., RIORDAN, N.H. Pharmacokinetics of vitamin C: insights into the oral and intravenous administration of ascorbate. **P R Health Sci J.**, 27, 7-19, 2008.

- DUMAN, R.S., HENINGER, G.R., NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, 54, 597-606, 1997.
- DUNN, A.J., SWIERGIEL, A.H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 81, 688-693, 2005.
- DUNN, A.J., SWIERGIEL, A.H. Effects of acute and chronic stressors and CRF in rat and mouse tests for depression. **Ann N Y Acad Sci.**, 1148, 118-126, 2008.
- DUNN, A.J., SWIERGIEL, A.H., BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Rev.**, 29, 891-909, 2005.
- EBMEIER, K.P., DONAGHEY, C., STEELE, J.C. Recent developments and current controversies in depression. **Lancet**, 367, 153-167, 2006.
- ECKELI, A.L., DACH, F., RODRIGUES, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. **Neuroreport**, 11, 839-843, 2000.
- EIPPER, B.A., MAINS, R.E. The role of ascorbate in the biosynthesis of neuroendocrine peptides. **Am J Clin Nutr.**, 54, 1153-1156, 1991.
- EISENSAMER, B., RAMMES, G., GIMPL, G., SHAPA, M., FERRARI, U., HAPFELMEIER, G., BONDY, B., PARSONS, C., GILLING, K., ZIEGLGÄNSBERGER, W., HOLSBOER, F., RUPPRECHT, R. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT<sub>3</sub>) receptor. **Mol Psychiatry**, 12, 994-1007, 2003.
- ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, 28, 435-451, 2004.
- ENGLARD, S., SEIFTER, S. The biochemical functions of ascorbic acid. **Annu Rev Nutr.**, 6, 365-406, 1986.

- EREN, I., NAZIROGLU, M., DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem Res.**, 32, 1188-1195, 2007.
- FINK, K., SCHIMITZ, V., BOING, C., GOTHERT, M. Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 352, 394-401, 1995.
- FLECK, M.P.A., LAFER, B., SOUGEY, E.B., PORTO, J.A., BRASIL, M.A., JURUENA, M.F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Rev Bras Psiquiatr.**, 25, 114-122, 2003.
- FORLENZA, M.J., MILLER, G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. **Psychosom Med.**, 68, 1-7, 2006.
- FRAZER, A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. **J Clin Psychiatry**, 1, 25-30, 2000.
- GABILONDO, A.M., MEANA, J.J., GARCIA-SEVILLA, J.A. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. **Brain Res.**, 682, 245-250, 1995.
- GADOTTI, V.M., KASTER, M.P., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES A.L.S. Depressant-like behavior of TNF-alpha in mice. **20th ECNP Congress, 2007, Viena Eur Neuropsychopharmacol.** 17, 399-399, 2007.
- GILLESPIE, C.F., NEMEROFF, C.B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med.**, 67, 26-28, 2005.
- GLENNON, R.A., NAIMAN, N.A., PIERSON, M.E., TITELER, M., LYON, R.A., WEISBERG, E. NAN-190: an arylpiperazine analog antagonizes the stimulus effects of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). **Eur J**

**Pharmacol.**, 154, 339-341, 1988.

GOLD, P.W., WONG, M.L., CHROUSOS, G.P., LICINIO, J. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. **Molecular Psychiatry**, 1, 257-264, 1996.

GREENBERG, P.E., STIGLIN, L.E., FINKELSTEIN, S.N., BERNDT, E.R. The economic burden of depression in 1990. **J Clin Psychiatry**, 54, 405-418, 1993.

GRUEL, J.M., GLASER, T. The putative 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists NAN-190 and BMY 7378 are partial agonists in the rat dorsal raphe nucleus in vitro. **Eur J Pharmacol.**, 211, 211–219, 1992.

GRÜNEWALD, R.A. Ascorbic acid in the brain. **Brain Res Rev.**, 18, 123-133, 1993.

GUAY-WOODFORD, L.M. Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. **Am J Physiol Renal Physiol.**, 285, 1034–1049, 2003.

GUTIÉRREZ-GARCÍA, A.G., CONTRERAS, C.M. Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. **Pharmacol Biochem Behav.**, 91, 542-548, 2009.

GUZE, S.B., ROBINS, E. Suicide and primary affective disorders. **Br J Psychiatry**, 117,437–438, 1970.

HALLIGAN, T.J., RUSSELL, N.G., DUNN, W.J. CALDRONEY, S.J., SKELTON, T.B. Identification and treatment of scurvy: A case report. **Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad Oral Endodont.**, 100, 188-192, 2005.

HARKIN, A., CONNOR, T.J., WALSH, M., S.T., JOHN, N., KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, 44, 616-623, 2003.

HARKIN, A., NALLY, R., KELLY, J.P., LEONARD, B.E. Effects of reboxetine and sertraline treatments alone and in combination on the binding properties of cortical

- NMDA and beta<sub>1</sub>-adrenergic receptors in an animal model of depression. **J Neural Transm.**, 107, 1213–1227, 2000.
- HEAL, D.J., BRISTOW, L.J., ELLIOTT, J.M., BLOOMFIELD, J.G., CATTO, L.C., ATTERWILL, C.K. The influence of L-triiodothyronine (T<sub>3</sub>) on the effects of repeated administration of desipramine or electroconvulsive shock on  $\alpha$ -2 and  $\beta$ -adrenoceptor function in the brain of the rat: implications for the potentiation of antidepressant therapy by T<sub>3</sub>. **Neuropharmacology**, 26, 1131–1139, 1987.
- HEAL, D.J., BRISTOW, L.M., HURST, E.M., ELLIOTT, J.M., BUCKETT, W.R. Sex-related differences in central adrenergic function and responsiveness to repeated administration of desipramine and electroconvulsive shock. **Br J Pharmacol.**, 97, 111–118, 1989.
- HENSALL, J.D. The effect of processing on the nutritive value of fruit and vegetable products. **Proc Nutr Soc.**, 32, 17-22, 1973.
- HENSLER, J.G. Differential regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors–G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, 26, 565–573, 2002.
- HIRANO, S., MIYATA, S., ONODERA, K., KAMEI, J. Involvement of dopamine D1 and  $\alpha$ 1-adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. **Eur J Pharmacol.**, 562, 72-76, 2007.
- HJORTH, S., SHARP, T.. Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT<sub>1A</sub> receptors: behavioural and in vivo brain microdialysis studies. **Life Sci.**, 46, 955–963, 1990.
- HOLSBOER, F., BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev.**, 17, 187-205, 1996.

- HOLTZHEIMER, P.E., NEMEROFF, C.B. Advances in the treatment of depression. **J NeuroRx**, 3, 42-56, 2006.
- HORNIG, D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. **Ann NY Acad Sci.**, 258, 103–118, 1975.
- HOYER, D., PAZOS, A., PROBST, A., PALACIOS, J.M. Serotonin receptors in the human brain: II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> recognition sites. **Brain Res.**, 376, 97–107, 1986.
- HYDE, S.C., GILL, D.R., HIGGINS, C.F., TREZISE, A.E., MACVINISH, L.J., CUTHBERT, A.W., RATCLIFF, R., EVANS, M.J., COLLEDGE, WH. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. **Nature**, 362, 250–255, 1993.
- ISHIHARA, K. SASA, M. Potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. **Neurosci Lett.**, 307, 37-40, 2001.
- JOCA, S.R., FERREIRA, F.R., GUIMARÃES, F.S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. **Stress**, 10, 227-249, 2007.
- JOCA, S.R.L., SKALISZ, L.L., BEIJAMINI, V., VITAL, M.A.B.F., ANDREATINI R. The antidepressive-like effect of oxcarbazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 10, 223-228, 2000.
- KASTER, M.P., BUDNI, J., BINFARÉ, 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.**, 31, 690-696, 2007a.

- KASTER, M.P., RAUPP, I. BINFARÉ, R.W., ANDREATINI, R., RODRIGUES, A.R.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: Evidence for the involvement of the noradrenergic system. **Eur J Pharmacol.**, 565, 119–124, 2007b.
- KATZ, R.J., ROTH, K.A., SCHMALTZ, K. Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. **Neurosci Biobehav Rev.**, 5, 259–264, 1981.
- KESSLER, R.C., ZHAO, S., BLAZER, D.G., SWARTZ, M. Prevalence, correlates, and course of minor depression and major depression in the National Comorbidity Survey. **J Affect Disord.**, 45, 19-30, 1997.
- KEW, J.N., KEMP, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, 179, 4-29, 2005.
- 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 Rep.**, 8, 365-370, 2003.
- KHISTI, R.T., CHOPDE, C.T. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one in mice. **Brain Res.**, 865, 291-300, 2000.
- KITADA, Y., MIYAUCHI, T., KANAZAWA, Y., NAKAMICHI, H., SATOH, S. Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta_1$ -adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. **Neuropharmacology.**, 22, 1055-1060, 1983.
- KITAMURA, Y., KITAGAWA, K., KIMOTO, S., SAGARA, H., SHIBATA, K., KAWASAKI, H, SENDO, T., GOMITA, Y. Selegilin exerts antidepressant-like effects during the forced swim test in adrenocorticotrophic hormone-treated rats. **J Pharmacologic Sci.**, 106, 639-644, 2008.

- KLOET, E.R., JOËLS, M., HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Rev Neurosci.**, 6, 463-475, 2005.
- KOLB, E. Some recent discoveries of metabolism and function of ascorbic acid. **Z Gesamte Inn Med.**, 45, 205-210, 1990.
- KORNHUBER, J., WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. **Biol Psychiatry**, 41, 135-144, 1997.
- KREISS, D.S., LUCKI, I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. **J Pharmacol Exp Ther.**, 274, 866-876, 1995.
- KRISHNAN, K.R., DORAISWAMY, P.M., FIGIEL, G.S., HUSAIN, M.M., SHAH, S.A., NA, C., BOYKO, O.B., MCDONALD, W.M., NEMEROFF, C.B., ELLINWOOD, E.H. JR. Hippocampal abnormalities in depression. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, 3, 387-391, 1991.
- KUGAYA, A., SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectr.**, 10, 808-819, 2005.
- LEVIN, B.E., RICHARD, D., MICHEL, C., SERVATIUS, R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 279, 1357-1364, 2000.
- LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. **N Engl J Med.**, 314, 892-902, 1986.
- LEVINE, M., CONRY-CANTILENA, C., WANG, Y., WELCH, R.W., WASHKO, P.W., DHARIWAL, K.R., PARK, J.B., LAZAREV, A., GRAUMLICH, J.F., KING, J., CANTILENA, L.R. Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. **Proc Natl Acad Sci.**, 93, 3704-3709, 1996.

- LIANG, W.J., JOHNSON, D., JARVIS, S.M. Vitamin C transport systems of mammalian cells. **Mol Membr Biol.**, 18, 87-95, 2001.
- LOSCHER, W., HONACK, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. **Eur J Pharmacol.**, 215, 199-208, 1992.
- LU, X.Y., KIM, C.S., FRAZER, A., ZHANG, W. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci.**, 103, 1593-1598, 2006.
- LUCCA, G., COMIM, C.M., VALVASSORI, S.S., RÉUS, G.Z., VUOLO, F., PETRONILHO, F., GAVIOLI, E.C., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. **J Psychiatr Res.**, 2008, *In Press*, doi:10.1016/j.jpsychires.2008.11.002.
- MACHADO, D.G., KASTER, M.P., BINFARÉ, R.W., DIAS, M., SANTOS, A.R., PIZZOLATTI M.G., BRIGHENTE, I.M., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, 31, 421-428, 2007.
- MACKENZIE, B., ILLING, A.C., HEDIGER, M.A. Transport model of the human Na<sup>+</sup>-coupled L-ascorbic acid (vitamin C) transporter SVCT1. **Am J Physiol Cell Physiol.**, 294, 451-459, 2008.
- MAJEWSKA, M.D., BELL, J.A., LONDON, E.D. Regulation of NMDA receptors by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Res.**, 537, 328-332, 1990.
- MAKINO, M., KITANO, Y., HIROHASHI, M., TAKASUNA, K. Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. **Eur J Pharmacol.**, 356, 1-7, 1998.

- MAKINO, M., KITANO, Y., KOMIYAMA, C., HIROHASHI, M., TAKASUNA, K. Involvement of central opioid systems in human interferon-alpha induced immobility in the mouse forced swimming test. **Br J Pharmacol.**, 130, 1269-1274, 2000.
- MALO, C., WILSON, J.X. Glucose modulates vitamin C transport in adult human small intestinal brush border membrane vesicles. **J Nutr.**, 130, 63-69, 2000.
- MANELA-AZULAY, M., MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., PEREZ, M.A., FILGUEIRA, A.L., CUZZI, T. Vitamina C. **An bras Dermatol.**, 78, 265-274, 2003.
- MANJI, H.K., MOORE, G.J., RAJKOWSKA, G., CHEN, G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol Psychiatry**, 5, 578–593, 2001.
- MANN, C.L., CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoids regulate plasma membrane potential during rat thymocyte apoptosis in vivo and in vitro, **Endocrinology**, 142, 421–429, 2001.
- MANN, J.J., MCBRIDE, P.A., MALONE, K.M., DEMEO, M., KEILP, J. Blunted serotonergic responsivity in depressed inpatients. **Neuropsychopharmacology**, 13, 53-64, 1995.
- MANTOVANI, M., PÉRTILE, R., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett.**, 343, 1-4, 2003.
- MASUDA, Y., OHNUMA, S., SUGIYAMA, T.  $\alpha_2$ -adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.**, 23, 19-21, 2001.
- MATTHEWS K., CHRISTMAS, D., SWAN, J., SORRELL, E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neurosci. Biobehav Rev.**, 29, 503–513, 2005.

- McARTHUR, R., BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav.**, 84, 436-452, 2006.
- McDONALD, J.W., LIU, X.Z., QU, Y., LIU, S., MICKEY, S.K., TURETSKY, D., GOTTLIEB, D.I., CHOI, D.W. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat Med.**, 5, 1410–1412, 1999.
- McINTOSH, L.J., SAPOLSKY, R. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Expl Neurol.**, 141, 201-206, 1996.
- MIKOVA, O., YAKIMOVA, R., BOSMANS, E., KENIS, G., MAES, M. Increased serum tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in major depression and multiple sclerosis. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 11, 203-208, 2001.
- MILBY, K., OKE, A., ADAMS, R.N. Detailed mapping of ascorbate distribution in rat brain. **Neurosci Lett.**, 28, 169-174, 1982.
- MINEUR, Y.S., BELZUNG, C., CRUSIO, W.E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behav Brain Res.**, 175, 43–50, 2006.
- MURRAY, C.J., LOPEZ, A.D. Global mortality, disability, and contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 349, 1436-1442, 1997.
- MURRAY, F. SMITH, D.W., HUTSON, P.H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol.**, 583, 115–127, 2008.
- NAIDU, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutr J.**, 2, 1-10, 2003.
- NARDI, A.E. Depressão no ciclo da vida. **Rev Bras Psiquiatr.**, 22, 149-152, 2000

- NESTLER, E.J., BARROT, M., DILEONE, R.J., EISCH, A.J., GOLD, S.J., MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, 34, 13-25, 2002a.
- NESTLER, E.J., GOULD, E., MANJI, H., BUCAN, M., DUMAN, R.S. GERSHENFELD, H.K., HEN, R., KOESTER, S., LEDERHENDLER, I., MEANEY, M.J., ROBBINS, T., WINSKY, L., ZALCMAN, S. Preclinical Models: Status of Basic Research in Depression. **Biol Psychiatry**, 52, 503–528, 2002b.
- NEMEROFF, C.B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res.**, 41, 189-206, 2007.
- NEMEROFF, C.B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry.**, 1, 336-342, 1996.
- NEMEROFF, C.B., OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci.**, 5, 1068-1070, 2002.
- NGUYEN, R.T.D., COWLEY, D.M., MUIR, J.B. Scurvy: A cutaneous clinical diagnosis. **Austr J Dermatol.**, 44, 48–51, 2003.
- NISHIKIMI, M., FUKUYAMA, R., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N., YAGI, K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. **J Biol Chem.**, 269, 13685-13688, 1994.
- NUTT, D.J. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. **J Clin Psychiatry**, 67, 3-8, 2006.
- O'NEILL, M.F., OSBORNE, D.J., WOODHOUSE, S.M., CONWAY, M.W. Selective imidazoline I<sub>2</sub> ligands do not show antidepressant-like activity in the forced swim test in mice. **J Psychopharmacol.**, 15, 18-22, 2001.

- PADAYATTY, S.J., KATZ, A., WANG, Y., ECK, P., KWON, O., LEE, J., 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.**, 22, 18–35, 2003.
- PADAYATTY, S.J., SUN, H., WANG, Y., RIORDAN, HD., HEWITT, S.M., KATZ, A., WESLEY, R.A., LEVINE, M. Vitamin C Pharmacokinetics: Implications for Oral and Intravenous Use. **Ann Intern Med.**, 140, 533-537, 2004.
- PÁEZ-PEREDA, M. New drug targets in the signaling pathways activated by antidepressants. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, 29, 1010–1016, 2005.
- PAPAKOSTAS, G.I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur Neuropsychopharmacol.**, 16, 391-402, 2006.
- PAPP, M., MORYL, E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. **Eur J Pharmacol.**, 263, 1-7, 1994.
- 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.**, 27, 4894-4901, 2007.
- PETERKOFISKY, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. **Am J Clin Nutr.**, 54, 1135–1140, 1991.
- PETRIE, R.X., REID, I.C., STEWART, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Pharmacol Ther.**, 87, 11-25, 2000.

- PITTENGER, C., CORIC, V., BANASR, M., BLOCH, M., KRYSTAL, J.H., SANACORA, G. Riluzole in the treatment of mood and anxiety disorders. **CNS Drugs**, 22, 761-786, 2008.
- PITTENGER, C., DUMAN, R.S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, 33, 88-109, 2008.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, 229, 327-336, 1977.
- POSSER, T., KASTER, M.P., BARAÚNA, S.C., ROCHA, J.B., RODRIGUES, A.L.S., LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Eur J Pharmacol.**, 602, 85-91, 2009.
- POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psych.**, 149, 999-1010, 1992.
- PRZEGALINSKI, E., ISMAIEL, A.M., CHOJNACKA-WOJCIK, E., BUDZISZEWSKA, B., TATARCZYNSKA, E., BLASZCZYNSKA, E. The behavioural, but not the hypothermic or corticosterone, response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, is antagonized by NAN-190 in rat. **Neuropharmacology**, 29, 521-526, 1990.
- RADA, P., MORENO, A.S., TUCCI, S., GONZALEZ, L.E., HARRISON, T., CHAU, D.T., HOEBEL, B.G., HERNANDEZ, L. Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the porsolt swim test. **Neuroscience**, 119, 557-565, 2003.
- RADDEN, J. **The Nature of Melancholy: From Aristotle to Kristeva**. Second edition, Oxford University Press, pp. 392, 2002.

- 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.**, 43, 537-565, 1994.
- REBEC, G.V., WITOWSKI, S.R., SANDSTROM, M.I., ROSTAND, R.D., KENNEDY, R.T. Extracellular ascorbate modulates cortically evoked glutamate dynamics in rat striatum. **Neurosci Lett.**, 378, 166-170, 2005.
- REBOUCHE, C.J. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. **Am J Clin Nutr.**, 54, 1147-1152, 1991.
- REDROBE, J.P., BOURIN, M. Partial role of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, 325, 129-135, 1997.
- RENARD, C.E., DAILLY, E., DAVID, D.J., HASCOET, M., BOURIN, M. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. **Fundam Clin Pharmacol.**, 17, 449-455, 2003.
- RICCI, L.C., WELLMAN, M.M. Monoamines: biochemical markers of suicide? **J Clin Psychol.**, 46, 106-116, 1990.
- RICE, M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends Neurosci.**, 23, 209-216, 2000.
- RIVERS, J.M. Safety of high-level of vitamin C ingestion. **Ann N Y Academy Sci.**, 498, 445-543, 1987.
- RODRIGUES, A.L.S., DA SILVA, G.L., MATEUSSI, A.S., FERNANDES, E.S., MIGUEL, O.G., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, 70, 1347-1358, 2002.

- RODRIGUES A.L.S., ROCHA J.B.T., MELLO C.F., SOUZA D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.**, 79, 150-156, 1996.
- ROGÓZ, Z., SKUZA, G., MAJ, J., DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacology**, 42, 1024-1030, 2002.
- ROSA, K.A., GADOTTI, V.M., ROSA, A.O., 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. *Neurosci Lett.*, 381, 185-888, 2005.
- RUMSEY, S.C., LEVINE, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. **Nutr Biochem.**, 9, 116-130, 1998.
- SANDSTROM, M.I. REBEC, G.V. Extracellular ascorbate modulates glutamate dynamics: role of behavioral activation. **BMC Neuroscience**, 8, 32-38, 2007.
- SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Arch Gen Psychiatry**, 57, 925-929, 2000.
- SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. **J Neurosci.**, 6, 2240-2244, 1986.
- SCHANDERL, S.H. Vitamin assay. In: *Methods in food analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis.* Academic Press, New York, pp.845, 1970.
- SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122, 509-522, 1965.
- SCHREIBER, M., TROJAN, S. Ascorbic acid in the brain. **Physiol Res.**, 40, 413-418, 1991.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem.**, 215, 213-219, 1993.

- SIMON, G.E., MAIER, W., USTUN, T.B., LINDEN, M., BOYER, P. Research diagnosis of current depressive disorder: a comparison of methods using current symptoms and lifetime history. **J Psychiatr Res.**, 29, 457-465, 1995.
- SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol.**, 375, 31-40, 1999.
- SKOLNICK, P. Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. **Amino Acids**, 23, 153-159, 2002.
- SOTIRIOU, S., GISPERT, S., CHENG, J., WANG, Y., CHEN, A., HOOGSTRATEN-MILLER, S., MILLER, G.F., KWON, O., LEVINE, M., GUTTENTAG, S.H., NUSSBAUM, R.L. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. **Nat Med**, 8, 514–517, 2002.
- STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, 85, 367-370, 1985.
- STÖGER, H., WILDERS-TRUSCHNIG, M., SCHMID, M., PETEK, W., SAMONIGG, H. Scurvy after a suicide attempt by starvation. **Dtsch Med Wochenschr.**, 119, 589-592, 1994.
- SWAAB, D.F., BAO, A., LUCASSEN, P.J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Ver.**, 4, 141-194, 2005.
- TAYLOR, C., ASHWANA, D.F., LAKSHMI, A.D., GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal.**, 17, 549-557, 2005.
- TENG, C.T., HUMES, E.C., DEMETRIO, F.N. Depressão e comorbidade clínicas. **Rev Psiquiatr Clín.**, 32, 149-159, 2005.

- TENNANT, C. Life events, stress and depression: a review of recent findings. **Aust N Z J Psychiatry**, 36, 173-182, 2002.
- TESTE, J.F., MARTIN, I., RINJARD, P. Electrotherapy in mice: dopaminergic and noradrenergic effects in the Tail Suspension Test. **Fundam Clin Pharmacol.**, 4, 39-47, 1990.
- THIERRY, B., STERU, L., SIMON, P., PORSOLT, R.D. The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology**, 90, 284-285, 1986.
- THOMPSON, A.J., LUMMIS, S.C. The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target. **Expert Opin Ther Targets**, 11, 527-540, 2007.
- TUGLU, C., KARA, S.H., CALIYURT, O., VARDAR, E, ABAY, E. Increased serum tumor necrosis factor- $\alpha$  levels and treatment response in major depressive disorder. **Psychopharmacology**, 170, 429-433, 2003.
- VALDÉS, F. Vitamina C. **Actas Dermosifiliogr.**, 97, 557-568, 2006.
- VINSON, J.A., BOSE, P. Comparative bioavailability of synthetic and natural vitamin C in guinea pigs. **Nutr Rep Int.**, 27, 875-880, 1983.
- WAEHRENS, J., GERLACH, J. Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. **J Affect Disord.**, 3, 193-202, 1981.
- WAMBEBE, C., SOKOMBA, E. Some behavioral and EEG effects of ascorbic acid in rats. **Psychopharmacology**, 89, 167-170, 1986.
- WILKES, S. Bupropion. **Drugs Today**, 42, 671-681, 2006.
- WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, 134, 319-329, 1997.

- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, 83:1-16, 1984.
- WILLNER, P., HALE, A.S., ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **J Affect Dis.**, 86, 37-45, 2005.
- WILLNER, P., MUSCAT, R., PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev.**, 16, 525-534, 1992.
- WILLNER, P., TOWEL, A., SAMPSON, D., SOPHOKLEOUS, S., MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, 93, 358-364, 1987.
- WONG, M., LICICIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci.**, 2, 343-351, 2001.
- YALCIN, I., AKSU, F., BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **Eur J Pharmacol.**, 514, 165-174, 2005.
- YAMADA, J., SUGIMOTO, Y., YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, 504, 207-211, 2004.
- YIGIT, U.S., LAMBRECHT, F.Y., ÜNAK, P., BIBER, F.Z, MEDINE, E.I., ÇETINKAYA, B. Preparation of <sup>99m</sup>Tc Labeled Vitamin C (Ascorbic Acid) and Biodistribution in Rats. **Chem Pharm Bull.**, 54, 1- 3, 2006.
- ZALSMAN, G., POSMANIK, S., FISCHER, T., HORESH, N., GOTHELF, D., GAL, G., SADEH, A., WEIZMAN, A., APTER, A. Psychosocial situations, quality of depression and schizophrenia in adolescents. **Psychiatry Res.**, 129, 149-157, 2004.
- ZARATE, C.A., DU, J., QUIROZ, J., GRAY, N.A., DENICOFF, K.D., SINGH, J., CHARNEY, D.S., MANJI, H.K. Regulation of cellular plasticity cascades in the

pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. **Ann N Y Acad Sci.**, 1003, 273-291, 2003.

ZARATE, C.A., QUIROZ, J., PAYNE, J., MANJI, H.K. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. **Psychopharmacol Bull.**, 36, 35-83, 2002.

ZOMKOWSKI, A.D.E., HAMMES, L., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **NeuroReport**, 13, 387-391, 2002.

ZOMKOWSKI, A.D.E., ROSA, A.O., LIN, J., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.**, 1023, 253-263, 2004.

ZOMKOWSKI, A.D.E., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Putrescine produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**, 30, 1419-1425, 2006.