

IVALDO JESUS LIMA DE OLIVEIRA

**O PAPEL DA VITAMINA C NA ANSIEDADE E MEMÓRIA EM DOIS ESTUDOS:
NA COGNIÇÃO EM HUMANOS ESCOLARIZADOS E NO
COMPORTAMENTO DE ANIMAIS CRESCIDOS
EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

BRASÍLIA, 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS A SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IVALDO JESUS LIMA DE OLIVEIRA

**O PAPEL DA VITAMINA C NA ANSIEDADE E MEMÓRIA EM DOIS ESTUDOS:
NA COGNIÇÃO EM HUMANOS ESCOLARIZADOS E NO
COMPORTAMENTO DE ANIMAIS CRESCIDOS
EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof^o Dr^o Sérgio Leme da Silva

Brasília

2014



IVALDO JESUS LIMA DE OLIVEIRA

**O PAPEL DA VITAMINA C NA ANSIEDADE E MEMÓRIA EM DOIS ESTUDOS:
NA COGNIÇÃO EM HUMANOS ESCOLARIZADOS E NO
COMPORTAMENTO DE ANIMAIS CRESCIDOS
EM AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 08 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Leme da Silva (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Nelson Torro Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba – UFP

Prof. Dr. Francisco Dyonisio Cardoso Mendes (Examinador Externo)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Joaquim Pereira Brasil Neto (Examinador Interno)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Valdir Filgueiras Pessoa (Examinador Interno)
Universidade de Brasília – UnB

Marília Barros (Examinador Suplente)
Universidade de Brasília – UnB

*Dedico este trabalho a três jóias raras,
que iluminam a minha vida:
minha Lindinha esposa Alessandra,
meu amado filho Lucas Vinícius e
minha doce amada filha Júlia Ronchi.
E também aqueles que me deram a vida:
Luiz Neto (in memoriam) e
Maria de Jesus, 83 anos e há 8 anos diagnosticada
com a doença de Alzheimer,
que me ensinaram duas coisas: amar a Deus
e nunca desistir de nada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo seu imenso amor. Para Deus nada é impossível.

Aos membros da família Oliveira que sempre me incentivaram e acreditaram que eu seria capaz de alcançar o meu objetivo.

Aos membros da família Ronchi que souberam entender a minha ausência em alguns momentos festivos.

Ao meu orientador o Prof^o Dr. Sérgio Leme da Silva, que soube me ajudar nos momentos mais difíceis, me apoiou e me incentivou, com profissionalismo e paciência, que possibilitaram a conclusão deste trabalho. Agradeço também pela sua amizade. Muito obrigado.

Ao estudante do curso de graduação em psicologia da UnB Victor Vasconcelos de Souza, que disponibilizou o seu tempo para a execução dos experimentos no Centro Universitário de Brasília (UniCEUB/LABOCIEN), bem como pelas inúmeras colaborações nos artigos.

Ao Prof^o Dr. Carlos Tomaz por ter compartilhado do seu conhecimento com sugestões e incentivos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof^o Dr. Vitor Augusto Motta Moreira pelas sugestões e comentários.

Aos Professores da banca Prof^o Dr. Nelson Torro Alves, Prof^o Dr. Joaquim Pereira Brasil Neto, Prof^o Dr. Valdir Filgueiras Pessoa, Prof^o Dr. Francisco Dyonisio Cardoso Mendes e a Prof^a Dr^a Marília Barros, agradeço pelas sugestões e colaboração para engrandecimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Francisco de Assis Rocha Neves Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde-PGCS, pela ajuda principalmente no início do curso.

À equipe da Secretaria do PGCS Jaqueline de Almeida Souza, Edigrês Alves de Souza, Ingrid Moscardini Torres e Tamires Cristina Carneiro Pinto pela atenção e pronto atendimento, quando precisei dos serviços da Secretaria.

À equipe multidisciplinar formada pelas psicólogas Aline Maria Lannone Alonso e Jaqueline Lopes Barreiro e pela nutricionista Grazielle Gebrim Santos. Obrigado pela colaboração.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), pelo valioso trabalho na coleta e análise das amostras de sangue dos estudantes.

A Magda Verçosa Carvalho Branco e Antonio Marcos da Conceição pela doação dos animais e permissão para que os experimentos fosse realizados no UniCEUB/LABOCIEN.

Ao estatístico Ms. Guilherme Sousa Rodrigues pelo auxílio nas análises estatísticas e a Rosimeire Aguiar Pereira Lopes pela revisão dos textos em Inglês.

Aos estudantes da UnB que participavam do Grupo Bichos Vivos: Pedro Henrique, Jéssica Felício, Tainã Braúna, Samantha Sousa, Rino Pereira, Letícia Vitorino, Lara Livia, João Paulo e a Dr^a Lucylle Fróis de Melo, pela amizade e carinho que compartilhamos nesta jornada acadêmica. Obrigado pela ajuda.

Ao meu sobrinho Rodrigo Moreira, que ajudou a confeccionar as tampas das caixas de enriquecimento.

Aos amigos do movimento Jovens Organizando e Instituído Amor (JOIA) da Arquidiocese de Brasília pelas orações e incentivos para que ao final tudo desse certo.

À Associação São Vicente de Paula, Lar dos Velhinhos de Taguatinga Sul, através da sua Coordenadora Irmã Marilsa por ter cedido a sala de leitura São José, construída pela Irmã Maria Celina (in memorian). Meus agradecimentos.

Aos funcionários da Biblioteca Machado de Assis de Taguatinga que me incentivaram com alegria e confiança que este trabalho logo seria concluído.

À Secretaria de Estado de Educação do Distrito Federal, pela concessão da Licença Remunerada para Estudo.

À Editage Cactus Communications pela revisão dos manuscritos para a submissão dos artigos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal pela ajuda de custo para a Participação no World Congress on Brain, Behavior and Emotion no Canadá em abril de 2014.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da UnB pela ajuda de custo na revisão do artigo.

Aos estudantes do Ensino Médio de Ceilândia que se ofereceram a participar desta pesquisa. Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado. Que Deus os recompense.

Por todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste sonho, que se tornou realidade, celebrando agora a vitória e confiando ainda mais: "tudo posso naquele que me fortalece".

*"Não sou nada, eu bem sei
Tão pequeno, um grão de areia em suas mãos
Barco a vela, que se abandona
Segue o rumo e vai buscando o alto mar
Assim me encontro diante de ti
Um Deus imenso que por amor se deixa alcançar
Te adorarei meu Deus enquanto eu existir
Proclamarei as maravilhas que fizeste em mim
O teu calor me envolve
O teu olhar me acalma
E em teus braços o teu amor inflama a minha alma
Que posso mais dizer se o coração já disse
Te amo..."*

Deus Imenso/Vida Reluz/Valmir Alencar

RESUMO

A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante que está envolvido na ansiedade, memória, estresse, fadiga, depressão e estado de humor. O estresse oxidativo pode desencadear distúrbios neuropsicológicos e os antioxidantes desempenham um importante papel terapêutico e beneficiam funções cognitivas relacionadas ao processo de envelhecimento. O enriquecimento ambiental promove bem-estar em animais e reduz níveis de ansiedade e déficits de memória. Neste contexto, surge a hipótese que a suplementação de vitamina C poderia influenciar a cognição e potencializar os efeitos comportamentais em animais crescidos em ambiente enriquecido. Adicionalmente, poucos estudos avaliaram a consequência dos efeitos da suplementação de vitamina C sobre a ansiedade e memória em humanos escolarizados, bem como a potencialização de efeitos do enriquecimento ambiental em animais envelhecidos. Assim, dois estudos foram conduzidos. O primeiro examinou os efeitos da suplementação da vitamina C em 42 estudantes do ensino médio, um estudo randomizado, duplo cego, controlado por placebo. Os estudantes foram suplementados com vitamina C (500 mg/dia) ou placebo. As concentrações plasmáticas de vitamina C e a pressão arterial foram medidas antes da intervenção e um dia depois da intervenção e os testes neuropsicológicos de ansiedade e memória foram conduzidos a cada estudante antes e depois de 14 dias de suplementação. Os resultados demonstraram que a vitamina C reduziu os níveis de ansiedade ($p < 0,01$) e conduziu a um aumento da concentração plasmática de vitamina C comparada ao placebo ($p < 0,001$). As médias das frequências cardíacas foram significativamente diferentes entre o grupo vitamina C e o grupo placebo ($p < 0,05$). Ademais, a vitamina C aumentou o score nas tarefas de cópia ($p < 0,05$) e reprodução de memória ($p < 0,001$) das Figuras Complexas de Rey; na memória lógica I ($p < 0,001$) e memória lógica II ($p < 0,001$) e na repetição de dígitos indiretos ($p < 0,05$) da Escala de Memória Weschler, após a intervenção. O segundo estudo investigou os efeitos da vitamina C combinada com um ambiente enriquecido em ratos de meia-idade (14 meses de idade). A metade dos animais foi alojada pós-desmame até 13 meses em um ambiente enriquecido, enquanto a outra metade foi mantida em ambiente padrão. Os animais receberam administração de salina (controle) ou vitamina C (100 mg/kg) 1 hora antes dos testes comportamentais: labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris. A vitamina C reduziu a

ansiedade ($p < 0,001$) e melhorou a memória de referência espacial em relação ao controle ($p < 0,001$). O enriquecimento ambiental aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($p < 0,05$) e melhorou a memória espacial de retenção comparado com o ambiente padrão ($p < 0,01$). O enriquecimento ambiental potencializou o efeito ansiolítico da vitamina C. Estes achados não somente fornecem evidências de que a vitamina C desempenha um importante papel terapêutico sobre estes processos cognitivos em humanos e animais, mas também aponta para o possível uso de antioxidantes na prevenção ou redução dos níveis de ansiedade e déficits de memória. Finalmente, sugere-se que uma dieta rica em vitamina C pode ser um coadjuvante ao tratamento medicinal e psicológico na melhora da ansiedade e memória, bem como um benefício potencial do enriquecimento ambiental sobre o declínio cognitivo relacionado ao processo natural de envelhecimento.

Palavras-chaves: vitamina C; estudantes do ensino médio; ansiedade; memória; enriquecimento ambiental; testes neuropsicológicos e comportamentais.

ABSTRACT

Vitamin C (ascorbic acid) is an antioxidant that is involved in anxiety, memory, stress, fatigue, depression, and mood state. Oxidative stress can trigger neuropsychological disorders and antioxidants play an important therapeutic role and benefit cognitive functions related to the aging process. Environmental enrichment promotes wellness in animals and reduces anxiety levels and memory deficits. In this context, the possibility arises that vitamin C supplementation could influence cognitive and behavioral effects of animals grown in an enriched environment. Furthermore, few studies have assessed the consequence of the effects of vitamin C supplementation on anxiety and memory in schooled humans, as well as the potentiation effects of environmental enrichment in aged animals. Thus, two studies were conducted. The first examined the effects of supplementation of vitamin C in 42 high school students, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Students were supplemented with either vitamin C (500 mg/day) or placebo. Plasma concentrations of vitamin C and blood pressure were measured before intervention and one day after the intervention and neuropsychological tests of anxiety and memory were conducted with each student before and after 14 days of supplementation. The results showed that vitamin C reduced anxiety levels ($p < 0,01$) and led to an increase in plasma vitamin C concentration compared to placebo ($p < 0,001$). Mean heart rates were significantly different between the vitamin C group and the placebo group ($p < 0,05$). Moreover vitamin C increased the score in the tasks of copying ($p < 0,05$) and reproduction of memory ($p < 0,001$) of the Rey Complex Figures, in logical memory I ($p < 0,001$) and logical memory II ($p < 0,001$) and in the repetition of indirect digits ($p < 0,05$) Wechsler Memory Scale, after the intervention. The second study investigated the effects of vitamin C with an enriched environment in middle-aged rats (14 months old). Half of the post-weaning animals were housed during up to 13 months in an enriched environment, while the other half was maintained in a standard environment. The animals received administration of saline (control) or vitamin C (100 mg/kg) 1 hour before behavioral tests: elevated plus maze, and Morris water maze. Vitamin C reduced anxiety ($p < 0,001$) and improved spatial reference memory compared to controls ($p < 0,001$). Environmental enrichment increased the percentage of time spent in the open arms ($p < 0,05$) and improved spatial memory retention compared to the standard environment

($p < 0,001$). Environmental enrichment potentiated the anxiolytic-like effect of vitamin C. These findings not only provide evidence that vitamin C plays an important therapeutic role of these cognitive processes in humans and animals, but also indicates the possible use of antioxidants in preventing or reducing the levels of anxiety and memory deficits. Finally it is suggested that a diet rich in vitamin C could be an adjunct to medical and psychological treatment in improving anxiety and memory, as well as a potential benefit of environmental enrichment on cognitive decline related to the process of natural aging.

Keywords: vitamin C; high school students; anxiety; memory; environmental enrichment; neuropsychological and behavioral tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biossíntese de L-ácido ascórbico.....	25
Figura 2. Oxidação do ácido ascórbico	27
Figura 3. Labirinto em cruz elevado	45
Figura 4. O conceito de reconsolidação da memória	48
Figura 5 . Classificação da Memória	51
Figura 6. Memória de longo prazo e estruturas cerebrais	53
Figura 7. Labirinto aquático de Morris	56
Figura 8. Deficiência de vitamina C no cérebro	63
Figura 9. Fluxograma dos participantes	87
Figura 10. Centro de ensino médio de Ceilândia	89
Figura 11. Figuras Complexas de Rey	94
Figura 12. Box plots dos escores de ansiedade.....	101
Figura 13. Linha do tempo do protocolo experimental	111
Figura 14. Ambiente padrão e ambiente enriquecido.....	113
Figura 15. Teste no labirinto em cruz elevado.....	114
Figura 16. Teste no labirinto aquático de Morris	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alimentos selecionados como fonte de vitamina C	26
Tabela 2. Características demográficas da amostra	97
Tabela 3. Distribuição de frequências das variáveis de descrição dos estudantes ...	98
Tabela 4. Recordatório nutricional dos estudantes	99
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos estudantes	100
Tabela 6. Desempenho dos estudantes nos testes neuropsicológicos de ansiedade e memória pré e pós-tratamento com vitamina C ou placebo.....	102
Tabela 7. Efeitos do ácido ascórbico ou salina em ratos de meia-idade crescidos em ambiente enriquecido ou ambiente padrão submetidos ao LCE.....	118
Tabela 8. Efeitos do ácido ascórbico ou salina em ratos de meia- idade crescidos em ambiente enriquecido ou ambiente padrão submetidos ao LAM	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** – Ácido ascórbico
- AI** – *Adequate Intake*, ingestão adequada
- AP** – Ambiente padrão
- B2 (Bcl-2)** – Linfoma de células
- BAI** – Inventário de Ansiedade Beck
- CAP** – Controle em ambiente padrão
- CEA** – Controle em enriquecimento ambiental
- CAT** – catalase
- CI** – Controle isolado
- CM** – Subteste controle mental da WMS
- CPVC** – Concentrações plasmáticas de vitamina C
- CS** – Controle social
- DA** – Doença de Alzheimer
- DD** – Subteste de repetição de dígitos diretos da WAIS
- DHA** – ácido desidroascórbico
- DI** – Subteste de repetição de dígitos indiretos da WAIS
- DRIs** – *Dietary Reference Intakes*, Ingestão Dietética de Referência
- EA** – Enriquecimento ambiental
- EAP+AA** – Experimental em ambiente padrão mais ácido ascórbico
- EAR** – *Estimated Average Requirement*, média estimada
- EEA+AA** – Experimental em enriquecimento ambiental mais ácido ascórbico
- FC** – Frequência cardíaca
- FCRC** – Figuras Complexas de Rey Cópia
- FCRM** – Figuras Complexas de Rey Memória
- G6PD** – desidrogenase de glicose-6-fosfato
- GPx** – glutaciona peroxidase
- GSH** – glutaciona redutase
- GSK-3 β** – glicogênio sintase-quinase-3 β
- GST** – glutaciona-s-transferase
- IDR** – Ingestão Diária Recomendada
- IN-OR** – Subteste de informação e orientação da WMS
- LAM** – Labirinto Aquático de Morris

- LCE** – Labirinto em Cruz Elevado
- LPO** – nível de peroxidação lipídica
- MDA** – malondialdeído
- ML1** – Subteste de memória lógica imediata da WMS
- ML2** – Subteste de memória lógica tardia da WMS
- NMDA** – N-metil-D-aspartato
- NMDAR** – N-metil-D-aspartato receptor
- NRP** – Programa de Reabilitação Neuropsicológica
- PAD** – Pressão arterial diastólica
- PAF1** – Subteste de aprendizagem imediata de pares de fácil associação da WMS
- PAF2** – Subteste de aprendizagem tardia de pares de fácil associação da WMS.
- PAS** – Pressão arterial sistólica
- RDA** – *Recommended Dietary Allowance*, ingestão diária recomendada
- RDC** – Resolução da Diretoria Colegiada
- SE** – ambiente padrão
- SOD** – superóxido dismutase
- STZ** – Streptozotocin
- SVCT2** – Transportadores de vitamina C dependente de sódio-2
- UL** – *Tolerable Upper Intake Level*, ingestão tolerável sem que haja efeitos adversos à saúde
- TEPT** – Transtorno de estresse pós-traumático
- WMS** – Escala de Memória Wechsler

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	VITAMINA C.....	22
1.1.1	Propriedades e Funções	24
1.1.2	Biodisponibilidade.....	29
1.1.3	Antioxidantes.....	34
1.1.4	Efeito neuroprotetor.....	36
1.2	PROCESSOS COGNITIVOS E EMOCIONAIS.....	38
1.2.1	Conceito de ansiedade.....	38
1.2.2	Transtorno de ansiedade.....	39
1.2.3	Ansiedade e desenvolvimento humano.....	42
1.2.4	Modelos animais de ansiedade	43
1.2.5	Formação da memória	46
1.2.6	Sistemas de memória em humanos	50
1.2.7	Sistema de memória em animais	54
1.2.8	Desenvolvimento da capacidade mnemônica da infância ao envelhecimento	58
1.2.9	A vitamina C e o desenvolvimento das funções cognitivas	62
1.3	PLASTICIDADE CEREBRAL, COGNIÇÃO E COMPORTAMENTO.....	64
1.3.1	Desenvolvimento Neural e Cognitivo.....	68
1.3.1.1	Comprometimento cognitivo leve ou declínio cognitivo	69
1.3.1.2	Declínio cognitivo em modelos animais.....	70
1.3.1.3	Reserva cognitiva e escolaridade como aprimoramento cognitivo em humanos.....	70

1.3.1.4	Enriquecimento ambiental como aprimoramento cognitivo e comportamental em animais	74
2	OBJETIVOS	81
2.1	GERAIS.....	81
2.2	ESPECÍFICOS	81
3	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	82
4	ESTUDO 1: EFEITOS DA VITAMINA C EM SERES HUMANOS ESCOLARIZADOS SOBRE A ANSIEDADE E MEMÓRIA	83
4.1	MÉTODOS	86
4.1.1	Participantes.....	86
4.1.2	Critério de Inclusão.....	86
4.1.3	Critério de Exclusão	86
4.1.4	Local da pesquisa.....	88
4.1.5	Perfil da equipe multidisciplinar	89
4.1.6	Perfil da equipe do LACEN-DF.....	90
4.1.7	Compostos	90
4.1.8	Procedimentos experimentais	90
4.1.8.1	Aferição da pressão arterial.....	91
4.1.8.2	Coleta de sangue e procedimentos laboratoriais.....	92
4.1.9	Testes neuropsicológicos	92
4.1.9.1	Ansiedade: Inventário de Ansiedade de Beck	92
4.1.9.2	Memória: Figuras Complexas de Rey	93
4.1.9.3	Memória: Escala de Memória Weschler	94
4.1.10	Análise estatística.....	96
4.2	RESULTADOS.....	97

	19
4.2.1 Características descritivas da amostra.....	97
4.3 DISCUSSÃO	103
4.4 CONCLUSÃO	108
5 ESTUDO 2: EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE A ANSIEDADE E MEMÓRIA EM RATOS CRESCIDOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO	109
5.1 MÉTODOS	111
5.1.1 Animais.....	111
5.1.2 Compostos e procedimentos experimentais.....	112
5.1.3 Enriquecimento ambiental	112
5.1.4 Labirinto em cruz elevado	113
5.1.5 Labirinto aquático de Morris	114
5.1.6 Análise estatística.....	116
5.2 RESULTADOS	117
5.2.1 Teste no labirinto em cruz elevado.....	117
5.2.2 Teste no labirinto aquático de Morris.....	118
5.3 DISCUSSÃO	120
5.4 CONCLUSÃO	124
6 DISCUSSÃO GERAL	125
7 CONCLUSÕES FINAIS.....	127
8 RECOMENDAÇÕES FINAIS	128
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	129
REFERÊNCIAS.....	130
ANEXOS	176

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA EM SERES HUMANOS	177
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA COM PESQUISA COM O USO DE ANIMAIS	179
ANEXO C – TERMO DE CONCORDÂNCIA DA COLETA DE SANGUE.....	182
ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	185
ANEXO E – AUTORIZAÇÃO PARA A COLETA DE DADOS.....	188
ANEXO F – DADOS PESSOAIS PARA A COLETA DE SANGUE	190
ANEXO G – DECLARAÇÃO DE COMPARECIMENTO.....	192
ANEXO H – ESCALA DE ANSIEDADE DE BECK.....	194
ANEXO I – ESCALA DE MEMÓRIA WESCHLER	196
ANEXO J – DADOS PESSOAIS E SOCIOECONÔMICOS.....	201
ANEXO K – ESTADO DE SAÚDE FÍSICA E MENTAL	203
ANEXO L – RECORDATÓRIO ALIMENTAR	205
ANEXO M – E-MAIL E CARTA DE ACEITE DO ARTIGO.....	207
ANEXO N – CÓPIA DA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO	211

1 INTRODUÇÃO

A vitamina C ou ácido ascórbico (AA) é um antioxidante essencial para a saúde humana (1). Apesar de ter sido descoberta e caracterizada no século XVII, este micronutriente continua sendo alvo de investigação na comunidade científica e desperta interesse pelas suas ações em diversos processos fisiológicos, neurobioquímicos, neuropsicofarmacológicos e medicinais, e também de algumas controvérsias (1-5).

Embora um número crescente de pesquisas tenha surgido, nas últimas décadas, na busca pelo entendimento do possível papel terapêutico desta vitamina, em distúrbios neuropsicológicos e déficits de memória, através de sua ação como antioxidante (6, 7), poucos estudos foram conduzidos para avaliar a consequência dos efeitos da suplementação de vitamina C sobre a ansiedade e memória em humanos escolarizados, bem como sua associação com o enriquecimento ambiental em animais envelhecidos.

De forma prévia, apresentamos uma fundamentação teórica a esta pesquisa abordando os aspectos estruturais, bioquímicos, funcionais e neuroprotetor desempenhado pela vitamina C e sua influência nos processos cognitivos e emocionais tais como, ansiedade e memória em humanos e modelo animal. A plasticidade cerebral, cognição e comportamento, bem como o desenvolvimento neural em humanos e modelo animal, também são temas aqui abordados. Adicionalmente, descrevemos a relação da reserva cognitiva e a escolaridade como aprimoramento cognitivo em humanos e a participação do enriquecimento ambiental em processos cognitivos e comportamentais em animais.

Em seguida realizamos uma intervenção experimental em humanos escolarizados, avaliados antes e depois da suplementação de vitamina C, através de uma bateria de testes neuropsicológicos de ansiedade e memória. Com a finalidade de dar maior crédito as hipóteses testadas nos humanos, conduzimos outra intervenção da vitamina C em modelo animal, acrescido de enriquecimento ambiental, sugerindo analogia do valor da escolarização e do uso da vitamina C, bem como avaliar o seu papel sobre a ansiedade e memória em humanos e animais.

1.1 VITAMINA C

As vitaminas foram, a meu ver, teoricamente desinteressantes. “Vitamina” significa que a pessoa tem que comer. O que se tem que comer é a primeira preocupação do chefe de cozinha, não para o cientista. Albert Szent-Györgyi (1963).

Esta célebre frase pronunciada pelo húngaro Albert Szent-Györgyi deu início a um amplo campo de investigação do papel destes micronutrientes chamados de vitaminas, que fazem parte do espectro nutricional e exercem inúmeras funções essenciais para a saúde humana.

A deficiência de vitamina C causa o escorbuto, uma das mais antigas doenças conhecidas da humanidade. Existem evidências da sua existência no Antigo Testamento, nos papiros de Ebers e na escrita de Plínio (8). Provavelmente esta doença apareceu nos hieróglifos Egípcios cerca de 3.000 BC, também foi descrita por Hipócrates no século V BC (9).

Durante a Idade Média, o escorbuto era endêmico no norte da Europa e no final do século XVII tornou-se um problema grave entre os marinheiros nas longas viagens de exploração (9). Estes homens se alimentavam de carne de charque, pão e rum, mas não ingeriam frutas e verduras. Por esta razão, muitos apresentavam sintomas como comprometimento das articulações, dos dentes, inflamações das gengivas e hemorragias em decorrência das rupturas dos vasos sanguíneos da boca, além das injúrias acometidas no sistema imunológico, que conduziam estes marinheiros à morte (10).

Com a publicação de “Treatise of the Scurvy”, em 1753, o médico naval James Lind demonstrou que seria fácil tratar o escorbuto. No seu experimento, conduzido em 12 pacientes, divididos em seis grupos, cada grupo recebeu tratamentos diferentes: cidra, vinagre, água do mar ou frutas cítricas. Os resultados encontrados indicaram que as frutas cítricas melhoraram os sintomas destes pacientes. A partir destes achados, James Lind passou a receitar laranjas e limões para a cura do escorbuto (10).

As pesquisas se intensificaram na busca de identificar o princípio antiescorbuto. Albert Szent-Györgyi (1928) isolou pela primeira vez uma substância reduzida a seis carbonos com a fórmula $C_6H_8O_6$ (11) caracterizada estruturalmente

por Waugh e King (12). Ele chamou esta molécula de “ignose”, termo derivado da combinação do ignosco do latim, que significa “não sabe” com o sufixo padrão para açúcares “ose”. Depois ele resolveu mudar o nome desta substância, para fins de publicação, para “ácido hexurônico”, porque esta molécula possuía seis átomos de carbono e apresentação propriedade ácida. O ácido hexurônico estava presente como um fator em muitas frutas e vegetais frescos (6).

Os laboratórios de Albert Szent-Györgyi e King, independentemente, confirmaram que a substância analisada apresentava propriedades no combate ao escorbuto e Szent-Györgyi deu o nome a esta substância de ácido ascórbico, recebendo o prêmio Nobel em 1937, por esta descoberta. Esta vitamina foi pela primeira vez sintetizada por Haworth e Hirst (13). Em 1938, o ácido ascórbico foi oficialmente denominado pelo nome químico de vitamina C (14).

Franz, Sands e Heyl (15) observaram efeito positivo da vitamina C, quanto à prevenção do resfriado comum. Estes pesquisadores obtiveram 4.6% menos incidência de resfriado para o grupo tratado com a vitamina C (com ou sem bioflavonóide) do que o grupo placebo ou bioflavonóide sozinho 14/44 versus 15/45, testados 15 anos mais tarde por Pauling (16).

O grande defensor da vitamina C foi o cientista Linus Pauling (1901-1994), vencedor do Prêmio Nobel de Química, principalmente pela obra “*A Natureza das Ligações Químicas*” (1954) e Prêmio Nobel da Paz (1962) por participar ativamente de manifestações contra testes nucleares, o uso de bombas atômicas como armas de guerra e a construção de usinas nucleares. Com a publicação do livro: “*Vitamin C and the Common Cold*” foi inaugurada uma controvérsia sobre o papel da vitamina C na prevenção contra a gripe e resfriados e também câncer (17).

Em seu estudo de 1971, Linus Pauling também discutiu outros quatro estudos duplo-cegos que demonstraram o efeito do ácido ascórbico ingerido regularmente, em doses maiores que 100 mg/dia, em comparação ao grupo placebo. Três outros trabalhos apresentaram efeito positivo para a vitamina C na prevenção do resfriado comum: Ritzel (18), Cowan, Diehl e Baker (19), com diminuição de 45% e 31%, respectivamente, na incidência de resfriado comum; e Wilson e Loh (20), que demonstraram uma redução significativa na incidência, duração e severidade de sintomas de resfriados pelo ácido ascórbico.

Assim, Linus Pauling concluiu que a ingestão de 1,000 mg de ácido ascórbico, diariamente, diminui a incidência de resfriado em cerca de 45% e a morbidade em 63%. Ademais, um pequeno efeito protetor (não estatisticamente significativo) é apresentado quando a gripe é induzida por inoculação com vírus em suspensão (16).

A controvérsia continuava e Linus Pauling mantinha sua postura diante da defesa em favor da vitamina C. Desta forma tornaram-se necessárias maiores investigações na tentativa de desvendar o mistério do efeito da vitamina C sobre a gripe e o resfriado comum.

Além de suas ações importantes para o metabolismo dos seres humanos, a vitamina C apresenta também funções farmacológicas de grande interesse científico e acadêmico. Existe uma extensa abordagem na literatura da aplicabilidade dessa vitamina no tratamento de uma variedade de doenças, e ainda a vitamina C é aceita por muitos como um comprimido que pode fazer milagres (5).

1.1.1 Propriedades e Funções

A biossíntese de L-ácido ascórbico em vegetais e animais é proveniente da D-glicose ou D-galactose, mas, devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, porcos da guiné, as cobaias, os morcegos frutívoros, macacos e humanos não podem sintetizar ácido ascórbico (1) (Figura 1). Porém, outros mamíferos sintetizam a vitamina C a partir da glicose no fígado, enquanto anfíbios, répteis e aves sintetizam nos rins (21). O nome químico do L-ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) é 2-oxo-L-trio-hexano-1,4-lactona-2,3-enadiol (21).

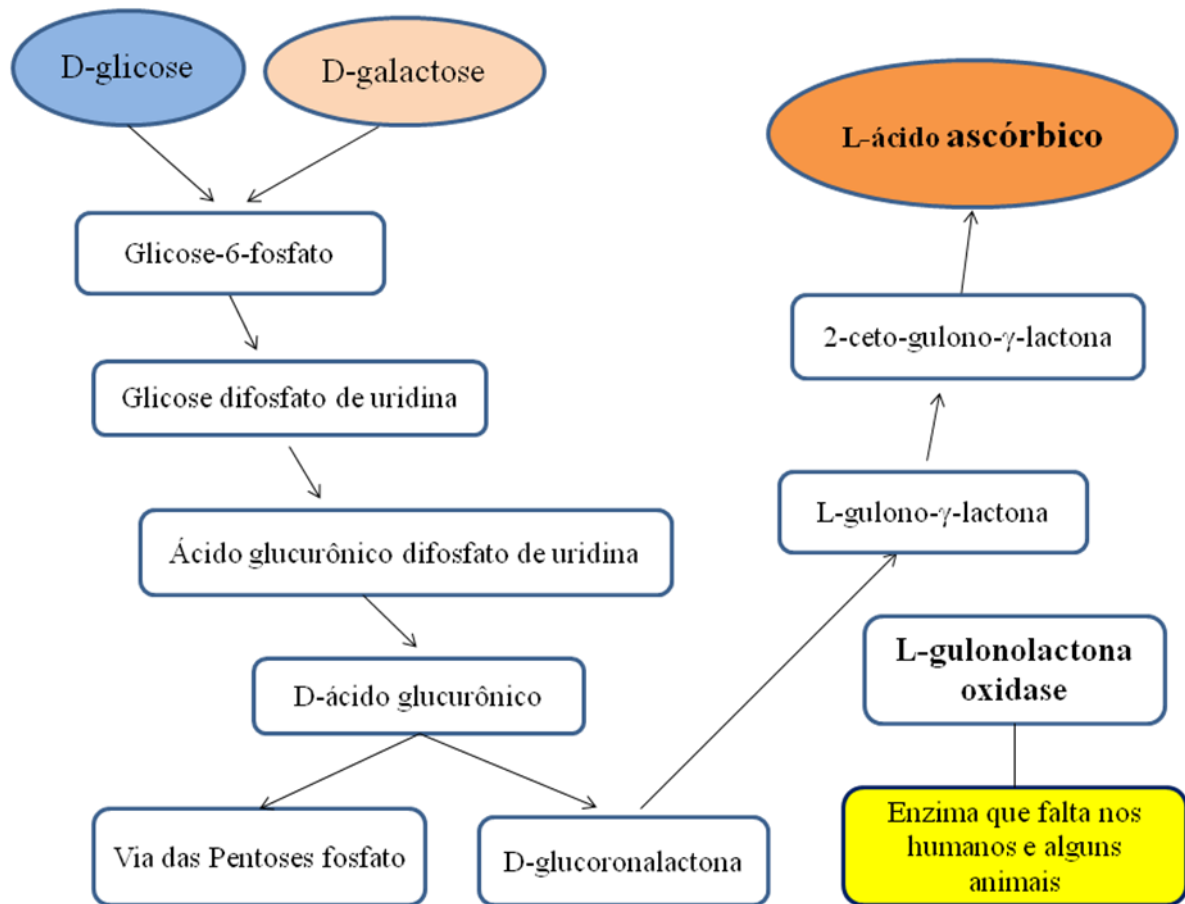


Figura 1. Biossíntese de L-ácido ascórbico Fonte: Adaptado de Naidu (1).

Os seres humanos necessitam ingerir vitamina C através das diversas fontes de alimentos disponíveis na natureza como frutas e legumes frescos (laranja, limão, uva, melancia, mamão, morango, melão, manga, abacaxi, framboesas, cerejas, acerola, caju e goiaba), vegetais folhosos verdes, tomates (brócolis, pimentões verdes e vermelhos, couve flor e repolho) ou como suplementação na forma de comprimidos (1, 22, 23) (Tabela 1).

A tabela a seguir apresenta alimentos selecionados que contêm vitamina C, com adaptações.

Tabela 1 – Alimentos selecionados como fonte de vitamina C

Frutas ⁽¹⁾	Vitamina C ^(*)	Vegetais ⁽¹⁾	Vitamina C ^(*)
Banana	8 – 16	Cebola	10 – 15
Maça	3 – 30	Tomate	10 – 20
Manga	10 – 15	Berinjela	15 – 20
Abacaxi	15 – 25	Rabanete	25
Cereja	15 – 30	Espinafre	35 – 40
Mamão papaya	39	Repolho	30 – 70
Laranja	30 – 50	Couve-flor	50 – 70
Uva	30 – 70	Broccoli	80 – 90
Limão	40 – 50	Coentro	90
Morango	40 – 70	Pimenta	150 – 200
		Salsa	200 – 300
Frutas ⁽²⁾			
Acerola	1.369		
Caju	219		
Goiaba	218		
Laranja (suco)	54		

^(*) mg/100 g de porção comestível

Fontes: ⁽¹⁾ (1)

⁽²⁾ (22, 23)

A vitamina C é um ácido fraco de seis carbonos com um pK 4.2 e peso molecular de 176.13 Daltons (24). Esta molécula é ionizada em pH fisiológico, contendo dois grupos ácidos ionizados (pK_a 4.04 and 11.34). Em solução aquosa é um poderoso agente redutor, apresentando um potencial redox em torno de 0.05 V em 30°C e pH 7.4. Quando submetido à oxidação, é prontamente reversível para ácido dehidroascórbico que pode por sua vez ser irreversivelmente hidrolisado para ácido dicetogulônico (3) (Figura 2).

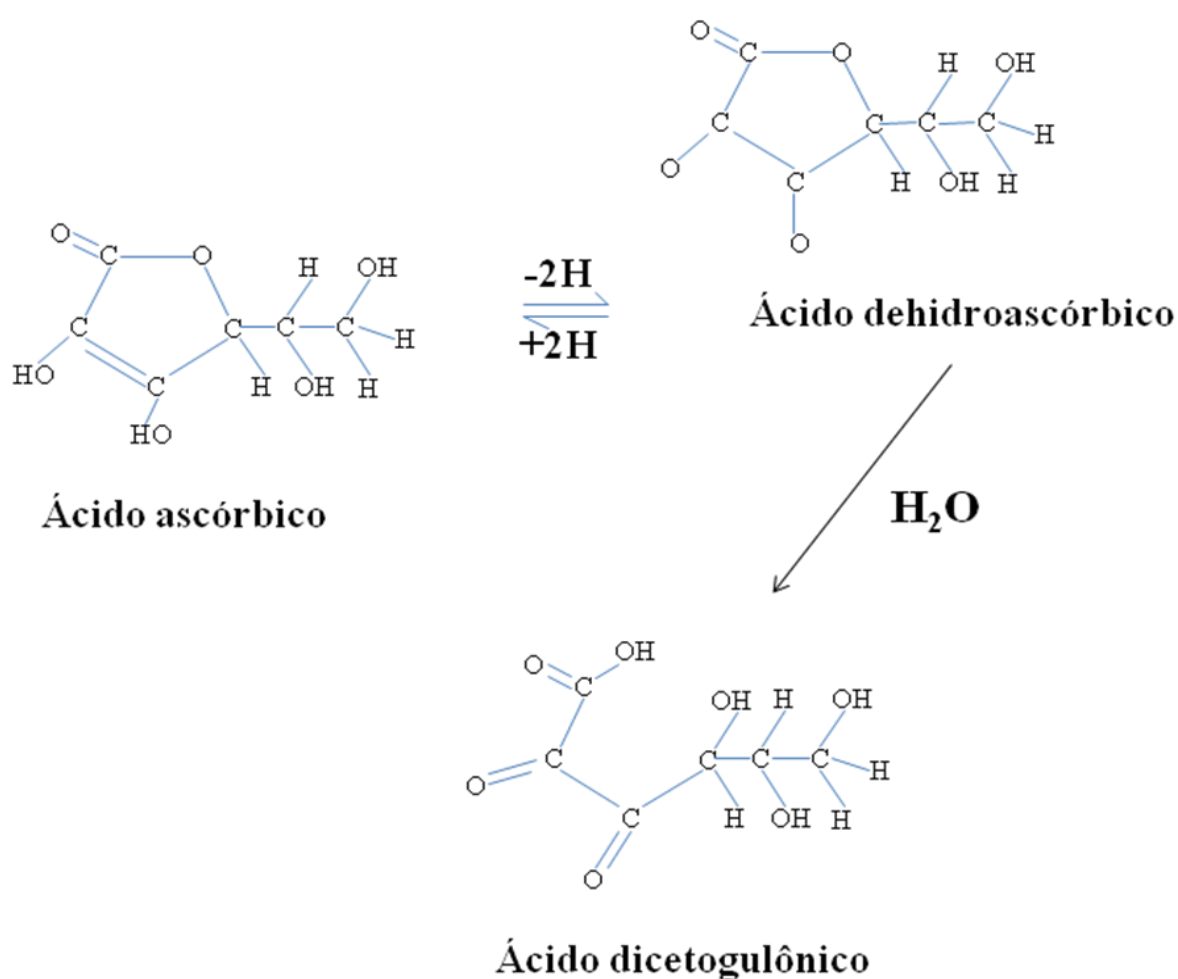


Figura 2. Oxidação do ácido ascórbico. Fonte: Adaptado de Grünewald (3).

A vitamina C está presente nos alimentos sob duas formas: a forma reduzida (ácido ascórbico) e a forma oxidada (ácido dehidroascórbico) os quais são encontradas nos tecidos orgânicos sob a forma ativa (14). Suas ações no corpo humano estão relacionadas com ambos os lados da reação de oxido-redução. Quando se oxida dá origem ao ácido dehidroascórbico, pela retirada de dois átomos de hidrogênio (ação oxidante). Quando é reduzida forma novamente o ácido ascórbico através do acréscimo de dois átomos de hidrogênio (25).

O ácido ascórbico é uma substância cristalina de sabor ácido, insolúvel em maior parte dos solventes orgânicos, é solúvel em água na proporção de 1 g em 3 ml. Ambientes quentes, exposições ao ar e meio alcalino aumentam o processo de oxidação da vitamina C, principalmente se o nutriente (alimento) estiver em contato com enzimas oxidativas, como o cobre ou ferro (26).

A vitamina C encontra-se distribuída em alguns tecidos do organismo como na glândula suprarenal, hipófise, retina (1 a 2 mg/g), fígado, pulmões, pâncreas e leucócitos (0,1 a 1 mg/g). Nos rins, músculos e eritrócitos, a quantidade de AA é menor. Contudo, como as reservas totais do organismo humano variam de zero a 3.000 mg, um estoque de 3.000 mg somente será mantido com a ingestão de níveis elevados, maiores do que 1 g/dia (26).

Esta vitamina possui diversas funções biológicas. Dentre elas participa da catálise através da doação de elétrons para cofatores de íons metálicos de enzimas hidroxilase, além de ser importante para a conversão de determinados resíduos de prolina e lisina, facilitando o processo de hidroxiprolina e hidroxilisina no desencadeamento da síntese de colágeno e de outros processos pós-translacionais (27).

Adicionalmente, o AA está envolvido na oxidação de proteínas das cadeias laterais de lisina com a finalidade de promover a hidroxitrimetilisina para a síntese de carnitina, a conversão de ácido fólico em ácido folínico, bem como a conversão de dopamina para noradrenalina (27). Ademais, participa também da absorção de ferro e foi observado que a vitamina C supera o efeito inibitório de quelantes de metal forte (ácido fítico) que possui a propriedade de reduzir a biodisponibilidade de ferro. Este efeito pode explicar porque esta molécula é considerada um potente agente que aumenta a absorção de ferro (28).

Finalmente, a vitamina C participa de uma variedade de reações fisiológicas (6, 29). Além de atuar como um cofator para importantes reações de hidroxilação, importantes para a síntese de carnitina, colágeno e catecolaminas (29). Na síntese de dois neurotransmissores importantes, como a serotonina e norepinefrina (1, 24). Esta vitamina é essencial para a conversão de triptofano a 5-hidroxitriptofano e de norepinefrina a partir de dopamina (1, 24).

O AA em pH fisiológico é um ânion monovalente e sua forma endógena existe como ascorbato (7). No cérebro de humanos, o acúmulo de ascorbato é proveniente do fornecimento de sangue, sendo mantido a uma concentração de milimolar, relativamente elevada, sobre diversas condições (3, 6; 30, 31). O ascorbato pode ajudar a prevenir o estresse oxidativo, e tem sido apontado com potencial agente terapêutico contra uma variedade de doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (4, 32).

1.1.2 Biodisponibilidade

A vitamina C presente nos alimentos é facilmente disponível e absorvida por transporte ativo no intestino delgado (33). A média de absorção em adulto tem um pico corporal de 1,2 - 2,0 g de ácido ascórbico, que pode ser mantido com ingestão de 75 mg/d de ácido ascórbico (34). Os principais metabólitos de ácido ascórbico em humanos são os ácidos: dehidroascórbico, 2,3-dicetogulônico e oxálico. A principal via de eliminação do ácido ascórbico e seus metabólitos é através da urina. Esta excreção é inalterada quando altas doses de ácido ascórbico são consumidas. A vitamina C não é tóxica, mas em altas doses (2 a 6 g/dia) pode causar distúrbios gastrointestinais ou diarreia (35, 36), contudo, não existe nenhuma evidência científica demonstrada, em seres humanos de que a ingestão de doses muito altas de vitamina C seja tóxica ou apresente efeitos adversos graves à saúde (36, 37).

Os valores de referência para ingestão de nutrientes de indivíduos e grupos, estabelecidas em conjunto pelos Estados Unidos e Canadá, conhecidas como Dietary Reference Intakes (DRIs), traduzidas como Ingestão Dietética de Referência (IDRs), são, portanto, valores de referência da população destes dois países e

publicadas no período de 1997 à 2004. As DRIs vieram substituir as antigas Recommended Dietary Allowances (RDAs) e Dietary Standards/Recommended Nutrient Intakes (RNIs), padrões de referência dos EUA e Canadá, respectivamente. Elas foram propostas com o objetivo de não somente nortear a prevenção de deficiências nutricionais, mas também visando a diminuição do risco de doenças crônicas não transmissíveis, além de fornecer limites superiores para que se possa ingerir nutrientes evitando os riscos de efeitos adversos provenientes de um consumo excessivo destes nutrientes (38).

Assim, as DRIs consistem num conjunto de quatro valores de referência de ingestão de nutrientes, que incorporam as recomendações dietéticas: necessidade média estimada (Estimated Average Requirement–EAR), ingestão dietética recomendada (Recommended Dietary Allowance - RDA), ingestão adequada (Adequate Intake - AI) e limite máximo de ingestão tolerável sem que haja efeitos adversos à saúde (Tolerable Upper Intake Level - UL) (39, 40).

A necessidade média estimada (EAR) é o valor de ingestão diária de um nutriente que se estima para atender às necessidades de 50% de indivíduos saudáveis de um grupo em determinada faixa etária, condição fisiológica e gênero. A ingestão adequada (AI) representa um valor de ingestão de nutriente, não de necessidade, que provavelmente excede a real necessidade de quase todos os indivíduos saudáveis, dentro de um determinado gênero e estágio de vida. A ingestão dietética recomendada (RDA) é a quantidade do nutriente suficiente para atender à necessidade da maior parte da população, aproximadamente em 97 a 98% dos indivíduos saudáveis de um grupo em determinado estágio de vida e gênero. O limite superior tolerável de ingestão (UL) é o mais alto nível de ingestão habitual do nutriente, que provavelmente não coloca em risco de efeitos adversos, em aproximadamente, todos os indivíduos de um determinado estágio de vida e gênero. Quando a ingestão aumenta acima do UL, aumenta o risco potencial de efeitos prejudiciais à saúde. Desta forma, a vitamina C tem alta probabilidade de ser tolerada biologicamente, o que não significa que este valor seja recomendado (IOM, 39, 40).

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece, na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 269, de 22 de setembro de 2005, que a “Ingestão Diária Recomendada (IDR) é a quantidade de proteína,

vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia.”.

A ingestão diária é estabelecida com base na ingestão habitual de pessoas saudáveis e pretende atender à necessidade da maioria da população (98%), sendo que a ingestão aqui advém do consumo alimentar e não da ingestão de suplementos. Assim, a IDR é uma ferramenta para avaliar a adequação da dieta e/ou alimento em relação ao nutriente em questão e não limitar a ingestão do mesmo (39, 40)

O UL é um parâmetro do *Institute of Medicine*, no qual a ingestão diária recomendada de vitamina C para atender a necessidade de homens de 14 a 18 anos é de 75 mg e acima dessa idade, 90 mg. Já para mulheres, a IDR de 14 a 18 anos é de 65 mg e acima dessa idade 75 mg. Os níveis de UL são estabelecidos com base na observação da presença de efeitos adversos, assim, ingestão abaixo da UL tem baixa probabilidade de efeitos adversos. O estabelecimento do UL surgiu com o crescimento da prática de fortificação de alimentos e do uso de suplementos alimentares dado que este é um valor a partir do qual o risco de toxicidade aumenta progressivamente (38). Portanto, toda suplementação supre a IDR, visto que o valor de IDR considera a ingestão de fontes alimentares e não de suplementos/medicamentos (38).

Sobre a incidência de cálculo renal pela formação de oxalatos em sujeitos predispostos, a literatura mostra que cerca de 75% dos cálculos renais contém cálcio e são normalmente compostos de oxalato de cálcio, porém 5 a 10% deles são compostos por ácido úrico. Existem suposições de que altas doses de vitamina C aumentam a excreção de ácido úrico e de oxalato, e este fato poderia, em tese, facilitar à formação de cálculos renais. Acontece que existem também outros fatores que estão associados ao aumento do risco de formação de cálculos de oxalato de cálcio, como exemplo: a ingestão excessiva de proteína, oxalato e sódio, bem como a ingestão insuficiente de fibras e líquidos, altas temperaturas, além da exposição excessiva ao sol (41).

Apesar de ter sido observada uma correlação entre a ingestão de vitamina C e o oxalato urinário, não há demonstração evidente que comprove que a ingestão de altas doses de vitamina C possa representar um risco na formação de cálculos de

oxalato de cálcio em indivíduos saudáveis. Portanto, alguns relatos de formação de cálculos renais desencadeado pelo consumo excessivo de vitamina C estão associados a indivíduos com nefropatias (36).

Auer et al. (41) utilizou 4 g/dia de AA durante 5 dias e concluíram que a ingestão nessa dose não afetou os principais fatores de risco associados com oxalato de cálcio e formação de cálculos renais. Além disso, grandes doses de vitamina C (1,5 g ou mais) não produzem cálculos renais (42). Evidências indicam que o consumo elevado de vitamina C não aumenta a excreção de oxalato ou induz um aumento potencial na formação de cálculos renais (43, 44, 45). Por fim, nenhum efeito da ingestão de altas doses de ácido ascórbico foi encontrado na excreção de ácido úrico presente na urina, verificada diariamente (46).

Levine et al. (24) relataram que doses moderadas de vitamina C apresentam maior biodisponibilidade, sugerindo que doses compreendidas entre 1.000 e 2.000 mg têm biodisponibilidade mais baixa do que uma dose de 500 mg. Além disso, dados epidemiológicos demonstraram que o consumo de doses de vitamina C > 750 mg diminuem a mortalidade (47). Porém, doses similares > 715 mg, foram associadas com a progressão mais lenta para o desencadeamento de AIDS em homens infectados com o vírus da imunodeficiência humana adquirida-HIV (48). Por outro lado, as doses de vitamina C \leq 100 mg não tiveram efeito sobre o desenvolvimento de câncer (49). Partindo destes e de outros dados epidemiológicos, a ingestão da vitamina C pode variar de < 100 mg para > 750 mg.

Estudos de Aranha et al. (50) revelaram o tempo necessário de suplementação com vitamina C, seja em forma de fármaco (comprimidos) ou na forma natural, presente no suco de acerola (*Malpighia glabra* L.) em idosos institucionalizados e residentes em cinco instituições da Grande João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil, com a finalidade de normalizar os níveis séricos da vitamina C e comparar qual tipo de suplementação teria melhor efeito na população estudada.

Os níveis séricos de ácido ascórbico neste estudo foram compreendidos entre 0,20 a 0,80 mg/dL, que correspondiam ao intervalo entre os limites de carência grave e de normalidade, portanto, estes níveis foram considerados como carência moderada. Já os valores iguais ou acima de 1,60 mg/dL foram descritos como acima do normal. O consumo alimentar foi verificado por inquérito dietético, constatando

um aumento significativo nas médias dos níveis de ácido ascórbico após 10, 20 e 30 dias, comparados aos níveis iniciais. Foi observado que os idosos suplementados com suco de acerola com teor de 500 mg de vitamina C por porção, após 10 dias, apresentaram níveis significativamente mais elevados do que os outros idosos que foram suplementados com 500 mg de vitamina C em forma de comprimidos.

Estes autores concluíram que no 20º dia de suplementação da vitamina C o efeito foi satisfatório para normalizar os níveis séricos dos idosos estudados, sugerindo que este tempo poderia ser utilizado para idosos em geral, e principalmente aqueles com hipovitaminose C que vivem em instituições que abrigam idosos carentes, além de indicar o suco de acerola como um suplemento de fácil aquisição e por ser um produto natural que contém vitamina C.

Em outro estudo desenvolvido por Costa et al. (51) foi avaliada a prevalência da deficiência de vitamina C em 104 crianças de 2 a 6 anos de idade, de creches municipais de João Pessoa, PB. Nesta mesma pesquisa a eficácia da vitamina C foi analisada, através da suplementação das crianças com suco de acerola. Para isto foram realizadas dosagens de vitamina C sérica e de hemoglobina antes e depois da intervenção. Os resultados demonstraram que havia, inicialmente, prevalência de 69,2% de carência de vitamina C ($< 0,80$ mg/dL) e 35,7% de crianças com níveis baixos de hemoglobina ($Hb < 11,0$ mg/dL), indicando anemia. Para aquelas crianças que apresentaram níveis baixos de vitamina C (72 crianças) foram fornecidos, durante 35 dias, suco de acerola com um volume de 150 mL (teor médio 565 mg de ácido ascórbico/100 mL).

Os níveis séricos médios de vitamina C antes e após a suplementação foram de $0,52 + 0,20$ mg/dL e $1,43 + 0,43$ mg/dL, respectivamente, apresentando diferença estatisticamente significativa. Também ocorreu aumento significativo na concentração média de hemoglobina, que era de $11,17 + 1,46$ g/dL passando para $12,22 + 1,52$ g/dL. Assim, tomados juntos, estes resultados indicam que a disponibilidade e o baixo custo da acerola, nesta região, justificariam a proposta de inclusão desta fruta em programas de alimentação para populações de alto risco para a anemia, tendo em vista o teor de vitamina C presente neste alimento.

Em adição foi demonstrado, também, que a suplementação com comprimidos de 200 mg de vitamina C, durante 30 dias, corrigiu satisfatoriamente os níveis séricos de ácido ascórbico de idosos franceses institucionalizados de ambos os sexos (52).

Em uma revisão, Deruelle e Baron (53) relataram que a vitamina C, em dose maior do que 400 mg/dia, pode melhorar a proteção contra o estresse oxidativo, certos tipos de câncer, e doenças degenerativas e crônicas. Além disso, sugere que a suplementação de vitamina C além de ser segura, também é necessária para atingir a saúde ideal. Portanto, de acordo com a literatura atual, estes autores aconselham as pessoas saudáveis a consumirem diariamente cinco porções de frutas e vegetais, adicionados a 1 g de vitamina C, dividida em duas ou três doses durante o dia, a fim de assegurar um ajuste ótimo em vitamina C.

Com base em estudos epidemiológicos têm sido sugerido que a ingestão diária de 100 mg/dia de vitamina C é associado com a redução da incidência de mortalidade provocada por ataques cardíacos, isquemia e câncer (54). Mas é oportuno observar que estresse, hábito de fumar, alcoolismo, febre e infecções virais podem causar um declínio acentuado dos níveis sanguíneos de AA (1).

1.1.3 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que, em baixa concentração, são capazes de retardar o processo oxidativo de proteínas, carboidratos, lípidios e DNA (55), podendo ser classificadas em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. Alguns antioxidantes podem ser sintetizados endogenamente, como enzimas e cofatores enzimáticos. Porém, os antioxidantes não-enzimáticos são obtidos de fontes dietéticas e são classificados como: polifenóis, os quais consistem de ácidos fenólicos e flavonóides. Outras classes de antioxidantes incluem vitaminas, carotenóides, compostos organossulfurados e minerais (56).

As primeiras linhas de defesa antioxidante no sistema biológico incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e alguns

minerais, tais como selênio (Se), cobre (Cu) e Zinco (Zn). Para a segunda linha de defesa antioxidante estão presentes a glutathiona (GSH), vitamina C, vitamina E, albumina, carotenóides e flavonóides. Na terceira linha de defesa encontra-se um complexo grupo de enzimas com a finalidade de reparar o dano ocorrido no DNA, proteínas, oxidação de lipídios e peróxidos como, por exemplo, as enzimas reparadoras do DNA, proteases, lipases, transferases e metionina sulfóxido redutase (55).

Os antioxidantes têm se destacado, nos últimos anos, devido ao seu importante papel como agentes profiláticos e terapêuticos em diversas doenças (56). O estresse oxidativo pode provocar danos celulares e teciduais como consequência do desequilíbrio entre espécie reativa de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes, resultando em uma série de comprometimentos celulares que podem conduzir a diversas patologias, como artrite, asma, carcinogênese, disfunção cardiovascular, cataratas, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, bem como diabetes e outras doenças autoimunes (55).

A vitamina C exerce ação como antioxidante por agir como um doador de elétrons ou como um eficiente sequestrador de radicais livres (7). Apresenta, portanto, efeitos neuroprotetores provenientes de sua ação antioxidante (27).

Estudos têm mostrado que o tratamento com os antioxidantes podem beneficiar as funções cognitivas em animais idosos e em seres humanos (57, 58). Isto pode ser devido ao envolvimento dos antioxidantes na redução do estresse oxidativo combinado com uma maior sensibilidade para a geração de espécies reativas de oxigênio em animais e idosos, o que pode levar à morte da célula e comprometimento cognitivo (59, 60). Kolosava et al. (61) demonstraram que suplementação com antioxidantes a longo prazo atenua déficits cognitivos e marcadores de estresse oxidativo em ratos senescent-accelerated OXYS em comparação com ratos Wistar. No entanto, o mecanismo exato de neuroproteção atribuído aos antioxidantes in vivo e do impacto do estresse oxidativo na disfunção cognitiva continua a ser investigado.

O processo de envelhecimento tem sido muitas vezes associado com o aumento do dano oxidativo, o que conduz à hipótese de que os antioxidantes devem prolongar a vida útil, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo (62). Há especulações sobre a ingestão diária de vitamina C e sua capacidade de retardar o

processo de envelhecimento e aumentar a longevidade (63). AA foi usado como um suplemento em dietas para humanos. No entanto, a sua participação na expectativa de vida em humanos e modelos animais ainda não está claro. Por esta razão, Pallauf et al. (62) avaliaram o efeito de AA no tempo de vida. Estes autores descobriram que alguns estudos sugerem um aumento na expectativa de vida, enquanto outros estudos não mostraram nenhum efeito benéfico do AA sobre a longevidade.

1.1.4 Efeito neuroprotetor

Para acessar o cérebro e vários outros tecidos, a vitamina C tem que ser oxidado a ácido dehidroascórbico, que por sua vez necessita ser transportado por difusão facilitada via transportadores de glicose (GLUT) antes de ser reduzido, no meio intracelular, de volta a ácido ascórbico (30, 64). Desta forma ascorbato é transportado para dentro do cérebro e neurônios via transportadores de vitamina C dependente de sódio-2 (SVCT2), os quais promovem acúmulo de ascorbato dentro das células contra um gradiente de concentração (65, 66).

A vitamina C é altamente concentrada no sistema nervoso central (67), onde possui várias funções: é essencial para a síntese de noradrenalina a partir de dopamina (6), está envolvida na libertação de acetilcolina a partir das vesículas sinápticas de diferentes espécies e de noradrenalina em preparação de vesículas sinápticas do cérebro de ratos (68); exerce ação como um neuromodulador no cérebro, estando envolvido na transmissão glutamatérgica, dopaminérgica, colinérgica e GABAérgica (3, 6, 7). Estudos prévios indicam que a vitamina C previne déficit de memória em decorrência deste efeito antioxidante (69). Em adição, tem sido mostrado que sua aplicação local aumenta a resposta de neurônios dopaminérgicos e glutamatérgicos, portanto, é possível que parte de seus efeitos seja devido às suas funções modulatórias do neurotransmissor glutamato (70).

Existe uma clara relação entre o ácido ascórbico e os sistemas colinérgicos e dopaminérgicos, pois há evidência de que o ácido ascórbico pode se comportar como um antagonista do receptor de dopamina. Ademais, o ácido ascórbico inibe a

ligação de agonistas específicos dos receptores D₁ ([³H]SKF 38393) e D₂ ([³H] N-0437) de dopamina (71).

Tem sido proposto que o ascorbato age como um neuromodulador envolvido nos sistemas glutamatérgicos e dopaminérgicos (3, 6). Embora os mecanismos pelos quais o ascorbato afeta a neurotransmissão não tenha sido bem estabelecida. Acredita-se que isto possa estar relacionado, em parte, pela mudança redox no receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). Esta molécula pode proteger neurônios da excitotoxicidade induzida pela ativação do receptor NMDA e previne injúria celular induzida por glutamato e morte em culturas de células granulares do cerebelo (72, 73). Estes efeitos podem ser devidos à modulação redox do receptor pelo ascorbato (74, 75) ou do direto sequestro de ROS pela ativação do receptor NMDA. Quando ocorre um severo estresse causado por isquemia aumenta a liberação de grande quantidade de ascorbato proveniente de células neuronais (76), os quais são associados com recaptção de glutamato pelas células da glia e neurônios (7, 77). A remoção de glutamato extracelular por este processo estaria também relacionado com a diminuição da excitotoxicidade causada pela ativação de células e receptores de glutamato (3, 6, 76).

Existem projeções ricas de neurônios glutamatérgicos provenientes do córtex para o neostriato. Quando ocorre uma injúria no córtex, interferindo nessa conexão, os níveis basais de ascorbato diminuem no neostriato (6, 78). O aumento dos níveis de ascorbato extracelular que são vistos depois da atividade ou administração de anfetaminas não são uniformes através das diversas áreas cerebrais e possivelmente devem implicar no sistema de troca entre o neurotransmissor glutamato e ascorbato no controle dessas mudanças (79).

Estudos de voltametria *in vivo* da atividade induzida por anfetamina indicam que ocorre um aumento dos níveis de ascorbato no núcleo caudado. Além disso, administração de ambos scopolamina e MK-801 (antagonista clássico do receptor NMDA) diminui o aumento no pico de ascorbato, sugerindo a relação entre a liberação de ascorbato e a estimulação do receptor colinérgico (80).

Diversos resultados de estudos *in vivo* suportam a hipótese da concepção que ascorbato intracelular é crucial para proteção contra estresse oxidativo. Um aumento intracelular de ascorbato em fatias de cérebros de ratos diminuiu o edema induzido por estresse oxidativo (81).

Algumas doenças neurodegenerativas têm sido avaliadas devido a inúmeras evidências do envolvimento do estresse oxidativo em processos cerebrais, observando os aspectos importantes da participação do ascorbato neste contexto (4). Tudo indica que neurônios são especialmente sensíveis à deficiência de ascorbato, talvez porque os neurônios tenham metabolismo oxidativo 10 vezes mais alto do que células da glia (82; 83). Possivelmente, esta sensibilidade neuronal é mais expressiva quando o suprimento de ascorbato é baixo sob certas condições, principalmente quando existe excesso de estresse oxidativo.

A relação do ROS em doenças neurodegenerativas desperta interesse para a busca do entendimento das ações do ascorbato, como um agente antioxidante, pela sua abordagem terapêutica, apesar de sua interação com sistemas de neurotransmissores, ainda é difícil discernir qual seria o específico mecanismos que esteja envolvido em doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer, Parkinson, Huntington e outras e a participação do ascorbato neste circuito neuronal (4).

1.2 PROCESSOS COGNITIVOS E EMOCIONAIS

1.2.1 Conceito de ansiedade

A ansiedade é uma resposta diante da percepção de um perigo ou ameaça que pode ser acompanhada de componentes comportamentais, fisiológicos e cognitivos. Os componentes comportamentais estão relacionados à maneira como evitar a situação que provoca a ansiedade. As reações fisiológicas podem incluir o aumento da frequência cardíaca e sudorese. Os componentes cognitivos estão associados com crenças e pensamentos adversos e uma expectativa de dano (84, 85).

A ansiedade pode ser caracterizada como traço e estado. A ansiedade traço é identificada por diferentes situações e é estável, enquanto a ansiedade estado é transitória, apenas é vivenciada em situações específicas (86). Estes componentes da ansiedade podem ser adaptativos quando expressam sobrevivência ou melhoram

desempenho. Desta forma, por exemplo, a adrenalina é liberada para os indivíduos diante do perigo ou quando ocorre um aumento da atenção para ajudar estudantes em seus exames e tarefas escolares (87).

1.2.2 Transtorno de ansiedade

Os transtornos de ansiedade são um dos tipos mais comuns de doença diagnosticadas na infância, adolescência e idade adulta, incluindo também estudantes do ensino médio. As causas e fisiopatologia não estão completamente esclarecidas. Estudos têm revelado que os transtornos de ansiedade afetam em torno de 28,8% da população dos EUA (88), e correspondem a um custo total de 42,300 milhões dólares (89). Estima-se que um oitavo do total da população mundial sofre de ansiedade inapropriada (90).

Quando a ansiedade se torna persistente, excessiva, e compromete significativamente as atividades da vida diária é classificada como um transtorno mental que pode ser diagnosticada, conforme o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) (91).

A mais nova edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) da American Psychiatric Association foi publicada oficialmente em 18 de maio de 2013. Esta edição é fruto de um trabalho de doze anos de estudos, revisões e pesquisas de campo, que resultou do esforço e dedicação de centenas de profissionais divididos em grupos com diferentes atribuições. A meta final estabelecida foi garantir que esta nova versão abrangesse a inclusão, reformulação e exclusão de diagnósticos, que possibilitaria uma fonte segura e científica com vistas à aplicabilidade em pesquisas, bem como na prática clínica (92).

Nesta nova edição da DSM-5, o capítulo referente ao Transtorno de Ansiedade foi reformulado e os diagnósticos de Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Transtorno de Estresse Agudo e Transtorno de Estresse Pós-Traumático foram realocados em novos capítulos (92).

Os quadros fóbicos conhecidos por Agorafobia, Fobia Específica e Transtorno de Ansiedade Social deixaram de exigir que o indivíduo com mais de dezoito anos identifique seu medo como “medo excessivo ou irracional”, tendo em vista que

diversos pacientes buscam supervalorizar o perigo disponibilizado pelo objeto ou mesmo pelo evento fóbico experimentado. Para o diagnóstico desses transtornos é necessário uma duração mínima de seis meses, não delimitando a idade do paciente, ou seja, para todas as idades (92).

Outros transtornos, tal como o Transtorno de Pânico e a Agorafobia, foram separados como diagnósticos independentes. Isto possibilitou o reconhecimento de casos nos quais a Agorafobia pode aparecer sem a presença de sintomas de pânico. Por sua vez, o Ataque de Pânico pode ser observado como comorbidade em outros transtornos mentais não essencialmente ligados à ansiedade. Este fato levou o DSM-5 à inclusão do Ataque de Pânico como especificador para todos os demais transtornos (92).

A American Psychiatric Association (91) descreve os transtornos de ansiedade especificados abaixo, DMS-5 (2013):

Transtornos de Ansiedade

Transtorno de Ansiedade de Separação

Mutismo seletivo

Fobia Específica

Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social)

Transtorno de Pânico

Ataque de Pânico (especificador)

Agorafobia

Transtorno de Ansiedade Generalizada

Transtorno de Ansiedade induzido por medicamentos/substâncias

Transtorno de Ansiedade devido a outra condição médica

Outro Transtorno de Ansiedade especificado

Transtorno de Ansiedade não especificado

Obsessivo-Compulsivo e Doenças Relacionadas

Transtorno Obsessivo-Compulsivo

Transtorno Dismórfico Corporal

Transtorno entesouramento

Tricotilomania (Transtorno de puxar os cabelos)

Transtorno de Escoriação (Skin-Picking – doença da pele picking)

Transtorno Obsessivo-Compulsivo induzido por medicamentos/substâncias e Transtorno relacionado

Transtorno Obsessivo-Compulsivo e devido a outra condição médica e Transtorno relacionado

Outro Transtorno Obsessivo-Compulsivo especificado e transtorno relacionado

Transtorno Obsessivo-Compulsivo não especificado e transtorno relacionado

Trauma e Transtornos relacionados ao Estresse

Transtorno de Apego Reativo

Transtorno de Engajamento Social Desinibido

Transtorno de Estresse Pós-Traumático

Transtorno de Estresse Agudo

Transtornos de Adaptação

Outro Trauma especificado e Transtorno relacionado ao Estresse

Trauma não especificado e Transtorno relacionado ao Estresse

Uma diversidade de fatores pode desencadear o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade, dentre eles incluem: influência genética, ambiental, familiar, temperamento e estilo cognitivo (93, 94, 95). Transtornos de ansiedade também são associados com uma gama de consequências negativas, tais como: redução da autoestima e da qualidade de vida; aumento do risco de depressão e abuso de substâncias (96-101). Ademais, os transtornos de ansiedade estão envolvidos com ônus econômico substancial devido à participação na força de trabalho e gastos com altos custos medicinais e dependência de assistência médica dos governantes (102, 103, 104).

Pesquisas têm revelado que pessoas diagnosticadas com o TOC apresentam vieses no processamento da informação, ressaltando a atenção (105, 106), memória (107, 108, 109) e vieses de interpretação para informações que representem ameaças (110-113). Além disso, outros estudos identificaram que indivíduos com TOC mostram prejuízo de memória (114, 115, 116); na organização visuoespacial (117, 118, 119), bem como nas funções executivas (120, 121, 122).

1.2.3 Ansiedade e desenvolvimento em humanos

As condições nutricionais do recém-nascido e da gestante estão relacionadas com o peso ao nascer, mensurado na primeira hora após o nascimento, e que indicam condições apropriadas de saúde dos indivíduos, e pode influenciar o crescimento, desenvolvimento e, em longo prazo, também pode indicar as condições de saúde dos adultos (123). Alguns estudos têm apontado que a ansiedade na gestação pode ser considerada um possível fator determinante para a prematuridade e o baixo peso dos bebês ao nascer (124-127).

A ansiedade pode interferir negativamente na gestação devido a mudanças endócrinas e comportamentos de risco, como, por exemplo: o hábito de fumar e ingestão de bebidas alcóolicas pela gestante; pré-natal inadequado ou tardio; ganho de peso gestacional e alimentação inadequada (128, 129). Sintomas de ansiedade são frequentes e prejudiciais às mulheres em idade cronológica propícia à fertilidade. Na verdade, muitas mulheres apresentam quadros de ansiedade no período gestacional (130).

Os transtornos de ansiedade são os tipos mais comuns de psicopatologia encontrados em crianças (131, 132). Estão relacionados a aspectos negativos, social, escolar e ajustamento pessoal. Nem sempre ocorrem de forma passageira e podem persistir na adolescência e na fase adulta, caso não forem adequadamente tratados (133, 134).

Estudos têm revelado que problemas de ansiedade na infância podem desencadear outras formas de psicopatologia, tais como transtornos de conduta, transtornos de humor, depressão e tentativas e concretização de suicídio (135, 136), além de outros problemas sociais, como, por exemplo, dificuldades em resolver problemas, impopularidade e relacionamentos entre casais fragilizados (137, 138, 139). Desta maneira, crianças ansiosas apresentaram menos sucesso para constituir amizades do que aquelas que não manifestavam transtorno de ansiedade, caracterizando que a ansiedade na infância exhibe dificuldades sociais significativas (140, 141).

Os sintomas físicos dos transtornos de ansiedade são provenientes da liberação dos hormônios relacionados com o estresse como adrenalina e cortisol,

pelos quais produzem efeitos sobre a maioria dos órgãos do corpo. Quando os transtornos de ansiedade não são tratados adequadamente, podem conduzir a quadros depressivos, os quais, por sua vez, podem resultar no aumento da pressão arterial, palpitações cardíacas, dor no peito, respiração rápida ou falta de ar, sudorese excessiva, aumento da tensão muscular, bem como irritação e diminuição do fluxo sanguíneo intestinal, provocando náuseas ou diarreia. Pode haver ainda diminuição na atividade sexual. Crianças com quadros de ansiedade podem ter medo de estar distante de seus familiares, não querer mais frequentar a escola, desencadear medo de pessoas estranhas ou medo de dormir ou terem pesadelos recorrentes (142).

1.2.4 Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais de ansiedade podem ser utilizados com a finalidade de contribuir para o entendimento de mecanismos moleculares e na busca de novos agentes farmacológicos, com vista ao tratamento da ansiedade, que possivelmente seria inviável em seres humanos. Modelos animais para avaliação de fatores psicopatológicos têm se tornado uma valiosa ferramenta na análise de uma variedade de causas tanto genéticas, ambientais ou farmacológicas, que estão envolvidas com os sintomas homólogos àqueles apresentados em pacientes com transtornos específicos (143).

A validade do modelo é um critério determinante para o desenvolvimento de modelos animais com a finalidade de estudar fatores psicopatológicos que representem o processo estudado de forma mais real e fidedigna possível. Existem três tipos de parâmetros aplicados para a validade dos modelos animais, como se segue: (1) validade de fase; (2) validade de constructo e (3) validade preditiva (144).

A validade de fase consiste de um modelo fenotipicamente semelhante, que possa emitir respostas detectadas no modelo animal que represente idênticas respostas comportamentais e fisiológicas encontradas nos seres humanos. A validade de constructo está associada com a semelhança entre uma base teórica e lógica, subjacente ao modelo comportamental observado em animais e humanos. Já

a validade preditiva está envolvida na sensibilidade do modelo animal a agentes farmacológicos efetivos na prática clínica. Compostos ansiogênicos devem produzir efeitos opostos, enquanto agentes que clinicamente não apresentam nenhum efeito, também não devem ter efeitos sobre os testes aplicados no modelo animal (144).

Os três tipos de validade podem ser independentes entre si, por exemplo, um modelo animal por ter validade preditiva e de constructo, mas não a validade de face. O modelo ideal seria aquele que apresenta as duas validades (preditiva e constructo) para ser utilizado em pesquisa na busca do entendimento dos mecanismos, da etiologia, bem como dos aspectos biológicos e comportamentais envolvidos na patologia estudada; que pode ser semelhante, tanto em animais como em humanos (144, 145).

Em adição, modelos animais usados na prática experimental podem ser avaliados através de procedimentos laboratoriais em uma espécie específica, com o objetivo de verificar fenômenos que devem ser detectados numa outra espécie, que propiciam identificar possíveis intervenções no tratamento de determinado transtorno que está sendo estudado (146, 147, 148).

Os humanos compartilham cerca de 90% dos seus genes com ratos, portanto, este modelo animal parece ser uma ferramenta biológica importante em estudos relacionados às ciências biomédicas, visto o aumento da quantidade de laboratórios ativos que utilizam ratos em seus protocolos experimentais (146, 147, 149). Adicionalmente, modelos animais auxiliam a avaliação de situações estressantes que não podem ser aplicadas em seres humanos, por inúmeras razões, bem como por comprometimentos éticos (147).

Modelos animais de ansiedade podem ser classificados como respostas condicionadas e respostas não condicionadas (144). O primeiro modelo está associado a respostas condicionadas emitidas pelo animal após eventos estressantes (exposição a choque elétrico) e na maioria das vezes provoca dor no animal; já o segundo modelo inclui paradigmas de base etológica, com um repertório de comportamentos espontâneos e de reações naturais (fuga, esquiva e congelamento), quando o animal é submetido ao estímulo estressante sem a presença explícita de eventos dolorosos, ou que causem desconforto para o animal

no momento do teste (câmaras iluminadas ou exposição ao cheiro do predador) (144).

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais conhecidos modelos etológicos de teste comportamental para avaliar níveis de ansiedade. Foi idealizado inicialmente para ratos por Pellow et al. (150), mas atualmente pode ser utilizado também com outras espécies, tais como camundongos, porcos da guiné, voles, hamsters e gerbils. Outros tipos de labirintos foram desenvolvidos em derivação ao LCE, e incluem labirinto em T elevado, labirinto zero e LCE instável (144).

O LCE é construído sob a forma de uma cruz que tem dois braços abertos, em oposição um ao outro, por uma plataforma central. Os outros dois braços possuem as mesmas dimensões, mas as paredes laterais são fechadas. O labirinto formado é elevado do chão para que os braços abertos possam fornecer um ambiente desconhecido, aberto e elevado. Uma ligeira borda saliente é colocada sobre os braços abertos com a finalidade de proporcionar aderência adicional aos animais, evitando possíveis quedas do labirinto (Figura 3).



Figura 3. Labirinto em cruz elevado

Os ensaios experimentais podem ser gravados com o uso de câmeras de vídeo. No teste, o animal é colocado individualmente sobre a plataforma central do LCE. O número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados podem ser registrados durante o teste com o tempo máximo de 5 min. Cada entrada em um dos braços é definida quando o animal coloca as quatro patas sobre o braço. Após o término de cada teste, o LCE é limpo com uma solução de 10% de etanol (151).

Este paradigma tem como base a aversão natural que roedores emitem a espaços abertos e proporciona conflito entre exploração e aversão a locais abertos e elevados. Perfis comportamentos exibidos no LCE incluem elementos de neofobia, abordagem de exploração e conflito de esquiva. Desta forma, o LCE é referido como um modelo de conflito comportamental espontâneo não condicionado (144), portanto etológico. Em adição, o LCE é sensível aos agentes com propriedades ansiogênicas e ansiolíticas, validado tanto para ratos como para camundongos (152, 153).

A principal limitação para uso de modelos etológicos é a falta de padronização entre os diversos laboratórios de pesquisa. A diversidade é observada em diferentes perfis: alguns modelos utilizam equipamentos quadrados, outros circulares; ambientes claros, outros escuros; ambientes bem iluminados, outros totalmente escuros; alguns são abertos e outros são fechados. O tempo de registro do teste também pode variar de 2 a 20 min, mas geralmente se utiliza 5 min de exposição ao LCE (145).

1.2.5 Formação da Memória

O conceito de memória, descrito por Izquierdo (154), envolve operações de aquisição, formação, conservação e evocação de informações. Nesta definição o termo “aquisição” seria o sinônimo de “aprendizagem”, gravado por ter sido aprendido. Assim, estímulos sensoriais convertidos pela ação neuronal, em código de sinais elétricos e neuroquímicos complexos são reconvertidos durante a evocação, tornando-se compreensíveis pela consciência.

A aprendizagem é definida como uma mudança comportamental, mais ou menos permanente, que acontece devido à prática (155). Segundo Eric Kandel (156), a aprendizagem e a memória são processos contínuos.

“A aprendizagem é o processo pelo qual se adquire conhecimento sobre as coisas em volta do mundo e a memória é o processo pelo qual o conhecimento adquirido deste mundo é codificado, armazenado e, posteriormente, recuperado” (156).

Desta forma, a aprendizagem é o processo que altera o comportamento subsequente, enquanto a memória é a capacidade de recordar os acontecimentos e experiências do passado (157).

No decorrer de mais de um século assumiu-se que memórias adquiridas recentemente permaneciam em um estado dinâmico por um período de tempo bem curto, depois ela era fixada ou consolidada. Pensava-se, portanto, que memórias consolidadas eram persistentes e insensíveis a interrupções (158). Nos últimos 15 anos esta visão clássica da consolidação tornou-se objeto de contestação. Evidências mostram que a recuperação ou reativação de memórias consolidadas voltam a um estado de memória instável. Por sua vez, estas memórias reativadas necessitam ser novamente reestabilizadas (reconsolidação) (159).

Durante este processo, as memórias reconsolidadas podem ser fortalecidas, enfraquecidas ou mesmo atualizadas, possibilitando modificações em memórias aparentemente estáveis, até para aquelas memórias de década (159). Assim as memórias são suscetíveis a novas alterações, desencadeando, desta maneira, uma oportunidade para que memórias aparentemente estáveis sejam atualizadas (159) (Figura 4).

Esta idéia de que as memórias retornam de um estado vulnerável depois da sua recuperação não é totalmente recente. Já na década de 1960, experimentos utilizando choques “eletroconvulsoterapia”, um tratamento amnésico, propiciava perda de memória, quando era administrada logo em seguida a recuperação (160, 161). Respostas similares eram encontradas nos anos seguintes (162, 163). Estes resultados foram interpretados como sinais para uma distinção entre traços de memórias inativas, não vulneráveis dentro do cérebro, bem como traços de memórias ativas passíveis de interrupção, independentemente do tempo de codificação

(164). Identificado como amnésia dependente (162, 163) e tempo mais tarde chamado de reconsolidação (165, 166).

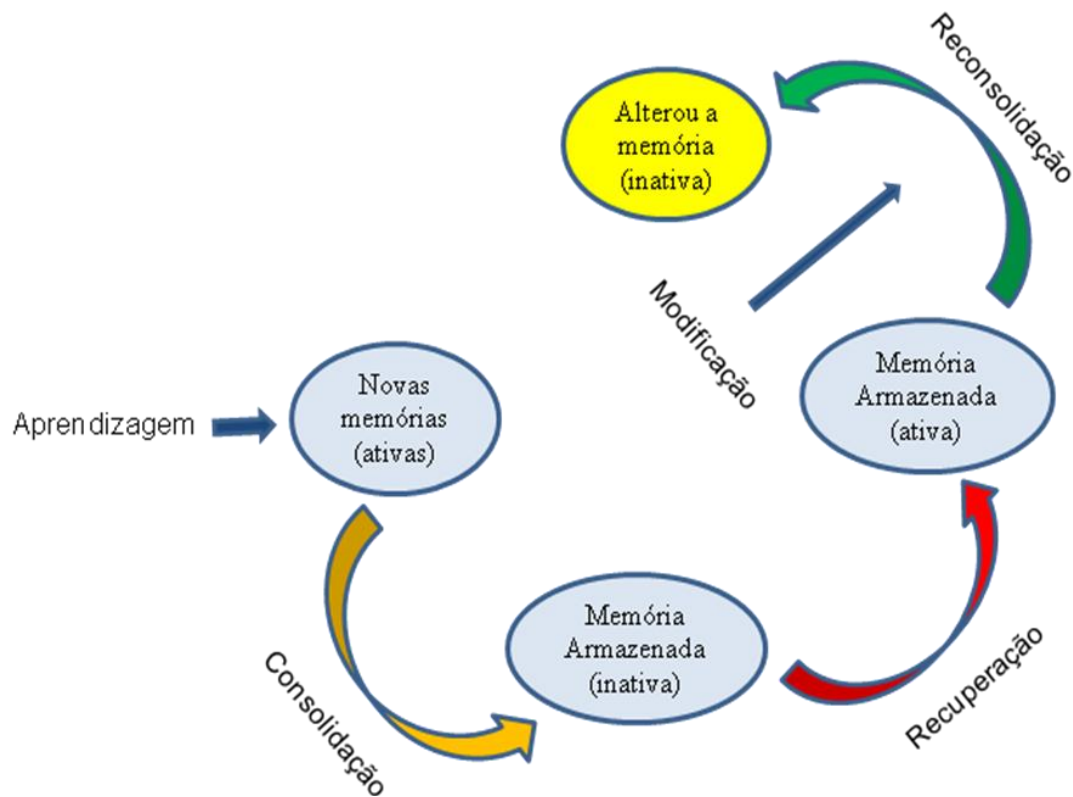


Figura 4. O conceito da reconsolidação da memória. Depois de um estímulo novo ser aprendido, a memória encontra-se no estado ativo até passar para a consolidação. No momento da recuperação a memória consolidada que está inativa passa para um estado ativo novamente, a partir deste ponto a memória precisa ser estabilizada de novo. O processo pelo qual memórias são reativadas novamente é conhecido por reconsolidação. Durante o processo de reconsolidação os traços de memória ativos são vulneráveis para as modificações. Fonte: Adaptado de Schwabe et al. (159).

A capacidade para que ocorram alterações das memórias emocionais estabelecidas revelam importantes implicações para o tratamento de diversas perturbações mentais, dentre elas o transtorno de ansiedade, como no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (167). Neste transtorno de ansiedade o evento que provocou o trauma pode ser considerado o resultado da superconsolidação da memória envolvida em eventos traumáticos, pela ação de hormônios do estresse,

tais como os glicocorticóides e noradrenalina, que são liberados em respostas a inúmeras situações de experiências traumáticas (168).

Estes hormônios são descritos como promotores da formação de memórias duradouras (158, 169). Desta maneira uma estratégia para tratar memórias traumáticas seria o bloqueio da ação destes hormônios, após um evento potencialmente estressante e traumático que ocorreu, interferindo no processo de consolidação. Existem evidências que esta abordagem pode ser bem sucedida (170, 171, 172). Por exemplo, pacientes que sofreram um acidente de carro e foram tratados com o antagonista do receptor β -adrenérgico propranolol pouco tempo depois do acidente, tornaram-se menos propensos para o desenvolvimento dos sintomas do TEPT nos três meses que sucederam ao acidente, em comparação aos pacientes que receberam placebo (170).

Nestes casos, a formação da memória somente poderá ser modulada no período de tempo relativamente curto após o evento traumático, durante os quais muitas pessoas não conseguem acesso ao tratamento clínico. Aqui a reconsolidação da memória é acionada. Se as memórias são suscetíveis a alterações novamente após a recuperação, isto pode gerar uma oportunidade para modificações da memória traumática. Pacientes com TEPT crônico foram solicitados a escrever um roteiro de algum evento traumático pessoal, abordando a situação traumática que provocou o TEPT (173). Os pacientes receberam logo em seguida propranolol ou placebo. Após uma semana todos os pacientes foram submetidos a um procedimento de imagens orientado para roteiros psicofisiológicos. Os resultados encontrados revelaram que as respostas psicofisiológicas durante a exposição da imagem mental de situações traumáticas eram significativamente mais baixas em pacientes tratados uma semana antes com propranolol do que os pacientes do grupo placebo.

Outros três estudos replicaram estes resultados (174). Apesar da falta de grupo controle apropriada, estes estudos, possibilitaram concluir que os efeitos observados eram em decorrência das alterações na reconsolidação da memória, não sugeriram que manipulações depois da recuperação da memória devam ser uma estratégia promissora para o tratamento da TEPT, mesmo quando o evento traumático ocorreu a décadas passadas (159).

1.2.6 Os sistemas de Memória em Humanos

A memória de curto prazo, conhecida como sistema unitário, começa a ser questionada devido a novos estudos experimentais, com a introdução do conceito de memória operacional sugerido por Baddeley e Hitch (1975). Assim, a memória de curto prazo, também definida como memória imediata, por se tratar de uma memória de funcionamento rápido, que dura cerca de alguns segundos e no máximo de três minutos (1975), portanto, é uma memória que mantém os indivíduos integrados aos fatos vivenciados da realidade imediata.

Memória operacional, por sua vez, é um sistema que processa e armazena e opera informações por um determinado período de tempo curto, que pode variar de minutos a horas, com uma limitada capacidade para armazenar a informação. Esta memória exerce ação na execução de tarefas complexas e rotineiras, tais como a compreensão da linguagem, raciocínio lógico e matemático. Ela pode se comunicar com retenção e troca de informações com a memória de longo prazo. Baddeley (1976) propôs uma divisão para a memória operacional em subsistemas: o executivo central, que desempenha gerenciamento das operações cognitivas e controle da atenção, embora, apresente uma capacidade atencional limitada.

Dois outros subsistemas integram o executivo central, são eles: a alça fonológica, que mantém por um tempo reduzido o processamento das informações verbais e auditivas e o esboço visuoespacial, que apresenta funções similares quanto às informações de aspecto visual e espacial. Existe ainda, um terceiro subsistema, proposto por Baddeley (1977), chamado de retentor episódico, que exerce função de integrar as informações fonológicas, visuais e espaciais provenientes do ambiente externo ou da memória de longo prazo. Este subsistema representa uma situação multimodal e temporal (1978, 1979).

Evidências mostram que o sistema do laço fonológico é bem estabelecido, e funcionaria independente do sistema de memória visuoespacial. Este, porém, poderia ser mais bem entendido caso houvesse uma divisão em dois componentes: um para as informações visuais e outro para as espaciais. Isto levaria a melhores interpretações dos resultados experimentais, além de melhorar as estratégias para modificações de memórias traumáticas (1980) (Figura 5).

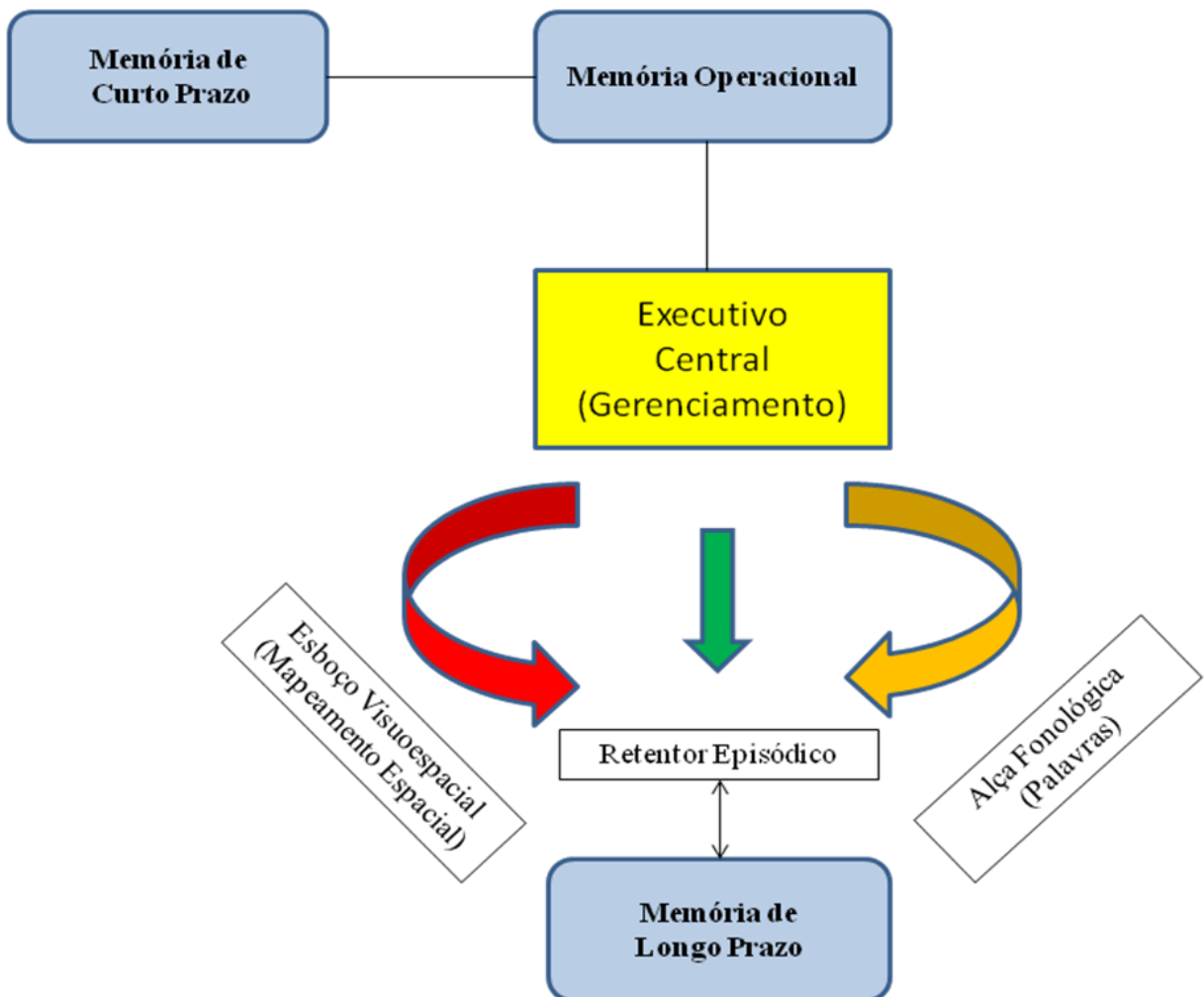


Figura 5. Classificação da Memória. Fonte: Adaptado de Andrade et al. (181); (Repovs e Baddeley (178).

No caso da memória de longo prazo, os sistemas múltiplos de memórias foram classificados e definidos como memórias declarativas (explícita) que poderiam ser prejudicadas em pacientes amnésicos, por lesão hipocampal (182) e não declarativa (implícita). Este primeiro tipo de memória envolvia a lembrança de fatos e eventos conscientes, decompostas em memória semântica (para fatos) e memória episódica (para eventos) (Figura 6).

A memória declarativa foi considerada associada a uma rede altamente flexível, que permite que estas memórias sejam acessadas conscientemente e “declaradas”, ou seja, memória explícita na consciência (183). Além disso, danos no hipocampo estão envolvidos nestes processos mnemônicos, enquanto outros são preservados. O sistema de memória poupado representa as memórias que não compõe arquivos conscientes, portanto, memória implícita à consciência (184). Este sistema de memória que poderia estar preservado na amnésia ou em animais com injúria hipocampal foi descrito como memórias não declarativas (implícitas) definidas como memórias que são apresentadas por meio do desempenho e do reconhecimento, como habilidades, *priming* (pré-ativado), condicionamento clássico e aprendizagem não associativa (Figura 6).

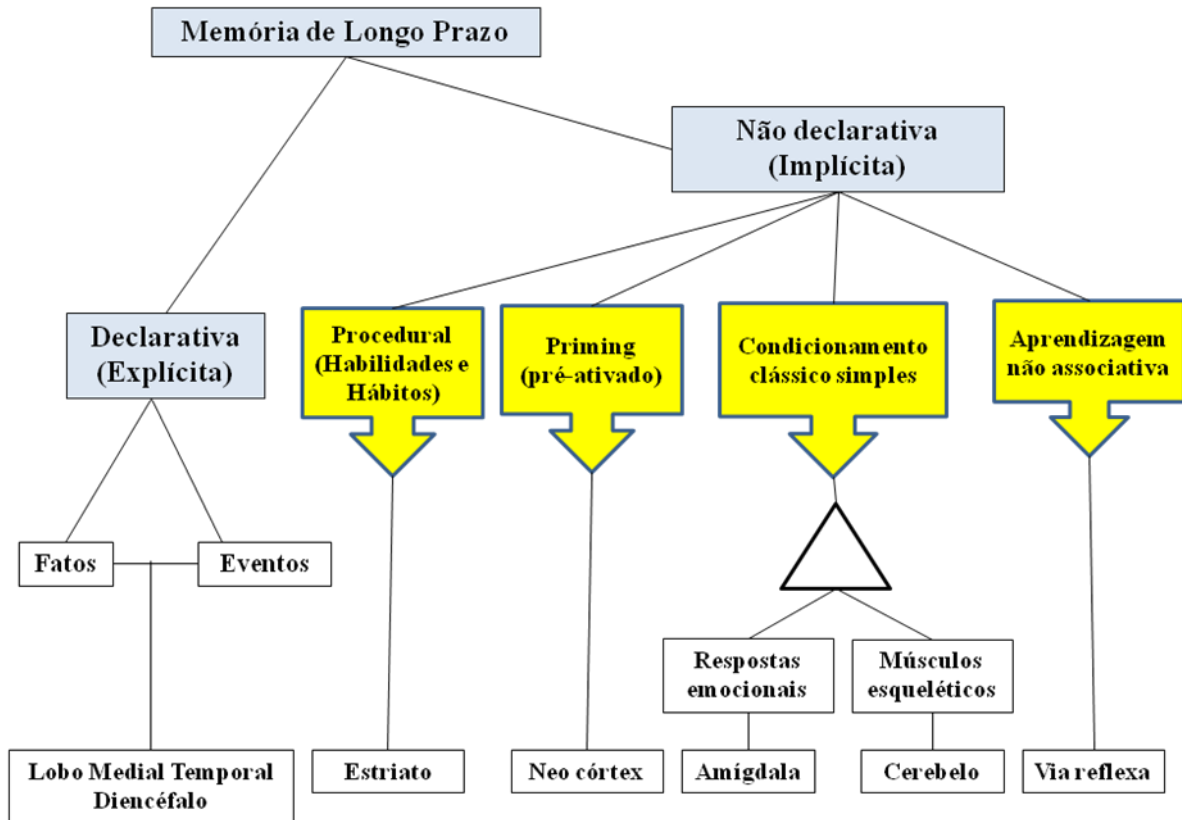


Figura 6. Memória de longo prazo e estruturas cerebrais envolvidas nos múltiplos sistemas de memória. Fonte: (185) adaptado de Mullaly e Maguire (186). © National Academy of Sciences.

1.2.7 Os sistemas de Memória em Animais

Os animais demonstram possuir conhecimento do mundo que os cercam e que é necessário para que ocorra a sua reprodução e sobrevivência. O comportamento animal se organiza através da informação adquirida e antecipa os eventos externos que ultrapassam as condições ambientais (187).

A etologia encarrega-se de fornecer uma fonte de informações em relação aos eventos externos, tomando como base fatores genéticos e a história seletiva do organismo. Campan e Breugnon (188) se referem a estas informações como uma visão extremamente genética “*memória-restrita-à-leitura*”. Por outro lado, Ades (187) apontou que esta memória de conteúdo hereditário está também respaldada na experiência, capaz de exercer um controle e orientar a vida dos animais no ambiente.

Existe um consenso que a memória é composta por vários sistemas ou módulos, que funcionam e atuam de modo específico. Por exemplo, a memória de hábitos (189) está envolvida na aquisição de novas habilidades, melhor desempenho motor e no comportamento operante, como na memória implícita. Se um esquilo nunca abriu uma avelã irá perder um bom tempo roendo-a de um lado para o outro, mas com a prática, logo chegará a uma solução simples, que apenas com uma dentada, consegue partir a casca da avelã em duas partes, incorporando esta ação ao seu repertório de comportamento (190). Portanto, a memória de hábito se desenvolve a partir das repetições e de acordo com Sherry e Schacter (189), este tipo de memória depende “da detecção e da preservação da invariância durante a repetição dos episódios”.

A memória de eventos adotada por Sherry e Schacter (189), também chamada memória episódica (191), refere-se à preservação na entrada da informação recebida através da percepção, com suas variáveis específicas. Este tipo de memória é visto como memória de eventos particulares, das localizações, das sequências emitidas de respostas prévias e das interações sociais. É formada a partir de estímulos apropriados e imediatos, bem como específicos. Ela mantém os pormenores contextuais, promovendo algumas experiências do indivíduo como um evento único (189). Um experimento realizado com a rã (*Rana pipiens*) consistia da

apresentação de um cartão preto em rápida aproximação da rã. O animal se sente ameaçado e pula para o lado oposto onde se encontra o cartão. Mesmo sendo uma resposta automática tem um fundo contextual: quando existe um obstáculo na frente ou do lado da rã, o animal desvia o pulo. Desta maneira, Ingle e Hoff (192) demonstraram que a rã se lembra dos obstáculos, por alguns segundos, após a remoção do cartão, contudo o animal continua a direcionar o pulo como se a barreira ainda estivesse presente. Este comportamento do animal tem sentido porque a experiência inicial com o cartão foi codificada e resultou em traços mais ou menos lábeis no sistema nervoso do animal, que passou a incorporar a experiência passada no seu repertório e a memória recebe o status de conceito etológico básico (189).

Sobre o aspecto da orientação, em animais, é importante que o refúgio, o local de coleta ou o ambiente da caça e o lugar apropriado das atividades reprodutivas sejam locais para onde o animal possa voltar, depois de eventuais afastamentos. Esta capacidade de armazenar as experiências anteriores e de poder usá-las posteriormente, como verdadeiros guias de trajetórias, são essenciais para os animais, e apresentam diversas vantagens, tais como: diminuição dos esforços e tempo gasto com investidas aleatórias em busca de alimento; redução das chances de encontro casual com predadores, proporcionando liberdade para o animal realizar outras atividades importantes para sua sobrevivência. Por consequência, esta capacidade é selecionada em várias espécies, levando em conta fatores genéticos e ambientais ecologicamente relevantes (189). Desta maneira, cada evento se torna uma pista de extrema importância para se armazenar e orientar o comportamento e cada hábito que se aprimora com a experiência se torna uma vantagem etológica para o desempenho de um comportamento eficiente.

O labirinto aquático de Morris (LAM) foi idealizado por Richard G. M. Morris em (193), como um equipamento alternativo ao labirinto radial (194). Este teste é amplamente utilizado (195, 196, 197). O LAM consiste de uma piscina redonda com água (Figura 7). O animal aprende a localizar a plataforma oculta de acordo com quatro pontos de partida diferentes. Após certo número de ensaios, utilizando-se de pistas distais, os animais demonstram que a latência para a localização da plataforma oculta, diminui. Outra estratégia para avaliar a aprendizagem é testar os animais com a remoção da plataforma escondida, mediando-se a quantidade de

tempo gasto com o nado dos animais nas proximidades da antiga localização da plataforma (194). Camundongos podem usar três diferentes estratégias para localizar a plataforma oculta (198), como se segue: (1) estratégia “práxica”, que ocorre no aprendizado de uma sequência de movimentos que devem ser executados para chegar à plataforma; (2) estratégia “táxica”, quando o animal utiliza sinais ou guias visuais proximais para alcançar a plataforma; e (3) estratégia “espacial”, quando o animal atinge o alvo, utilizando-se informações sobre a localização espacial da plataforma, conforme a configuração espacial das pistas distais disponíveis no momento dos ensaios. Poderíamos entender que a estratégia práxica estaria relacionada à memória de hábito, enquanto que as estratégias táxica e espacial estariam associadas à memória de eventos.

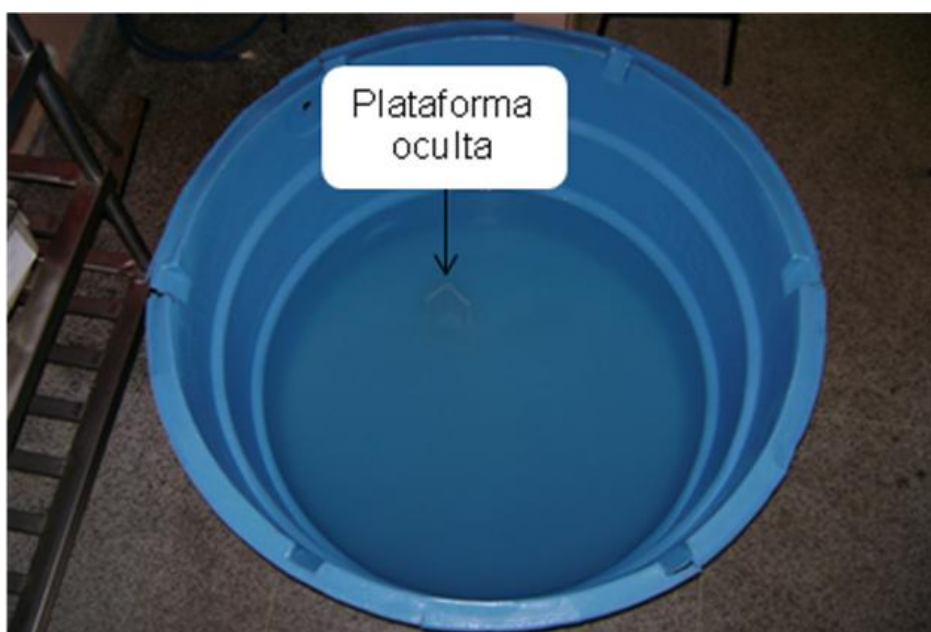


Figura 7. Labirinto aquático de Morris

Para o teste no LAM, o tamanho da piscina utilizada com camundongos pode ser de 75 a 150 cm de diâmetro e, para ratos, de 150 a 180 cm. O diâmetro da piscina pode ou não comprometer o desempenho dos animais nos ensaios, mas depende também da cepa do animal utilizado (199, 200). Diversos parâmetros podem ser avaliados no LAM, tais como latência para localizar a plataforma oculta e medida do comprimento do caminho usado pelo animal para atingir a plataforma,

velocidade do nado, tempo gasto nos quatro quadrantes, números de cruzamentos próximos da plataforma, e porcentagem de ensaios que foram detectados nos animais que não conseguiram encontrar a plataforma no tempo limite de 2 min (157). Existem, porém, outros fatores que podem estar associados ao desempenho dos animais no LAM, como por exemplo, o número de ensaios por dia, o número de dias de treino, o tempo de duração dos ensaios e tempo de intervalo entre um ensaio e outro subsequente (201).

O teste do LAM permite a reprodução de estudos relacionados com a memória de referência (memória de eventos), memória de trabalho (memória de hábito) e aprendizagem (195, 202). Além disso, foi demonstrado que o LAM é altamente sensível para avaliar danos no hipocampo (197, 203, 204). Em adição animais idosos exibem prejuízo de aprendizagem para localizar a plataforma de escape (205, 206, 207). Um estudo longitudinal em camundongos revelou que a aprendizagem ocorrida anteriormente no LAM pode prevenir déficits de memória espacial envolvida com o processo do envelhecimento (208).

O LAM é um paradigma de fácil construção e também de boa adaptação, contudo, requer sistemas de gravação de vídeos com a utilização de softwares sofisticados, que auxiliam na análise de parâmetros comportamentais, às vezes, não prontamente com livre acesso para todos os pesquisadores. Para amenizar os níveis de estresse no teste do LAM, alguns pesquisadores acreditam que é necessário um período de habituação antes de iniciar os ensaios (194), entretanto, outros não concordam (209). O uso de pistas visuais “extra-labirinto”, pistas difusas e ausência de pistas podem interferir no desempenho da memória espacial dos animais testados no LAM (210).

1.2.8 Desenvolvimento da capacidade mnemônica, da infância ao envelhecimento

Os correlatos neurais da memória episódica humana têm sido o alvo de inúmeras investigações, pelos neurocientistas, nos últimos 60 anos. O primeiro ano pós-natal é caracterizado por mudanças dramáticas no desenvolvimento da memória, principalmente na idade crítica de (9 meses aproximadamente) em que os bebês humanos possivelmente começam a evidenciar rudimentar memória dependente do hipocampo (186).

“Temos que começar a perder a memória, para perceber que ela é o que torna a nossa vida. Pois a vida sem memória não é vida. Nossa memória é nossa coerência, nossa razão, nosso sentimento, até mesmo nossa própria ação. Portanto, sem ela, não somos nada...” (211).

Imaginemos a vida sem memória, seria quase impossível realizar todas as tarefas que desempenhamos no dia a dia. Professores não poderiam ensinar, sem a lembrança do que já haviam aprendido nas aulas da universidade. Músicos teriam muita dificuldade para tocar e cantar onde estariam as notas musicais e as partituras. Na verdade, quase todas as profissões estariam comprometidas. De fato, aprendizagem e memória fazem parte da nossa vida.

Este sentimento de vazio tem sido experimentado, muitas vezes, pelos indivíduos que sofrem perda de memória na idade adulta, e estudos com pacientes amnésicos tem investigado essa condição (212).

Muitas pessoas acreditam que um bebê apresenta capacidade mnemônica semelhante a pacientes gravemente amnésicos (212), mas isto não é verdade (213). As crianças não vivem como propôs William James (214), em um estado de bagunça e confusão. Pelo contrário, crianças possuem uma capacidade surpreendente para codificar e reter o conhecimento que são próprias de suas necessidades (215). Seguem alguns exemplos: recém-nascidos podem distinguir a voz de sua mãe (216) e aprendem a modificar seu comportamento de sucção em resposta ao reforço da amamentação (217); com 3 a 4 dias de idade são capazes de reconhecer a face de sua mãe (218) e com 8 a 10 dias podem identificar o leite materno próprio de sua mãe em relação ao leite de outra mãe (219). Porém, um forte contraste desta

capacidade mnemônica, é detectado em humanos adultos, que não conseguem lembrar nenhum episódio de sua infância, tendo em vista que durante este período da vida, os bebês sofrem profundamente de uma perda de memória, chamada de amnésia infantil (220).

Para desvendar esta aparente discrepância, foi apresentada na comunidade científica, teorias a respeito da literatura da memória infantil, através da publicação de trabalhos conduzidos por Nadel e Zola-Morgan (221), Schacter e Moscovitch (212) e Bachevalier e Mishkin (222) que estão diretamente ligados à mudança no paradigma conceitual de memória como uma entidade unitária (223). O ponto de partida é baseado no perfil cognitivo e da memória do interessante paciente Henry Gustav Molaison (1926-2008), conhecido por H.M.

“Quando tinha 27 anos de idade H.M. foi submetido a uma cirurgia de remoção dos focos epiléticos. Nessa cirurgia foram removidos, de ambos os lados, o lobo temporal medial (MTL), amígdala e os 2/3 anteriores do hipocampo. Depois da cirurgia, H.M. perdeu a capacidade de formar novas memórias. Para ele tudo era novo, cada refeição, cada novo amigo, novo caminho, novo lugar... tudo para ele era como se fosse a primeira vez” (224).

Este evento tornou H.M. um amnésico para novas experiências, ou seja, para memórias episódicas. Assim, o hipocampo foi identificado como estrutura neural crítica para a aquisição e reconhecimento de memórias episódicas. Apesar deste prejuízo de memória, o paciente H.M. apresentava novas habilidades processuais como desenhar no espelho (225). O caso H.M. levou ao conceito de um múltiplo sistema de memórias. Habilidades preservadas em pacientes amnésicos eram registradas através de inúmeras tarefas cognitivas e perceptuais (182). Achados provenientes de trabalhos com modelo animal indicavam que o hipocampo sustentava tipos específicos de memória (226-229), e conduziram à idéia de que havia múltiplos sistemas de memória (230). Isto foi posteriormente apoiado com a descoberta da existência de estruturas neurais para cada tipo específico de memória (186).

O envelhecimento é caracterizado pelo processo de transformação de um indivíduo adulto saudável em mais frágil, com a diminuição das reservas dos sistemas fisiológicos e por um aumento exponencial para adquirir a maioria das doenças. Pela vulnerabilidade que este processo propicia, pode conduzir o indivíduo, em muitos casos, à morte (231).

Ainda no processo relacionado ao envelhecimento ocorrem mudanças no cérebro, como a atrofia, alargamento dos sulcos, estreitamento nos giros e diminuição da matéria cinzenta cortical (232). Em consequência destas alterações morfológicas no cérebro pode haver um declínio nas habilidades cognitivas. Salthouse e Czaja (233) demonstraram que idosos apresentavam desempenhos mais baixos em testes cognitivos do que indivíduos mais jovens. Em adição, o estudo da cognição em idosos vem focando em alguns processos atencionais e no funcionamento cognitivo relacionados com o lobo frontal e a memória episódica, incluindo conteúdos visuoespaciais (234).

A população mundial de idosos tem crescido de forma significativa nas últimas décadas. Com este aumento, muitos pesquisadores estão interessados em avaliar e estudar esta clientela, em decorrência de alterações naturais do processo de envelhecimento (235). Neste processo ocorrem mudanças físicas, psicossociais, funcionais e socioeconômicas. Mudanças físicas são graduais e progressivas, caracterizadas pelo declínio das funções de determinados órgãos vitais e dos sistemas do corpo de forma diferenciada; as alterações psicossociais estão envolvidas nas modificações afetivas e cognitivas, associados aos comprometimentos fisiológicos do processo de envelhecimento. Em relação às mudanças funcionais, existe a necessidade de ajuda, com o intuito de facilitar o desempenho dos idosos nas atividades básicas do cotidiano. Já as modificações socioeconômicas estão intrinsecamente relacionadas com os aspectos da aposentadoria dos idosos (236).

Dentre as alterações cognitivas do idoso, a memória vem se destacando. Muitos idosos reclamam de falhas de memória. Eles podem avaliar a sua memória a partir da sua importância para o desempenho das atividades do dia a dia. Este aspecto é chamado de “percepção subjetiva de memória”. Quando o idoso relata deficiência da sua própria memória, desencadeia em si um momento de reflexão, que por muitas vezes passa despercebido das dificuldades do cotidiano, e neste momento, o idoso pode refletir nas várias abordagens envolvidas com problemas de memória (237, 238).

Alguns aspectos da cognição podem ser prejudicados pelo processo do envelhecimento, enquanto outros são preservados (239). Avaliações de idosos saudáveis, submetidos a testes neuropsicológicos, têm indicado que as funções

cognitivas permanecem estáveis (239). Porém, existem os chamados “brancos ocasionais”, representado pelo fato do idoso não se lembrar onde colocou seus óculos e esquecer o nome de um amigo que não vê há um bom tempo. Com o passar da vida, os reflexos de falhas de memória, os constantes esquecimentos cotidianos, os efeitos das relações com a família e os amigos, propiciam aos idosos sentimentos de um futuro incerto e preocupante, evidenciado através do papel vital da memória na vida humana.

Dentro desta ótica se faz necessário ofertar atividades para os idosos, visando a sua qualidade de vida, bem como estimular funções cognitivas e emocionais para a manutenção da sua autonomia nas atividades diárias e prevenção de um possível quadro de declínio cognitivo. Programas com atividades deste tipo são ofertadas em ambiente hospitalar e monitoradas através de pesquisas, como por exemplo, em Brasília, pelo grupo de Da-Silva (240, 241, 242).

Estudos randomizados e controlados têm evidenciado que o treino cognitivo pode melhorar a memória, a atenção, o humor e o bem estar psíquico, contudo, a duração e o impacto no cotidiano dos idosos são desconhecidos (241-246).

No passar de décadas, fortes evidências têm sugerido que o hipocampo é uma estrutura neural importante para a aprendizagem e memória, bem como está relacionado com déficits cognitivos associados ao processo de envelhecimento (224, 247-254). Além disso, estudos envolvendo seres humanos com danos no hipocampo têm revelado que esta região encefálica desempenha um importante papel na memória espacial (255-261). Desta forma, pacientes que apresentam dano no lobo temporal medial bilateral demonstram prejuízo da memória declarativa tipo episódica, mas evidenciam o tipo semântica que se mantém relativamente preservado (262, 263).

Adicionalmente, estes pacientes possuem boas habilidades para desempenhar atividades de procedimentos e hábitos, ou seja, memória de procedimentos ou não declarativas e apresentam, também, vocabulário normal e conhecimento dos fatos aprendidos anteriormente. Alta atividade hipocampal tem sido observada, através de imagem funcional, em pessoas, durante a navegação em uma cidade virtual (264, 265). Similarmente, outro estudo envolvendo motoristas de taxi de Londres mostrou que uma vasta experiência de navegação em uma cidade está relacionada a um maior volume de substância cinzenta no hipocampo em

comparação ao grupo controle (266). Ademais, estudos com modelos animais (ratos e macacos) com lesões hipocampais ou alterações ligadas à idade acometidas no hipocampo mostraram prejuízos no aprendizado em tarefas de memória espacial (267-272).

Desta forma, o hipocampo caracteriza-se como uma estrutura primordial para a memória declarativa, bem como vulnerável aos efeitos do processo de envelhecimento (273, 274), portanto, injúria nesta região encefálica resulta em deficiências cognitivas semelhantes às aquelas identificadas em pessoas idosas (275-278). Outros estudos com humanos revelam que ocorre, com o avanço da idade, uma diminuição de 30 a 80% no desempenho das pessoas na execução de tarefas que estejam envolvidas com a memória espacial (279-283).

1.2.9 A vitamina C e o desenvolvimento das funções cognitivas

A vitamina C é um micronutriente de vital importância para o cérebro e tem sido relatados inúmeras funções, tais como a neuromodulação e o envolvimento na angiogênese. Ausência de vitamina C no cérebro tem sido mostrada como prejudicial à sobrevivência em ratos SVCT2 recém-nascidos (^{-/-}), e sua deficiência perinatal reduz o volume do hipocampo, número de neurônios e causa diminuição da cognição espacial em cobaias, sugerindo que a deficiência materna de vitamina C pode ter consequências graves para a prole. Além disso, a deficiência de vitamina C tem sido proposta como importante fator no declínio cognitivo e no risco de derrame e gravidade relacionada à idade (284).

A proposta das causas e consequências da deficiência de vitamina C no cérebro pode ser explicada por diversos fatores, dentre eles doenças, uso constante do tabaco, inadequada ingestão de vitamina C, bem como fatores genéticos e gravidez. Em adição, a vitamina C modula os sistemas colinérgicos, catecolinérgicos e glutamatérgicos. O AA também desempenha função no desenvolvimento neuronal através da maturação, diferenciação e formação da bainha de mielina (Figura 8).



Figura 8 – Deficiência de vitamina C no cérebro. Adaptado de Hansen (284).

Evidências têm apontado para a vitamina C como um importante fator da homeostasia redox no SNC, associado à inadequada suplementação de AA na dieta, resultando efeitos negativos sobre o desempenho cognitivo (285, 286, 287). O SNC apresenta alta concentração de vitamina C em comparação com outros órgãos do corpo (7, 288). Dados têm revelado redução no volume do hipocampo e prejuízo de memória espacial em porcos da guiné induzidos pela deficiência de AA na dieta (285, 289). No cérebro a vitamina C é regionalmente distribuída com altas concentrações, no hipocampo, córtex occipital e frontal (290, 291). Na verdade,

neurônios possuem alta concentração de vitamina C, cerca de 10 mM, comparados com as células da glia que apresentam cerca de 1 mM (292).

1.3 PLASTICIDADE CEREBRAL, COGNIÇÃO E COMPORTAMENTO

A plasticidade neural consiste em uma mudança adaptativa que acomete o sistema nervoso nas suas funções e estruturas, podendo ocorrer em qualquer momento do estágio da ontogenia, permitindo a interação do ambiente interno ou externo, ou ainda como resposta aos danos, traumas ou lesões que atingiram o circuito neuronal (293).

Segundo Pia (294), o termo plasticidade foi introduzido pelo fisiologista Alemão Albrecht Bethe, nos anos de 1930. Este cientista define a plasticidade neural como a capacidade do organismo de adaptar-se às alterações que comprometem o ambiente externo e interno, pela ação sinérgica de vários órgãos, com a coordenação do sistema nervoso central (SNC).

Uma das mais importantes descobertas científicas na área da neurociência, que culminou com o fim de um dogma a respeito dos neurônios foram conduzidas por Eriksson et al. (295) que publicaram, pela primeira vez, evidências concretas de que o cérebro de um indivíduo adulto humano possuía a capacidade de regenerar novos neurônios. Acreditava-se que neurônios não se reproduziriam em humanos adultos. Partindo desta premissa estes pesquisadores evidenciaram em modelos animais que apenas uma pequena porção de neurônios sobrevive, como consequência da tentativa de aumentar a quantidade de neurônios. Os autores concluíram que, através do enriquecimento ambiental (EA), que propicia constantes desafios, é possível duplicar a quantidade de neurônios, após o período de enriquecimento (295).

Santiago Ramón y Cajal e Eugênio Tanzi desenvolveram trabalhos pioneiros sobre a regeneração neural, que revelaram existir uma relação mais direta entre a plasticidade neuronal e o SNC (296). Cajal afirmou que haveria uma possibilidade de que a prática do exercício mental pudesse desencadear maior crescimento das

ramificações neuronais, enquanto Tanzi propôs a hipótese de que, nas junções neurais, ocorreriam alterações plásticas, durante o processo da aprendizagem (296).

Estudos da plasticidade neural podem ser classificados em situações que manipulam o ambiente e avaliam as alterações morfológicas e/ou funcionais no ambiente neural, ou a nível comportamental, após traumatismo ou lesões do SNC, conhecidos como “*recuperação de funções*” (297). O processo agudo consiste em mudança do tecido nervoso para manter a homeostasia do organismo, bem como para realizar a cicatrização e o reparo tecidual (297, 298).

A plasticidade neural tem sido investigada ao nível molecular, visando identificar possíveis mecanismos e processos celulares, bem como ao nível comportamental e da interação com o sistema neural. Neste contexto, pode-se destacar o desenvolvimento neuronal, a recuperação das funções neurais e a reorganização morfofuncional da circuitaria nervosa envolvida nos processos de aprendizagem, consolidação de memória ou de lesões cerebrais (299, 300).

Pesquisas envolvendo a plasticidade cerebral, propostas por Kolb e Whishaw (297), seguem três categorias gerais: metabólicas, neuroquímicas e morfológicas. (1) As alterações das atividades metabólicas são avaliadas em áreas corticais e subcorticais, tanto no hemisfério onde ocorreu a lesão (ipsilaterais) como no hemisfério oposto (contralaterais); (2) As mudanças neuroquímicas são focalizadas em função das sinapses, com a investigação dos processos e mecanismos que promovem um aumento da síntese de neurotransmissores e sua liberação ou a potencialização das respostas pós-sinápticas, em decorrência de eventos que estimulam a aprendizagem ou por lesões neuronais; (3) as alterações morfológicas acometem as estruturas das sinapses e dos neurônios, tais como: a regeneração e ramificação de axônios, com aumento do tamanho dos corpos celulares, do número de dendritos, da quantidade de neurônios e das sinapses.

Para a análise comportamental, é necessário garantir as seguintes características: (1) após a lesão, o comportamento deve manter as suas características topográficas e funcionais presentes como linha de base em relação ao comportamento, antes da lesão ter acontecido; (2) a recuperação de um determinado comportamento não deve interferir de forma negativa em outros comportamentos; e (3) o comportamento deve ser regular na sua frequência e se mantém a longo prazo (297).

Relatos do século XVIII já demonstravam interesse pelos efeitos na experiência, no treino e no exercício, eventos, portanto, relacionados com o SNC. Assim Bonnet e Malacarne (1779 e 1783), de acordo com as citações de Rosenzweig (296), demonstraram que os encéfalos de animais que foram submetidos a treinos sistemáticos, durante vários anos, apresentavam um cerebelo bem mais desenvolvido e possuíam uma maior quantidade de circunvoluções comparadas àqueles animais sem treino. Entretanto, conceitos relacionados com a plasticidade do SNC e do comportamento só foram comprovados através de experimentos, mais tarde, na década de 1960.

Experimentos com gaiolas-viveiro, utilizando técnicas de enriquecimento realizados por Rosenzweig et al. (301) demonstraram que em diferentes idades, havia uma interação dos animais com esse ambiente repleto de estímulos, que resultou em modificações específicas no SNC. Foram encontrados alterações com o aumento das seguintes estruturas cerebrais: na espessura das camadas do córtex visual; no tamanho dos corpos dos neurônios e dos núcleos; no número de sinapses e na fenda sináptica; na quantidade de dendritos e espículas dendríticas; no volume e no peso do encéfalo, bem como nos níveis dos neurotransmissores. Portanto, alterações morfológicas e funcionais ocorreram em áreas corticais através da exposição e da interação dos animais em ambientes ricos em diversidade de estímulos (289).

Os mecanismos celulares subjacentes à aprendizagem e memória são considerados como eventos que ocorrem na plasticidade sináptica, com alterações na estrutura ou bioquímica das sinapses, que resultam em mudanças nos efeitos pós-sinápticos. O psicólogo Donald Hebb (1940) hipotetizou que traços da memória permanente poderiam ser formados e sustentados através das interações de redes neurais (302). Cerca de 30 anos depois, Bliss e colaboradores em 1973 detectaram um aumento de longa duração na intensidade sináptica no giro dentado, em coelhos, como resposta à estimulação de alta frequência (303, 304). Este fenômeno passou a ser conhecido como *potenciação de longa duração* (LTP) bastante estudada no hipocampo (305).

A LTP é estudada em finos cortes de fatias de hipocampo que são preservadas vivas em solução artificial do líquido cefaloespinal. Lesões no hipocampo afetam a LTP e podem conduzir a déficits de memória. A LTP, como

fenômeno subjacente ao armazenamento da memória, em animais, pode ocorrer em duas fases: (1) fase inicial da LTP, que ocorre geralmente por um tempo menor do que uma hora após a estimulação; esta LTP não requer a síntese de proteínas e da transcrição gênica; (2) fase tardia, que ocorre pelo período maior do que 3 horas após a estimulação; esta LTP envolve a síntese de proteínas e a transcrição gênica (306, 307). Na fase tardia da LTP foram relatados déficits associados ao processo de envelhecimento (308, 309, 310). Ademais, depois de múltiplas sessões diárias que induziam LTP, foi demonstrado que a LTP foi deteriorada mais rapidamente em ratos idosos, quando comparados com os ratos adultos (275).

Estudos têm demonstrado que o receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) está envolvido na grande maioria das formas da LTP (311-315), onde o influxo de cálcio para o interior da célula é estimulado pela ativação do receptor NMDA. A entrada de cálcio no neurônio pós-sináptico ativa proteínas quinases, como a cálcio/calmodulina quinase, em seguida ocorre a ativação do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), que produz um aumento da condutância de moléculas de sódio e potássio, aumentando a capacidade de responder ao estímulo emitido pelo glutamato (316). Este influxo de cálcio proporciona também a ativação de adenil-ciclase, que ativa adenosina trifosfato (ATP) para o AMPc. Esta molécula ativa a proteína cinase C que promove a fosforilação do fator responsivo de transcrição do AMPc (CREB), bem como a síntese de proteínas e mudanças estruturais (317). A ativação do receptor NMDA desempenha importante papel na aquisição de memória espacial (318, 319). Quando ocorre um bloqueio farmacológico deste receptor ou deleção da subunidade NR1, ocorrem injúrias substanciais da memória de referência espacial (313, 314, 319, 320). De maneira similar, camundongos nocaute NR1 apresentam também comprometimento da LTP (321).

1.3.1 Desenvolvimento Neural e Cognitivo

O sistema nervoso está relacionado ao estresse, onde é percebido e determinado o que é ameaçador, além de emitir respostas comportamentais e fisiológicas em combate ao agente estressor. O desenvolvimento cerebral possui uma grande capacidade de adaptar-se e promover mudanças às situações estressantes e outras experiências, tais como estrutural e de substituição neuronal, remodelação dendrítica e alteração do volume sináptico. Estes eventos são características de respostas neurais emitidas por um adulto, em detrimento a fatores ambientais. O hipocampo é uma estrutura onde os três tipos de plasticidade estrutural foram observadas e investigadas, com o uso da combinação de abordagens comportamentais, eletrofisiológicas, morfológicas, moleculares e farmacológicas (322).

Da mesma maneira, novos dados de regiões cerebrais envolvidas na ansiedade, medo, humor, função cognitiva e controle comportamental, como a amígdala e o córtex pré-frontal também demonstram que o cérebro de um indivíduo adulto é na verdade maleável, e, portanto, uma estrutura adaptável, que apresenta uma capacidade de plasticidade estrutural reversível (322).

Os hormônios esteróides possuem um papel importante, atuando nesta plasticidade, tanto por via genômica como também via mecanismos não-genômicos. Em adição, outros mediadores intracelulares, bem como sistemas de neurotransmissores também participam da plasticidade estrutural (322).

O estresse desencadeia um desequilíbrio dentro do circuito neural encarregado de auxiliar a cognição, a tomada de decisões. A ansiedade e o humor podem aumentar ou diminuir a expressão destes comportamentos. O aumento da vigilância, do medo e da ansiedade em um ambiente ameaçador pode ser caracterizado como uma mudança adaptativa. Contudo, se a fonte de perigo passa, mas o estado comportamental persiste, bem como as mudanças no circuito neural, esta inadaptação pode necessitar de uma intervenção, realizada através da combinação de terapia comportamental e farmacológica, como por exemplo, em casos crônicos de transtorno de ansiedade e de estado de humor (322).

1.3.1.1 Comprometimento Cognitivo Leve ou Declínio Cognitivo

O conceito de Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) vem se desenvolvendo na última década, com a finalidade de compreender a relação entre o envelhecimento saudável e patológico (323, 324, 325). Indivíduos que apresentem CCL nem sempre evoluem para a demência, apresentando quadros estáveis e também podem demonstrar diminuição do déficit cognitivo. Este fato pode ser associado a diversos quadros clínicos, tais como: doenças metabólicas, eventos traumáticos, bem como doenças vasculares e psiquiátricas e também depressão (326). Este conceito pode ser classificado dentro de alguns subtipos, que podem ou não apresentar reclamações a respeito dos déficits de memória pelos idosos. Os subtipos são denominados: CCL amnésico de único domínio; amnésico múltiplos domínios; não amnésico de múltiplos domínios e não amnésico de único domínio. O subtipo CCL amnésico (CCL-A) é o mais evidente e que comumente desencadeia a doença de Alzheimer (325, 326).

Para se diagnosticar o CCL nos indivíduos se utiliza o critério apresentado no CCL-A, ou seja, o subtipo amnésico. Estes critérios incluem: (1) queixa subjetiva de memória; (2) déficits de memória em decorrência da idade e anos de escolaridade, que foram detectadas em testes neuropsicológicos; (3) observação que as atividades da vida diária e as demais funções cognitivas são preservadas; e (4) ausência de demência (325).

Estudos longitudinais revelam que ocorre uma taxa de conversão de 10% a 15% ao ano de pessoas identificadas com CCL-A, para a doença de Alzheimer (DA). Por outro lado, indivíduos saudáveis podem evoluir para DA em uma taxa de apenas 1% a 2% ao ano (325, 327). Desta forma, se faz necessário a busca de intervenções para este grupo de pessoas, visando à qualidade de vida (328).

1.3.1.2 Declínio Cognitivo em Modelos Animais

O processo de envelhecimento está associado ao declínio das funções cognitivas, tanto em humanos como em animais de laboratório. Roedores jovens adultos desempenham tarefas de aprendizagem melhor e mais rápidas do que animais idosos. Esses animais envelhecidos, quando expostos ao enriquecimento ambiental, podem melhorar sua capacidade de aprendizagem e desempenhar suas tarefas cognitivas como um animal jovem. O cérebro dos animais idosos ainda retém apreciável plasticidade para desencadear melhora nos processos cognitivos pelos quais estes animais são submetidos (329).

Lesões semelhantes, com a presença de depósitos amilóides já foram encontradas em animais idosos como cães, primatas, roedores e ursos (330, 331, 332). Cães idosos foram utilizados num estudo para avaliar a acumulação de β -amilóide (constituintes de depósitos amilóides) e também das funções cognitivas. A acumulação deste peptídeo se relacionou à queda global da cognição e afetou apenas algumas tarefas comportamentais. No entanto, o nível de déficit cognitivo estava mais associado ao grau de deposição do que com a idade do animal, já que indivíduos diferentes do mesma faixa etária apontavam graus de acumulação diferenciados (329).

1.3.1.3 Reserva cognitiva e escolaridade como aprimoramento cognitivo em humanos

A reserva cognitiva (RC) ou reserva cerebral é a capacidade do indivíduo de tolerar as mudanças associadas com a idade e com doenças envolvidas com patologias cerebrais, sem o desencadeamento de sintomas clínicos ou sinais fisiológicos em decorrência da doença (333). A RC sugere, ainda, que a inteligência inata ou experiências da vida cotidiana podem fornecer reserva, que consiste de um conjunto de habilidades ou repertórios que possibilitam aos indivíduos a lidar com o desenvolvimento progressivo de demências, DA ou demência vascular, de uma

maneira melhor do que outras pessoas (334, 335). Ademais a RC também explica a relação entre a escolaridade, a complexidade ocupacional, a habilidade para a leitura, o índice de inteligência (IQ) e a demência. A RC é vista como modificações de estruturas do próprio cérebro e processamento (336). Efetivamente, alterações cerebrais morfológicas e neuroquímicas foram detectadas em animais crescidos em ambientes enriquecidos com vários fatores estimulantes (337).

A RC é utilizada para explicar como os indivíduos podem variar significativamente em termos do declínio cognitivo, bem como a manifestação dos sintomas para a demência, em relação às alterações neurodegenerativas que são semelhantes nos aspectos da natureza e da extensão (338). A RC pode assumir duas características, conforme entendimento de Stern et al. (339). (1) reserva neuronal formada por redes cerebrais que são mais eficientes ou demonstram grande capacidade neural e podem ser menos susceptíveis a injúrias e (2) compensação neural nas quais as redes cerebrais alternativas podem compensar os danos induzidos por patologia em redes neuronais preexistentes.

Desta forma, tem-se postulado a hipótese que a RC atua através de ambos os mecanismos: de proteção e compensatórios. As pessoas que possuem altos níveis de RC terão uma menor prevalência e incidência de desenvolver demências, principalmente DA. Existem ambos os caminhos: patológico e clínico. O patológico se inicia em um tempo fixo no percurso da vida. Isto pode sugerir que o indivíduo que possui maior RC levaria mais tempo para o início da DA e, portanto, morreria também mais tarde. Porém, pode-se supor que o tempo do início da DA pode variar e ter desdobramento lento e silencioso. Então a hipótese da RC sugere pouco ou nenhum efeito sobre a idade do paciente para que o aparecimento de sintomas clínicos de demência se manifeste (340).

A hipótese explícita para a RC é a noção de um limiar, porque, neste caso, a RC já não pode compensar a injúria cerebral subjacente. Finalmente, pode-se esperar que entre os pacientes demenciados, aqueles indivíduos com maior RC irão demonstrar uma maior patologia cerebral comparada àqueles pacientes com menor RC (340).

Em conclusão uma estimulação mental e física mais intensa no início e durante toda a vida pode aumentar a RC, permitindo que as funções cognitivas sejam mantidas em idosos e com a finalidade de proteger e retardar o aparecimento

de demência ou DA. Em relação à escolaridade como uma medida substituta para a RC, fica evidente a ligação das demências com a educação, postulada que a hipótese da RC para o ensino superior pode ser: (1) reduzir a prevalência e incidência de demência; (2) apresenta pouco ou nenhum efeito sobre a idade no início da demência; (3) possui um efeito limiar, como resultado de um declínio cognitivo acelerado; (4) não tem efeito sobre a morte do paciente (335).

O papel da escolaridade vem crescendo, ao longo do tempo, como uma variável sociodemográfica importante para o processamento neuropsicológico. Neste sentido dados coletados em indivíduos saudáveis tem evidenciado que, quanto maior forem os anos de estudos, melhor será o desempenho em inúmeras tarefas neurocognitivas, com alterações estruturais, volumétricas e funcionais do cérebro. No que se refere aos dados coletados de amostras de pacientes com lesão cerebral adquirida, foi observada uma tendência de sobreposição do efeito da escolaridade sobre o da lesão; e com pacientes portadores de quadros demenciais houve uma relação de maior escolaridade com o aumento da RC (341).

As várias áreas da neuropsicologia clínica, cognitiva, do desenvolvimento, experimental, de avaliação e reabilitação vem buscando novos entendimentos sobre as influências sociais e culturais nas diversas funções cognitivas. Essas influências incluem a escolaridade, experiências pessoais e a quantidade de atividades desempenhadas pelos indivíduos no seu cotidiano (342).

Pesquisas comportamentais e de neuroimagem destacam o papel da escolaridade no desempenho de tarefas neuropsicológicas, na organização cerebral, bem como um fator neuroprotetor em algumas patologias cerebrais (341). Estudos em indivíduos saudáveis revelam que a quantidade de anos de estudo é um fator importante para se determinar o desempenho neuropsicológico em atividades que envolvem a memória, a atenção, a linguagem e as funções executivas. Até mesmo em tarefas cognitivas não verbais têm-se observado o impacto dos anos de escolaridade (343).

Estudos que têm como objetivo uma análise comparativa entre grupos ou normatização, evidenciam que a variável escolaridade desempenha papel relevante, sendo acompanhada pelo fator idade (344). Na análise comparativa entre indivíduos analfabetos, que não tenham frequentado nenhuma aprendizagem formal escolar, e pessoas escolarizadas, a avaliação da influência da variável escolaridade e da

aquisição da linguagem na cognição humana, ao nível comportamental, revelou que os indivíduos escolarizados tiveram melhor desempenho das tarefas em relação aos não escolarizados (343, 345, 346).

Outro estudo conduzido por Meguro et al. (347), com idosos de 65 anos ou mais, demonstraram efeitos sobre a educação em algumas tarefas cognitivas, tais como: fluência verbal de geração de listas e de palavras; *Trail Making Test (A e B)*; memória episódica de curto prazo e abstração e julgamento. De acordo com a idade dos participantes, somente foram observados efeitos no subteste de símbolo de dígitos da Escala Wechsler de Inteligência revisado (WAIS-R), quando o efeito da variável escolaridade foi controlado. Estes achados sugerem que a escolaridade como uma reserva cognitiva desempenha um papel importante no processo de envelhecimento, de um modo mais ativo do que em relação à variável idade.

Estes autores apontaram a escolaridade como uma variável que está envolvida em experiências ambientais, que promove também efeitos na cognição e indicaram que as diferenças encontradas entre os grupos podem ser devido a alterações estruturais do cérebro, resultando no aumento das sinapses e na vascularização cerebral (347).

Outro estudo longitudinal foi realizado com uma população de idosos chineses investigou variáveis sociais, de estilo de vida e de saúde (348). Os resultados encontrados sugerem que os efeitos da escolaridade foram indicadores independentes do prejuízo cognitivo, mesmo após as variáveis como risco cardiovascular e as variáveis socioculturais e de saúde serem controladas. Por outro lado, outro estudo comparativo com idosos de 60 a 64 anos demonstrou que o grau de atrofia cerebral associada com a idade não estava relacionada com a escolaridade dos idosos na execução das tarefas cognitivas. Os grupos analisados quanto à variável escolaridade apresentavam o seguinte perfil: menos de 10 anos de estudo, de 10 a 12 anos de estudo e o último grupo de 13 anos de estudo ou mais. Portanto, não havia grupo de pessoas com baixa escolaridade. Estes resultados sugerem que a educação exerceu um efeito protetor contra o declínio cognitivo apenas em indivíduos com altos níveis de atrofia (349).

A heterogeneidade cognitiva parece estar relacionada a fatores genéticos e psicológicos, com a predisposição para doenças crônicas e degenerativas, bem como a personalidade e fatores envolvidos no histórico de vida de cada indivíduo

com o passar dos anos de idade (350, 351). Assim, maior heterogeneidade está presente no desempenho neuropsicológico em pessoas que possuem baixa escolaridade, quando comparadas àquelas de alta escolaridade. Isto pode ser explicado provavelmente em decorrência da interação da escolaridade com o meio social (352, 353). A heterogeneidade também ocorre na avaliação do desempenho cognitivo em adultos jovens, podendo influenciar os diferentes níveis de estimulação cognitiva que estão sendo avaliados (341).

Técnicas complementares de neuroimagem estão associadas às investigações de tarefas neuropsicológicas relacionadas aos efeitos da escolaridade sobre os processos cognitivos. Estudos conduzidos por Solé-Padullés et al. (354), utilizando ressonância magnética funcional (fMRI), mostraram que, entre grupos de adultos saudáveis, a maior RC, está associada ao tamanho do cérebro e à menor ativação cerebral durante a execução de tarefas cognitivas. Participantes que possuem maior RC usam menos redes neurais, contudo, desempenham com maior eficiência as tarefas propostas, em comparação com idosos que demonstram pouca RC e, portanto, ativam mais regiões encefálicas para desempenharem as mesmas tarefas, como por exemplo: as regiões fronto-temporais, núcleos subcorticais e o cerebelo. O fenômeno está relacionado a respostas compensatórias (355).

1.3.1.4 Enriquecimento ambiental como aprimoramento cognitivo e comportamental em animais

Donald Hebb (1940) formalizou a importância do enriquecimento para roedores em laboratório. Este pesquisador demonstrou que, quando ratos de laboratórios que tinham liberdade para explorar suas caixas, semelhantes a animais de estimação, apresentavam melhores respostas para resolver problemas e exibiam maior habilidade em tarefas que avaliavam a aprendizagem do que ratos alojados em condições laboratoriais padrão (356).

Atualmente, o termo “enriquecimento ambiental” foi proposto como um conjunto de atividades que possibilita melhorar as necessidades etológicas e psicológicas dos animais, com modificações no seu recinto e na sua rotina, visando

ofertar desafios ou aparatos ecológicos, cognitivos, ocupacionais ou artificiais, para otimizar o bem-estar fisiológico e psicológico dos animais (357). Estes estímulos não são recebidos pelos animais, quando expostos a condições de alojamento padrão (296).

O EA tem sido avaliado desde 1960, por inúmeros pesquisadores que visam observar seus efeitos de estimulação ambiental, experiência e treino sobre o cérebro. Rosenzweig et al. (301) realizou um experimento clássico. Estes autores utilizaram “gaiolas viveiros” com uma rica variedade de estímulos, tais como diversos objetos de formas e tamanhos diferentes, espelhos, rodas de atividade, escadas e espaço mais amplo, bem como diferentes estratégias para obtenção de alimentos. Os resultados demonstraram que em diferentes idades, a interação com esse ambiente enriquecido em estímulos houve um aumento da espessura das camadas do córtex visual, do tamanho do núcleo e do corpo celular do neurônio, aumento do número de sinapses e das fendas sinápticas, do número de dendritos e de espículas dendríticas, bem como maior volume e aumento do peso cerebral e, por fim, alterações nos níveis dos neurotransmissores (301).

Pesquisadores como Widman et al. (358), Tomaz e Costa (359) e Ferrari et al. (360) revelaram alterações neuroquímicas em decorrência da exposição de animais em ambiente enriquecido, como síntese de proteínas no córtex e aumento da porcentagem de RNA. Em adição, o EA altera os níveis de cortisol. Por exemplo, Carlstead et al. (361), trabalharam com ambiente enriquecido para leopardos (*Prionailurus bengalensis*) em cativeiro, que possibilitava que estes animais pudessem se esconder de outros felinos maiores (*Panthera spp*) que viviam em cativeiro vizinho. Estes autores observaram que houve uma redução de comportamento e de estereotipias motoras denominadas “pacing” (i.e., andar de um lado para outro sem uma finalidade aparente) seguido da diminuição dos níveis de cortisol.

Outro grupo de pesquisadores (362, 363) constataram que EA aplicado no cativeiro de grande felinos (*Panthera tigris tigris*) no Zoológico de Brasília, Distrito Federal, desinibiram as atividades locomotoras desses animais quando exposto à presença de visitantes. Ademais, o EA acentuou as atividades comportamentais cognitivas e diminuíram anormalidades, tais como o *pacing*. Estes resultados demonstraram o efeito terapêutico de EA, amenizando os níveis de estresse no

cativeiro induzido pela ausência de estímulos, e também pela presença dos visitantes, sugerindo uma correlação biológica propiciada pela intervenção do EA, pelas quais estes felinos foram submetidos (241).

Roedores crescidos em ambiente enriquecido apresentam uma série de respostas plásticas no cérebro, dentre elas: neurogênese, aumento da ramificação dendrítica, aumento do tamanho celular, que podem ter como consequências melhoras na aprendizagem e memória (364, 365, 366). Estes eventos podem conduzir na busca do entendimento de doenças neurodegenerativas em modelos animais, bem como de lesões cerebrais e transtornos psiquiátricos (367-371).

Estudos que envolvem o uso de EA em ratos de laboratório dependem de diversos fatores. (1) tamanho das caixas e o número de animais alojados em cada caixa; (2) tipos de objetos utilizados no período de enriquecimento; (3) a idade dos animais no início da manipulação experimental; (4) o período de duração que os animais são mantidos na caixa de enriquecimento (5) A cepa e o sexo dos animais utilizados no protocolo experimental e (6) os tipos de controles utilizados, controle social (CS) ou controle isolado (CI) (372).

A média da densidade das caixas utilizadas no EA em vários estudos foi estimada em $1.039 \text{ cm}^3/\text{animal}$ e 4 a 5 animais por caixa. A quantidade de ratos alojados juntos variou muito, no máximo 15 e no mínimo 2 ratos por caixa. Brown e Grunberg (373) constataram que animais expostos em caixas lotadas produziu um efeito elevado dos níveis de corticosterona e também elevados níveis de ansiedade quanto mantidos em condições de isolamento. Ademais, ratos crescidos em isolamento exibem um padrão comportamental conhecido por “síndrome do isolamento social”, que está ligado à hiperatividade na exploração por ambientes novos, mas pobre para a adaptabilidade (374) e maior impulsividade (375), quando comparados a ratos crescidos em EA. Adicionalmente, ratos CI submetidos ao LCE apresentaram maior nível de ansiedade, evitando explorar os braços abertos do que os animais CS (376, 377). Finalmente, ratos alojados em condições de isolamento demonstram comportamento depressivo, quando testados no teste do nado forçado (TNF) (374, 378), maturação sexuais tardia (379) e são mais afetados negativamente pelos estímulos estressantes do que os animais alojados em EA (372).

Laviola et al. (370) propôs que animais mantidos em EA devem ser usados com o objetivo de testar a validade de modelos animais de transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos, contudo é necessário a padronização do EA para se obter bons resultados.

Estudos conduzidos por Zimmermann et al. (380) notaram que ratos mantidos em EA, submetidos ao teste do campo aberto, demonstraram capacidade para explorar os conflitos gerados pela emocionalidade/medo, pois o comportamento exploratório pode ser reduzido pela expressão de medo manifestada pelo animal. EA diminui este medo e desencadeia a habituação mais rápida a novos ambientes, comparados com CI ou CS. Em adição, se houver uma habituação mais rápida, melhor será o processamento da informação, e conseqüentemente, melhor habilidade de enfrentamento (372).

Em relação à emocionalidade da ansiedade, estudos têm mostrado que o EA reduz os níveis de ansiedade em ratos com a idade de 4 semanas, mantidos em EA por 9 a 13 semanas, quando submetidos ao LCE, exibindo significativamente maior porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e entradas nos braços abertos em comparação com os controles CI ou CS. O grupo controle CI revelou, significativamente, porcentagem mais baixa de tempo gasto nos braços abertos e entradas nos braços abertos, do que ambos os grupos alojados em condições de EA ou controle CS, apresentando o efeito da interação social, mesmo na ausência de EA físico (381).

Sobre os aspectos de gênero, ao avaliar ratas fêmeas expostas ao EA com 9 a 13 semanas de idade, alojadas por 4 a 8 semanas no EA e com o uso de controle CI, obteve-se como resultado o aumento do tempo gasto nos braços abertos e redução da porcentagem de tempo gasto nos braços fechados (382). Além disso, animais expostos ao EA pós desmame, com duração de EA de 9 a 13 semanas, aumentaram o número e a porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE (383, 384) em comparação com os controles CS. Todos estes achados corroboram com a sugestão de que EA reduz os níveis de ansiedade em animais submetidos ao LCE. Porém, dois trabalhos contraditórios foram encontrados, demonstrando que nenhuma diferença significativa ocorreu no tempo gasto ou na porcentagem de entradas nos braços abertos sobre ratos alojados em AE, controles CI ou CS (378, 385).

O estudo conduzido por Brenes et al. (378) demonstrou que os ratos machos mantidos em EA apresentaram significativamente mais entradas nos braços fechados do que os seus controles CI ou CS, pelos quais sugerem aumento dos níveis de ansiedade nestes animais. Estes autores indicam que possivelmente estes resultados possam ter sido devido a fatores de procedimentos laboratoriais, como por exemplo: local de aplicação do LCE muito iluminado e alterações nos níveis de ansiedade promovida pela manipulação dos animais no momento da marcação do rabo (378). Outras avaliações dos níveis de ansiedade com animais alojados em EA, por 2 semanas, revelaram que EA foi capaz de reduzir o comportamento defensivo em ratos Wistar adultos em relação ao CS (386).

O teste no LAM é utilizado para avaliar a aprendizagem e a memória, bem como efeitos de EA. Neste caso, ratos mantidos em EA têm mostrado redução na latência para localizar a plataforma oculta no teste do LAM em relação ao CI (387) e também comparados aos controles CS (388, 389, 390). Animais alojados em EA com 4 semanas de idade, mantidos em EA por 4 a 8 semanas e controles CI e SC também apresentaram redução da latência para localizar a plataforma oculta no LAM (391).

Outro estudo registrou que os animais CI demoraram 6 dias para localizar a plataforma oculta com o tempo mínimo de 7 a 10 s, enquanto o grupo dos animais mantidos em EA atingiram estes mesmos critérios apenas em 3 dias de treino (388). Resultados contraditórios também foram revelados no teste do LAM em animais alojados em EA. Estudos conduzidos por Ueda et al. (392) não encontraram nenhum efeito na latência de localização da plataforma oculta em animais alojados em EA. Estes autores sugerem que possivelmente os animais CS apresentaram bom desempenho no LAM e caso fosse utilizado CI a diferença significativa poderia ter sido detectada.

Adicionalmente, animais crescidos em EA, por 1 ano, apresentaram diminuição da latência em relação aos CI (393). Ademais, EA foi capaz de reduzir a latência em animais alojados por 9 a 13 semanas em condições de EA (394) além de diminuir thigmotaxia em comparação com o grupo CI (382) e com o grupo SC (395).

Ratos expostos ao teste do campo aberto tendem a explorar a zona periférica deste equipamento. Este comportamento de permanecer perto das paredes laterais do aparato é chamado de **thigmotaxia**. Porém, a thigmotaxia diminui lentamente durante os primeiros minutos após a introdução do animal no teste. Experimentos anteriores têm considerado o grau de thigmotaxia como indicativo de ansiedade. Esta hipótese foi validada com o uso de drogas ansiogênicas, que aumentam a thigmotaxia e ansiolíticas que reduzem este comportamento (396).

Finalmente, Cui et al. (397) não observaram nenhum efeito do AE em ratos normais mantidos por 4 a 8 semanas, em EA, no desempenho do teste do LAM. Contudo, condições de EA restauraram os déficits de aprendizagem espacial devido a estímulos estressantes sofridos pelos animais no início da vida.

Estudos envolvendo condições de EA avaliados sobre teste no LAM apresentam principalmente efeitos de EA sobre o processo de envelhecimento ou declínio cognitivo, proveniente de resultados de lesão ou injúria cerebral. Em geral, pelo que foi demonstrado em diversos estudos, tudo indica que os efeitos encontrados com o uso de EA em experimentação animal revelam efeitos positivos sobre a aprendizagem espacial e memória analisados no teste do LAM, embora com algumas exceções, em decorrência de resultados contraditórios publicados na literatura (372).

O EA por um período curto de tempo, todos os dias ou contínuo, de 3 a 4 semanas, não atingiu efeitos benéficos em camundongos (398). Por outro lado, quando os animais são submetidos a mais de 10 semanas, continuamente em EA, disponibilizando interações sociais, atividades físicas e desempenho de funções intelectuais ocorre redução do declínio da memória espacial envolvida com o processo de envelhecimento (399). Em adição, EA, por um período longo de tempo, aumenta a neurogênese hipocampal até 5 vezes em animais idosos (400). Em camundongos idosos transgênicos (modelo animal de Alzheimer) também ocorreram melhoras cognitivas (401), bem como diminuíram a incidência e severidade de transtornos neurodegenerativos relacionados ao processo de envelhecimento (402).

A habilidade de EA sobre a longevidade foi investigada por Lores-Arnaiz et al. (403) onde se considerou marcadores de plasticidade sináptica durante o processo de envelhecimento. Os experimentos foram conduzidos em ratos machos e fêmeas mantidos em EA com SC por 107 semanas (a idade final dos animais era de 27 meses). Os resultados revelaram que o EA aumentou significativamente a

longevidade dos animais idosos e o efeito foi mais evidente em ratos machos do que nas fêmeas. Estes animais apresentavam níveis elevados de óxido nítrico sintase (NOS) tanto mitocondrial com citosólico, além de um significativo aumento nas áreas dendríticas e do corpo celular dos neurônios corticais e hipocâmpais, em comparação com o SC (403).

O tempo de exposição prolongado de animais ao EA preveniu declínio de memória relacionado à idade, avaliado no LAM, e ocorreu um aumento da plasticidade neuronal, quando comparado ao SC. Um efeito relacionado ao sexo também foi observado nas fêmeas alojadas em EA, que apresentaram um aumento nas atividades complexas do cérebro, quando foram avaliadas pelos níveis de NOS, comparadas ao SC. Em contrapartida, não houve diferenças significativas entre EA e SC nos animais machos (402).

Em conclusão, experimentos com a prática do EA têm crescido nos últimos anos. Animais crescidos em EA apresentam efeitos positivos em relação aos aspectos fisiológicos e psicológicos, comprovando que o EA promove bem-estar para estes animais (404). Animais saudáveis e bem adaptados contribuem significativamente para a qualidade dos dados coletados em pesquisas científicas (405). Para a neurociência, a aplicação de EA tem ampla investigação sobre diversas áreas de atuação, tais como: sobre a depressão, ansiedade, dependência de drogas, doenças de Alzheimer e Parkinson, além de lesões cerebrais traumáticas e lesão da medula espinal, dentre outras. Contudo, ainda existe a necessidade de mais pesquisas a respeito dos efeitos de EA e o bem-estar animal. É viável ressaltar que a EA não é a única solução para amenizar os problemas dos animais de cativeiro. EA tem suas limitações, mas se executada com eficiência, produzirá um impacto favorável na vida dos animais (406).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

Investigar os efeitos da vitamina C sobre a ansiedade e memória em dois estudos: o primeiro em estudantes do Ensino Médio de Escola Pública, visando avaliar e comparar parâmetros fisiológicos e desempenho cognitivo, e o segundo em ratos de meia-idade, crescidos em ambiente enriquecido, para verificar a influência da vitamina C sobre os efeitos comportamentais em modelo animal de ansiedade e memória, associada com o enriquecimento ambiental.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Investigar os efeitos da suplementação da vitamina C sobre os níveis de ansiedade e déficits de memória dos estudantes, antes e após as intervenções da vitamina C (experimental) ou placebo (controle), em um estudo randomizado e duplo cego.
- b) Avaliar os parâmetros fisiológicos dos estudantes, tais como: aferição da pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca e as medidas da concentração plasmática de vitamina C, antes e após as intervenções.
- c) Avaliar e comparar o desempenho cognitivo dos estudantes suplementados com vitamina C ou placebo, antes e após as intervenções, através de uma bateria de testes neuropsicológicos de ansiedade e memória.
- d) Investigar a influência da vitamina C (experimental) e solução salina (controle) em ratos de meia-idade (14 meses), crescidos em ambiente com enriquecimento, sobre a ansiedade e memória, avaliadas no LCE e no LAM.

3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O primeiro estudo envolveu estudantes do Ensino Médio de Escola Pública. Os pesquisadores garantiram total privacidade e seguro anonimato aos participantes, na confidencialidade dos dados coletados, bem como proporcionaram liberdade para a desistência em qualquer etapa da pesquisa, sem nenhum prejuízo, no decorrer dos procedimentos laboratoriais e testes neuropsicológicos de ansiedade e memória.

Todos os participantes foram informados dos detalhes do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido, foi assinado pelo participante maior de idade (18 a 70 anos) ou pelos pais responsáveis pelo estudante menor de idade (14 a 17 anos). O protocolo experimental está de conformidade com a Declaração de Helsinki e Guia de Boas Práticas Clínicas, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, sob o nº 022/12 (Anexo A).

O segundo estudo foi conduzido em modelo animal de ansiedade e memória. Todos os procedimentos utilizados estão de acordo com as orientações contidas no Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (UnB, Brasil), conforme Publicação NIH Nº 85-23 que rege os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, revisado em 1985, sob o nº 59616/2010 (Anexo B).

Todos os esforços foram realizados para evitar o sofrimento dos animais durante os procedimentos laboratoriais e no período de manutenção e limpeza das caixas dos animais, tanto em ambiente enriquecido, quanto no ambiente padrão.

4 ESTUDO 1: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE VITAMINA C EM SERES HUMANOS ESCOLARIZADOS SOBRE A ANSIEDADE E MEMÓRIA

A ansiedade é acompanhada de alterações dos sinais fisiológicos, em decorrência a uma resposta produzida por uma ameaça aparente, vaga ou interna (407) e serve como uma função adaptativa, preparando o indivíduo para o potencial perigo, bem como alertando a pessoa para estar preparada para uma ameaça iminente (407, 408). No entanto, quando a ansiedade é extremamente elevada e persistente, pode ser considerada, dentro dos critérios dos transtornos, como um evento patológico (408).

A ansiedade também está associada a problemas secundários, como falta de autoconfiança e dificuldades acadêmicas (409). Nesses casos, a ansiedade pode causar irritabilidade, inquietação, distúrbios do sono, preocupação persistente, náuseas, palpitações, dores de cabeça, dores de estômago (410). Além disso, para os estudantes, outros sintomas podem ser expressos em sala de aula e contribuir para o baixo desempenho acadêmico, tais como: pânico, medo de falhar nos exames, nervosismo, incapacidade de realizar tarefas, e batimentos cardíacos acelerados (411). Altos níveis de ansiedade podem prejudicar a memória de trabalho e aumentar a distração dos estudantes (412, 413) e obtenção de notas mais baixas (414). A ansiedade vem sendo o principal preceptor do desempenho acadêmico dos estudantes (415), pois um aumento dos níveis de ansiedade pode estar associado a um desempenho acadêmico inferior (416, 417).

Estudos têm mostrado que a vitamina C está relacionada com o comportamento ansioso e psicológico desencadeado por situações de estresse. O tratamento por 14 dias com doses elevadas de vitamina C (1,000 mg três vezes por dia) reduziu a pressão arterial, diminuição do cortisol, e reduziu respostas subjetivas associadas ao estresse psicológico agudo (418). Níveis de concentração plasmática de vitamina C foram inversamente associados com a pressão arterial sistólica e diastólica em estudos transversais (419, 420).

Mazloom et al. (421) demonstraram que a vitamina C reduziu significativamente os escores de ansiedade, em comparação com vitamina E e placebo em pacientes diabéticos tipo 2; no entanto, não foram encontradas

diferenças significativas entre os grupos experimental e controle para os escores de depressão ou estresse.

Recentemente, Aburawi et al. (422) investigaram a eficácia da vitamina C como tratamento para a depressão e a sua ação associada com antidepressivos, tal como paroxetina, fluoxetina, clomipramina, fluvoxamina, e a combinação de olanzapina e clomipramina. Os autores concluíram que a combinação de vitamina C, com antidepressivos, resultou em uma melhor resposta terapêutica para a depressão. Da mesma forma, Amr et al. (423) também demonstraram a eficácia da adição de vitamina C à fluoxetina como um coadjuvante para o tratamento do transtorno depressivo maior em pacientes pediátricos. Adicionalmente, numerosos estudos de modelos animais de depressão têm mostrado os efeitos antidepressivos de vitamina C (424-429).

A suplementação de vitamina C tem produzido resultados inconsistentes para o tratamento da fadiga em seres humanos. No entanto, um ensaio clínico realizado por Suh et al. (430) forneceu resultados positivos. A administração intravenosa de vitamina C diminuiu a fadiga em trabalhadores de escritório após duas horas, e os níveis de fadiga permaneceram inferiores por um dia, com altos níveis de vitamina C no plasma e redução do estresse oxidativo em relação ao grupo placebo. Além disso, outros estudos têm indicado uma alta prevalência de hipovitaminose C e D em pacientes com cuidados agudos e melhora do humor, reduzindo o distresse em pacientes hospitalizados (431, 432, 433).

O estresse oxidativo pode contribuir para a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (409, 434). Um estudo demonstrou que há associações entre níveis de oxidantes/antioxidantes e transtornos de ansiedade em crianças e adolescentes (409). Isto sugere que o estresse oxidativo pode ser prejudicial em crianças e adolescentes com transtornos de ansiedade. Neste sentido, o elevado consumo de oxigênio que ocorre no cérebro e a sua constituição rica em lípidios (435, 436) podem contribuir para o estresse oxidativo, e isto pode promover ou provocar distúrbios psiquiátricos (437, 438). Entre outros fatores, tais como genético, neuroquímico, neurobiológico e psicológico, o estresse oxidativo pode ser um fator importante para a etiopatogenia de transtornos de ansiedade (401).

Outros estudos também encontraram uma ligação entre estresse oxidativo e transtorno obsessivo compulsivo e transtorno de pânico, indicando que o

metabolismo oxidativo pode afetar a regulação da ansiedade (439, 440). Para combater essas alterações neuroquímicas, os sistemas biológicos são equipados com defesas antioxidantes. Portanto, a suplementação com antioxidantes podem desempenhar um papel terapêutico importante para combater o estresse oxidativo em indivíduos que sofrem de ansiedade (407).

O objetivo deste primeiro estudo foi verificar se um importante antioxidante como a vitamina C exerce um efeito ansiolítico em estudantes do Ensino Médio. Os níveis de ansiedade dos estudantes foram avaliados por um instrumento validado conhecido como Inventário de Ansiedade de Beck. Além de analisar e comparar o desempenho cognitivo dos estudantes suplementados com vitamina C ou placebo, antes e após a intervenção, através de uma bateria de testes neuropsicológicos de memória. Isto possibilitou a investigação do suposto papel terapêutico da vitamina C na cognição de humanos escolarizados e sua relação com a ansiedade e a memória.

Os efeitos da suplementação da vitamina C sobre a ansiedade em estudantes do Ensino Médio, que fazem parte deste estudo, já foram publicados no *Pakistan Journal of Biological Sciences* e uma cópia é apresentada no Anexo N.

4.1 MÉTODOS

4.1.1 Participantes

Estudantes do Ensino Médio de Escola Pública, de ambos os sexos, foram convidados a participar neste estudo. Foram entrevistados 99 estudantes, sendo 70,7% do sexo feminino e 29,3% do sexo masculino. Destes, 97 foram selecionados, conforme os critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo. Na 1ª avaliação realizada por psicólogas, 2 estudantes foram excluídas, por estarem ingerindo medicamentos de uso controlado para epilepsia e disfunção da tireóide. Na coleta de dados do 1º dia do experimento (linha de base) 22,68% dos estudantes desistiram e 34,02% dos estudantes não participaram dos procedimentos laboratoriais pós-tratamento, caracterizando duas perdas amostrais. Assim, 42,29% dos estudantes completaram todas as etapas do estudo. O fluxograma dos participantes é apresentado na Figura 9.

4.1.2 Critérios de Inclusão

Todos os estudantes que apresentavam pleno gozo da saúde física e mental foram incluídos no corrente estudo. Não havia histórico de tabagismo entre os participantes.

4.1.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os estudantes que estavam ingerindo regularmente suplementos de vitamina C ou medicamentos restritos a pacientes psiquiátricos, bem como aqueles que tinham histórico de doença tais como: diabetes, hipertensão, problemas de coração, pulmão, predisposição para doença renal, desnutrição,

raquitismo, baixo peso para a sua idade. Também foram excluídas deste estudo as estudantes grávidas.

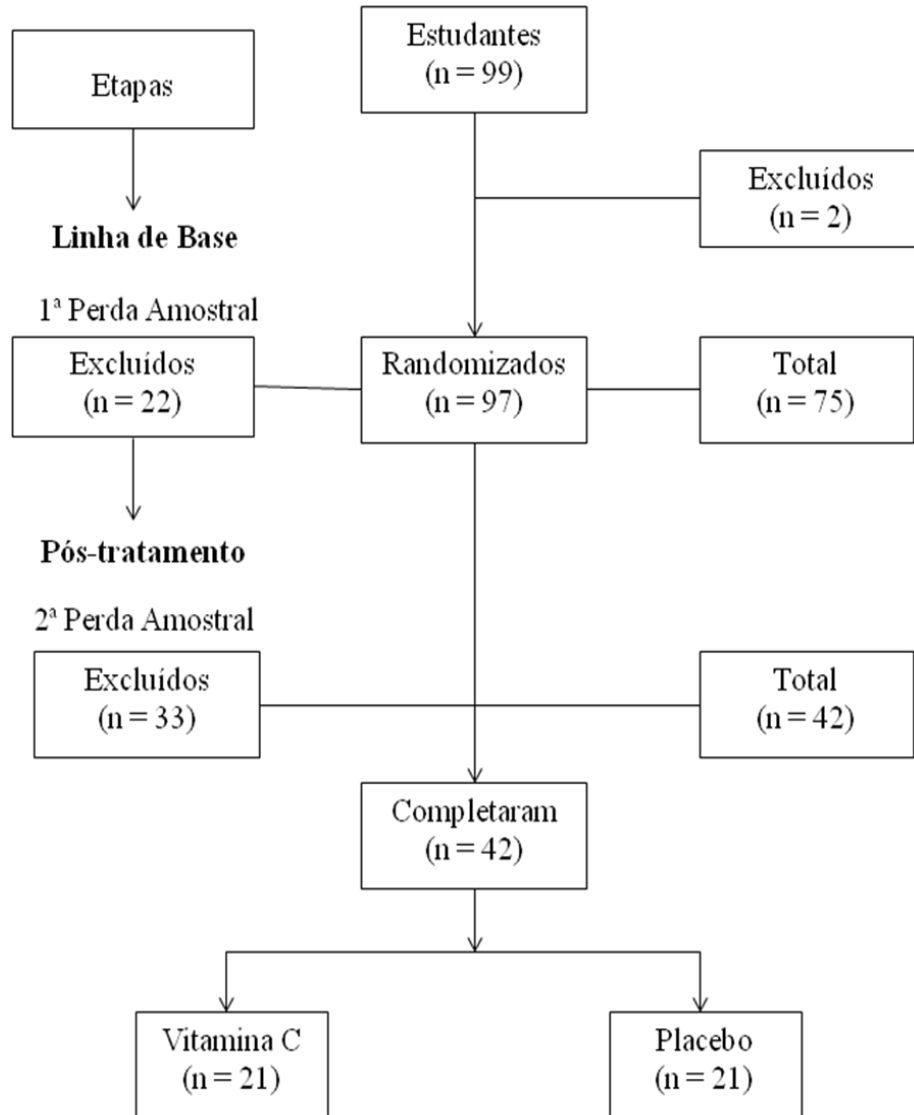


Figura 9. Fluxograma dos participantes

4.1.4 Local da Pesquisa

O Centro de Ensino Médio de Escola Pública (CEM) foi criado pelo Decreto nº 108, de 28 de novembro de 1978 (Figura 10). É uma entidade de caráter educacional e ocupa um espaço de grande importância no contexto histórico-educacional da comunidade de Ceilândia. Como Instituição de Ensino Médio (IE), o CEM é destaque na comunidade do Setor “O”, Ceilândia/Distrito Federal, sendo responsável pela inserção de vários jovens no contexto universitário do DF. A IE passou a ser atendida pelo Programa de Desenvolvimento Educacional (PDE) em 2009, bem como em consonância com as políticas públicas do MEC e da Secretaria de Educação do Distrito Federal.

A clientela do CEM é formada por estudantes na faixa etária a partir de 13 anos no turno vespertino, 15 anos no turno matutino e 17 anos até 70 anos no turno noturno. A grande maioria dos estudantes são trabalhadores, estagiários, menor aprendiz ou desempenham serviços diversos ou são filhos(a) de trabalhadores(as) em geral, isto é, comunidade de médio a baixo poder aquisitivo. Existem também no corpo discente 02 estudantes com necessidades educacionais especiais matriculados em séries regulares com acompanhamento da coordenação e da orientação educacional.



Figura 10. Centro de Ensino Médio de Escola Pública

4.1.5 Perfil da Equipe Multidisciplinar

Os estudantes foram avaliados por uma equipe multidisciplinar com experiência em bioquímica, nutrição, psicologia e neurociências. A equipe era formada pelas Psicólogas Aline Maria Lannone Alonso (CRP 01/8637), Doutoranda em Ciências do Comportamento, do Instituto de Psicologia, da Universidade de Brasília - UnB e Jaqueline Lopes Barreiro (CRP 01/13581) com as seguintes atribuições: aplicação dos testes neuropsicológicos, entrevistas semi-estruturada e avaliação psicológica dos estudantes. A Nutricionista Dra. Grazielle Gebrim Santos (CRN 3655), responsável pela descrição nutricional, recordatório nutricional e ingestão de nutrientes. Todas as profissionais eram devidamente credenciadas pelos seus respectivos Conselhos Regionais de Psicologia (CRP) e de Nutrição (CRN).

4.1.6 Perfil da Equipe do LACEN-DF

O Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) é um órgão vinculado à Subsecretaria de Vigilância à Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde. Sua criação se deu em setembro de 2000, em substituição ao Instituto de Saúde do DF - ISDF, então com 22 anos de atividade. O LACEN-DF tem como objetivo realizar pesquisas científicas e exames laboratoriais como atividades de vigilância sanitária e epidemiológica.

O LACEN-DF integra a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde e está sob a Gerência do Mestre em Ciências Farmacêuticas e Farmacêutico, Ms Nelson Frick da Silva Fagundes, Gerência de Medicamentos e Toxicologia do LACEN-DF, que realizou juntamente com sua Equipe de Bioquímicos a coleta e análise de sangue dos estudantes, cumprindo as normas de segurança e procedimentos, visando à proteção dos sujeitos de pesquisa e seus responsáveis legais.

4.1.7 Compostos

As cápsulas de vitamina C e as cápsulas de placebo foram obtidas da Farmacotécnica (Farmácia de Manipulação de Medicamentos – Brasília, Distrito Federal).

4.1.8 Procedimentos Experimentais

Quarenta e dois estudantes foram recrutados e designados aleatoriamente (n = 21 para cada grupo) para receber a vitamina C ou placebo. Não houve desistências. Os participantes tomaram cápsulas de placebo ou cápsulas de suplemento de vitamina C (500 mg/dia), todos os dias, durante 14 dias. Apenas a

nutricionista responsável pelo acompanhamento e distribuição das cápsulas estava ciente da composição das cápsulas. Os estudantes foram avaliados por uma equipe multidisciplinar com experiência em bioquímica, nutrição, psicologia e neurociência. A equipe realizou entrevistas com todos os estudantes. Os estudantes foram informados sobre a finalidade e os procedimentos experimentais. O primeiro dia do experimento começou às 08h00, com a recepção dos estudantes no laboratório, onde eles receberam um kit de um nutricionista contendo cápsulas de vitamina C ou placebo. As cápsulas de placebo eram idênticas na aparência como as cápsulas de vitamina C (ambas em cores verdes e brancas). Em seguida, foi aferida a pressão arterial sistólica e diastólica, a frequência cardíaca e foram coletadas amostras de sangue (5 mL) dos estudantes. Todos os estudantes foram informados que para a coleta das amostras de sangue seria necessário jejum de oito horas e que a coleta de sangue teria início às 09h00. A coleta de sangue terminou às 10h00 e as amostras foram encaminhadas para análise. Após a coleta de sangue foi oferecido café da manhã aos estudantes participantes. No dia seguinte, os estudantes foram então avaliados pelas psicólogas da equipe, em ordem aleatória, com uma bateria de testes neuropsicológicos de ansiedade e memória. Estes testes do 1º dia constituíram as medidas iniciais (linha de base). Estes procedimentos experimentais foram repetidos no 15º dia (pós-tratamento), após a sequência da suplementação.

4.1.8.1 Aferição da Pressão Arterial

Antes das amostras de sangue serem coletadas, as medidas da pressão arterial sistólica e diastólica e a frequência cardíaca dos estudantes foram aferidas através de um esfigmomanômetro autoinflável automática portátil (Powerpack MS-918). O procedimento foi repetido no décimo quinto dia pós-tratamento.

4.1.8.2 Coleta de Sangue e Procedimentos Laboratoriais

A aferição da concentração plasmática de ácido ascórbico foi inicialmente baseada na oxidação do ácido ascórbico por ácidos dicetogulônico e ácidoshidroascórbico. Estes produtos reagem com 2,4 dinitrofenilhidrazina para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona. Este composto, após reação com o ácido sulfúrico (H_2SO_4), forma um produto com uma banda de absorção que pode ser medida a 520 nm. Neste estudo, a concentração de ácido ascórbico no plasma foi avaliada segundo o protocolo proposto por Bessey (441) com uma metodologia semelhante a estudos anteriores (442, 443). Amostras de sangue venoso (5 mL) foram coletadas de todos os alunos com uso de agulha hipodérmica. Uma solução de 100 ml contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina (2%), tioureia (5%), e sulfato de cobre (0,6%) (DTC) foi preparada imediatamente após isso, uma amostra de 0,4 mL (soro) foi removida e adicionada a 1,6 mL de ácido tricloroacético (TCA) mistura de 5% durante 30 segundos, e centrifugado a 2.500 rpm durante 10 min. Em seguida, 0,2 mL de reagente de DTC foi adicionado a 0,6 mL de sobrenadante e a solução foi posteriormente agitada durante 30 s. Este procedimento foi realizado em triplicata. Para completar a solução padrão, 1 ml de H_2SO_4 a 65% foi adicionado e as amostras foram agitadas durante 30 s. Após 30 minutos, na proteção da luz, a leitura foi feita em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) a 520 nm. A concentração de ácido ascórbico no plasma foi calculada usando uma curva de calibração.

4.1.9 Testes Neuropsicológicos

4.1.9.1 Ansiedade: Inventário de Ansiedade de Beck

O Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) foi projetado por Beck, Epstein, Brown e Steer em 1988 (444, 445). Vinte e um itens foram projetados para medir os sintomas somáticos, afetivos e cognitivos característicos de ansiedade. Este

inventário foi construído para evitar confusão com os sintomas de depressão. Pontuação entre 8 e 15 são interpretados como ansiedade leve, entre 16 e 25, como ansiedade moderada, e entre 25 e 63 ansiedade grave (445).

4.1.9.2 Memória: Figuras Complexas de Rey

As Figuras Complexas de Rey (FCR) objetivam avaliar a atividade perceptiva e a memória visual, nas fases de cópia e reprodução de memória. Seu idealizador foi André Rey (446) e padronizado por Osterrieth (447). Este teste tem por objetivo verificar o modo como o sujeito apreende os dados perceptivos que lhe são apresentados e o que foi conservado espontaneamente pela memória, não existindo limite de idade, e podendo ser utilizado para qualquer idade.

O teste consiste em apresentar ao participante o cartão com a figura A na horizontal, e duas folhas de papel branco, sem pautas, que serão utilizadas para desenhar a figura em dois momentos: no primeiro, foi solicitado ao participante que copiasse a figura A, prestando atenção às proporções, sem precisar fazer uma cópia exata, mas copiando o maior número de detalhes possíveis. O tempo gasto com a tarefa foi registrado com a utilização de um cronômetro, assim que se iniciou a cópia. O segundo momento do teste aconteceu após três minutos da apresentação da figura, e consistiu em reproduzir, de memória, a figura A copiada anteriormente, em outra folha de papel em branco, disponibilizada pelo examinador. O participante é convidado a desenhar de memória tudo o que se lembrar da figura A. Não há necessidade de limitar o tempo para a reprodução da figura A e o participante avisa ao examinador quando considerar que já terminou a tarefa. Contudo, é necessário acionar o cronômetro para registrar quanto tempo o participante gastou para executar a tarefa proposta.

As FCR são amplamente usadas para avaliar a memória visuo-espacial e memória não verbal, não apenas em pacientes com epilepsia, mas também em diferentes áreas das neurociências (448). Este teste permite explorar as habilidades de organização visuo-espacial, planejamento e desenvolvimento de estratégias. A figura modelo é composta das seguintes propriedades: (1) ausência de significação

evidente; (2) realização gráfica fácil e (3) Estrutura do conjunto suficientemente complicada, com o objetivo de exigir do participante ou paciente uma atividade perceptiva analítica e organizada (Figura 11) (449).

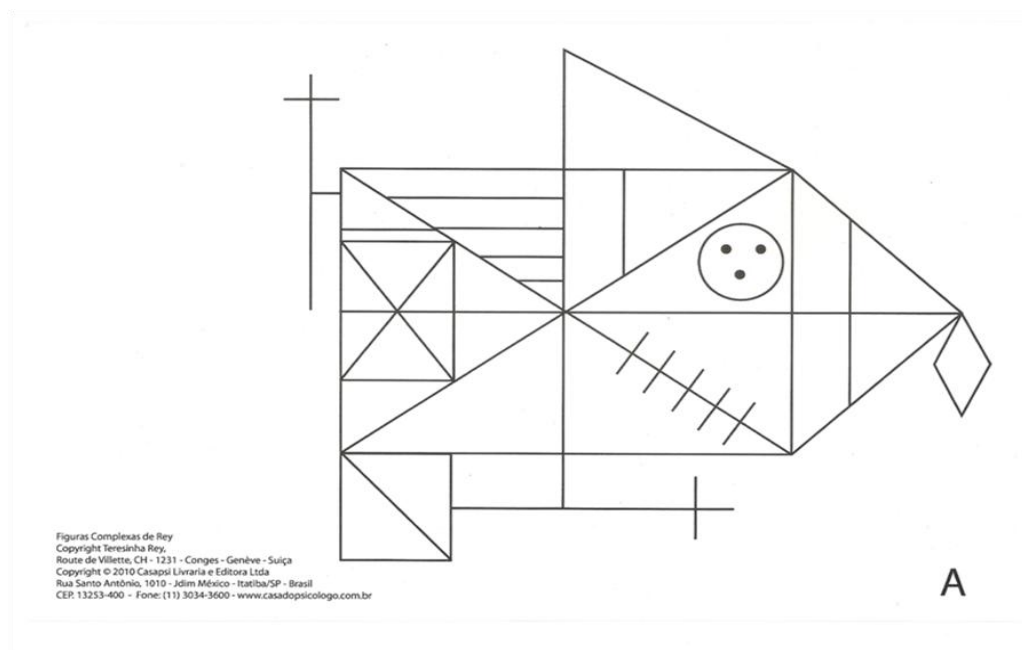


Figura 11. Figura Complexa de Rey. Fonte: (449).

4.1.9.3 Memória: Escala de Memória Weschler

Este teste de memória foi idealizado para propiciar informações importantes nas avaliações neuropsicológicas e clínicas em gerais, além da reabilitação dos aspectos ligados ao bom funcionamento da memória. O objetivo deste teste de memória é avaliar a memória declarativa episódica (informações específicas de uma situação ou contexto), bem como memória de curto e longo prazo e discrepâncias acerca do nível intelectual e da capacidade mnésica dos participantes. O teste é composto por 11 (onze) subtestes, aplicados individualmente, porém é importante disponibilizar um tempo em torno de 35 minutos para a realização total do teste. Foram utilizados 6 (seis) subtestes nesta pesquisa, listadas abaixo:

- 1) **Informação:** necessária para a avaliação da memória imediata e passada relacionadas com conteúdos episódicos; este subteste é caracterizado por meio de perguntas autobiográficas, como por exemplo: data e local de nascimento, nomes de pessoas da história remota e atual do governo;
- 2) **Orientação:** importante para avaliar a noção de espaço e tempo, dia, mês, ano que o participante acredita se encontrar no momento do teste;
- 3) **Controle Mental:** relacionado com raciocínio lógico simples, atenção e evocação livre ligado a memória imediata;
- 4) **Dígitos em ordem direta e inversa:** útil para avaliar a atenção e evocação verbal de números. Este subteste verifica se o participante consegue responder um estímulo verbal e é capaz de manter a atenção, enquanto estiver executando a tarefa no teste. O subteste da ordem inversa consiste em verificar o raciocínio lógico;
- 5) **Memória Lógica I e II:** relacionado com a memória declarativa verbal imediata e tardia. Este subteste garante que o participante memorize um contexto verbal de uma estória a curto e longo prazo. O subteste se inicia quando o examinador conta duas estórias curtas e de lembranças imediatas e o participante tem que relatá-las de acordo com o que consegue se lembrar das estórias. São anotados quantos itens o participante recordou dentre 25 itens presentes em cada estória. O escore máximo é de 50 pontos de cada fase.
- 6) **Aprendizagem de Pares Associados I e II:** envolvido na aprendizagem e memorização imediata de 8 pares de palavras com associação óbvia e não óbvia.

4.1.10 Análise Estatística

O programa software GraphPad Prism foi utilizada para a construção da figura deste experimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SPSS IBM versão 20.0 para Windows (IBM Corp NY, EUA). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão (DP). Para avaliar a normalidade das distribuições das variáveis, foram realizados testes de Kolmogorov-Smirnov. Quando os resultados foram normalmente distribuídos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste paramétrico teste t. Quando os resultados não foram normalmente distribuídos, foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon signed-rank e Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram analisadas por meio de testes qui-quadrado. Os níveis de significância foram fixados em $p < 0,05$.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Características descritivas da amostra

As características demográficas dos estudantes encontram-se na Tabela 2. Em relação à idade o teste t indicou que o grupo vitamina C não era significativamente diferente em comparação com o grupo placebo ($p = 0,125$). Não houve diferenças entre os sexos ($p = 1,000$). As avaliações de altura, peso e índice de massa corporal (IMC) também foram equiparadas não havendo diferenças demográficas significativas entre o grupo da vitamina C, em comparação ao grupo placebo. Em resumo, os dois grupos não diferiram entre si em relação às características descritivas.

Tabela 2 - Características demográficas dos estudantes^(1,2).

Variáveis	Vitamina C (n=21)	Placebo (n=21)	Valor de p
Idade (anos)	30,43 ± 14,35	24,24 ± 11,07	0,125 ⁽³⁾
Gênero (N)			
Masculino (%)	5 (23,80)	5 (23,80)	1,000 ⁽⁴⁾
Feminino (%)	16 (76,19)	16 (76,19)	
Altura (m)	1,62 ± 0,09	1,63 ± 0,09	0,930 ⁽⁵⁾
Peso (kg)	61,43 ± 14,46	59,00 ± 11,59	0,624 ⁽⁵⁾
IMC (kg/m²)	23,32 ± 4,77	22,27 ± 3,76	0,513 ⁽⁵⁾

IMC, Índice de massa corporal.

⁽¹⁾ Todos os valores são expressos com médias ± desvio padrão (DP).

⁽²⁾ Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade das distribuições das variáveis.

⁽³⁾ *t*-test.

⁽⁴⁾ Teste do Qui-quadrado.

⁽⁵⁾ Mann-Whitney *U* test.

Os dados da distribuição de frequências das variáveis de descrição dos estudantes encontram-se na Tabela 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e as variáveis: faixa etária ($p = 0,819$), escolaridade ($p = 0,564$), estado civil ($p = 0,445$), atuação profissional ($p = 0,757$), situação financeira ($p = 0,251$) e religiosidade ($p = 0,268$).

Tabela 3 - Distribuição de frequências das variáveis de descrição dos estudantes.

Variáveis	Vitamina C (n=21)		Placebo (n=21)		Total (n=42)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	N	%	
Faixa Etária							
14 a 17 anos	7	33,34	8	38,09	15	35,71	0,819
18 a 49 anos	12	57,14	12	57,14	24	57,14	
50 a 70 anos	2	9,52	1	4,76	3	7,14	
Escolaridade (*)							
1º Ano	3	14,28	5	23,80	8	19,04	0,564
2º Ano	5	23,80	3	14,28	8	19,04	
3º Ano	0	0	1	4,76	1	2,38	
3º EJA	13	61,90	12	57,14	25	59,52	
Estado Civil							
Casado	8	38,09	6	28,57	14	33,34	0,445
Solteiro	12	57,14	15	71,42	27	64,28	
Separado	1	4,76	0	0	1	2,38	
Trabalha							
Sim	11	52,38	12	57,14	23	54,76	0,757
Não	10	47,61	9	42,85	19	45,23	
Renda Familiar							
Até 2 SM	6	28,57	8	38,09	14	33,34	0,251
3 a 4 SM	5	23,80	9	42,85	14	33,34	
5 a 6 SM	4	19,04	1	4,76	5	11,90	
7 a 8 SM	2	9,52	0	0	2	4,76	
Não declarou	4	19,04	3	14,28	7	16,67	
Religião							
Católica	8	38,09	4	19,04	12	28,57	0,268
Evangélica	5	23,81	4	19,04	9	21,42	
Sem religião	8	38,09	13	61,90	21	50	

(*) Estudantes do Ensino Médio Regular e Educação de Jovens e Adultos (EJA) cursando o período letivo 2013. Turnos: matutino (2º e 3º anos), vespertino (1º ano) e Noturno (3º EJA) = 3º seguimento da EJA; N = número de participantes, SM = salário mínimo, % = frequência.

¹ Teste do Qui-quadrado.

Adicionalmente, em termos de nutrição os estudantes foram avaliados através do recordatório nutricional, os dados estão apresentados na Tabela 4. Verificou-se que de modo geral, os estudantes são considerados eutróficos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos vitamina C e placebo sobre as variáveis das refeições ($p = 0,569$), consumo de alimento ($p = 0,807$) e bebidas ($p = 0,816$), indicando que os grupos são homogêneos em relação aos aspectos nutricionais.

Tabela 4 - Recordatório Nutricional dos estudantes⁽¹⁾.

Variáveis	Vitamina C (n=21)		Placebo (n=21)		Total (n=42)		p ⁽²⁾
	N	%	N	%	N	%	
Nome das Refeições							
Café da manhã	15	19,23	19	21,83	34	20,60	0,569
Lanche da manhã	11	14,10	7	8,04	18	10,90	
Almoço	18	23,07	20	22,98	38	23,03	
Lanche da tarde	16	20,51	14	16,09	30	18,18	
Jantar	15	19,23	19	21,83	34	20,60	
Ceia	3	3,84	8	9,19	11	6,67	
Subtotal	78	100	87	100	165	100	
Alimentos							
Saladas	16	57,14	19	65,51	35	61,40	0,807
Frutas	7	25	6	20,68	13	22,80	
Verduras	5	17,85	4	13,79	9	15,78	
Subtotal	28	100	29	100	57	100	
Bebidas							
Refrigerantes	10	71,42	15	75	25	73,52	0,816
Sucos	4	28,57	5	25	9	26,47	
Total	120	100	136	100	256	100	

⁽¹⁾ Todos os valores são expressos com médias. N = número de participantes, % = frequência.

⁽²⁾ Teste do Qui-quadrado.

A concentração plasmática de vitamina C, a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca são apresentadas na Tabela 5, tanto no início do estudo e após a intervenção experimental (pós-tratamento). O teste de Wilcoxon Signed Rank revelou que houve uma diminuição significativa entre o grupo vitamina C pós-tratamento em comparação com o tratamento inicial ($p = 0,010$). A concentração plasmática de vitamina C foi maior no grupo vitamina C do que no grupo placebo após o período de intervenção ($p = 0,001$). Da mesma maneira, foram encontradas diferenças significativas na média da frequência cardíaca do grupo vitamina C ($p = 0,032$) comparado com o grupo placebo ($p = 0,741$). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos vitamina C ($p = 0,933$) e placebo ($p = 0,965$) e da pressão diastólica entre os grupos vitamina C ($p = 0,698$) e placebo ($p = 0,728$) pré ou pós-tratamento sobre a média da pressão sistólica e pressão arterial diastólica. Estes resultados sugerem que o grupo experimental da vitamina C tinha melhor resposta fisiológica comparada com o grupo controle placebo, apenas na média da frequência cardíaca, indicando que a vitamina C melhorou este parâmetro que está envolvido com os sintomas de ansiedade. Como mostrado na Figura 12, os escores de ansiedade após a intervenção foram significativamente menores para a vitamina C ($p = 0,010$) do que o grupo controle placebo ($p = 0,050$), indicando que os suplementos orais de vitamina C melhoraram os níveis de ansiedade dos estudantes.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos e fisiológicos dos estudantes pré e pós-tratamento com suplementação de vitamina C ou placebo, conforme análise não paramétrica Wilcoxon signed rank test ^(1, 2).

Variáveis	Vitamina C (n = 21)		p ⁽²⁾	Placebo (n = 21)		p ⁽²⁾
	Antes	Depois		Antes	Depois	
CPVC (mg/dl)	1,09 ± 0,52	1,85 ± 0,46	0,001***	1,19 ± 0,38	1,31 ± 0,53	0,741
PAS (mm Hg)	121,70 ± 23,84	119,00 ± 13,16	0,933	114,30 ± 11,85	114,20 ± 9,41	0,965
PAD (mm Hg)	76,10 ± 13,03	75,70 ± 8,49	0,698	73,20 ± 10,57	72,00 ± 9,59	0,728
FC (bpm)	79,20 ± 11,98	74,70 ± 9,36	0,032*	81,50 ± 13,85	81,00 ± 12,90	0,476

CPVC, concentração plasmática de vitamina C; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; FC, frequência cardíaca.

⁽¹⁾ Todos os dados são expressos como médias ± DP.

⁽²⁾ Teste de Kolmogorv-Smirnov para a normalidade das distribuições das variáveis.

⁽³⁾ *($p < 0,05$) e ***($p < 0,001$).

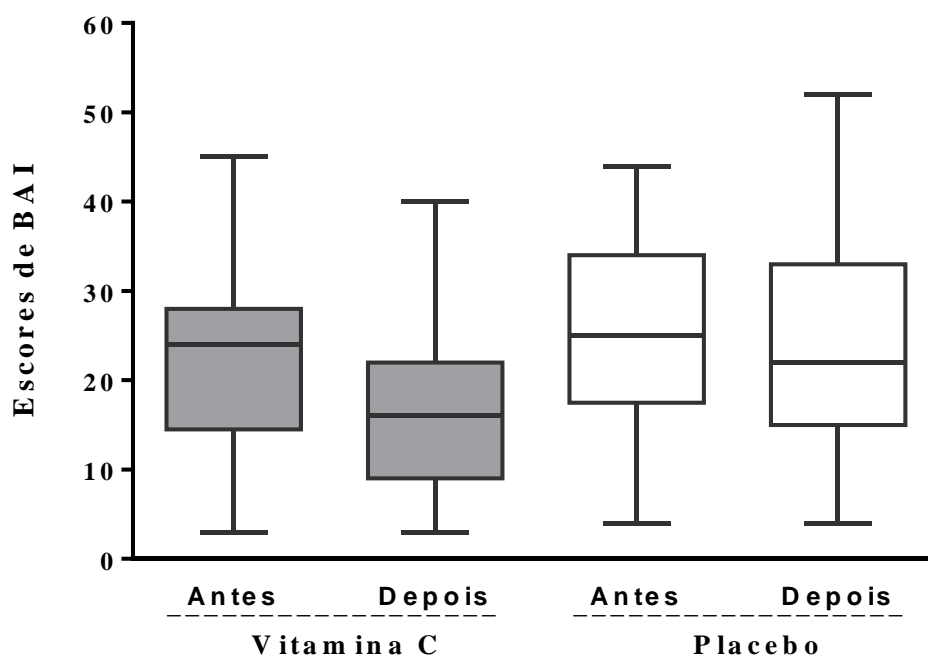


Figura 12: Efeitos da vitamina C ou placebo sobre a ansiedade avaliada pelo BAI. Box plots dos escores de ansiedade dos estudantes do grupo vitamina C ($n = 21$) e do grupo placebo ($n = 21$). A ansiedade foi avaliada antes (linha de base) e depois (14 dias de tratamento) pelo BAI em ambos os grupos ($p = 0,010$), conforme análise não paramétrica de Wilcoxon signed-rank test.

Os escores médios de ansiedade e a bateria de testes neuropsicológicos de memória são apresentados na Tabela 6, tanto no início do estudo e após a intervenção experimental (pós-tratamento). A análise não paramétrica de Wilcoxon signed rank test revelou que houve uma diminuição significativa entre o grupo vitamina C [$Z = -2,57$ ($p = 0,010$)] e o grupo controle placebo [$Z = -0,67$ ($p = 0,501$)], pós-tratamento em comparação com o tratamento inicial. O Wilcoxon signed rank test apresentou também diferenças significativas no desempenho dos estudantes, após a suplementação de vitamina C [$Z = -2,25$ ($p = 0,024$)] ou placebo [$Z = -1,81$ ($p = 0,070$)], nas tarefas de cópia, e vitamina C [$Z = -3,23$ ($p = 0,001$)] ou placebo [$Z = -0,48$ ($p = 0,627$)], para a reprodução de memória das Figuras Complexas de Rey. E ainda revelou um aumento nos escores do subteste de memória lógica imediata (ML1) da escala de memória de Wechsler (WMS) do grupo

vitamina C [(Z = -3,73 (p = 0,001)] ou do grupo placebo [(Z = -0,72 (p = 0,468)] e subteste de memória lógica tardia (ML2) da WMS do grupo vitamina C [(Z = -3,54 (p = 0,001)] ou do grupo placebo [(Z = -1,38 (p = 0,165)], bem como do subteste de repetição de dígitos indiretos (DI) da WMS do grupo vitamina C [(Z = -2,35 (p = 0,020)] ou do grupo placebo [(Z = -0,40 (p = 0,688)]. Não foram encontradas diferenças significativas para os demais subtestes tais como: subteste de informação e orientação; subteste controle mental; subteste de repetição de dígitos diretos; subteste de aprendizagem imediata de pares de fácil associação e subteste de aprendizagem tardia de pares de fácil associação da WMS.

Tabela 6 - Desempenho dos estudantes nos testes neuropsicológicos pré e pós-tratamento com suplementação de vitamina C ou placebo, conforme análise não paramétrica Wilcoxon signed rank test^(1,2).

Testes	Vitamina C (n = 21)		Escore Z e valor de p ⁽³⁾	Placebo (n = 21)		Escore Z e valor de p ⁽³⁾
	Antes	Depois		Antes	Depois	
BAI	22,33 ± 10,35	16,86 ± 10,19	-2,57 0,010**	25,43 ± 10,56	24,95 ± 13,11	-0,67 0,501
IN-OR	14,71 ± 0,56	14,48 ± 0,68	-1,18 0,236	14,67 ± 0,66	14,43 ± 0,51	-1,50 0,132
CM	4,39 ± 0,66	4,52 ± 0,59	-0,25 0,803	4,70 ± 0,82	4,52 ± 0,73	-1,15 0,248
FCRC	29,93 ± 5,18	31,79 ± 4,58	-2,25 0,024*	29,86 ± 6,00	31,43 ± 3,88	-1,81 0,070
FCRM	16,10 ± 6,20	19,38 ± 5,55	-3,23 0,001***	17,90 ± 6,89	17,19 ± 4,98	-0,48 0,627
ML1	10,95 ± 3,56	13,24 ± 3,69	-3,73 0,001***	12,45 ± 3,09	12,55 ± 3,23	-0,72 0,468
ML2	10,76 ± 3,77	13,17 ± 4,02	-3,54 0,001***	11,79 ± 2,90	12,10 ± 3,40	-1,38 0,165
DD	9,62 ± 1,91	9,05 ± 2,58	-1,36 0,172	9,57 ± 1,57	9,81 ± 2,64	-0,63 0,527
DI	5,62 ± 1,72	6,10 ± 1,67	-2,35 0,020*	5,71 ± 1,10	5,57 ± 1,75	-0,40 0,688
PAF1	5,98 ± 2,08	5,83 ± 1,82	-0,90 0,363	6,81 ± 1,33	6,43 ± 1,60	-0,95 0,341
PAF2	6,05 ± 1,53	5,95 ± 1,88	-0,12 0,901	6,34 ± 1,63	6,90 ± 1,30	-1,18 0,234

BAI: Inventário de Ansiedade de Beck; IN-OR: subteste de informação e orientação da WMS (Escala de Memória Wechsler); CM: subteste controle mental da WMS; FCRC: Figuras Complexas de Rey – Cópia; FCRM: Figuras Complexas de Rey – Memória; ML1: subteste de memória lógica imediata da WMS; ML2: subteste de memória lógica tardia da WMS; DD: subteste de repetição de dígitos diretos da WAIS; DI: subteste de repetição de dígitos indiretos da WAIS; PAF1: subteste de aprendizagem imediata de pares de fácil associação da WMS; PAF2: subteste de aprendizagem tardia de pares de fácil associação da WMS. Antes e depois da intervenção.

⁽¹⁾ Todos os dados são expressos como médias ± DP.

⁽²⁾ Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade das distribuições das variáveis.

⁽³⁾ *(p < 0,05), (p < 0,01**) e (p < 0,001***).

4.3. DISCUSSÃO

O primeiro estudo avaliou os efeitos da suplementação de vitamina C sobre a ansiedade e memória em estudantes do Ensino Médio de Escola Pública. A vitamina C mostrou um efeito ansiolítico, conforme indicado pela redução dos escores de ansiedade de BAI. Adicionalmente, a vitamina C também diminuiu a frequência cardíaca quando comparado com o placebo. Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior que investigou os efeitos de seis semanas de suplementação com a vitamina C (1.000 mg/dia) e vitamina E (400 UI/dia) nos níveis de ansiedade, depressão e estresse em pacientes diabéticos tipo 2. Os resultados desse estudo mostraram que a vitamina C reduziu significativamente os escores de ansiedade em relação ao placebo e à vitamina E. Em contraste, a vitamina E aumentou significativamente os escores de ansiedade. Esse estudo também mostrou que a vitamina C diminuiu os níveis de estresse em comparação com o grupo placebo (421).

As baixas frequências cardíacas decorrentes da suplementação da vitamina C encontradas em nossa pesquisa apresentam-se convergentes aos níveis reduzidos de ansiedade, conferidos por baixos escores de respirações por minutos (bpm) aferidas por outros autores (411) que estavam associadas também a desempenhos acadêmicos de boa qualidade de estudantes de engenharia.

Ansiedade e depressão são transtornos psiquiátricos comuns, induzidos pelo estresse (407). A deficiência de vitamina C pode desencadear sintomas depressivos. Baixos níveis de ácido ascórbico têm sido associados com sintomas depressivos e maiores taxas de mortalidade em pessoas idosas (450). Adicionalmente, Amr et al. (423) demonstraram que a vitamina C melhorou a eficácia da fluoxetina no tratamento da depressão e, dada a ausência de efeitos adversos substanciais em paciente pediátrico com diagnóstico de transtorno depressivo maior, pode ser considerada um atraente coadjuvante terapêutico. Os autores ressaltaram a necessidade de testes clínicos em maior escala para avaliar a eficácia terapêutica da vitamina C como um coadjuvante para o tratamento da depressão e sua ação associada a medicamentos antidepressivos (423).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que os transtornos de ansiedade de início precoce podem contribuir como disparadores para o desenvolvimento de depressão e outros transtornos do humor que surgem mais tarde na vida (451, 452). Da mesma forma, transtornos de ansiedade e perturbações do humor estão associados com mecanismos patogênicos envolvidos com a via oxidativa (409). Para estes autores a suplementação de vitamina C pode atuar como um antioxidante que conduz a alterações bioquímicas e comportamentais, reduzindo a ansiedade, por mecanismos similares aqueles efeitos observados sobre os sintomas depressivos, fadiga, e estado de humor. Assim os dados aqui coletados reforçam essa hipótese.

Existem anormalidades que podem alterar a função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que está envolvido com a resposta ao estresse e transtorno de ansiedade, e implicado na resposta emocional (453, 454). Por exemplo, a exposição crônica ao estresse tem sido associada ao dano oxidativo, e ativação do eixo HPA (455). Outro estudo descobriu que altos níveis de ansiedade aumentam significativamente o estresse oxidativo (456). Além disso, o estresse oxidativo gera uma produção excessiva de radicais livres e falhas do mecanismo de defesa antioxidante (457). O déficit de antioxidantes pode diminuir a proteção contra ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são altamente reativo e tóxico, causando danos a proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e mitocôndrias (458, 459). Os antioxidantes neutralizam os efeitos do ROS e exercer ação prevenindo diversas doenças (55). Esses autores sugerem que indivíduos com transtornos de ansiedade podem ser deficientes em antioxidantes. Neste contexto os dados coletados nesta pesquisa corroboram a ideia de que a suplementação de compostos com propriedades antioxidantes pode ser uma nova estratégia para prevenção e redução de níveis de ansiedade.

Os resultados desse estudo demonstraram que, após a intervenção, o grupo da vitamina C obteve médias das frequências cardíacas menores em comparação com o grupo placebo. O neurotransmissor Ácido γ -aminobutírico (GABA) está envolvido na regulação cardiovascular. Administração intracerebroventricular de agonistas de GABA diminui a pressão arterial e a frequência cardíaca; a vitamina C, por sua vez, estimulou a ligação do 3H-GABA (460). Outro estudo encontrou um aumento na pressão arterial e também na frequência cardíaca depois da

microinjeção de glutamato dentro do núcleo paraventricular. O antagonista do receptor NMDA DL-2-amino-5-ácido fosfonoaléxico (AP-5) bloqueou estas respostas (461). Em contraste, altos níveis de ansiedade traumática indicada pela elevada frequência cardíaca desencadeada pelo aumento da liberação de catecolaminas (422). Ácido ascórbico pode modular a atividade catecolaminérgica e diminuir reações de estresse (422). Esta hipótese baseia-se em várias descobertas. O ácido ascórbico tem sido descrito como um fator de regulação de Na^+/K^+ .ATPase por meio da modulação de catecolaminas. Também atua sobre o volume de neurotransmissores no sistema nervoso central, como demonstrado por um estudo em que o TOC foi tratado com a vitamina C (462).

Da mesma forma, a vitamina C pode reduzir a ansiedade e aliviar o estresse tanto pela estimulação da ligação do GABA e bloquear a função do receptor NMDA ou agir através da ativação dos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos (422). Níveis de ansiedade reduzidos podem estar associados com a diminuição da frequência cardíaca, pelos quais são indicativos da liberação diminuída de catecolaminas. Como sugerido anteriormente o ácido ascórbico pode modular a atividade catecolaminérgica (422) e, conseqüentemente, pode ser responsável por esta baixa frequência cardíaca encontrada no presente estudo.

Bruno et al. (463) investigaram o efeito da administração aguda de vitamina C sobre a atividade simpática do músculo cardíaco e balanço simpático cardíaco em pacientes hipertensos. Nesse estudo, a vitamina C foi capaz de reduzir a movimentação adrenérgica cardiovascular em pacientes hipertensos, o que indica que o estresse oxidativo pode contribuir para a ativação simpática na hipertensão. Portanto, isto sugere que os antioxidantes podem ser capazes de restaurar o controle vagal da frequência cardíaca. Ademais, altas doses de vitamina C reduziram a pressão arterial sistólica e diastólica, estresse subjetivo e respostas ansiosas a um estressor psicológico interpessoal agudo e, ainda, após o estresse, a vitamina C promoveu uma queda mais rápida do cortisol salivar (418). Porém, o resultado do corrente estudo não sugere nenhuma diferença significativa na pressão sanguínea (sistólica e diastólica) entre o grupo da vitamina C e o grupo placebo, embora os participantes desse estudo não apresentassem histórico de hipertensão. A vitamina C reduziu significativamente a pressão arterial em pacientes hipertensos,

mas não em indivíduos normotensos (463) o que foi similar aos achados no presente estudo, visto que os nossos sujeitos eram estudantes normotensos.

Em adição, os dados apresentados aqui estão de acordo com os resultados encontrados por Brody et al. (418), que verificaram que os níveis de vitamina C plasmática aumentaram significativamente, para o grupo vitamina C (médias de 1,55 para 2,65 mg/dL), mas não do grupo de placebo (médias de 1,36 para 1,40 mg/dL). Além disso, o tratamento com a vitamina C aumentou os níveis plasmáticos de vitamina C no sangue, sugerindo que a deficiência de vitamina C está envolvida com alterações psicológicas (464, 465). Adicionalmente, outro estudo revelou que há um aumento na concentração plasmática de vitamina C, por cerca de 50%, após a suplementação de vitamina C, a uma dose de 500 mg/dia, durante oito semanas (466), e que também a meia-vida de vitamina C em um adulto é em torno de 10-20 dias (1). Assim, estes resultados foram semelhantes aos detectados no corrente estudo (vêr Tabela 5).

A melhora significativa do desempenho cognitivo nas tarefas de cópia e memória das Figuras Complexas de Rey (Memória Visuo Construtiva), ML1 e ML2 (Memória Lógica Declarativa Episódica) e dígitos indiretos (Memória Operacional), após a intervenção da vitamina C, possivelmente, pode ser em decorrência da estimulação dos neurônios que contém vitamina C e que já foram mapeados no hipocampo e córtex frontal e occipital por (290, 291). Isto porque a área hipocampal é substrato neural para a Memória Declarativa Episódica e a área frontal é substrato da Memória Operacional e as áreas conjuntas frontal e occipital são substrato da Memória Visuo Construtiva (186).

No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas no subteste de Dígitos em ordem direta, em ambos os grupos vitamina C ou placebo. Os estudantes apresentaram médias em torno de 9 dígitos. Contudo, no subteste de Dígitos em ordem inversa, o grupo vitamina C, após a suplementação, apresentou escore maior ($6,10 \pm 1,67$, $p < 0,05$), sugerindo que a vitamina C melhorou a memória dos estudantes nessa tarefa. Pesquisadores revelaram que indivíduos com bom desempenho em tarefas de memorização de dígitos tem maior motivação para as atividades intelectuais, indicado pelo bom controle e flexibilidade mental e, ainda, um bom nível de tolerância às situações que provoquem tensão (467), ou seja, sujeitos mais resistentes à ansiedade.

Finalmente, cada tarefa do subteste Dígitos (direta e indireta) está relacionada com processos cognitivos diferentes. Os comandos da ordem inversa estão mais ligados ao sistema executivo central e da atenção componentes da memória operacional e importantes participantes da consolidação de memória de longo prazo, enquanto o da ordem direta envolve apenas reverberação de sistema de memória de curto prazo (468). A vitamina C, de alguma maneira, favoreceu o melhor desempenho na tarefa de dígitos na ordem inversa e não na ordem direta, possivelmente por estar ativando neurônios dos substratos frontais e temporais do sistema executivo central, componente da memória operacional.

4.4. CONCLUSÃO

No primeiro estudo ficou demonstrado que a vitamina C melhorou os níveis de ansiedade avaliados através do BAI, nos estudantes do Ensino Médio, suplementados com vitamina C, e também apresentou melhor resposta na frequência cardíaca, indicando que este antioxidante pode estar envolvida neste parâmetro fisiológico relacionado com sintomas de ansiedade.

Estes achados não só reforça a evidência de que a vitamina C desempenha um importante papel terapêutico na ansiedade, mas também aponta para a possibilidade do uso de antioxidantes na prevenção e redução dos níveis de ansiedade.

Adicionalmente, a vitamina C aumentou os escores nas tarefas de cópia e memória das FCR (Memória Visuo Construtiva), ML1 e ML2 (Memória Lógica Declarativa Episódica) e dígitos indiretos (Memória Operacional), sugerindo que a vitamina C apresentou um efeito positivo nestes tipos de memória, medidas nos estudantes do Ensino Médio.

Em síntese, este estudo sugere que uma dieta rica em vitamina C pode ajudar a reduzir os níveis de ansiedade, e, possivelmente, aumentar a eficiência cognitiva em tarefas de memória visuo construtiva, memória operacional e memória lógica.

5. ESTUDO 2: EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE A ANSIEDADE E MEMÓRIA EM RATOS CRESCIDOS EM AMBIENTE ENRIQUECIDO

O ácido ascórbico (AA), conhecido como vitamina C, é um micronutriente que está envolvido em modelo animal de ansiedade, memória e estado de humor em humanos. Estudos têm revelado que AA reduz a imobilidade tônica e a reação de medo em codornas japonesas (469, 470), bem como em frangos de corte (470). Estes autores concluíram que o AA pode atenuar o medo subjacente e deve ter implicações no bem-estar destes animais.

Estudos utilizando modelos animais têm demonstrado uma melhora na aprendizagem e memória depois do tratamento com vitamina C, sozinha, ou combinada com a vitamina E (471, 472, 473). A administração crônica de vitamina E (250 mg/kg por dia) ou vitamina C (300 mg/kg por dia) por 60 dias, em camundongos jovens (3 meses) e camundongos idosos (15 meses), e a combinação de vitamina C e vitamina E, melhora as funções cognitivas dos animais idosos, mas não a dos camundongos jovens (471). Em adição, AA sozinho, ou em combinação com oxiracetam, uma droga nootrópica, teve suas ações investigadas sobre a amnésia induzida por escopolamina em teste de habituação (teste de aversão ao claro versus escuro) em camundongos idosos. Os resultados deste estudo mostraram que o AA reduziu o tempo gasto dos animais no compartimento claro versus escuro. Esses autores concluíram que AA preveniu a amnésia induzida por escopolamina nestes camundongos (472). A combinação de vitamina C e vitamina E melhorou a aprendizagem e memória em ratos normais e reverteu déficits de aprendizagem e memória em ratos diabéticos (473). Porém, a vitamina E não é muito efetiva (474), pelo menos combinada com a vitamina C, confirmando a nossa escolha da vitamina C para o corrente estudo.

Adicionalmente, estudos têm indicado uma alta prevalência de hipovitaminose C e D em pacientes com cuidados agudos e melhora do humor, reduzindo o distresse em pacientes hospitalizados (431, 432, 433).

O enriquecimento ambiental (EA) é um paradigma experimental que permite a estimulação cognitiva entre animais tanto social e/ou física, sensorial e motora, com

a finalidade de reduzir problemas como a ansiedade e déficits de memória (368, 372, 475). Na EA, roedores são expostos a grandes caixas contendo vários objetos (372, 476) e comparados com dois tipos de controle: controle isolado (CI), mantidos individualmente; ou controle social (CS), alojados em grupos de animais do mesmo sexo (399, 477, 478). Ambos são alojados em ambiente padrão (AP).

Existem evidências de que o EA reduz o declínio cognitivo relacionado com a idade (479). Em um estudo, camundongos NMR1 foram alojados em ambiente enriquecido por um período de 14 a 20 meses e seguidos de avaliação de desempenho da memória e teste de ansiedade, bem como medidas as propriedades eletrofisiológicas das redes neuronais do hipocampo. Nesse estudo, EA reduziu a ansiedade e preveniu déficits de memória nesses animais envelhecidos (479). Da mesma forma, outros estudos indicam que EA reduz os níveis de ansiedade e melhora fatores relacionados à emocionalidade (480). O EA em combinação com o estradiol, também melhora as respostas mnemônicas de memória espacial em camundongas fêmeas jovens, de meia-idade e idosas, testadas no LAM e na tarefa de reconhecimento de objetos (481).

Experimentos têm mostrado que EA favorece as intervenções farmacológicas para proteger contra várias doenças neurodegenerativas, tais como, DA (482), Parkinson (483), e doença de Huntington (484). Os resultados têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de plasticidade neural, que pode ocorrer devido à complexa estimulação desencadeada por exposição de modelos animais submetidos ao EA (368), tais como a neurogênese no giro dentado do hipocampo, aumento da densidade sináptica, e aumento das ramificações dendríticas (485). Em termos de alterações neurobiológicas, EA melhora a potencialização de longo prazo e a atividade monoaminérgica e a transmissão sináptica colinérgica (368), bem como a formação de novas sinapses em áreas como o córtex cerebral e gânglios basais (364, 368, 486-488). EA também aumenta o número de células gliais (489) e de astrócitos (490).

Este segundo estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do AA sobre a ansiedade e memória em ratos de meia-idade crescidos em ambiente enriquecido. Neste contexto, foram utilizados como medidas comportamentais as respostas emitidas pelos animais no LCE e no LAM, para investigar os efeitos deste antioxidante associado ao EA.

5.1. MÉTODOS

5.1.1. Animais

Vinte e oito ratos Wistar machos e 32 fêmeas, com 25 dias de idade, pesando cerca de (100 a 150 g), foram disponibilizados, para este estudo, provenientes do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB, DF, Brasil), que também autorizou a execução do protocolo experimental nas dependências do Laboratório de Ciências da Saúde (LABOCIEN) do UniCEUB. Depois de cinco dias de habituação no laboratório, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: metade dos animais machos e metade das fêmeas foram alojados em caixas grandes contendo vários objetos, paradigma experimental característico do EA. A outra metade dos animais foi alojada em caixas de mesmas dimensões sem nenhum objeto, ou seja, em condições AP. Todos os animais permaneceram em suas caixas, até que os testes comportamentais fossem realizados e foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) e um ciclo de luz-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas). Os animais tiveram livre acesso à comida e água. Os experimentos foram realizados durante o ciclo diurno (9:00-16:00 horas). A linha do tempo do protocolo experimental está apresentada na Figura. 13.

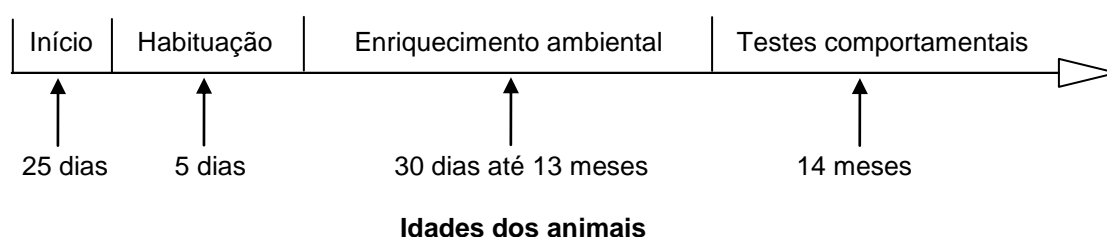


Figura 13. Linha do tempo do protocolo experimental

5.1.2. Compostos e procedimentos experimentais

O ácido ascórbico foi obtido da Vetec Ltda, Brasil e dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). Solução salina (controle) ou com ácido ascórbico (100 mg/kg) foi administrada via oral (gavage) a um volume de 1 ml/kg de peso corporal, uma hora antes dos testes comportamentais. Devido a sua alta sensibilidade à degradação, a solução de ácido ascórbico foi preparada no dia em que foi usada, sempre no início da experiência. Depois de um período de 13 meses, quando os animais atingiram a idade de 14 meses de idade (ou seja, de meia-idade), pesando cerca de (220 a 350 g), os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de tratamento: (1) controle solução salina e ambiente padrão (CAP); (2) controle solução salina e enriquecimento ambiental (CEA); (3) experimental em ambiente padrão mais ácido ascórbico (EAP + AA), e (4) experimental em enriquecimento ambiental mais ácido ascórbico (EEA + AA). Esta metodologia foi semelhante a estudos anteriores (478, 491, 492).

5.1.3. Enriquecimento Ambiental

O EA começou quando os animais atingiram 30 dias de idade e continuou por 13 meses. O EA consistiu de caixas de vidro grandes (70 × 50 × 40 cm) contendo vários objetos, tais como túneis de plástico, bolas, rampas, escadas, e vários brinquedos de vários tamanhos, formas e texturas (354). Cada caixa alojava ratos machos (n = 7) e fêmeas (n = 8), tanto em AP como em EA. Condições de alojamento dos animais em AP e EA são mostradas na Figura 14.

As gaiolas eram limpas uma vez por semana e todos os objetos eram trocados por novos objetos com posições alteradas, com a finalidade de ofertar um ambiente que favorecesse a oportunidade para a interação social e comportamento exploratório. Os animais alojados na condição AP eram mantidos sob as mesmas

condições, com a ressalva de que os seus habitat eram desprovidos de qualquer tipo de objeto, salvo serragem, comida e água *ad libitum* (Figura 14).



Figura 14. Ambiente padrão e enriquecimento ambiental

5.1.4. Labirinto em Cruz Elevado

As especificações do aparelho utilizado, nesse estudo, foram fundamentadas em pesquisas conduzidos por Pellow et al. (150), tomando com base a capacidade do LCE para detecção de agentes com efeitos ansiogênicos e ansiolíticos em ratos. O dispositivo era feito de madeira e composto por dois braços abertos e dois fechados (com as mesmas dimensões, 50 x 10 cm), opostos entre si e elevados a 50 cm a partir do piso. Os braços fechados foram cercados por paredes laterais com 50 centímetros de altura, exceto para a entrada, que encerrava uma plataforma central de 10 x 10 cm. Os braços abertos foram cercados por uma borda de acrílico transparente de 1 cm de altura, para evitar que o animal caísse do aparelho. A superfície e paredes laterais internas do labirinto foram pintadas com uma resina escura, à prova de água para evitar permeação de urina.

As sessões experimentais foram realizadas em um ambiente com baixa intensidade de luz e (atenuada) de som apropriado. Cada animal foi colocado no centro do LCE, de frente para o braço fechado e foram autorizados a explorar livremente o equipamento por 5 min. Foram registradas as frequências de entradas

nos braços abertos, as frequências de tempo gasto nos braços, e o número absoluto de entradas nos braços fechados do LCE. Uma entrada foi gravada quando o animal colocou as quatro patas em um braço. A porcentagem de entradas nos braços abertos e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos eram indicativas de efeito ansiolítico, e o número total de entradas nos braços fechados foi usado como uma medida de atividade locomotora. Após cada sessão de teste, o labirinto era limpo com uma solução de etanol (10% v / v) e secado com papel absorvente a fim de evitar o odor e impregnação (Figura 15).



Figura 15. Teste no labirinto em cruz elevado

5.1.5. Labirinto Aquático de Morris

Para avaliar a memória de referência espacial dos ratos, uma versão descrita por Morris (193) foi usada com um protocolo semelhante ao descrito por Angelucci et al. (493). O LAM consiste de uma piscina circular de 170 centímetros de diâmetro e 70 cm de profundidade, de cor azul, preenchida aproximadamente por 30 cm de água a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ com uma plataforma de 11×14 cm, submersa

2 cm abaixo da superfície da água. A plataforma foi posicionada no mesmo lugar para todos os testes experimentais, nomeadamente no centro de um dos quatro quadrantes da piscina (193).

A sessão de treino foi executada em um único dia, num ambiente com baixa intensidade de luz e (atenuada) de som apropriado e constou de três tentativas consecutivas, que consistia em colocar os animais na água, com cabeça em frente à parede da piscina. Foi permitido que os ratos nadassem livremente para localizar a plataforma oculta de fuga. A latência para encontrar a plataforma foi medida em segundos e a média da latência para o número de tentativas foi calculada. Quando um animal não encontrava a plataforma dentro de 120 segundos, este era gentilmente conduzido para ela pelo experimentador, onde permanecia por 20 segundos (Figura 16). Após este tempo, os animais eram removidos da plataforma e devolvidos para as caixas, e esperavam por mais dois minutos antes de começar o próximo treino. Os ratos eram secos e devolvidos para as suas caixas após o término da sessão de treino. A sessão de teste foi realizada 24 horas após a sessão de treino, seguindo os mesmos procedimentos, contudo, sem a administração, nos animais, de AA e nem solução salina.



Figura 16. Teste no labirinto aquático de Morris

5.1.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SPSS versão 20.0 para Windows (IBM Corp, NY, EUA). Em geral, os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para avaliar os resultados no LCE, uma ANOVA foi utilizada como fatores entre-sujeitos o “ambiente” e o “tratamento”. Já para as análises estatísticas no LAM, foi usada uma two way ANOVA de medidas repetidas com o “ambiente” e “tratamento”, como variáveis independentes e “número de tentativas” como medidas repetidas. Os dados foram combinados para machos e fêmeas para cada grupo de tratamento, por ter sido observado em preliminar ANOVA que não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos, semelhante ao estudo de Frick et al. (399). O nível de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo para todos os testes.

5.2. RESULTADOS

5.2.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados relativos aos testes comportamentais de ansiedade no LCE, após a administração de ácido ascórbico (100 mg/kg), nos ratos de meia-idade associados ao enriquecimento ambiental estão apresentados, na (Tabela 7). A ANOVA revelou um efeito principal, significativo de AA, nas medidas clássicas avaliadas no LCE. O AA mostrou um efeito ansiolítico nos animais, como mostrado pelo aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F(1,59) = 84,82$, $p = 0,001$) e um aumento na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($F(1,59) = 49,29$, $p = 0,001$), em comparação com o grupo controle (salina). A análise estatística para o número de entradas nos braços fechados não diferiu ($F(1,59) = 0,12$, $p = 0,73$), indicando que o AA não teve efeito sedativo na locomoção dos animais.

A diferença estatisticamente significativa também foi observada para o EA, em comparação com o AP, na porcentagem de tempo gastos nos braços abertos ($F(1,59) = 4,16$, $p = 0,047$). Não foram encontradas diferenças significativas quando comparados os grupos EA e AP para outros parâmetros, tais como a porcentagem de entradas nos braços abertos ($F(1,59) = 2,14$, $p = 0,15$) e o número de entradas nos braços fechados ($F(1,59) = 1,45$, $p = 0,23$). O EA favoreceu uma melhora dos níveis de ansiedade e este efeito tornou-se mais pronunciado na presença de AA. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o EA potencializou o efeito ansiolítico do AA.

Tabela 7. Efeitos da administração aguda de AA (100 mg/kg) ou salina em ratos de meia-idade crescidos em AP ou AE submetidos ao teste comportamental no LCE⁽¹⁾.

Teste comportamental	CAP	CAE	EAP+AA	EEA+AA
% entradas BA	14,19 ± 3,95	18,34 ± 4,17	50,68 ± 2,99 ⁽²⁾	58,73 ± 5,36 ⁽²⁾
% tempo gastos BA	5,78 ± 2,28	9,40 ± 4,11	33,72 ± 4,13 ⁽²⁾	50,01 ± 7,41 ^(2,3)
Número de entradas BF	4,33 ± 0,81	4,07 ± 0,54	4,67 ± 0,64	3,27 ± 0,75

CAP, controle salina e ambiente padrão; CAE, controle salina e enriquecimento ambiental; EAP+AA, experimental em ambiente padrão mais ácido ascórbico; EEA+AA, experimental em enriquecimento ambiental mais ácido ascórbico; BA, braços abertos; BF, braços fechados. Machos (n = 7) e fêmeas (n = 8) para cada grupo.

⁽¹⁾ Os dados são expressos com médias ± EPM

⁽²⁾ Diferença significativa entre AA versus Controle ($p < 0.001$).

⁽³⁾ Diferença significativa entre EA versus AP ($p < 0.05$)

5.2.2 Teste do Labirinto Aquático de Morris

No teste comportamental no LAM, o AA melhorou o desempenho dos animais na sessão treino e na sessão teste sobre a memória de referência espacial em relação aos controles (Tabela 14). A análise estatística ANOVA two-way para medidas repetidas sobre a latência de escape revelou efeitos significativos de tratamento AA ($F(1,59) = 28,25$, $p = 0,001$), enriquecimento ambiental ($F(1,59) = 4,11$, $p = 0,05$), e sessão de treinamento ($F(1,59) = 25,90$, $p = 0,001$), mas não houve interação significativa entre estes fatores ($F(1,118) = 2,03$, $p = 0,16$). Houve diferença significativa na latência de escape ao comparar AA ao grupo controle no 1º, 2º e 3º treinos ($F(1,59) = 19,48$, $p = 0,001$, $F(1,59) = 10,54$, $p = 0,010$ e $F(1,59) = 21,31$, $p = 0,001$, respectivamente). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa para os animais alojados no AE versus AP, no 1º, 2º e 3º treinos ($F(1,59) = 3,76$, $p = 0,06$, $F(1,59) = 2,10$, $p = 0,09$ e $F(1,59) = 0,65$, $p = 0,43$, respectivamente).

Na sessão teste, ANOVA two-way para medidas repetidas sobre a latência de escape revelou um efeito principal significativo do tratamento de AA ($F(1,59) = 9,80$, $p < 0,001$), o ambiente ($F(1,59) = 5,11$, $p < 0,01$), e uma sessão de teste ($F(1,59) = 7,03$, $p < 0,01$), mas não houve interação significativa entre esses fatores ($F(1,118) = 0,25$, $p = 0,62$). Diferenças significativas foram observadas na latência de escape entre o grupo de AA e o grupo controle nos testes 1º e 3º ($F(1,59) = 4,12$, $p < 0,05$ e $F(1,59) = 10,65$, $p < 0,01$, respectivamente). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa no 2º teste ($F(1,59) = 1,25$, $p = 0,27$). Curiosamente, o ANOVA revelou um efeito principal significativo do ambiente no 1º teste ($F(1,59) = 5,84$, $p = 0,05$) e 2º teste ($F(1,59) = 8,62$, $p = 0,010$), mas não houve diferença significativa para o 3º teste ($F(1,59) = 2,90$, $p = 0,09$). Por outro lado, uma diferença significativa ocorreu na 1ª tentativa depois de 24 horas no LAM, indicando que os animais mantidos em EA demonstraram melhor evocação de memória do que os animais alojados em AP.

Tabela 8. Efeitos da administração aguda de AA (100 mg/kg) ou salina em ratos de meia-idade alojados em AP ou AE submetidos ao teste comportamental no LAM⁽¹⁾.

Teste comportamental	CAP	CAE	EAP+AA	EEA+AA
Treino 1	95,00 ± 11,16	66,87 ± 11,69	41,20 ± 11,54 ⁽³⁾	19,43 ± 6,27 ⁽⁴⁾
Treino 2	60,40 ± 12,75	29,87 ± 8,95	16,87 ± 5,33 ⁽³⁾	13,71 ± 5,03 ⁽³⁾
Treino 3	46,07 ± 10,87	35,67 ± 9,33	8,27 ± 1,24 ⁽⁴⁾	7,14 ± 1,94 ⁽⁴⁾
Teste 1	37,33 ± 7,23	21,20 ± 6,20	25,53 ± 7,11 ⁽²⁾	13,29 ± 5,34 ^(2,5)
Teste 2	18,53 ± 4,07	10,13 ± 1,01	15,42 ± 3,98	7,71 ± 1,02 ⁽⁶⁾
Teste 3	26,53 ± 10,87	16,93 ± 3,58	10,93 ± 2,18 ⁽³⁾	6,86 ± 1,10 ⁽³⁾

CAP, controle salina e ambiente padrão; CAE, controle salina e enriquecimento ambiental; EAP+AA, experimental em ambiente padrão mais ácido ascórbico; EEA+AA, experimental em enriquecimento ambiental mais ácido ascórbico. A média da latência para localizar a plataforma é expressa em segundos. Machos ($n = 7$) e fêmeas ($n = 8$) para cada grupo.

⁽¹⁾ Os dados são expressos com médias ± EPM.

⁽²⁾ Diferença significativa entre AA versus Controle ($p < 0,05$).

⁽³⁾ Diferença significativa entre AA versus Controle ($p < 0,01$)

⁽⁴⁾ Diferença significativa entre AA versus Controle ($p < 0,001$)

⁽⁵⁾ Diferença significativa entre EA versus AP ($p < 0,05$)

⁽⁶⁾ Diferença significativa entre EA versus AP ($p < 0,01$)

5.3 DISCUSSÃO

O segundo estudo avaliou os efeitos do ácido ascórbico, combinado com um ambiente enriquecido, em ratos de meia idade submetidos a testes comportamentais de ansiedade e memória. Os resultados indicaram que o AA apresentou um efeito ansiolítico observado no aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos e tempo gasto nos braços abertos no LCE, sem afetar o número de entradas nos braços fechados, o que indica que o efeito ansiolítico de AA é específico e não envolve um efeito sedativo. Além disso, o ambiente enriquecido favoreceu a melhora dos níveis de ansiedade e este efeito tornou-se mais pronunciado na presença de AA. Desta maneira, os resultados aqui apresentados indicam que o EA potencializou o efeito ansiolítico de AA.

Os resultados do corrente estudo estão de acordo com uma pesquisa que investigou os efeitos da vitamina C e vitamina E, separadamente e em conjunto, em ratos machos e fêmeas (cerca de 110 dias de idade) nos comportamentos relacionados com a ansiedade em campo aberto e a resposta de sobressalto ao alarme sonoro (494). Estes autores misturaram doses diferentes de ácido ascórbico para os ratos machos (1,6 mg/ml) e para fêmeas (0,76 mg/ml) na água potável, e observaram que essas doses de vitamina C e vitamina E aumentaram a locomoção no campo aberto, a ocupação dos quatro quadrantes e do centro do aparelho, enquanto diminuíram a amplitude da resposta de sobressalto. Quando os animais foram tratados com as vitaminas, separadamente, ou em conjunto, os efeitos sinérgicos não foram detectados. Os efeitos destas vitaminas, em diminuir a ansiedade podem ter sido devido às suas propriedades antioxidantes, à atenuação da atividade do cortisol, ou ao envolvimento de estruturas cerebrais e neurotransmissores (494).

Estudos em animais e humanos têm mostrado que altos níveis de AA podem ser detectados em estruturas neurais envolvidas na ansiedade, tais como a amígdala e o hipocampo (291, 495). A função da vitamina C como sequestradora de radicais livres é bem conhecida, e os efeitos neuroprotetores podem ser atribuídos às suas ações antioxidantes, que reduzem o estresse oxidativo neural (57). O efeito ansiolítico desta vitamina pode estar relacionado com a modulação induzida pela vitamina C no estresse oxidativo, em decorrência da maior atividade da glutathiona-s-

transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e diminuição da peroxidação lipídica (496).

O antagonismo do NMDAR tem sido associado com propriedades ansiolíticas em ratos e camundongos, com efeitos semelhantes aos dos benzodiazepínicos (497). É possível que as ações do AA possam inibir a atividade de NMDAR, o que poderia levar a uma redução dos níveis de ansiedade (498). Além disso, vários estudos têm mostrado que a vitamina C pode normalizar a atividade dos neurônios serotoninérgicos (499) envolvidos na ansiedade em humanos (500), o que normalmente é tratada com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (501).

Em relação ao envolvimento do AA sobre o estresse oxidativo, estudos conduzidos por El-Gendy et al. (502) avaliaram o papel do AA como um antioxidante para proteger contra o estresse oxidativo induzido pela administração aguda de imidacloprida, um pesticida relativamente novo, pertencente à classe de compostos neonicotinóides. Pesticidas podem levar ao estresse oxidativo e aumento de radicais livres e uma opção é usar antioxidantes que podem sequestrar estes radicais livres. O efeito neuroprotetor de AA (200 mg/kg) foi avaliado 30 minutos antes ou após a administração de imidacloprida (502). Os resultados encontrados por estes autores revelaram que a dose letal média (LD₅₀) de imidacloprida, após 24 horas foi de 149,76 mg/kg. A administração oral de imidacloprida desencadeou elevação significativa sobre o nível de peroxidação lipídica (LPO), e nas atividades de enzimas antioxidantes, incluindo CAT, SOD, GPx e GST. O nível de GSH foi diminuído; contudo, a atividade de G6PD permaneceu inalterada. Por sua vez, o AA reduziu o dano oxidativo induzido por administração aguda de imidacloprida, diminuiu os níveis de LPO e alterou o sistema de defesa antioxidante no fígado dos animais. Além disso, o efeito neuroprotetor do pré-tratamento com o AA foi superior ao pós-tratamento, no combate ao estresse oxidativo induzido por imidacloprida (502).

Em relação aos resultados dos testes no LAM, o presente estudo está de acordo com vários autores que avaliaram medidas semelhantes (503-507). A administração de α -tocoferol (40 mg/kg) e de AA (100 mg/kg) preveniu déficits de memória de referência espacial, avaliados no LAM, em ratos tratados com prolina (503). Ademais, o AA atenuou os déficits de aprendizagem espacial, também no LAM, induzida por escopolamina em camundongos jovens (504). O AA também reduziu déficits de aprendizagem espacial em camundongos transgênicos

APP/PSEN1 de meia-idade (12 meses), e mais velhos (24 meses), no LAM (505). Em adição, o tratamento com o AA (60 e 120 mg/kg), por três e oito dias consecutivos, melhorou a aprendizagem e memória de camundongos envelhecidos no teste da esQUIVA passiva tipo “step-down” (506). Outro estudo que avaliou o efeito de AA injetado sozinho, ou em combinação com o ácido propiônico, substância envolvida no estresse oxidativo, indicou que o AA foi capaz de reverter o déficit de memória espacial induzido pela administração do ácido propiônico (507).

Assim, a dose de AA utilizada no presente estudo (100 mg/kg) foi selecionada depois de avaliar o efeito do AA em condições agudas e crônicas em uma experiência anterior em nosso laboratório, no qual observou-se que, com doses mais elevadas de AA, houve uma melhor resposta em termos de melhoria dos níveis de ansiedade e déficit de memória, em comparação com o controle (solução salina), no LCE e no LAM. Ademais, a via de administração oral aguda, adotada no presente experimento, e o tempo de espera para que os animais fossem submetidos aos testes no LCE e LAM, ou seja, uma hora depois, com uma única dose, estão de acordo com vários estudos de modelos animais de depressão, que têm demonstrado os efeitos antidepressivos da vitamina C (424-429).

Esses resultados aqui coletados são consistentes com um estudo que demonstrou que ratos envelhecidos, expostos ao EA, não apresentaram efeitos nocivos provocados pelo envelhecimento sobre a ansiedade e memória (479). Este estudo também sugeriu que a diminuição da ansiedade, nestes animais, poderia ser responsável pela melhora do desempenho de tarefas de memória, como relatado em ratos (386) e em seres humanos (508). Alta ansiedade está associada com pior desempenho na memória. O EA melhora a memória, diminuindo o nível de ansiedade e este mecanismo previne déficit de memória relacionado à idade (386, 399). Frick et al. (399) revelaram que o EA reduziu o prejuízo relacionado à idade na aquisição e retenção de memória espacial em camundongos machos e fêmeas C57BL/6 (18 meses de idade), testados por um dia, no LAM. Esta redução foi similar aos camundongos de ambos os sexos. EA também reduziu a ansiedade em ratos jovens em comparação ao CI (381, 382) ou CS (384). Em contraste, Hellemans et al. (381) demonstraram que os animais CI exibem uma menor percentagem estatisticamente significativa para as entradas nos braços abertos e gastam menos tempo nos braços abertos, em comparação com animais expostos ao EA e com CS.

Isso indica que os animais CI apresentam níveis mais elevados de ansiedade em relação aos animais CS, sugerindo que animais CS, sem enriquecimento físico, comprometem a redução da ansiedade no LCE.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de entradas nos braços abertos (Tabela 7) pode ser explicado pela mais baixa locomoção dos animais alojados em EA comparada com AP; portanto, animais enriquecidos tendem a explorar menos o LCE do que animais alojados em AP. Por outro lado, acredita-se que os baixos níveis de atividade locomotora aumentam significativamente a ansiedade (509). No entanto, os resultados encontrado no corrente estudo são consistentes com Pham et al. (391), que verificaram que os ratos mantidos em EA, desde a idade de dois meses, durante um período de 12 meses, mostraram menor mobilidade no teste do campo aberto do que os ratos CI. Estes autores sugeriram que ratos alojados em EA habituem-se mais rapidamente do que os ratos CI em novos ambientes, uma vez que os animais percebem estímulos novos como menos aversivos, devido a experiências anteriores em um ambiente enriquecido, repleto de vários estímulos.

Em outro estudo, Harati et al. (395) investigaram a memória espacial em ratas Long-Evans de 1 mês de idade, que foram alojadas em AP ou EA e testados após 3, 12 ou 24 meses (jovens, de meia-idade, e idosos, respectivamente). Quando testadas no LAM, as ratas alojadas em EA apresentaram melhor desempenho da memória espacial para todas as idades. No entanto, há estudos com resultados contraditórios. Harburger et al. (510) avaliaram o efeito de EA contínuo em camundongos machos jovens (3 meses), de meia-idade (15 meses), e idosos (21 meses) e indicou que o enriquecimento de 24 horas, durante seis semanas, levou a uma diferença significativa na memória de referência espacial apenas em animais idosos, e não nos animais jovens e de meia-idade.

De fato, os resultados aqui apresentados, nesse estudo mostram que o EA melhorou a memória de longo prazo, na sessão teste, em animais de meia-idade, a partir da primeira tentativa no LAM, indicando que o EA teve efeito sobre a memória de retenção, 24 horas após a sessão de teste.

5.4 CONCLUSÃO

O segundo estudo demonstrou o efeito ansiolítico do ácido ascórbico em ratos de meia-idade crescidos em ambiente enriquecido, avaliados no LCE, além de indicar que este efeito tornou-se mais pronunciado, quando o ácido ascórbico foi combinado com o enriquecimento ambiental, sugerindo que este antioxidante pode influenciar os níveis de ansiedade de animais idosos.

Em adição, o ácido ascórbico melhorou a aprendizagem e a memória espacial na sessão treino, demonstrado pela diminuição da latência para localizar a plataforma oculta, no LCE, nas três tentativas consecutivas, indicando a melhora da memória de curto prazo nesses animais. Além disso, ficou demonstrado que o AA apresentou uma melhor resposta sobre a memória de retenção, quando os animais foram testados no LAM, 24 horas depois, sugerindo a influência do AA também sobre a memória de longo prazo, em ratos envelhecidos.

Por outro lado, o EA somente apresentou efeito sobre a memória de longo prazo, nas 1ª e 2ª tentativas, avaliados na sessão de teste, indicando que o paradigma experimental do EA apresentou efeito positivo sobre a memória dos animais envelhecidos.

Em conclusão, estes achados não só proporcionam evidência de que o ácido ascórbico desempenha um papel terapêutico importante nos processos cognitivos de ansiedade e memória em ratos idosos mantidos em um ambiente enriquecido, mas sugere o importante papel do enriquecimento ambiental como determinante na eficiência de tarefas que envolvem níveis de ansiedade e memória.

6 DISCUSSÃO GERAL

Estudos com crianças com muito baixo peso ao nascer tem relevado comprometimento cognitivo (511, 512, 513). Tomando como referência altos níveis de vitamina C detectadas no cérebro de jovens e o aumento da taxa metabólica que ocorre durante o processo de crescimento, estes eventos indicam que a deficiência da vitamina C pode apresentar consequências negativas, tais como demonstradas pelos estudos de Tolsa et al. (513) que ao analisar bebês prematuros (idade gestacional, 32,5 semanas) e baixo peso corporal (1.246 g), revelaram redução do volume cerebral, bem como da substância cinzenta, comparados aos bebês prematuros que apresentavam peso normal.

Outro estudo que acompanhava bebês com nascimento prematuro (mediana 28 semanas) e peso variando entre 840 a 1.490 g também demonstrou efeitos na cognição a longo prazo. A avaliação por meio de ressonância magnética demonstrou atrofia persistente no hipocampo, substância branca perioccipital e do corpo caloso, além do aumento dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo. Estes sujeitos apresentaram, também, após testes neuropsicológicos, memória prejudicada e baixas habilidades matemáticas (512).

Os eventos descritos acima podem ser associados à deficiência de vitaminas, principalmente a vitamina C. Portanto, esta pesquisa sugere a ingestão diária deste micronutriente, através de uma dieta contendo frutas, legumes e vegetais, fontes ricas em vitamina C, que podem propiciar a regulação da homeostasia corporal, prevenindo, assim, possíveis injúrias neuropsicológicas, associadas ao estresse oxidativo e outros fatores, que comprometem o bom funcionamento do sistema nervoso.

Estudos epidemiológicos têm revelado que existe uma associação entre concentração sanguínea, antioxidante e injúria cognitiva (514, 515). Foi detectada a correlação entre escores em teste de memória e níveis plasmáticos de vitamina C em sujeitos idosos saudáveis de 60 anos de idade (516). Estes autores sugeriram que a malnutrição pode ser uma possível causa ou efeito do declínio cognitivo em pessoas idosas (516).

Outro estudo conduzido por Ortega et al. (517) em uma população de idosos que recebiam ingestão na dieta de vitamina C, revelou que os indivíduos apresentaram funções cognitivas melhores em relação àqueles que não recebiam a vitamina C na dieta. Perrig et al. (518) demonstrou que altas concentrações plasmáticas de AA eram relacionadas com melhor desempenho em tarefas de memória realizadas por indivíduos idosos. Ademais, ingestão de vitamina C, por um período de 4 anos protege contra o declínio cognitivo (519). Em contraste, Kalmijn et al. (520) não observou nenhuma associação entre a ingestão de vitaminas antioxidantes sobre o declínio cognitivo.

Pacientes com DA apresentavam baixa concentração plasmática de vitamina C, mesmo com ingestão de vitamina C semelhante, comparados com o grupo controle e suas concentrações eram correlatas com declínio cognitivo. Estudos prospectivos também revelou uma associação entre a vitamina C com o baixo risco de desencadear a DA (521, 522).

Finalmente, este estudo indica o importante papel terapêutico da vitamina C sobre os processos cognitivos e emocionais, avaliados tanto em humanos escolarizados como em modelo animal de ansiedade e memória, aplicado em ambiente enriquecido.

Assim, a educação, a escolarização, a prática de atividade física, o lazer, o divertimento, à leitura de bons livros, o bom relacionamento com as pessoas, ou seja, situações claras de enriquecimento ambiental, junto à alimentação saudável, com nutrientes balanceados em vitamina C, certamente irão favorecer uma melhor eficiência dos componentes neuropsicológicos emocionais e cognitivos desses indivíduos, estejam eles em faixas etárias jovens ou adultas, e possivelmente em faixas senis.

7 CONCLUSÕES FINAIS

- A vitamina C apresentou perfil ansiolítico em humanos escolarizados e também em ratos de meia-idade crescidos em ambiente enriquecido.
- A vitamina C melhorou a resposta da frequência cardíaca, parâmetro fisiológico, relacionado com sintomas de ansiedade.
- A vitamina C aumentou os escores nas tarefas de cópia e memória das Figuras Complexas de Rey, memória lógica I e II, e na repetição de dígitos indiretos, subtestes da Escala de Memória de Weschler, indicando uma melhora da memória nos estudantes avaliados.
- A administração do ácido ascórbico promoveu a melhora da memória de curto e longo prazo, nos ratos de meia-idade crescidos em ambiente enriquecido.
- O enriquecimento ambiental potencializou o efeito ansiolítico do ácido ascórbico e melhorou a memória de longo prazo.

8 RECOMENDAÇÕES FINAIS

- Recomendar a implantação de programas nutricionais nas Escolas Públicas, com a inclusão de alimentos saudáveis ricos em vitamina C, visto que a vitamina C se revelou como um eficiente antioxidante na redução dos níveis de ansiedade e déficits de memória.
- A vitamina C pode ser recomendada como um coadjuvante ao tratamento medicinal e neuropsicológico sobre os distúrbios cognitivos em humanos.
- Recomendar o uso de dietas ricas em vitamina C, na alimentação diária de idosos, tendo em vista suas ações sobre a ansiedade e memória em animais envelhecidos.
- O enriquecimento ambiental desempenhou um papel determinante na eficiência da execução de tarefas envolvidas com a memória em ratos envelhecidos. Assim, esses dados de certa forma validam técnicas de estimulação cognitiva envolvendo enriquecimento de vida, muito utilizada em Programas de Reabilitação Neuropsicológicos dirigidos a idosos demenciados ou com declínio cognitivo.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Em pesquisas futuras, sugerimos avaliar mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo, em pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade e outros transtornos neuropsiquiátricos.
- Sugerimos também investigar a relação entre a suplementação de vitamina C, estresse oxidativo e antioxidantes, como coadjuvante no tratamento de outras patologias.
- Ainda, sugerimos a replicação da intervenção da vitamina C em estudantes universitários e indivíduos idosos, com a finalidade de avaliar a influência deste antioxidante sobre a escolaridade e o declínio cognitivo associado à idade.
- A ingestão de suplementos nutricionais, através da alimentação, tais como vitamina C, é susceptível de ter um impacto sobre os hábitos alimentares de forma diferenciada entre os indivíduos, visando à promoção da saúde, humor e bem-estar, assim como controlar os níveis de ansiedade e déficits de memória. Assim, sugerimos a investigação do potencial da vitamina C nos indivíduos que praticam a alimentação regada de vitamina C.

REFERÊNCIAS

1. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview *Nutrit. J.* 2003; 2:7-10.
2. Levine M, Dhariwal KR, Welch RW, Wang Y, Park JB. Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62:S1347-56.
3. Grünewald RA. Ascorbic acid in the brain. *Brain Res. Rev.* 1993; 18:123-133.
4. Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 46:719-30.
5. Verrax J. e Calderon BP. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Bioch. Pharmacol.* 2008; 76:1644-1652.
6. Rebec GV, Pierce RC. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog. Neurobiol.* 1994; 43:537-65.
7. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 2000; 23:209-16.
8. Nelson DL, Cox MM, Cuchilio CM. Estructura tridimensional de las proteínas. En: Nelson DL, Cox MM, Cuchilio CM, editores. *Lehninger. Principios de Bioquímica.* 4th Ed. Sabadell: Ediciones Omega S.A. 2006. p. 116-55.
9. Clemeston CAB. Classical scurvy: a historical review. In: *Vitamin C*, vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press. 1989; 1-10.
10. Lind J. *A treatise of scurvy.* Printed by Sands, Murray and Cochran for Kincaid, Donaldson A, Edinburgh A. 1753.
11. Svirbely JL, Szent-Gyorgyi A. The chemical nature of vitamin C. *Biochem. J.* 1932; 26865-26870.
12. Waugh WA, King CG. Isolation and identification of vitamin C. *J. Biol. Chem.* 1932; 97:325-331.
13. Haworth WN, Hirst EL. Synthesis of ascorbic acid. *J. Soc. Chem. Ind. (London)* 1933; 52:645-647.

14. Anderson L, Dibble MV, Turkki PR, Mitchell HS. *Nutrição*. 17 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. 1988. p.119-123.
15. Franz WL, Sands GW, Heyl HL. Blood ascorbic acid level in bioflavinoid and ascorbic acid therapy of common cold. *Jama*. 1956; 162:1224-1226.
16. Pauling L. The significance of the evidence about ascorbic acid and the common cold. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1971; 68:2678-1681.
17. Pauling L. *Vitamin C, the common cold and the flu*. São Francisco. WH Freeman. 1976.
18. Ritzel G. Ascorbic acid and infections of the respiratory tract. *Helv. Med. Acta*. 1961; 28-63.
19. Cowan DW, Diehl HS, Baker B. Vitamins for the prevention of colds. *J. Am. Med. Assoc.* 1942; 120-1267.
20. Wilson CWM, Loh HS. Ascorbic acid and upper respiratory inflammation. *Acta Allergol.* 1970; 24:367.
21. Moser U, Bendich A. Vitamin C. In: *Handbook of Vitamins* Edited by: Machlin LJ. Marcel Dekker, New York, Ch. 1990. p. 5.
22. Azoubel LMO, Garcia RWD, Naves MMV. Tabela de composição de alimentos In: Dutra-de-Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier. 1998. p. 363-376.
23. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
24. Levine M, Ascorbic acid specifically enhances dopamine betamonoxygenase activity in resting and stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem*. 1986; 7347-7356.
25. Pauling L. *Como viver mais e melhor: o que os médicos não dizem sobre sua saúde*. 4. Ed. São Paulo: Best Seller. 1988. p. 400.
26. Guiland JC, Lequeu B. *As vitaminas do nutriente ao medicamento*. São Paulo: Santos. 1995. p. 375.

27. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003; 22:18-35.
28. Hallberg L: Bioavailability of dietary iron in man. *Annu. Rev. Nutr.* 1981; 1:123-127.
29. Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemi. Cell Bio.* 1990; 68:1166-1167.
30. Agus DB, Gambhir SS, Pardridge WM, Spielholz C, Baselga J, Vera JC. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J. Clin. Invest.* 1997; 100:2842-2848.
31. Schreiber M, Trojan S. Ascorbic acid in the brain. *Physiol. Res.* 1991; 40:413-8.
32. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 2006; 97:1634-58.
33. Sauberlich HE. Bioavailability of vitamins. *Prog. Food Nutr. Sci.* 1985; 9:1-33.
34. Sauberlich HE. Ascorbic acid. In: *Present knowledge in Nutrition* Edited by: Brown ML. Nutrition Foundation, Washington DC, 1990.
35. Anderson D, Phillips BJ, Yu T, Edwards AJ, Ayesh R, Butterworth KR: The effect of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with low or high cholesterol levels. *Environ. Mol. Mutagens.* 1997; 30:161-174.
36. Johnson CS. Biomarkers for establishing a tolerable upper intake level for vitamin C. *Nutr. Rev.* 1999; 57:71-77.
37. Bendich A. Vitamin C safety in humans. In: *Vitamin C in Health and Disease* Edited by: Packer L, Fuchs J. Marcel Dekker Inc. New York. 1997; 369-379.
38. IOM. Institute of Medicine. *Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements.* Washington (DC): National Academy Press, 2006.
39. IOM. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes: Applications in dietary assessment.* Washington, DC: National Academic Press, 2000.

40. IOM. Institute of Medicine. Dietary References Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Washington, DC: National Academic Press, 2004.
41. Auer BL, Auer D, Rodgers AL. The effect of ascorbic acid ingestion on the biochemical and physicochemical risk factors associated with calcium oxalate kidney stone formation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998; 36:143-147.
42. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10:840-845.
43. Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005 81:736-745.
44. Hathcock JN. Vitamins and minerals: Efficacy and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997; 66:427-437.
45. Hoffer A. Ascorbic acid and kidney stones. *Can. Med. Assoc. J.* 1985; 132:320.
46. Schmidt KH, Hagmaier V, Hornig DH, Vuilleumier JP, Rutishauser G. Urinary oxalate excretion after large intakes of ascorbic acid in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981; 34:305-311.
47. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 1999; 3:194-202.
48. Tang AM, Graham NMH, Kirby AI, McCall D, Willett WC, Saah AJ. Dietary micronutrient intake and risk of progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus type I (HIV-I)-infected homosexual men. *Am. J. Epidemiol.* 1993; 138:937-51.
49. Blot WJ, Li J-Y, Taylor PR, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Nat. Cancer Inst.* 1993; 85:1483-92.
50. Aranha FQ, Moura LSA, Simões MOS, Barros ZF, Quirino IVL, Metri JC, Barros JC. Normalização dos níveis séricos de ácido ascórbico por suplementação com suco de acerola (*Malpighia glabra* L.) ou farmacológica em idosos institucionalizados. *Rev. Nutr. Campinas* 2004; 17:309-317.

51. Costa MJC, Terto ALQ, Santos LMP, Rivera MAA, Moura LSA. Efeito da suplementação com acerola nos níveis sanguíneos de vitamina C e de hemoglobina em crianças pré-escolares. *Rev. Nutr. Campinas* 2001; 14:13-20.
52. Moura LS, Guiland JC, Fuchs F, Richard D. Vitamins E, C, thiamin, riboflavin and vitamin B6 status of institutionalized elderly including the effects of supplementation. *Nutr. Res.* 1993; 13:1379-92.
53. Deruelle F e Baron B. Vitamin C: Is Supplementation Necessary for Optimal Health? *J. Alt. Comp. Med.* 2008; 14:1291-1298.
54. Carr AC, Frei B: Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999; 13:1007-1024.
55. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potencial applications of antioxidants. *J. Pharmacy. res.* 2013; 828-835.
56. Ratmanm DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Contr. Rele.* 2006; 113:189-207.
57. Martin A, Youdim K, Szprengiel A, Shukitt-Hale B, Joseph J. Roles of vitamins E and C on neurodegenerative diseases and cognitive performance. *Nutr. Rev.* 2002; 60:308-26.
58. Socci DJ, Crandall BM, Arendash GW. Chronic antioxidant treatment improves the cognitive performance of aged rats. *Brain Res.* 1995; 693:88-94.
59. Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000; 18:367-81.
60. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 2002; 1:117-23.
61. Kolosova NG, Shcheglova TV, Sergeeva SV, Loskutova LV. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats. *Neurobiol. Aging* 2006; 27:1289-97.
62. Pallauf K, Bendall JK, Scheiermann C, Watschinger K, Hoffmann J, Roeder T, Rimbach G. Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food and Chem. Toxicol.* 2013; 58:255-63.

63. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol. Lett.* 1998; 102-103:5-18.
64. Vera J, Rivas C, Fischbarg J, Golde D. Mammalian facilitative hexose transporters mediate the transport of dehydroascorbic acid. *Nature* 1993; 364:79-82.
65. Takanaga H, Mackenzie B, Hediger M. Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Arch.* 2004; 447:677-82.
66. Bánhegyi G, Braun L, Csala M, Puskás F, Mandl J., Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23:793-803.
67. Barabás J, Nagy E, Degrell I. Ascorbic acid in cerebrospinal fluid - a possible protection against free radicals in the brain. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 1995; 21:43-48.
68. Kuo CH, Hata F, Yoshida H, Yamatodani A, Wada H. Effect of ascorbic acid on release of acetylcholine from synaptic vesicles prepared from different species of animals and release of noradrenaline from synaptic vesicles of rat brain. *Life Sci.* 1979; 24:911-15.
69. Castagne V, Rougemont M, Cuenod MKQD. Low brain glutathione and ascorbic acid associated with dopamine uptake inhibition during rat's development induces long-term cognitive deficit: relevance to schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* 2004; 15:93-105.
70. Antzoulatos EG, Byrne JH. Learning insights transmitted by glutamate. *Trends Neurosci.* 2004; 27:555-60.
71. Tolbert LC, Morris PE, Jr. Spollen JJ, Ashe SC. Stereospecific effects of ascorbic acid and analogues on D1 and D2 agonist binding. *Life Sci.* 1992; 51:921-930.
72. Ciani E, Groneng L, Voltattorni M, Rolseth V, Contestabile A, Paulsen RE. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1996; 728:1-6.
73. Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Ciotti MT, Marra E, Calissano P. Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation. *J. Neurochem.* 1997; 68:2038-2045.

74. Majewska MD, Bell JA. Ascorbic acid protects neurons from injury induced by glutamate and NMDA. *Neuroreport* 1990; 1:194-196.
75. Majewska MD, Bell JA, London ED. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. *Brain Res.* 1990; 537:328-332.
76. Yusa T. Increased extracellular ascorbate release reflects glutamate re-uptake during the early stage of reperfusion after forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 2001; 897:104-113.
77. Miele M, Boutelle MG, Fillenz M. The physiologically induced release of ascorbate in rat brain is dependent on impulse traffic, calcium influx and glutamate uptake. *Neurosci.* 1994; 62:87-91.
78. Basse-Tomusk A, Rebec GV. Corticostriatal and thalamic regulation of amphetamine-induced ascorbate release in the neostriatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990; 35:55-60.
79. Schreiber M, Trojan S. Ascorbic acid in the brain. *Physiol Res*, 1991; 40:413-428.
80. Saponjic RM, Mueller K, Krug D, Kunko PM. The effects of haloperidol, scopolamine, and MK-801 on amphetamine-induced increases in ascorbic and uric acid as determined by voltammetry in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994; 48:161-168.
81. Brahma B, Forman RE, Stewart EE, Nicholson C, Rice ME. Ascorbate inhibits edema in brain slices. *J. Neurochem.* 2000; 74:1263-1270.
82. Hediger M. A. New view at C. *Nat. Med.* 2002; 8:445-446.
83. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 75:1149-1163.
84. Craske MG, Rauch SL, Ursano R, Prenoveau J, Pine DS, Zinbarg RE. What is an anxiety disorder? *Depression and Anxiety*, 2009; 26:1066-1085.
85. Kraaimaat F, Vanryckeghem M, Dam-Baggen R. Stuttering and social anxiety. *J. Fluency Dis.* 2002; 27:319-331.
86. Endler NS, Parker JDA. Stress and anxiety: Conceptual and assessment issues. *Stress Medicine* 1990; 6:243-248.

87. Beesdo-Baum K, Knappe S. Developmental epidemiology of anxiety disorders. *Child and Adolescent Clinics of North America*, 2012; 21:457-478.
88. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 2005; 62:593-602.
89. Lépine JP. The epidemiology of anxiety disorders: prevalence and societal costs. *J. Clin. Psychiatry* 2002; 63:4-8.
90. Rabbani M, Sajjadi SE, Zarei HR. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89:271-276.
91. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V)*. Washington, DC: American Psychiatric Association. 2013.
92. Araújo AC, Neto F.L. The new north american classification of mental disorders – DSM -5. *Rev. Bras. Terap. Comp. Cogn.* 2014; 1:67-82.
93. Knappe S, Beesdo-Baum K, Wittchen H.). Familial risk factors in social anxiety disorder: Calling for a family-oriented approach for targeted prevention and early intervention. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry.* 2010; 19:857-871.
94. Iverach L, Rapee R. Social anxiety disorder and stuttering: current status and future directions. *J. Fluency Dis.* 2013; 08:003.
95. Rapee RM, Schniering CA, Hudson JL. Anxiety disorders during childhood and adolescence: Origins and treatment. *An. Rev. Clin. Psych.* 2009; 5:311-341.
96. Barrera TL, Norton PJ. Quality of life impairment in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder. *J. Anxiety Disord.* 2009; 23:1086-1090.
97. Costello EJ, Mustillo S, Erkanli A, Keeler G, Angold A. Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Arch. Gen. Psychiatry* 2003; 60:837-844.
98. Kertz SJ, Woodruff-Borden J. Human and economic burden of GAD, sub threshold GAD, and worry in a primary care sample. *J. Clin. Psychol. Med. Setting* 2011; 18:281-290.

99. Massion AO, Warshaw MG, Keller MB. Quality of life and psychiatric morbidity in panic disorder and generalized anxiety disorder. *Am. J. Psychiatry* 1993; 150:600-607.
100. Stevanovic D. Impact of emotional and behavioral symptoms on quality of life in children and adolescents. *Qual. Life Res.* 2013; 22:333-337.
101. Wolitzky-Taylor K, Bobova L, Zinbarg RE, Mineka S, Craske MG. Longitudinal investigation of the impact of anxiety and mood disorders in adolescence on subsequent substance use disorder onset and vice versa. *Addict. Behav.* 2012; 37:982-985.
102. Hoffman DL, Dukes EM, Wittchen H. Human and economic burden of generalized anxiety disorder. *Depression and Anxiety* 2008; 72-90.
103. Roy-Byrne PP, Wagner A. Primary care perspectives on generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychiatry* 2004; 65:20-26.
104. Waghorn GR, Chant DC. Employment restrictions among persons with ICD-10 anxiety disorders: Characteristics from a population survey. *J. Anxiety Disord.* 2005; 19:642-657.
105. Fox E. Interference and negative priming from ignored distracters: the role of selection difficulty. *Percept. e Psychophys.* 1994; 56:565-574.
106. Foa EB, Liao D, McCarthy PR, Shoyer B, Murdock TB. Information processing in obsessive-compulsive disorder. *Cogni. Ther. Res.* 1993; 17:173-189.
107. Constans JI, Foa EB, Franklin ME, Mathews A. Memory for actual and imagined events in OC checker. *Behav. Res. and Ther.* 1995; 33:665-671.
108. Radomsky AS, Rachman S. Memory bias in obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav. Res. Ther.* 1999; 37:605-618.
109. Tolin DF, Abramowitz JS, Brigidi BD, Amir N, Street GP, Foa EB. Memory and memory confidence in obsessive-compulsive disorder. *Behav. Res. Ther.* 2001; 39:913-927.
110. Salkovskis PM. Obsessive-compulsive problems: a cognitive-behavioural analysis. *Behav. Res. Ther.* 1985; 23:571-583.

111. Salkovskis PM, Westbrook D. Behavior therapy and obsessional ruminations: can failure be turned into success? *Behav. Res. Ther.* 1989; 27:149-160.
112. Salkovskis PM. Understanding and treating obsessive-compulsive disorder. *Behav. Res. Ther.* 1999; 37:29-52.
113. Shafran R, Rachman S. Thought-action fusion: a review. *J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry* 2004; 35:87-107.
114. Christensen KJ, Kim SW, Dysken MW, Hoover KM. Neuropsychological performance in obsessive-compulsive disorder. *Biol. Psychiatry* 1992; 31:4-18.
115. Dirson S, Bouvard M, Cottraux J, Martin R. Visual memory impairment in patients with obsessive-compulsive disorder. A controlled study. *Psychother. Psychosomatics.* 1995; 63:22-31.
116. Savage CR, Deckersbach T, Wilhelm S, Rauch SL, Baer L, Reid T, Jenike MA. Strategic processing and episodic memory impairment in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychology* 2000; 14:141-151.
117. Aronowitz BR, Hollander E, DeCaria C, Cohen L, Saoud JB, Stein D. Neuropsychology of obsessive-compulsive disorder: preliminary findings. *Neuropsychiatry, Neuropsychology, and Behavior Neurology.* 1994; 7:81-86.
118. Cohen LJ, Hollander E, DeCaria CM, Stein DJ, Simeon D, Liebowitz MR, Aronowitz BR. Specificity of neuropsychological impairment in obsessive-compulsive disorder: a comparison with social phobic and normal control subjects. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 1996; 8:82-85.
119. Hollander E, Cohen L, Richards M, Mullen L, DeCaria C, Stern Y. A pilot study of the neuropsychology of obsessive-compulsive disorder and Parkinson's disease: basal ganglia disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 1993; 5:104-107.
120. Abbruzzese M, Bellodi L, Ferri S, Scarone S. The selective breakdown of frontal functions in patients with obsessive-compulsive disorder and in patients with schizophrenia: a double dissociation experimental finding. *Neuropsychologia* 1997; 35: 907-912.
121. Nelson E, Early TS, Haller JW. Visual attention in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res.* 1993; 49:183-196.

122. Veale DM, Sahakian BJ, Owen AM, Marks IM. Specific cognitive deficits in testes sensitive to frontal lobe dysfunction in obsessive-compulsive disorder. *Psychol. Med.* 1996; 26:1261-1269.
123. Motta ME, Silva GA, Araújo OC, Lira PI, Lima MC. O peso ao nascer influencia o estado nutricional ao final do primeiro ano de vida? *J. Pediatr. Rio de Janeiro.* 2005; 81:377-382.
124. Mancuso RA, Schetter CD, Rini CM, Roesch SC, Hobel CJ. Maternal prenatal anxiety and corticotropin-releasing hormone associated with timing of delivery. *Psychosom. Med.* 2004; 66:762-769.
125. Zimmer-Gembeck MJ, Helfand M. Low birthweight in a public prenatal care program: behavioral and psychosocial risk factors and psychosocial intervention. *Soc. Sci. Med.* 1996; 43:187-197.
126. Baghwanani SG, Seagraves K, Dierker LJ, Lax M. Relationship between prenatal anxiety and perinatal outcome in nulliparous women: a prospective study. *J. Nat. Med. Assoc.* 1997; 89:93-98.
127. Wadhwa P.D, Sandman C.A., Porto M., Dunkel-Schetter C., Garite TJ. The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: a prospective investigation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993; 169:858-65.
128. Grimstad H, Scheir B, Backe B, Jacobsen G. Anxiety, physical abuse, and low birth weight. *Scand. J. Public. Health.* 1999; 27:296-300.
129. Orr S, James SA, Miller CA, Barakat B. Psychosocial stressors and low birth weight in an urban population. *Am. J. Prev. Med.* 1996; 12:459-466.
130. Gouveia VV, Chaves SSS, Oliveira ICP, Dias M, Gouveia R, Andrade P. The use of the GHQ-12 in a general population: a study of its construct validity. *Psicol. Teor. Pesqui.* 2003; 19:241-248.
131. Spence SH. A measure of anxiety symptoms among children. *Behav. Res. Ther.* 1998; 36:545-566.
132. Rapee RM. Generalized anxiety disorder: a review of clinical features and theoretical concepts. *Clin. Psychol. Rev.* 1991; 11:419-440.

133. Strauss CC, Frame CL, Forehand RL. Psychosocial impairment associated with anxiety in children. *J. Consult. Clin. Child Psychol.* 1987; 16:235-239.
134. Keller MB, Lavori, PW, Wunder J, Beardslee WR, Schwarts CE, Roth J. Chronic course of anxiety disorders in children and adolescents. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.*1992; 31:595-599.
135. Kovacs M, Gatsonis C, Paulauskas SL, Richards C. Depressive disorders in childhood. IV. A longitudinal study of comorbidity with and risk for anxiety disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 1989; 46:776-783.
136. Johnson J, Weissman MM, Klerman GL. Suicidal tendencies in panic disorder: Clinical and epidemiologic issues. In: Burrows GD, Roth M, Noyes JR, editors. *Contemporary issues and prospects for research in anxiety disorders.* New York: Elsevier. 1992. p. 181-99.
137. Kashani JH, Orvaschel H. Anxiety disorders in mid-adolescence: a community sample. *Am. J. Psychiatry* 1988; 145:960-4.
138. Allen AJ, Leonard H, Swedo SE. Current knowledge of medications for the treatment of childhood anxiety disorders. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 1995; 34:976-86.
139. Rubin KH, Clark ML. Preschool teachers' ratings of behavioral problems: observational, sociometric and social-cognitive correlates. *J. Abnorm. Child Psychology* 1983; 11:273-86.
140. Edelbrock C. Teachers' perceptions of childhood anxiety and school adjustment. In: *Conference Anxiety disorders in children: implications for school adjustment; Paper.* Cape Cod MA; 1985.
141. Pollack MH, Otto MW, Sabatino S, Majcher D, Worthington JJ, McArdle ET. Relationship of childhood anxiety to adult panic disorder: correlates and influence on course. *Am. J. Psychiatry* 1996; 153:376-81.
142. Jain A, Sharma R, Gahalain N. Anxiety disorder: An overview. *Int. J Pharmacy Life Sc.*, 2010; 1:396-409.
143. Shekhar A, McCann UD, Meaney MJ. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology* 2001; 157: 327-339.

144. Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam. Clinic. Pharmacol.* 2007; 21:567-574.
145. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2013; 68:175-183.
146. Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. *Handbook of Molecular Genetics for Brain and Behavior Research*. New York: Elsevier. 1999. pp. 77–99.
147. Pathak NL, Kasture SB, Bhatt NM, Patel RG. Experimental modeling of anxiety. *J. Appl. Pharmac. Scienc.* 2011; 01:06-10.
148. Raison CL, Miller AH. When not enough is too much: The role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am. J. Psychiatry.* 2003; 160:1554-1565.
149. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behav. Brain Res.* 2001; 125:141-149.
150. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985; 14:149-167.
151. Kumar D, Bhat ZA, Kumar V, Khan NA, Chashoo IA, Zargar MI. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. *Eur. J. Integr. Med.* 2012; 4:169-e176.
152. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995; 16:33-36.
153. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92:180-185.
154. Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed; 2002.
155. Kimble GA, Hilgard ER, Marquis DG. The definition of learning (chapter 1). In Kimble, GA (Ed.), *Hilgard and Marquis` Conditioning and Learning*. Appleton Century-Crofts, New York, 1961. pp. 1-3.
156. Kandel E, Schwartz J, Jessel TM. *The Principles of Neural Science*, 4 ed. McGraw Hill Companies, New York, 2000.
157. Sharma S., Rakoczy S., Browon-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 2010; 87:521-536.

158. McGaugh J. Memory—a century of consolidation. *Sci.* 2000; 287:248-251.
159. Schwabe L, Nader K, Pruessner J. C. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. *Biol. Psychiatry.* 2014; 76:274-280.
160. Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Sci.* 1968; 160:554-555.
161. Schneider AM, Sherman W. Amnesia: A function of the temporal relation of foot-shock to electroconvulsive shock. *Sci.* 1968; 159:219-221.
162. Lewis DJ, Bregman NJ. Source of cues for cue-dependent amnesia in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1973; 85:421-426.
163. Lewis DJ, Bregman NJ, Mahan J. Cue-dependent amnesia in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1972; 81:243-247.
164. Lewis DJ. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 1979; 86:1054-1083.
165. Spear N. Retrieval of memory in animals. *Psychol. Rev.* 1973; 80:163-194.
166. Przybylski J, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* 1997; 84:241-246.
167. Rubin RD, Fried R, Franks CM. New applications of ECT. In: Rubin RD, Franks CM, editors. *Advances in Behavior Therapy*. New York: Academic Press. 1968.
168. Pitman RK. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol. Psychiatry* 1989; 26:221-223.
169. McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004; 27:1-28.
170. Pitman RK, Sanders KM, Zusman RM, Healy AR, Cheema F, Lasko NB, Cahill L, Orr SP. Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol. *Biol. Psychiatry* 2002; 51:189-192.
171. Vaiva G, Ducrocq F, Jezequel K, Averland B, Lestavel P, Brunet A, Marmar CR. Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma. *Biol. Psychiatry* 2003; 54:947-949.

172. McGhee L, Maani CV, Garza TH, De Socio PA, Gaylord KM, Black IH. The effect of propranolol on posttraumatic stress disorder in burned service members. *J. Burn. Care Res.* 2009; 30:92-97.
173. Brunet A, Orr SP, Tremblay J, Robertson K, Nader K, Pitman RK. Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *J. Psychiatr. Res.* 2008. 42:503-506.
174. Brunet A, Poudja J, Tremblay J, Bui E, Thomas E, Orr SP, et al.. Trauma reactivation under the influence of propranolol decreases posttraumatic stress symptoms and disorder: 3 open-label trials. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2011; 31:547-550.
175. Baddeley AD, Hitch G. J. Working memory. In Bower, G (ed). *The psychology of learning and motivation.* Academic. Press. 1974; 47-90.
176. Baddeley AD. Working memory and language: an overview. *J. Comm. Disord.* 2003; 36:189-208.
177. Baddeley AD. Recent developments in working memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1998; 8:234-238.
178. Repovs G, Baddeley, A. The multi-component model of working memory: Explorations in experimental cognitive psychology. *Neurosc.* 2006; 139:5-21.
179. Oliveira RM. O conceito de executivo central e suas origens. *Psic. Teor. Pesq.* 2007; 23:399-406.
180. Logie RH. Visuo-spatial processing in working memory. *Quartely J. Exp. Psychology* 1986; 38A:229-247.
181. Andrade V.M, Santos F.H., Bueno O. *Neuropsicologia Hoje.* São Paulo: Artes Médicas, 2004.
182. Cohen NJ, Squire LR. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Sci.* 1980; 210:4466, 207-210.
183. Konkell A, Cohen NJ. Relational memory and the hippocampus: representations and methods. *Frontiers in Neurosc.* 2009; 3:166-174.

184. Graf P, Schacter DL. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn.* 1985; 11: 501-518.
185. Squire LR, Zola-Morgan S. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceed. Nat. Acad. Sci. USA* 1996; 93:13515-13522.
186. Mullally SL, Maguire EA. Learning to remember: the early ontogeny of episodic memory. *Develop. Cog. Neurosci.* 2014; 9:12-29.
187. Ades C. Towards a natural history of memory. *Psicologia USP, São Paulo*, 4: 25-47, 1993.
188. Campan R, Breugnon G. Spatial memories and cognition in insects. *Etologia*, 1989; 1:63-86.
189. Sherry DF, Schacter DL. The evolution of multiple systems. *Psychological Review.* 1987; 4:439-454.
190. Eibi-Eibesfeldt I. *Ethology, the biology of behavior.* Sunderland, Sinauer Associates, 1975.
191. Tulving E. Précis of elements of episodic memory. *Behav. and Brain Sci.* 1984; 2:223-268.
192. Ingle DG, Holff K. Visually elicited evasive behavior in frogs. *Bio. Sci.* 1990; 40:284-91.
193. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1984; 11:47-60.
194. Morris RGM. Spatial localization does not depend on the presence of local cues. *Learn Motiv.* 1981; 12:239-260.
195. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 2001; 36:60-90.
196. Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav. Neurosci.* 1993; 107:618-626.

197. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297:681-683.
198. Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.* 1989; 48:29-69.
199. Van Dam D, Lenders G, De Deyn PP. Effect of Morris water maze diameter on visual spatial learning in different mouse strains. *Neurobiol. Learn Mem.* 2006; 85:164-172.
200. van der Staay FJ. Effects of the size of the Morris water tank on spatial discrimination learning in the CFW1 mouse. *Physiol. Behav.* 2000; 68:599-602.
201. Zhou SJ, ZhuME, Shu D, Du XP, Song XH, Wang XT, Zheng RY, Cai XH, Chen JF, He JC. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A(2A) receptors. *Brain Res.* 2009; 1303:74-83.
202. Dudchenko PA. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004; 28:699-709.
203. Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav. Neurosci.* 1999; 113:1170-1188.
204. Sutherland RJ, Kolb B, Whishaw IQ. Spatial mapping: definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neurosci. Lett.* 1982; 31:271-276.
205. Foster TC, Barnes CA, Rao G, McNaughton BL. Increase in perforant path quantal size in aged F-344 rats. *Neurobiol. Aging.* 1991; 12:441-448.
206. Gage FH, Dunnett SB, Bjorklund A. Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiol. Aging.* 1984; 1:43-48.
207. Gallagher M, Burwell RD, Kodosi MH, McKinney M, Southerland S, Vella-Rountree L, Lewis MH. Markers for biogenic amines in the aged rat brain: relationship to decline in spatial learning ability. *Neurobiol. Aging.* 1990; 11:507-514.
208. Vicens P, Redolat R, Carrasco MC. Effects of early spatial training on water maze performance: a longitudinal study in mice. *Exp. Gerontol.* 2002; 37:575-581.

209. Avila-Costa MR, Fortoul TI, Nino-Cabrera G, Colin-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Gutierrez-Valdez AL, Ordonez-Librado JL, Rodriguez-Lara V, Mussali-Galante P, Diaz-Bech P, Anaya-Martinez V. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) promote memory deterioration. *Neurotoxicol.* 2006; 27:1007-1012.
210. Champagne D, Dupuy JB, Rochford J, Poirier J. Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neurosc.* 2002; 114:641-654.
211. Bunuel L. *My Last Sigh*. Knopf, New York. 1983.
212. Schacter DL, Moscovitch M. Infants, amnesics, and dissociable memory systems. In: Moscovitch, M. (Ed.), *Infant Memory: Its Relation to Normal and Pathological Memory in Humans and Other Animals*. Springer, New York, 1984; 173-216.
213. Rovee-Collier C. Dissociations in infant memory: rethinking the development of implicit and explicit memory. *Psychol. Rev.* 1997; 104:467-498.
214. James W. *Principles of Psychology*. Holt, New York. 1890.
215. Spear NE. The future of learning and memory from a psychobiological perspective. In: Sarris, V., Parducci, A. (Eds.), *Perspectives in Psychological Experimentation*. Erlbaum, Hillsdale, NJ 1984; 87-103.
216. DeCasper AJ, Fifer WP. Of human bonding: newborns prefer their mothers' voices. *Sci.* 1980; 208:1174-1176.
217. Sameroff AJ. Can conditioned responses be established in the new-born infant? *Develop. Psychology* 1971; 5:1-12.
218. Bushnell IWR, Sai F, Mullin JT. Neonatal recognition of the mother's face. *British J. Develop. Psychology* 1989; 7:3-15.
219. MacFarlane A. Olfaction in the development of social preferences in the human neonate. *Ciba Found Symp.* 1975; 33:103-11.
220. Howe ML, Courage ML. On resolving the enigma of infantile amnesia. *Psychol. Bull.* 1993; 113:305-326.

221. Nadel L, Zola-Morgan S. Infantile amnesia: a neurobiological perspective. In: Moscovitch, M. (Ed.), *Infant Memory: Its Relation to Normal and Pathological Memory in Humans and Other Animals*. Springer, New York, 1984; 145-171.
222. Bachevalier J, Mishkin M. The development of memories vs. habits in infant monkeys. Paper Presented to the International Organization of Psychophysiology. 1982.
223. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn Mem.* 2004; 82:171-177.
224. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurosurg. Psychiatry* 1957; 20:11-21.
225. Milner B. Les troubles de la mémoire accompagnant des lésions hippocampiques bilatérales. In: *Physiologie de l'hippocampe*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 257–272, English translation: Milner B., Glickman S. (Eds.), 1965. Van Nostrand, Princeton, 1962; 97-111.
226. Gaffan D. Recognition impaired and association intact in the memory of monkeys after transection of the fornix. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1974; 86:1100-1109.
227. Hirsh R. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav. Biol.* 1974.12:421-444.
228. O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. The Clarendon Press, Oxford. 1978.
229. Squire LR, Zola-Morgan S. 1983. The neurology of memory: the case for correspondence between the findings for human and nonhuman primate. In: Deutsch, J.A. (Ed.) *the Physiological Basis of Memory*. Academic Press, New York, 1983; 199-268.
230. Tulving E. Memory and consciousness. *Canadian Psychology* 1985; 26:1-12.
231. Miller RA. *The Biology of Aging and Longevity*. Em Hazzar, W.R., Blass, J.P., Halter, J.B., Ouslander, J.G., Tinetti, M.E. (Orgs.), *Principles of Geriatric Medicine & Gerontology* (pp. 3-15). USA: McGraw-Hill. 2003.

232. Lezak MS. Neuropsychological assessment. New York: Oxford Universities Press. 1995.
233. Salthouse TA, Czaja SJ. Structural constraints on process explanations in cognitive aging. *Psychol. Aging* 2000; 15:44-55.
234. Ostrosky-Solis F, Jaime RM, Ardila A. Memory abilities during normal aging. *Inter. J. Neuroci.* 1998; 93:151-162.
235. Cunha NV. The challenge of an Anthropology of the ages. *Hist. Ciênci. saúde-Manguinhos* 2000; 6:7-14.
236. Lindôso ZCL, Cammarota MP, Argimon II, Gomes I, Schwanke CHA. Percepção subjetiva de memória e habilidade manual em idosos de uma oficina de inclusão digital *Rev. Bras. Geriatri. Gerontol.* Rio de Janeiro, 2011; 14:303-317.
237. Vieira EB. Manual de gerontologia: um guia teórico-prático para profissionais, cuidadores e familiares. Rio de Janeiro: Revinter; 187. 1996.
238. Almeida OP. Queixa de problemas com a memória e o diagnóstico de demência. *Arq. Neuro-psiquiatr.* 1998; 56:605-612.
239. Laks J. Comprometimento de memória associado à idade. *Rev. Bras. Neurol.* 1999; 35:1-2.
240. Da-Silva SL. Reabilitação neuropsicológica em idosos: uma gota no oceano. *Revista Eletrônica Com Ciência, Maio LaborJor-Unicamp-SBPC.* 2004.
241. Da Silva SL, Coelho DS, Alchieri JC. Plasticidade Cerebral, Meio Ambiente, Comportamento e Cognição: Bases aliadas às Neurociências para o estudo da Reabilitação Neuropsicológica da Memória. In: Landeira-Fernandez J, Silva MTA. (Org.). *Intersecções entre Neurociência e Psicologia.* 1 ed. São Paulo: Louise, 1. 2006.
242. Da-Silva SL, Pereira DA, Veloso F, Satler CE, Arantes A, Guimarães RM. Neuropsychological rehabilitation of memory applied to dementia: an intra-subject noncontrolled study. *Estud. Psicol.* 2011; 28:229-240.
243. Belleville S, Gilbert B, Fontaine F. Improvement of episodic memory in persons with mild cognitive impairment and healthy older adults: evidence from a cognitive intervention program. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2006; 22:486-499.

244. Rapp S, Brenes G, Marsh AP. Memory enhancement training for older adults with mild cognitive impairment: a preliminary study. *Aging Ment. Health* 2002; 6:5-11.
245. Rozzini L, Costardi D, Vicini-Chilovi B. Efficacy of cognitive rehabilitation in patients with mild cognitive impairment treated with cholinesterase inhibitors. *Inter. J. Geriatr. Psychiatry* 2006; 22:356-360.
246. Talassi E, Guerreschi M, Feriani M, Fedi V, Bianchetti A, Trabucchi M.. Effectiveness of a cognitive rehabilitation program in mild dementia (MD) and mild cognitive impairment (MCI): a case control study. *Arch Gerontol Geriatr*, 2007; 44:391-399.
247. Corkin S. What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews. Neurosc.* 2002; 3: 153-160.
248. Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, Hyman BT. H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J. Neurosci.* 1997; 17:3964-3979.
249. Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F. Developmental amnesia associated with early hypoxic-ischaemic injury. *Brain* 2000; 123:499-507.
250. Pigott S, Milner B. Memory for different aspects of complex visual scenes after unilateral temporal- or frontal-lobe resection. *Neuropsychol.* 1993; 31:1-15.
251. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 1992; 99:195-231.
252. Stefanacci L, Buffalo EA, Schmolck H, Squire LR. Profound amnesia after damage to the medial temporal lobe: a neuroanatomical and neuropsychological profile of patient E. P. *J. Neurosci.* 2000; 20:7024-7036.
253. Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 1998; 8:198-204.
254. Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M. Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Sci.* 1997; 277:376-380.

255. Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychol.* 1997; 35:11-24.
256. Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behav. Brain Res.* 2002; 132:77-84.
257. Feigenbaum JD, Polkey CE, Morris RG. Deficits in spatial working memory after unilateral temporal lobectomy in man. *Neuropsychol.* 1996; 34:163-176.
258. Goldstein LH, Canavan AG, Polkey CE. Cognitive mapping after unilateral temporal lobectomy. *Neuropsychol.* 1989; 27:167-177.
259. Maguire EA, Burke T, Phillips J, Staunton H. Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychol.* 1996; 34:993-1001.
260. Rosenbaum RS, Priselac S, Kohler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M. Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nature Neurosci.* 2000; 3:1044-1048.
261. Teng E, Squire LR. Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 1999; 400:675-677.
262. Bayley PJ, O'Reilly RC, Curran T, Squire LR. New semantic learning in patients with large medial temporal lobe lesions. *Hippocampus* 2008; 18:575-583.
263. Schmolck H, Kensinger EA, Corkin S, Squire LR. Semantic knowledge in patient H.M. and other patients with bilateral medial and lateral temporal lobe lesions. *Hippocampus* 2002; 12:520-533.
264. Bohbot VD, Iaria G, Petrides M. Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychol.* 2004; 18:418-425.
265. Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RS, Frith CD, O'Keefe J. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Sci.* 1998; 280:921-924.

266. Maguire EA, Woollett K, Spiers HJ. London taxi drivers and bus drivers: a structural MRI and neuropsychological analysis. *Hippocampus* 2006; 16:1091-1101.
267. Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. *Behav. Neurosci.* 1999; 113:1170-1188.
268. de Bruin JP, Moita MP, de Brabander HM, Joosten RN. Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. *Neurobiol. Learn Mem.* 2001; 75:164-178.
269. Gallagher M, Rapp PR. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annu. Rev. Psychol.* 1997; 48:339-370.
270. Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural Biol.* 1993; 60:9-26.
271. Murray EA, Baxter MG, Gaffan D. Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behav. Neurosci.* 1998; 112:1291-1303.
272. Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, Rawlins JN. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav. Brain Res.* 2002; 133:279-291.
273. Mesulam MM. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron.* 1999; 24:521-529.
274. Miller DB, O'Callaghan JP. Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res. Rev.* 2005; 4:123-140.
275. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1979; 93:74-104.
276. Barnes CA. Aging and the physiology of spatial memory. *Neurobiol. Aging* 1988; 9:563-568.
277. Gallagher M, Nicolle MM. Animal models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. *Behav. Brain Res.* 57 1993; 2:155-162.

278. Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986; 83:3027-3031.
279. Cherry KE, Park DC. Individual difference and contextual variables influence spatial memory in younger and older adults. *Psychol. Aging* 1993; 8:517-526.
280. Evans GW, Brennan PL, Skorpanich MA, Held D. Cognitive mapping and elderly adults: verbal and location memory for urban landmarks. *J. Gerontol.* 1984; 39:452-457.
281. Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br. J. Nutr.* 2010; 103:730-734.
282. Kritz-Silverstein D, Von Muhlen D, Barrett-Connor E, Bressel MA. Isoflavones and cognitive function in older women: the soy and Postmenopausal Health In Aging (SOPHIA) Study. *Menopause* 2003; 10:196-202.
283. Thorp AA, Sinn N, Buckley JD, Coates AM, Howe PR. Soya isoflavone supplementation enhances spatial working memory in men. *Br. J. Nutr.* 2009; 102:1348-1354.
284. Hansen SN, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients* 2014; 6:3818-3846.
285. Tveden-Nyborg P, Johansen LK, Raida Z, Villumsen CK, Larsen JO, Lykkesfeldt J. Vitamin C deficiency in early postnatal life impairs spatial memory and reduces the number of hippocampal neurons in guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90:540-546.
286. Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Does vitamin C deficiency result in impaired brain development in infants? *Redox Rep.* 2009; 14:1-6.
287. Gale CR, Martyn CN, Cooper C. Cognitive impairment and mortality in a cohort of elderly people. *Br. Med. J.* 1996; 312:608-611.
288. Hughes RE, Hurley RJ, Jones PR. Retention of ascorbic acid by guinea pig tissues. *Br. J. Nutr.* 1971; 26:433-438.

289. Tveden-Nyborg P, Vogt L, Schjoldager JG, Jeannet N, Hasselholt S, Paidi MD, Christen S, Lykkesfeldt J. Maternal vitamin C deficiency during pregnancy persistently impairs hippocampal neurogenesis in offspring of guinea pigs. *PLoS One* 2012; 7:e48488.
290. Harrison FE, Green RJ, Dawes SM, May JM. Vitamin C distribution and retention in the mouse brain. *Brain Res.* 2010; 1348:181-186.
291. Milby K, Oke A, Adams RN. Detailed mapping of ascorbate distribution in rat brain. *Neurosci. Lett.* 1982; 28:15-20.
292. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974; 53:2-6.
293. Phelps CH. Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: Some selected comments. *Progr. Brain Res.* 1990; 86:3-10.
294. Pia HW. Plasticity of the central nervous system- a neurosurgeon's experience of cerebral compensation and decompensation. *Acta Neurol.*, 1985; 77:81-102.
295. Eriksson PS, Perillieva E, Bjork-Eriksson T. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medic.* 1998; 4:1313-1317.
296. Rosenzweig MR. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu. Rev. Psychol.* 1996; 47:1-32.
297. Kolb B, Whishaw IQ. Plasticity in the neocortex: mechanisms underlying recovery from early brain damage. *Progr. Neurobiol.* 1989; 32, 235-276.
298. Finger S, Almli R.. Brain damage and neural plasticity: mechanisms of recovery or development? *Brain Res. Rev.* 1982; 10:177-186.
299. Morris RGM, Kandel ER, Squire LR. The neuroscience of learning and memory: Cell neural circuits and behavior. *Trend. Neurosci.* 1988; 11:125-127.
300. Weinberger NM, Diamond DM. Physiological plasticity in auditory cortex: Rapid induction by learning. *Progr. Neurobiol.* 1987; 29:1-5.
301. Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond M. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1962; 55:429-437.
302. Hebb DO. *The Organization of Behavior*. Wiley, New York, 1949.

303. Bliss TV, Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973; 232:357-374.
304. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 1973; 232:331-356.
305. Douglas RM, Goddard GV. Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1975; 86:205-215.
306. Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus based long-term memory. *Cell* 1997; 88:615-626.
307. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39.
308. Eckles-Smith K, Clayton D, Bickford P, Browning MD. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain Research. Mol. Brain Res.* 2000; 78:154-162.
309. Lanahan A, Lyford G, Stevenson GS, Worley PF, Barnes CA. Selective alteration of long term potentiation-induced transcriptional response in hippocampus of aged, memory-impaired rats. *J. Neurosci.* 1997; 17:2876-2885.
310. Moore CI, Browning MD, Rose GM. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged Fischer 344 rats. *Hippocampus* 1993; 3:57-66.
311. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 1983; 334:33-46.
312. Errington ML, Lynch MA, Bliss TV. Long-term potentiation in the dentate gyrus: induction and increased glutamate release are blocked by D(-)aminophosphonovalerate. *Neurosci.* 1987; 20:279-284.
313. Morris RG, Davis S, Butcher SP. Hippocampal synaptic plasticity and NMDA receptors: a role in information storage? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biol. Scien.* 1990; 329:187-204.

314. Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 1990; 12:1016-1028.
315. Shankar S, Teyler TJ, Robbins N. Aging differentially alters forms of long-term potentiation in rat hippocampal area CA1. *J. Neurophysiol.* 1998; 79:334-341.
316. Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 2004; 84:87-136.
317. Eichenbaum H, Cohen NJ. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain.* Oxford University Press, New York, 2001.
318. Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; 319:774-776.
319. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87:1327-1338.
320. Danysz W, Zajackowski W, Parsons CG. Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* 1995; 6:455-474.
321. Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S. Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 2003; 38:305-315.
322. McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 2012; 62:3e12.
323. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E.. Mild cognitive impairment. Clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 1999; 56:303-308.
324. Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, Tangalos EG, Cummings JL, DeKosky ST. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the Am Acad. Neurol. *Neurol.* 2001; 56:1133-1142.

325. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 2001; 58:1985-1992.
326. Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Bäckman L, Albert M, Almkvist O, Arai H, Basun H, Blennow K, de Leon M, DeCarli C, Erkinjuntti T, Giacobini E, Graff C, Hardy J, Jack C, Jorm A, Ritchie K, van Duijn C, Visser P, Petersen RC. Mild cognitive impairment-beyond controversies, towards a consensus: report of International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J. Inter. Med.* 2004; 256:240-246.
327. Bruscoli M, Lovestone S. Is MCI really just early dementia? A systematic review of conversion studies. *Inter. Psychogeriatr.* 2004;16:129-140.
328. Simon SS, Ribeiro MPO. Comprometimento cognitivo leve e realibilitação Neuropsicológica: uma revisão bibliográfica. *Psic. Rev. São Paulo* 2011; 20:93-122.
329. Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb–Williams maze task. *J. Neurosci. Res.* 2002; 70:340-346.
330. Cummings B, Head E, Ruehl W, Milgram N, Cotaman C. The Canine as an Animal Model of Human Aging and Dementia. *Neurobiol. Aging.* 1996; 17:259-268.
331. Tekirian TL, Cole GM, Russell MJ, Yang F, Wekstein DR, Patel E, Snowdon DA, Markesbery WR, Geddes JW. Carboxy terminal of beta-amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains. *Neurobiol. Aging.* 1996; 17:249-57.
332. Uno H. Age-related pathology and biosenescent markers in captive rhesus macaques. *Age (Omaha)* 1997; 20:1-13.
333. Fratiglioni L, Wang HX. Brain reserve hypothesis in dementia. *J. Alzheimers Dis.* 2007; 12:11-22.
334. Scarmeas N, Stern Y. Cognitive reserve and lifestyle. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 2003; 25:625-633.
335. Meng X, D'Arcy C. Education and Dementia in the Context of the Cognitive Reserve Hypothesis: A Systematic Review with Meta-Analyses and Qualitative Analyses. *PloS One* 2012; 6:e38268.

336. Katzman R. Education and the prevalence of dementia and Alzheimer's disease. *Neurol.* 1993; 43:13-20.
337. Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 73:167-175.
338. Whalley LJ, Deary IJ, Appleton CL, Starr JM. Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing Res. Rev.* 2004; 3:369-382.
339. Stern Y. Cognitive Reserve and Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2006; 20:S69-74.
340. Paradise M, Cooper C, Livingston G. Systematic review of the effect of education on survival in Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatr.* 2009; 21:25-32.
341. Parente M.A.M.P., Scherer, L.C., Zimmermann N., Fonseca, R.P. Evidências do papel da escolaridade na organização cerebral. *Rev. Neuropsicol. Latinoamericana.* 2009; 72-80.
342. Stern Y. Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 2009; 47:2015-2028.
343. Rosselli M, Ardila A. The impact of culture and education on non-verbal neuropsychological measurements: a critical review. *Brain Cogn.* 2003; 52:326-333.
344. Ostrosky-Solís F, Ardila A, Rosselli M. NEUROPSI: a brief neuropsychological test battery in Spanish with norms by age and educational level. *J. Inter. Neuropsychol. Soci.* 1999; 5:413-433.
345. Brucki S, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PHF, Okamoto IH. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2003; 61: 777-781.
346. Petersson K, Reis, A, Askelöf S, Castro-Caldas A, Ingvar M. Language processing modulated by literacy: a network analysis of verbal repetition in literate and illiterate subjects. *J. Cogn. Neurosci.* 2000; 12:364-382.
347. Meguro K, Shimada M, Yamaguchi S, Ishizaki J, Ishii H, Shimada Y, Sato M, Yamadori A, Sekita, Y. Cognitive function and frontal lobe atrophy in normal elderly adults: Implications for dementia not as aging related disorders and the reserve hypothesis. *Psychiatr. Clin. Neurosci.* 2001; 55:565-572.

348. Ho SC, Woo J, Sham J, Chan SG, Yu ALM. A 3-year follow-up study of social, lifestyle and health predictors of cognitive impairment in a Chinese older cohort. *Inter. J. Epidemiol.* 2001; 30:1389-1396.
349. Christensen H, Anstey KJ, Parslow RA, Maller J, Mackinnon A, Sachdev P.. The brain reserve hypothesis, brain atrophy and aging. *Gerontol.* 2007; 53:82-95.
350. Reiman EM, Chena K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandya D, Osborn D, Saundersk AM, Hardym J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proceed. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 6:284-289.
351. Willis SL, Baron JB. Midlife Cognition: The association of personality with cognition and risk of cognitive impairment. In S. M. Hofer, & D. F. Alwin (Eds), *Handbook of Cognitive Aging: Interdisciplinary Perspectives*. California: United States. 647-661. 2008.
352. Bertolucci PHF, Brucki SMD, Campacci S, Juliano Y. The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status. *Arq. Neuropsiquiatr.* 1994; 52:1-7.
353. Lecours AR, Mehler J, Parente MAMP. Alphabetization et cerveaux. In Unesco. (Org.). *Pour comprendre*. OTTAWA: UNESCO. 175-190. 1984.
354. Solé-Padullés C, Bartrés-Faz D, Junqué C, Vendrell P, Rami L, Clemente IC, Bosch B, Villar A, Bargalló N, Jurado MA, Barrios M, Molinuevo JL. Brain structure and function related to cognitive reserve variables in normal aging, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 2009; 30:1114-1124.
355. Cabeza R. Hemispheric asymmetry reduction in old adults: The HAROLD Model. *Psychol. Aging.* 2002; 17:85-100.
356. Hebb DO. The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am. Psychol.* 1947; 2:306-307.
357. Gaspar AD. Manipulação de objetos nos chimpanzés do zôo de Lisboa: contributo para discussão do bem-estar psicológico dos animais em cativeiro. *Ana. Psicol.* 1993; 4:557-569.

358. Widman DR, Abrahamson G.C, Rosellini RA. Environmental enrichment: the influence of restricted daily exposure and subsequent exposure to uncontrollable stress. *Physiol. Behav.* 1992; 51:309-18.
359. Tomaz C, Costa JC. Neurociências e memória. *Humanidades*, 2001; 48:146-160.
360. Ferrari E.A.M. Toyoda M.S.S. Faleiros L., Cerutti S.M. Plasticidade neural: relações com o comportamento e abordagens experimentais. *Psicol: teor. pesq.* 2001; 17:187-194.
361. Carlstead K, Brown J, Seindsticker S. Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology.* 1993; 12:321-332.
362. Barreto WP, Carvalho TC, Reis GMCL. Enriquecimento ambiental de um grupo de *Panthera tigris tigris* no Zoológico de Brasília. *Anais do XX Encontro Anual de Etologia da Sociedade Brasileira de Etologia*, Natal, Brasil, 20-294. 2002.
363. Ferreira FL, Oliveira I, Leal W. Enriquecimento ambiental de um grupo de *Panthera tigris tigris* em dias de baixa e alta circulação de visitantes no Zoológico de Brasília. *Anais do XXI Encontro Anual de Etologia da Sociedade Brasileira de Etologia*, Uberlândia, Brasil, 123. 2003.
364. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, et al. Environmental enrichment and the brain. *Prog. Brain Res.* 2002; 138:109-33.
365. Petrosini L, De Bartolo P, Foti F, Gelfo F, Cutuli D, Leggio MG, et al. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Res. Rev.* 2009; 61:221-39.
366. Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 2009; 32:233-239.
367. Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). *Prog. Neurobiol.* 2004; 72:167-82.
368. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 2000; 1:191-198.

369. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7:697-709.
370. Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* 2008; 31:159-68.
371. Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog. Neurobiol.* 2010; 92:572-592.
372. Simpson J, Kell JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats – behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 2011; 222:246-264.
373. Brown KJ, Grunberg NE. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. *Physiol. Behav.* 1995; 58:1085-1089.
374. Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2008; 89:85-93.
375. Perry JL, Stairs DJ, Bardo MT. Impulsive choice and environmental enrichment: effects of d-amphetamine and methylphenidate. *Behav. Brain Res.* 2008; 193:48-54.
376. Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A, Linnoila M. Effects of isolation-rearing on voluntary consumption of ethanol, sucrose and saccharin solutions in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1998; 139:210-216.
377. Wright IK, Upton N, Marsden CA. Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol. Behav.* 1991; 50:1129-1132.
378. Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav. Brain Res.* 2009; 197:125-37.
379. Swanson HH, van de Poll NE. Effects of an isolated or enriched environment after handling on sexual maturation and behaviour in male and female rats. *J. Reprod. Fertil.* 1983; 69:165-71.

380. Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Wurbel H. Enrichment dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behav. Brain Res.* 2001; 121:11-20.
381. Hellems KG, Nobrega JN, Olmstead MC. Early environmental experience alters baseline and ethanol-induced cognitive impulsivity: relationship to forebrain 5-HT1A receptor binding. *Behav. Brain Res.* 2005; 159:207-220.
382. Sparling JE, Mahoney M, Baker S, Bielajew C. The effects of gestational and postpartum environmental enrichment on the mother rat: A preliminary investigation. *Behav. Brain Res.* 2010; 208:213-223.
383. Pena Y, Prunell M, Rotllant D, Armario A, Escorihuela RM. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*; 2009; 34:1390-1404.
384. Pena Y, Prunell M, Dimitsantos V, Nadal R, Escorihuela RM. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behav. Brain Res.* 2006; 174:181-187.
385. Hoffmann LC, Schutte SR, Koch M, Schwabe K. Effect of “enriched environment” during development on adult rat behavior and response to the dopamine receptor agonist apomorphine. *Neurosc.* 2009; 158:1589-1598.
386. Leal-Galicia P, Saldivar-Gonzalez A, Morimoto S, Arias C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. *Dev Neurobiol.* 2007; 67:395-405.
387. Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 73:193-207.
388. Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, Wurbel H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 73:209-224.
389. Hellems KG, Benge LC, Olmstead MC. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2004; 150:103-115.

390. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 1999; 39:569-578.
391. Pham TM, Soderstrom S, Winblad B, Mohammed AH. Effects of environmental enrichment on cognitive function and hippocampal NGF in the non-handled rats. *Behav. Brain Res.* 1999; 103:63-70.
392. Ueda S, Sakakibara S, Yoshimoto K. Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neurosci.* 2005; 135:395-402.
393. Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neurosci.* 1999; 94:279-286.
394. Harris AP, D'Eath RB, Healy SD. Environmental enrichment enhances spatial cognition in rats by reducing thigmotaxis (wall hugging) during testing. *Anim. Behav.* 2009; 77:1459-1464.
395. Harati H, Majchrzak M, Cosquer B, Galani R, Kelche C, Cassel JC, et al. Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol. Aging*; 2009; 32:718-736.
396. Simon P, Dupuis R., Costentin J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.* 1994; 61:59-64.
397. Cui M, Yang Y, Yang J, Zhang J, Han H, MaW, et al. Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. *Neurosci. Lett.* 2006; 404:208-212.
398. Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick, KM. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 2006; 85:139-152.
399. Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn. Mem.* 2003; 10:187-198.

400. Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann. Neurol.* 2002; 52:135-143.
401. Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H. Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable β -amyloid deposition. *Neuroreport.* 2004; 15:1751-1754.
402. Mattson MP, Duan W, Lee J, Guo Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: Molecular mechanisms. *Mech. Ageing Dev.* 2001; 122:757-778.
403. Lores-Arnaiz S, Bustamante J, Arismendi M, Vilas S, Paglia N, Basso N, et al. Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behav. Brain Res* 2006; 169:294-302.
404. Stewart K, Bayne K. Environmental enrichment for laboratory animals. In: Reuter JD, editor. *Laboratory animal medicine and management*. New York: International veterinary information service; 2004.
405. Chance MRA, Russell WMS. The benefits of giving experimental animals the best possible environment. In: Reinhardt V, editor. *Comfortable quarters for laboratory animals*. Washington, DC: Animal Welfare Institute. 1997. p. 12–5.
406. Andrade A, Andrade MCR, Marinho AM, Filho JF. *Biologia, Manejo e Medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica*. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2010.
407. Gautam M, Agrawal M, Gautam M, Sharma P, Gautam AS, Gautam S. Role of antioxidants in generalised anxiety disorder and depression. *Indian. J. Psychiatry* 2012; 54:244-247.
408. Weinberger DR. Anxiety at the frontier of molecular medicine. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344:1247-1249.
409. Guney E, Ceylan MF, Tektas A, M. Alisik, M. Ergin, Z. Goker, G. S. Dinc, O. Ozturk, A. Korkmaz, S. Eker, M. Kizilgun and O. Erel. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *J. Affect. Disord.*, 2014; 156: 62-66.

410. American Psychiatric Association, 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th, Text-Revision (DSM-IV-TR). American Psychiatric Association, Washington (DC).
411. Vitasari P, Wahab MNA, Herawan T, Othman A, Sinnadurai SK. A pilot study of pre- post anxiety treatment to improve academic performance for engineering students. *Proc. Soc. Behav. Sci.* 2011; 15:3826-3830.
412. Aronen ET, Vuontella V, Steenari MR, Salmi J, Carlson S. Working memory, psychiatric symptoms, and academic performance at school. *Neurobiol. Learn Mem.* 2005; 83:33-42.
413. Cassady JC, Johnson RE. Cognitive test anxiety and academic performance. *Contemp. Educat. Psychology.* 2002; 27: 270-295.
414. Hamzah MH, Language anxiety among first year Malay students of the international Islamic college: an investigation of L2 skills, sources of anxiety, and L2 performance. Master's Thesis. International Islamic University of Malaysia, Malaysia. 2007.
415. McCraty R. When anxiety causes your brain to jam, use your heart. Institute of Heart Math. Heart Math Research Center, Institute of Heart Math, Boulder Creek, CA. 2007.
416. Mazzone L, Ducci F, Scoto MC, Passaniti E, D'Arrigo VG, Vitiello B. The role of anxiety symptoms in school performance in a community sample of children and adolescents. *BMC Public. Health* 2007; 7:1471-2458.
417. Sena JDW, Lowe PA, Lee SW. Significant predictors of test anxiety among students with and without learning disabilities. *J. Learn. Disabilit.,* 2007; 40:360-376.
418. Brody S, Preut R, Schommer K, Schürmeyer TH. A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. *Psychopharmacology.* 2002; 159:319-24.
419. Ness AR, Chee D, Elliott P. Vitamin C and blood pressure—an overview. *J. Hum. Hypertens.* 1997; 11:343-350.
420. Bates CJ, Walmsley CM, Prentice A, Finch S. Does vitamin C reduce blood pressure? Results of a large study of people aged 65 or older. *J. Hypertens.,* 1998; 16:925-932.

421. Mazloom Z, Ekramzadeh M, Hejazi N. Efficacy of supplementary vitamins C and E on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *Pak. J. Biol. Sci.* 2013; 16:1597-15600.
422. Aburawi SM, Ghambiriou FA, Attumi AA, Altubuly RA, Kara AA. Effect of ascorbic acid on mental depression drug therapy: clinical study. *J. Psychol. Psychother.*, 2014; 4:118.
423. Amr M, El-Mogy A, Shams T, Vieira K, Lakhan S. Efficacy of vitamin C as an adjunct to fluoxetine therapy in pediatric major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutr. J.* 2013; 12: 31.
424. Binfaré RW, Rosa AO, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues ALS. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009; 33:530-540.
425. Moretti M, Freitas AE, Budni J, Fernandes SC, Balen G. de O, Rodrigues ALS. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav. Brain Res.* 2011; 225:328-333.
426. Moretti M, Budni J, Ribeiro CM, Rodrigues ALS. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 687:21-27.
427. Moretti M, Colla A, de Oliveira Balen G, dos Santos, DB, Budni J, de Freitas AE, Farina M, Rodrigues ALS. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J. Psychiatr. Res.* 2012; 46:331-340.
428. Moretti M, Budni J, Dos Santos DB, Antunes A, Daufenbach JF, Manosso LM, Farina M, Rodrigues ALS. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *J. Mol. Neurosci.* 2013; 49:68-79.
429. Moretti M, Budni J, Freitas AE, Rosa PB, Rodrigues ALS. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. *J. Psychiatr. Res.* 2014; 48:16-24.

430. Suh SY, Bae WK, Ahn HY, Cho SE, Jung GC, Yeom CH. Intravenous vitamin C administration reduces fatigue in office workers: A double-blind randomized controlled trial. *Nutr. J.* 2012; 11:1-7.
431. Evans-Olders R, Eintracht S, Hoffer LJ. Metabolic origin of hypovitaminosis C in acutely hospitalized patients. *Nutrit.* 2010; 26:1070-74.
432. Wang Y, Liu XJ, Robitaille L, Eintracht S, Macnamara E, Hoffer LJ. Effects of vitamin C and vitamin D administration on mood and distress in acutely hospitalized patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013; 98:705-11.
433. Zhang M, Robitaille L, Eintracht S, Hoffer LJ. Vitamin C provision improves mood in acutely hospitalized patients. *Nutrit.* 2011; 27:530-33.
434. Ranjana KS, Negi R, Pande D, Khanna S, Khanna, H.D. Markers of oxidative stress in generalized anxiety psychiatric disorder: therapeutic implications. *J. Stress Physiol. Bioch.* 2012; 8:32-38.
435. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97:1634–58, 2006.
436. Ng F, Berk M, Dean O, A.I. Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacology.* 2008. 1-26.
437. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety. Relationship and cellular pathways. *Oxidat. Med. and Cell. Longev.* 2009; 2:63–67.
438. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosc. Res.* 2010; 68:261-275.
439. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundaget B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002; 46:27-32.
440. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Ustundag B, Bulut S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 2002; 46:186-189.
441. Bessey OA, Ascorbic acid. Microchemical methods. In: *Vitamin Methods*. New York: Academic Press 1960; 1:303.

442. Marim RG, Gusmão AS, Catanho REO, Deminice R, Therezo ALS, Jordão Júnior AA, Martins LPA. Effects of vitamin C supplementation on acute phase chagas disease in experimentally infected mice with *Trypanosoma cruzi* QM1 strain. Rev. Inst. Med. Trop. 2012; 54:319-323.
443. Garlipp-Picchi M, Deminice R, Ovidio PP, Jordão AA. Effects of ascorbic acid on oxidative stress biomarkers of elite swimmers. Rev. Bras. Med. Esporte. 2013; 19:394-398.
444. Beck AT, Epstein N, Brown G, Steer RA. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. J. Consult. Clin. Psychol. 56: 893-897.
445. Cunha JA. Manual da versão em português das escalas Beck. Tradução e adaptação brasileira. São Paulo: Casa do Psicólogo. 2001.
446. Rey A. L'Examen Psychologique dans le Cas d'Encéphalopathie Traumatique. Genève: Archives de Pscychologie 1941; 112:286-340.
447. Osterrieth PA. Le Test de Copie d'une Figure Complexe. Archives de Psychologie: Genève 1945; 30:205-353.
448. Jamus DR, Mäder MJ. A figura complexa de Rey e seu papel na avaliação neuropsicológica. J. Epilepsy Clin. Neurophysiol. 2005; 11:193-198.
449. Oliveira MS, Rigoni MS. Figuras complexas de Rey: teste de cópia e de reprodução de memória de figuras geométricas complexas. São Paulo: Casa do Psicólogo. 2010.
450. Hamer M, Bates CJ, Mishra GD. Depression, physical function, and risk of mortality: national diet and nutrition survey in adults older than 65 years. Am. J. Geriatr. Psychiatry 2011; 19:72-78.
451. Beesdo K, Bittner A, Pine DS, Stein MB, Höfler M, Lieb R, Wittchen HU. Incidence of social anxiety disorder and the consistent risk for secondary depression in the first three decade of life. Arch. Gen. Psychiatry 2007; 64:903-912.
452. Duffy A, Horrocks J, Doucette S, Keown-Stoneman C, S. McCloskey S, Grof P., Childhood anxiety: an early predictor of mood disorders in off spring of bipolar parents. J. Affect. Disord., 2013; 150:363-369.

453. Masood A, Nadeem A, Mustafa SJ, O'Donnell JM. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008; 326:369-379
454. Mathew SJ, Price RB, Charney DS. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: Implications for novel therapeutics. *Am. J. Med. Genet. C.* 2008; 148:89-98.
455. Aschbacher K, O'Donovan A, Wolkowitz OM, Dhabhar FS, Su Y, Epel E. Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 2013; 38:1698-1708.
456. Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 589:173-175.
457. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance, *Clin. Biochemist.* 1993; 26:351-357.
458. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog. in Neuro-Psychopharmacology and Biolog. Psychiatry.* 2011; 35:676-692.
459. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochemistry* 2004; 37:277-285.
460. Grigor`ev IP, Neokesariskii AA. Effect of ascorbic acid on the binding of 3H-GABA and 3H-glutamic acid to synaptosomes of the rat cerebral cortex. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1986; 102:288-289.
461. Li YF, Jackson KL, Stern JE, Rabeler B, Patel KP. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2006; 291:H2847-2856.
462. Jorm AF, Christensen H, Griffiths KM, Parslow RA, Rodgers B, Blewitt KA, 2004. Effectiveness of complementary and self-help treatments for anxiety disorders. *Med. J. Aust.* 2004; 181:S29-46.

463. Bruno RM, Daghini E, Ghiadoni L, Sudano I, Rugani I, Varanini M, Passino C, Emdin M, Taddei S. Effect of acute administration of vitamin C on muscle sympathetic activity, cardiac sympathovagal balance, and baroreflex sensitivity in hypertensive patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012; 96:302-308.
464. Chang C, Chen M, Wang T, Chang W, C. Lin C, Liu C. Scurvy in a patient with depression. *Dig. Dis. Sci.*, 2007; 52:1259-1261.
465. Kinsman R, Hood J. Some behavioral effects of ascorbic acid deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 1971; 24:455-464.
466. Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD, Brodie DA, Jackson MJ. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J. Physiol.* 2003; 549:645-652.
467. Glasser AJ, Zimmerman IL. Interpretación clínica de la Escala de Inteligencia de Wechsler para Niños (WISC). Madrid: Tea. 1977.
468. Figueiredo VLM, Nascimento E. Desempenho as duas tarefas do subteste dígitos do WISC-III e do WAIS-III. *Psicol. Teor. Pesq.* 2007; 23:313-318.
469. Jones RB, Satterlee DG, Moreau J, Waddington D. Vitamin C supplementation and fear-reduction in Japanese quail: short-term cumulative effects. *Br. Poult. Sci.* 1996; 37:33-42.
470. Satterlee DG, Jones RB, Ryder FH. Effects of ascorbyl-2-polyphosphate on adrenocortical activation and fear-related behavior in broiler chickens. *Poult. Sci.* 1994; 73:194-01.
471. Arzi A, Hemmati AA, Razian A. Effect of vitamins C and E on cognitive function in mouse. *Pharmacol. Res.* 2004; 49:249-52.
472. De Angelis L, Furlan C. The effects of ascorbic acid and oxiracetam on scopolamine-induced amnesia in a habituation test in aged mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 1995; 64:119-24.
473. Hasanein P, Shahidi S. Effects of combined treatment with vitamins C and E on passive avoidance learning and memory in diabetic rats. *Neurobiol. Learn Mem.* 2010; 93:472-78.

474. Sumien N, Heinrich KR, Sohal RS, Forster MJ. Short-term vitamin E intake fails to improve cognitive or psychomotor performance of aged mice. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 36:1424-33.
475. Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 1996; 78:57-65.
476. Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2001; 73:211-20.
477. Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging* 2003; 24:615-26.
478. Hughes RN, Collins MA. Enhanced habituation and decreased anxiety by environmental enrichment and possible attenuation of these effects by chronic α -tocopherol (vitamin E) in aging male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010; 94:534-542.
479. Freret T, Billard JM, Schumann-Bard P, Dutar P, Dauphin F, Boulouard M, Boeut V. Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan. *Neurobiol. Aging* 2012; 33:1005.e1-1005.e10.
480. Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav. Brain Res.* 2006; 175:1-8.
481. Gresack JE, Kerr KM, Frick KM. Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. *Neurobiol. Learn Mem.* 2007; 88:393-08.
482. Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 2009; 19:1008-1018.
483. Yuan ZY, Gu P, Liu L, Wang YY, Liu J, Cui DS, Geng Y, Zhang ZX, Zhu AP, Ma L, Wang MW. Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice. *Neurosci. Lett.* 2009; 454:6-10.

484. Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2009. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 2009; 89:369-82.
485. Mora F, Segovia G, Del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res. Rev.* 2007; 55:78-88.
486. Hamilton DA, Kolb B. Differential effects of nicotine and complex housing on subsequent experience-dependent structural plasticity in the nucleus accumbens. *Behav. Neurosci.* 2005; 119:355-365.
487. Kolb B, Gorny G, Söderpalm AHV, Robinson TE. Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse* 2003; 48:149-153.
488. Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L, Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* 2005; 163:78-90.
489. Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. A golgi-cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res. Dev.* 2003;141:55–61.
490. Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, de Oliveira FR, Paes JM. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 2010; 32:509-19.
491. Mesa-Gresa P, Pérez-Martinez A, Redolat R. Behavioral effects of combined environmental enrichment and chronic nicotine administration in male NMRI mice. *Physiol. Behav.* 2013; 10:65-76.
492. Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol. Learn Mem.* 2007; 87:101-108.
493. Angelucci ME, Cesario C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; 35:1201-1208.

494. Hughes RN, Lowther CL, van Nobelen M. Prolonged treatment with vitamins C and E separately and together decreases anxiety-related open-field behavior and acoustic startle in hooded rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011; 97:494-499.
495. Mefford IN, Oke AF, Adams RN. Regional distribution of ascorbate in human brain. *Brain Res.* 1981; 212:223-26.
496. Zaidi SM, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 340:229-33.
497. Plaznik A, Palejko W, Nazar M, Jessa M. Effects of antagonists at the NMDA receptor complex in two models of anxiety. *Eu. Neuropsychopharmacol.* 1994; 4:503-12.
498. Majewska MD, Bell JA, London ED. Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. *Brain Res.* 1990; 537:328-32.
499. Lee L, Kang SA, Lee HO, Lee BH, Jung IK, Lee JE, Hoe YS. Effect of supplementation of vitamin E and vitamin C on brain acetylcholinesterase activity and transmitter levels in rats treated with scopolamine, an inducer of dementia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2001; 47:323-28.
500. Naughton M, Mulrooney JB, Leonard BE. A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum. Psychopharmacol.* 2000; 15:397-15.
501. Ballenger JC. Current treatments of the anxiety disorders in adults. *Biol. Psychiatry* 1999; 46:1579-1594.
502. El-Gendy KS, Aly NM, Mahmoud FH, Kenawy A, El-Sebae AK. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food Chem. Toxicol.* 2010; 48:215-221.
503. Delwing D, Bavaresco CS, Monteiro SC, Matté C, Netto CA, Wyse ATS. α -Tocopherol and ascorbic acid prevent memory deficits provoked by chronic hyperprolinemia in rats. *Behav. Brain Res.* 2006;168:185-89.
504. Harrison FE, Hosseini AH, Dawes SM, Weaver S, May JM. Ascorbic acid attenuates scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. *Behav. Brain Res.* 2009; 205:550-58.

505. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald, MP, May JM. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wildtype mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2009; 93:443-450.
506. Parle M, Dhingra D. Ascorbic acid: a promising memory-enhancer in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 2003; 93:129-35.
507. Pettenuzzo L, Schuck, PF, Fontella F, Wannmacher CMD, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wajner M. Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002; 73:623-29.
508. Noël A, Quinette P, Guillery-Girard B, Dayan J, Piolino P, Marquis S, de la Sayette V, Viader F, Desgranges B, Eustache F. Psychopathological factors, memory disorders and transient global amnesia. *Br. J. Psychiatry* 2008; 193:145-151.
509. Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 1973; 21:205-235.
510. Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav. Brain Res.* 2007; 185:43-48.
511. Luciana M, Lindeke L, Georgieff M, Mills M, Nelson CA. Neurobehavioral evidence for working memory deficits in school-aged children with histories of prematurity. *Dev. Med. Child. Neurol.* 1999, 41:521-533.
512. Isaacs EB, Lucas A, Chong WK, Wood SJ, Johnson CL, Marshall C, Vargha-Khadem F, Gadian DG. Hippocampal volume and everyday memory in children of very low birth weight. *Pediatr. Res.* 2000; 47:713-720.
513. Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Rossignol AS, Lazeyras F, Hanquinet S, Pfizenmaier M, Hüppi PS. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr. Res.* 2004; 56:132-138.
514. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2003; 24:915-919.

515. Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, Stone SV, Gustafson D, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch. Neurol.* 2004; 61:82-88.
516. Goodwin JS, Goodwin JM, Garry PJ. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy elderly population. *J. Am. Med. Assoc.* 249 (1983) 2917–2921.
517. Ortega RM, Requejo AM, Andres P, Lopez-Sobaler AM, Quintas ME, Redondo MR, Navia R, Rivas T. Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997; 66:803-809.
518. Perrig WJ, Perrig P, Stahelin HB. The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1997; 45:718-724.
519. Paleologos M, Cumming RG, Lazarus R. Cohort study of vitamin C intake and cognitive impairment. *Am. J. Epidemiol.* 1998; 148:45-50.
520. Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* 1997; 145:33-41.
521. Morris MC, Beckett LA, Scherr PA, Hebert LE, Bennett DA, Field TS, Evans DA. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1998; 12:121-126.
522. Parigi AD, Panza F, Capurso C, Solfrizzi V. Nutritional factors, cognitive decline, and dementia. *Brain Res. Bull.* 2006; 69:1-19.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA COM SERES HUMANOS



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **022/12**

Título do Projeto: “Estudo da interferência da Vitamina C nos comportamentos de ansiedade e déficit de memória e o abandono dos estudos e reprovação escolar”.


Pesquisador Responsável: Ivaldo Jesus Lima de Oliveira

Data de Entrada: 04/04/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **022/12** com o título: “Estudo da interferência da Vitamina C nos comportamentos de ansiedade e déficit de memória e o abandono dos estudos e reprovação escolar”, analisado na 4ª Reunião Ordinária, realizada no dia 08 de maio de 2012.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 15 de agosto de 2012.


Prof. Natanael Sanches
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA COM USO DE ANIMAIS



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 3 de agosto de 2010.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “*Avaliação do Sistema Glutamérgico e Conexões nos Comportamentos de Ansiedade e Memória em Roedores*”, UNBDOC. n.º. 59616/2010, sob responsabilidade do Prof(a). Dr(a). Vânia Maria Moraes Ferreira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA





UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IBD
 COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA
 FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO

Data de início: Abril/2010

Data de término: Abril/2013

1. Finalidade

() Ensino (X) Pesquisa (DOUTORADO) () Extensão

2. Pesquisador Responsável (orientador): **Vania Maria Moraes Ferreira**

Departamento: **Ciências Farmacêuticas**

Ramal:

Número do RG: **1967190 SSP-PA**

CPF: **213.561.732-68**

3. Colaboradores:

Doutorando: **Ivaldo Jesus Lima de Oliveira** - 3536-7057
 9264-7748

4. Nome para contato: Vania Maria Moraes Ferreira

Telefone: ---

Celular: **8122-3197**

E-mail: **vmmf@unb.br**

Endereço: **SHTN, Tr 01, Lt 02, Condomínio Lakeside, apt. 414-A (Asa Norte)**

5. Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E CONEXÕES NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E MEMÓRIA EM ROEDORES**

6. Informações sobre o modelo animal

6.1 Espécie: **Ratos**

Linhagem/cepa/raça: **Wistar**

sexo: (X) M () F

Idade (aproximada): **2 meses**

Peso aproximado: **250 g**

6.2. A(s) espécie(s) utilizada(s) é(são) caracteristicamente animais de:

(x) laboratório () produção () selvagens () selvagens exóticos

() selvagens amansados () domésticos

6.3. Existe planejamento estatístico? (x) sim () não

6.4. Número total de animais: **140 animais**

Número de animais por grupo experimental/aulas: **10 animais/tratamento***

* Não há nenhuma possibilidade de redução de animais, visto que quando for trabalhados os aspectos cognitivos ficarão somente 5 animais para verificar

ANEXO C – TERMO DE CONCORDÂNCIA DA COLETA DE SANGUE



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
BRASÍLIA - DF
TELEFONE (061) 3107-1947
E-mail: cepfs@unb.br
<http://fs.unb.br/cep/>

TERMO DE CONCORDÂNCIA

O Gerente da Gerência de Medicamentos e Toxicologia, NELSON FRICK DA SILVA FAGUNDES, Farmacêutico Bioquímico e Industrial, Mestre em Ciências Farmacêuticas (UFRGS, 2000), Especialista em Políticas Públicas e gestão Estratégica em Saúde (ENAP/ENSP, 2006), responsável pela Gerência de Medicamentos e Toxicologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN-DF, vinculado a Subsecretaria de Vigilância à Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal está de acordo com a realização, neste Setor, da coleta de sangue e exames laboratoriais para determinação dos níveis séricos da Vitamina C, referente à execução da pesquisa: “ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C NOS COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE E DÉFICIT DE MEMÓRIA E O ABANDONO DOS ESTUDOS E REPROVAÇÃO ESCOLAR”, de responsabilidade do pesquisador IVALDO JESUS LIMA DE OLIVEIRA, com a finalidade de investigar o efeito da suplementação da Vitamina C (Ácido Ascórbico) nos níveis de ansiedade e déficit de memória e o fenômeno social do abandono dos estudos e da reprovação escolar em estudantes do Centro de Ensino Médio 09 de Ceilândia – CEM 09, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

O estudo envolve a suplementação de cápsulas de vitamina C para o grupo experimental e de placebo para o grupo controle, coleta e análise de sangue, aplicação de testes neuropsicológicos, avaliação psicológica, descrição nutricional, recordatório nutricional e ingestão de nutrientes, aplicados por Psicólogas e Nutricionistas devidamente credenciadas pelos seus respectivos Conselhos Regionais de Psicologia (CRP) e de Nutrição (CRN).

Nelson Frick da Silva



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
 FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO
 BRASÍLIA - DF
 TELEFONE (061) 3107-1947
 E-mail: cepfs@unb.br
<http://fs.unb.br/cep/>

Serão selecionados 120 estudantes de ambos os sexos, regulamente matriculados no CEM 09 de Ceilândia, divididos nos seus respectivos turnos, compostos por 40 estudantes: 20 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, que formarão três grupos por idade: 14 a 17 anos adolescentes, 18 a 45 adultos e 50 a 70 idosos, divididos em 10 estudantes para cada experimento, que também serão incluídos no grupo focal para o experimento: abandono dos estudos e reprovação escolar. Esta intervenção tem duração de 14 (dias), com previsão de início para o mês de setembro de 2012.

Os estudantes selecionados serão entrevistados pelas Psicólogas e Nutricionistas no início do experimento e serão coletados (5 ml) de amostra de sangue dos estudantes, após 8 (oito horas) em jejum, por uma Bioquímica responsável do LACEN-DF, utilizando luvas, seringas e agulhas descartáveis, seguindo as recomendações padrões de biossegurança, no 1º dia do experimento e no 14º dia (no início e no final dos tratamentos).

Brasília, 25 de julho de 2012.

Gerente responsável pela GMT/LACEN-DF/SVS

Nelson Frick Fagundes

Ms NELSON FRICK DA SILVA FAGUNDES

Assinatura/carimbo

Nelson Frick Fagundes
 Gerente GMT/LACEN-DF
 Matrícula: 188711-4

Pesquisador Responsável pelo protocolo de pesquisa:

Ivaldo Jesus Lima de Oliveira

Profº Ivaldo Jesus Lima de Oliveira

Assinatura

ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

O (a) Senhor(a) estudante do Centro de Ensino Médio de Ceilândia (CEM), maior de idade (18 a 74 anos) está sendo convidado(a), a participar do projeto de pesquisa com o título: ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DÉFICIT DE MEMÓRIA E O ABANDONO DOS ESTUDOS E REPROVAÇÃO ESCOLAR. Caso o(a) senhor(a) seja o responsável legal pelo seu(a) filho(a) menor de idade (14 a 17 anos) convidamos a autorizar a participação deles no referido projeto de pesquisa.

O objetivo desta pesquisa é investigar o efeito da suplementação da vitamina C (ácido ascórbico) nos níveis de ansiedade e déficit de memória e o fenômeno social do abandono dos estudos e da reprovação escolar em estudantes do CEM 09 de Ceilândia.

O(a) Senhor(a) ou o seu(a) filho(a) menor de idade receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome e/ou de seu(a) filho(a) não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a)s.

Esclarecemos que a sua participação ou de seu(a) filho(a) menor de idade, será através da aferição da pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca; da coleta de (5 ml) de amostra de sangue, após 8 (oito horas) em jejum, por uma Bioquímica responsável do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN-DF, vinculado a Subsecretaria de Vigilância à Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, que utilizará luvas, seringas e agulhas descartáveis, no 1º dia do experimento e no 15º dia (no início e no final dos tratamentos) sob a responsabilidade do Gerente da Gerência de Medicamentos e Toxicologia Mestre em Ciências Farmacêuticas e Farmacêutico Ms. Nelson Frick da Silva Fagundes, bem como de entrevistas, testes neuropsicológicos, avaliação psicológica, descrição nutricional, recordatório nutricional e ingestão de nutrientes aplicados por Psicólogas e Nutricionistas devidamente credenciadas pelos seus respectivos Conselhos Regionais de Psicologia (CRP) e de Nutrição (CRN) não havendo nenhum incômodo para os participantes. O(a) senhor(a) ou seu(a) filho(a) deverá comparecer a todos os procedimentos experimentais com a equipe multidisciplinar, nos laboratórios do CEM, na data e horário combinado antecipadamente. Estes procedimentos serão realizados em duas visitas (no 1º e 15º dia). Informamos que o(a) senhor(a) ou seu(a) filho(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para

o(a) senhor(a) ou seu(a) filho(a). Esclarecemos, ainda, que a sua participação ou do seu(a) filho(a) é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração. Solicitamos também permissão para gravar as entrevistas semi-estruturadas que serão utilizadas durante os procedimentos da execução deste projeto.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador.

Se o(a) Senhor(a) ou seu filho(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Profº Drº Sérgio Leme da Silva, Coordenador Geral da Pesquisa, Psicólogo do Instituto de Psicologia, Departamento de Processos Psicológicos Básicos, do Programa de Pós-graduação de Ciências do Comportamento telefone: (61) 3307-2625 Ramal: 515, (61) 9143-3003, no horário: 8:00 às 12:00 e 14:00 às 18:00 ou ao doutorando Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, telefone: (61) 3536-7057 ou (61) 9301-9855, responsável pela pesquisa ou ainda para o Ms Nelson Frick da Silva Fagundes, telefone: (61) 3225-2394.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável

Nome e assinatura

Brasília, ____ de _____ de _____

ANEXO E – AUTORIZAÇÃO PARA A COLETA DE DADOS



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE EDUCAÇÃO
Subsecretaria de Infraestrutura e Apoio Educacional
Coordenação de Unidades Regionais de Infraestrutura e Apoio Educacional



AUTORIZAÇÃO

Autorizamos o Professor Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, Doutorando de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília-UnB, a realizar no **Centro de Ensino Médio 09 de Ceilândia** a pesquisa “**ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DÉFICIT DE MEMÓRIA E O ABANDONO DOS ESTUDOS E REPROVAÇÃO ESCOLAR**”, por meio de coleta de sangue, aplicação de questionários/testes e entrevistas com alunos de 14 a 70 anos, com objetivo de “*investigar o efeito da vitamina C nos níveis de ansiedade e déficit de memória e o fenômeno social do abandono dos estudos e da reprovação escolar em estudantes do CEM 09*”.

Ressaltamos que a pesquisa deverá ser realizada mediante *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* assinado pelo participante maior de idade ou pelos pais/responsáveis pelo estudante menor de idade e a coleta de sangue deverá ser realizada conforme previsto no projeto, por profissional capacitado, respeitando as normas de biossegurança e dentro dos rigores da assepsia.

Certos da boa acolhida ao trabalho em comento, agradecemos antecipadamente e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais pelo telefone 3901-1877.

Brasília, 19 de outubro de 2012.

HERON DE SENA FILHO

Coordenação de Unidades Regionais de Infraestrutura e Apoio Educacional

ANEXO F – DADOS PESSOAIS PARA A COLETA DE SANGUE

Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN-DF, vinculado a Subsecretaria de Vigilância à Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal.

ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DÉFICIT DE MEMÓRIA E O ABANDONO DOS ESTUDOS E REPROVAÇÃO ESCOLAR.

Nome do Paciente: _____

Sexo: () Masculino () Feminino Estado Civil: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: ___ Série: ___ Turma: ___ Turno: _____

Nome da Mãe: _____

Nome do Pai: _____

Endereço: _____

Telefone: (___) _____ Celular: (___) _____

Solicitante: Farm. Bioq. Nelson Frick Fagundes

Exame solicitado: Teor sérico de Vitamina C

Observação: 1º Coleta em paciente sem intervenção (linha de base)

data: ___/___/___

2º Coleta em paciente (pós-tratamento)

data: ___/___/___

Estudantes do Centro de Ensino Médio 09 de Ceilândia

Pesquisador responsável: Ivaldo Jesus Lima de Oliveira

Matrícula: UnB-10/0072330

Matrícula: SEDF-32.635-6

ANEXO G – DECLARAÇÃO DE COMPARECIMENTO



Governo do Distrito Federal
Secretaria de Estado de Educação
Diretoria Regional de Ensino de Ceilândia
Centro de Ensino Médio 09 de Ceilândia



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o(a) estudante do Centro de Ensino Médio de Ceilândia _____, Série: _____ Turma: _____ Turno: _____ Modalidade _____ foi submetido à aferição da pressão sanguínea sístole, diástole e frequência cardíaca, coleta de sangue, e bateria de testes neuropsicológicos de ansiedade e memória, como participante da pesquisa de doutorado do Prof^o Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, Matrícula UnB-10/0072330, do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília – UnB, com o título: ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DA VITAMINA C NOS COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DÉFICIT DE MEMÓRIA E O ABANDONO DOS ESTUDOS E REPROVAÇÃO ESCOLAR, aprovada pelo CEP/FS/UnB 022/12, de 08.05.12.

Esclarecemos, ainda que os procedimentos da coleta de sangue foram realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN-DF, vinculado a Subsecretaria de Vigilância à Saúde, da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, no dia: ___/___/___ horário: _____ se iniciou a partir das 8:00 hs e se finalizou às 10:00 hs, devendo o(a) estudante retornar ao local de trabalho assim que for concluído todos os procedimentos experimentais e laboratoriais desta pesquisa.

Brasília, de _____ de 2012.

Ms Nelson Frick da Silva Fagundes
Gerente da Gerência de Medicamentos e Toxicologia
Mestre em Ciências Farmacêuticas e Farmacêutico
LACEN-DF

Ciente: Direção do CEM 09 de Ceilândia

ANEXO H – ESCALA DE ANSIEDADE DE BECK (BAI)

ESCALA DE ANSIEDADE DE BECK (BAI)

Nome: _____

	0	1	2	3
	AUSENTE	SUAVE Não me incomoda muito	MODERADO É desagradável, mas consigo suportar	SEVERO Quase não consigo suportar
1 – Dormência ou formigamento				
2 – Sensações de calor				
3 – Tremor nas pernas				
4 – Incapaz de relaxar				
5 – Medo de acontecimentos ruins				
6 – Confuso ou delirante				
7 – Coração batendo forte e rápido				
8 – Inseguro(a)				
9 – Apavorado(a)				
10 – Nervoso(a)				
11 – Sensação de sufocamento				
12 – Tremor nas mãos				
13 – Trêmulo(a)				
14 – Medo de perder o controle				
15 – Dificuldade de respirar				
16 – Medo de morrer				
17 – Assustado(a)				
18 – Indigestão ou desconforto abdominal				
19 – Desmaios				
20 – Rubor facial				
21 – Sudorese (não devido ao calor)				

ANEXO I – ESCALA DE MEMÓRIA WESCHELR (WMS)

INFORMAÇÃO E ORIENTAÇÃO

Nome: _____

Informação	Resposta	Ponto	Escore
1 – Qual o seu nome completo?		1	
2 – Quantos anos você têm?		1	
3 – Quando você nasceu?		1	
4 – Onde você nasceu?		1	
5 – Qual o primeiro nome da sua mãe (ou pai)?		1	
6 – Quem é o Presidente do Brasil?		1	
7 – Quem foi anterior a ele?		1	
8 – Quem é o Governador?		1	
9 – Quem é o Papa? Ou o Rei do Futebol?		1	
10 – Em que ano estamos?		1	
11 – Em que mês estamos?		1	
12 – Que dia do mês é hoje?		1	
13 – Em que lugar você está agora?		1	
14 – Em que cidade estamos?		1	
15 – Que horas são agora?		1	

CONTROLE MENTAL

Resposta	Tempo	Ponto	Escore
20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1	30`	0,1 ou 2	
A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z	30`	0,1 ou 2	
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40	45`	0,1 ou 2	

DÍGITOS DIRETOS

Nome: _____

	Item resposta	Ponto na tentativa (0 ou 1)	Ponto no Item (0, 1 ou 2)
1	1-7	1	
2	6-3	1	
1	5-8-2	1	
2	6-9-4	1	
1	6-4-3-9	1	
2	7-2-8-6	1	
1	4-2-7-3-1	1	
2	7-5-8-3-6	1	
1	6-1-9-4-7-3	1	
2	3-9-2-4-8-7	1	
1	5-9-1-7-4-2-8	1	
2	4-1-7-9-3-8-6	1	
1	5-8-1-9-5-1-7-4	1	
2	3-8-2-9-5-1-7-4	1	
1	2-7-5-8-6-2-5-8-4	1	
2	7-1-3-9-4-2-5-6-8	1	

Ponto máximo: 16

DÍGITOS INVERSOS

	Item resposta	Ponto na tentativa (0 ou 1)	Ponto no Item (0, 1 ou 2)
1	2-4	1	
2	5-7	1	
1	6-2-9	1	
2	4-1-5	1	
1	3-2-7-9	1	
2	4-9-6-8	1	
1	1-5-2-8-6	1	
2	6-1-8-4-3	1	
1	5-3-9-4-1-8	1	
2	7-2-4-8-5-6	1	
1	8-1-2-9-3-6-5	1	
2	4-7-3-9-1-2-8	1	
1	9-4-3-7-6-2-5-8	1	
2	7-2-8-1-9-6-5-3	1	

Ponto máximo: 14

PARES DE FÁCIL ASSOCIAÇÃO I E II

Nome: _____

Palavra	Par	1ª Tentativa	Tipo	Evocação tardia	Tipo
1 – ROSA	FLOR		F		F
2 – METAL	FERRO		F		F
3 – ESCOLA	DROGARIA		D		D
4 – REPOLHO	CANETA		D		D
5 – BEBÊ	CHORO		F		F
6 – ESPREMER	ESCURO		D		D
7 – OBEDECER	CENTÍMETRO		D		D
8 – FRUTA	MAÇÃ		F		F

Palavra	Par	2ª Tentativa	Tipo
1 – FRUTA	MAÇÃ		F
2 – ROSA	FLOR		F
3 – METAL	FERRO		D
4 – REPOLHO	CANETA		D
5 – OBEDECER	CENTÍMETRO		D
6 – ESCOLA	DROGARIA		D
7 – ESPREMER	ESCURO		D
8 – BEBÊ	CHORO		F

Palavra	Par	3ª Tentativa	Tipo
1 – OBEDECER	CENTÍMETRO		D
2 – REPOLHO	CANETA		D
3 – ROSA	FLOR		F
4 – ESCOLA	DROGARIA		D
5 – ESPREMER	ESCURO		D
6 – BEBÊ	CHORO		F
7 – METAL	FERRO		D
8 – FRUTA	MAÇÃ		F

ANEXO J – DADOS PESSOAIS E SOCIOECONÔMICOS

DADOS PESSOAIS E SOCIOECONÔMICOS

Identificação do entrevistado(a)

Data da Entrevista: ___/___/___ Horário de início _____ Término _____

Nome: _____

Sexo: () Masculino () Feminino Estado Civil: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Série: ___ Turma: ___ Turno: _____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____ Celular: (____) _____

Peso: _____ Kg Estatura: _____ cm

Profissão: _____

Você está trabalhando atualmente? _____

Local de trabalho: _____

Horário de trabalho: _____

Renda Familiar

Até 2 SM ()

3 a 4 SM ()

5 a 6 SM ()

7 a 8 SM ()

Não declarou ()

Nº de componentes da família: _____ Veículo próprio: () sim () não

Imóvel: () próprio () alugado () outros

ANEXO K – ESTADO DE SAÚDE FÍSICA E MENTAL

ESTADO DE SAÚDE FÍSICA E MENTAL

Nome do entrevistado(a): _____

Informe se é portador ou se já sofreu de:

Nº	Enfermidade	SIM	NÃO
01	Doenças do aparelho cardiocirculatório (angina, infarto, pressão alta, arritmias, aneurisma de aorta, cirurgias anteriores e doenças cardíacas congênicas)		
02	Doenças endócrinas e metabólicas (diabetes, hipertireoidismo e hipotireoidismo)		
03	Doenças do sangue, imunológicas e do colágeno ou autoimune (anemias, púrpuras, talassemias, AIDS e suas complicações, lúpus eritematoso e artrite reumatóide)		
04	Doenças do sistema nervoso e cerebrovasculares (derrame, aneurisma cerebral, paralisia cerebral, Parkinson, Alzheimer, epilepsia, esclerose múltipla lateral, Huntington e doenças congênicas do sistema nervoso)		
05	Doenças ou tomorizações malignas (leucemia, mieloma múltiplo, carcinoma, melanoma, linfoma e todos os tipos de câncer)		
06	Doenças do aparelho urinário e do aparelho reprodutor masculino ou feminino (cálculo renal, insuficiência renal, infecção urinária de repetição, incontinência urinária, doenças da próstata, cistos de ovário, mioma uterino e nódulos de mama)		
07	Qualquer outra doença que não esteja descrita acima, constante dos itens anteriores, que tenha gerado ou não intervenção médica.		

Declaro para os devidos fins, que me encontro em plena saúde física e mental e estou apto(a) a participar desta pesquisa e não estou grávida (feminino) e nem ingerindo suplementação regular de vitamina C, nem medicamentos controlados restritos aos pacientes psiquiátricos não tenho nenhuma doença grave, principalmente predisposição a doenças renais e nefropatias, bem como aspectos relacionados à prática nutricional: raquitismo, desnutrição, baixo peso corporal relacionado com a idade e problemas mentais.

Ciente: _____

Assinatura do Participante

ANEXO L – RECORDATÓRIO ALIMENTAR

RECORDATÓRIO ALIMENTAR

Nome: _____ Sexo: Masculino 1
 Feminino 2

Idade: _____ Série: _____ Turno: _____

Nº do questionário _____ Entrevistador: _____

Data da Entrevista: ___/___/___

Dia da semana do Recordatório _____ Horário: _____

Anote bebidas e alimentos (ingredientes de preparações) consumidos no dia anterior e os horários. Anote o nome das refeições. Não esqueça das marcas comerciais, medidas caseiras, utensílios (tipo de colher, copo, prato, etc).

Nome das Refeições	Horário	Local	Alimentos, bebidas e/ou preparações	Ingredientes e forma de preparo	Quantidades ingeridas (colheres, copo, xícara – medida caseira)
Café da manhã					
Lanche da manhã					
Almoço					
Lanche da tarde					
Jantar					
Ceia					
Intervalos de refeições					

O(A) Entrevistado(a) consumiu:

Refrigerante Sim Light/Diet Normal
 Não

Leite Sim Integral Desnatado Semidesnatado
 Não

Salada Sim Descrever o tempero utilizado
 Não

Bebidas Sim Verificar se adicionou algo
 Não

Apetite: Pouco Normal Muito

ANEXO M – E-MAIL E CARTA DE ACEITE DO ARTIGO

Veja como pode ser seu e-mail profissional:

1 Digite seu nome

2 Digite o nome da sua empresa

Home IG Notícias Economia Esportes Gente Delas Vídeos Mais sites Bate Papo Produtos IG

iG Mail - ivaldojesus@ig.com.br

Contatos Editar cadastro Alterar senha Ajuda Sair

ESCREVER

Caixa de entrada (839)

Enviados 42 de 3335

Rascunhos (25)

Lixeira

Spam (325)

Arquivadas

De Science Alert

Para ivaldojesus@ig.com.br

Assunto Status has been changed for your article No. 67854-PJBS-ANSI Ter. 11:11

Dear Ivaldo Jesus Lima de Oliveira,

Status of your above mentioned manuscript has been changed. Current status of your manuscript is as under:

Accepted: After minor revision.

For further information, please logon the system at <http://www.scialert.com/login.php> with your user id and password.

Best Regards
Science Alert Support Team

Black Friday Casas Bahia

Aproveite a Maior Liquidação do Ano Cadastre-se e Receba as Ofertas!

MAIS MOVER PARA EXCLUIR RESPONDER

Carreiras Jurídicas

verbojuridico.com.br

Estude via internet com os melhores Grátis (pad)

Foi DEMitido? LIG 93770034

Advogada Criminalista

Inderma-Dra. Barbara Uzel

Defesa Empresarial BSB DF

PT 1406 21/11/2014

sci@lert.com

LOGOUT

Home Page

Join as Reviewer

MY ARTICLES

Recently Submitted

In Review

For Revision

Accepted Articles

Press Ready Articles

Published Articles

Closed / Rejected

GENERAL

Submit New Article

Generate Invoice(s)

My Points

FOLLOW US

Like Share 13k

Follow @scialert

FEEDBACK

Tell us how we're doing!

For Revision

You have the following article(s) in this phase

Manuscript No.	67854-PJBS-ANSI
Title	Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Anxiety in Students: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial
Status	Accepted: After minor revision.
What should I do	Submit the revised manuscript after incorporating the requisite modifications.
Instructions	Answer all the questions of the Reviewer (if any) in the provided place before the submission of revised manuscript.
Submission Date	October 02, 2014

EVALUATION REPORTS

External [Comments of Reviewer 1](#)

[Submit revised manuscript.](#)

[Withdraw manuscript.](#)

Leave a message

Advertisement

Copyright © 2014 Science Alert. All Rights Reserved.

The screenshot shows a web browser window with the URL https://webmail.ig.com.br/?_task=mail&_action=show&_uid=6211&_mbox=INBOX&_caps=pdf%3D1%2Cfl. The page header includes navigation links like Home iG, Notícias, Economia, Esportes, Gente, Delas, Vídeos, Mais sites, Bate Papo, and Produtos iG. The user is logged in as **ivaldojesus@ig.com.br**.

The main content area displays an email from **Science Alert** to **ivaldojesus@ig.com.br**. The subject is **Status has been changed for your article No. 67854-PJBS-ANSI**, dated **Qua. 04:56**. The email body contains the following text:

Dear Ivaldo Jesus Lima de Oliveira,

Status of your above mentioned manuscript has been changed. Current status of your manuscript is as under:

Accepted: Final Checking for Layout Designing

For further information, please logon the system at <http://www.scialert.com/login.php> with your user id and password.

At the bottom of the email interface, there are buttons for **MAIS**, **MOVER PARA**, **EXCLUIR**, and **RESPONDER**.





Dec 22, 2014

Mr. Ivaldo Jesus Lima de Oliveira,
nil

Subject: Acceptance Letter for Article No. 67854-PJBS-ANSI

It's a great pleasure for us to inform you that below mentioned manuscript has been accepted for publication in Pakistan Journal of Biological Sciences as Research Article on the recommendation of the reviewers.

Title: Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Anxiety in Students: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

Author's Name: Ms. Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, Victor Vasconcelos de Souza, Dr. Victor Motta Moreira and Phd Sérgio Leme Da-Silva

Receiving Date: October 02, 2014

Date:

Revised on: November 30, 2014

Accepted on: December 03, 2014

Published on: December 13, 2014

Regards

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Imran Pasha', is written over a large, stylized blue circular mark.

M. Imran Pasha
Publication Manager

ANEXO N – CÓPIA DA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO

Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Anxiety in Students: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

¹Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, ²Victor Vasconcelos de Souza, ³Vitor Motta and ³Sérgio Leme Da-Silva

¹Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasília, Distrito Federal, CEP 70910-900, Brazil

²Department of Psychological, Institute of Psychology, University of Brasília,

³Department of Basic Psychological Processes, Institute of Psychology,
 Postgraduate Program in Behavioral Sciences, University of Brasília,
 Brasília, Distrito Federal, CEP 70910-900, Brazil

Abstract: Vitamin C (ascorbic acid) is a well-known antioxidant that is involved in anxiety, stress, depression, fatigue and mood state in humans. Studies have suggested that oxidative stress may trigger neuropsychological disorders. Antioxidants may play an important therapeutic role in combating the damage caused by oxidative stress in individuals that suffer from anxiety. In this context, it was hypothesized that oral vitamin C supplementation would reduce anxiety. However, few up to date studies have evaluated the consequences of oral vitamin C supplementation on anxiety in humans. The present study examined the effects of oral vitamin C supplements in 42 high school students, in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The students were given either vitamin C (500 mg day⁻¹) or placebo. Plasma concentrations of vitamin C and blood pressure were measured before the intervention and then one day after the intervention. Anxiety levels were evaluated for each student before and after 14 days following supplementation with the Beck Anxiety Inventory. Results showed that vitamin C reduced anxiety levels and led to higher plasma vitamin C concentration compared to the placebo. The mean heart rates were also significantly different between vitamin C group and placebo control group. Present study results not only provide evidence that vitamin C plays an important therapeutic role for anxiety but also point a possible use for antioxidants in the prevention or reduction of anxiety. This suggests that a diet rich in vitamin C may be an effective adjunct to medical and psychological treatment of anxiety and improve academic performance.

Key words: Vitamin C, anxiety, high school students, oxidative stress, beck anxiety inventory

INTRODUCTION

Vitamin C (ascorbic acid) is an antioxidant involved in anxiety, memory, fatigue and mood state studies. Some animals, including humans, cannot synthesize ascorbic acid due to lacking the enzyme, L-glulonolactone oxidase (Naidu, 2003). Many studies have shown that vitamin C is related to anxious behavior and psychology triggered by stressful situations. Treatment for 14 days with high doses of vitamin C (1.000 mg three times per day) decreased blood pressure, lowered cortisol and reduced subjective responses associated with acute psychological stress (Brody *et al.*, 2002). Vitamin C plasma concentration levels have been found to be inversely associated with systolic and diastolic blood pressure in cross-sectional studies (Ness *et al.*, 1997; Bates *et al.*, 1998). Mazloom *et al.* (2013) evaluated the effects of two

antioxidants (vitamins C and E) on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients. The vitamin C group showed a significant decrease in anxiety scores compared with vitamin E and placebo, however, no significant differences were found between groups for depression scores or stress.

More recently, another clinical study conducted by Aburawi *et al.* (2014) investigated the effect of vitamin C as a treatment for depression and its associated action with antidepressants, such as paroxetine, fluoxetine, clomipramine, fluvoxamine and the combination of olanzapine and clomipramine. The authors concluded that the combination of vitamin C with antidepressants resulted in a better therapeutic response for depression. Similarly, Amr *et al.* (2013) also demonstrated the efficacy of adding vitamin C to fluoxetine as an adjunct for treatment of major depressive disorder in pediatric

Corresponding Author: Ivaldo Jesus Lima de Oliveira, Campus Universitário Darcy Ribeiro (Asa Norte), em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, B, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil Tel: + 55 61 3536 7057 Fax: + 55 61 3307 2268

patients. Moreover, numerous studies of animal models of depression have shown the antidepressant effects of vitamin C (Binfare *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011, 2012a, b, 2013, 2014).

Vitamin C supplementation has yielded inconsistent results for the treatment of fatigue in humans. However, a clinical trial conducted by Suh *et al.* (2012) obtained positive results. Intravenous administration of vitamin C decreased fatigue in office workers at two hours and fatigue levels remained lower for one day. Workers in the experimental condition also exhibited higher plasma vitamin C levels and reduced oxidative stress compared to the placebo group. For workers in this study, vitamin C supplementation proved to be a safe and effective method to reduce fatigue. Furthermore, studies have indicated a high prevalence of hypovitaminosis C and D in acute-care hospitals. Administering Vitamin C improves mood and reduces distress in hospitalized patients (Evans-Olders *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011).

Anxiety is a response to a threat that is unknown, vague or internal which can alter physiological signals (Gautam *et al.*, 2012). Therefore, anxiety typically serves an adaptive function and prepares an individual for potential danger, alerting a person to be prepared to an imminent threat (Gautam *et al.*, 2012; Weinberger, 2001). However, when the anxiety is extremely high and persistent, it can become pathological and meet criteria for disorder (Weinberger, 2001). For many individuals, anxiety is also associated with secondary problems, such as a lack of self-confidence or for students, academic difficulties (Guney *et al.*, 2014). Moreover, for students, other symptoms may be expressed in the classroom and contribute to low academic performance, such as: panic, fear of failing examinations, feeling nervous and incapable of accomplishing tasks and racing heartbeat (Vitasari *et al.*, 2011). High levels of anxiety can impair working memory and increase distractibility in students (Aronen *et al.*, 2005; Cassady and Johnson, 2002). Other research has shown that students with increased anxiety levels during their end-of-semester examinations tend to obtain lower marks (Hamzah, 2007). Anxiety was the main predictor of academic performance among students (McCraty, 2007) and increasing anxiety levels can be associated with lower academic performance (Mazzone *et al.*, 2007; Sena *et al.*, 2007).

Oxidative stress can contribute to the pathophysiology of anxiety disorders (Guney *et al.*, 2014; Ranjana *et al.*, 2012). Present demonstrated that there are associations between total oxidant/antioxidant levels and anxiety disorders in children and adolescents (Guney *et al.*, 2014). This suggests that oxidative stress may be harmful in children and adolescents with anxiety disorders. In this sense, the high oxygen consumption that occurs in the brain and its lipid-rich constitution

(Halliwell, 2006; Ng *et al.*, 2008) may contribute to oxidative stress and this can promote or trigger psychiatric disorders (Bouayed *et al.*, 2009; Hovatta *et al.*, 2010). Among other factors such as genetics, neurochemistry, neurobiology and psychology, oxidative stress may be an important factor for the etiopathogenesis of anxiety disorders (Guney *et al.*, 2014). Other studies have also found a link between oxidative stress and Obsessive-Compulsive Disorder (OCD) and Panic Disorder (PD), further indicating that oxidative metabolism can affect the regulation of anxiety (Kuloglu *et al.*, 2002a, b). To combat such neurochemical changes, biological systems are equipped with antioxidant defenses. Therefore, antioxidant supplementation may play an important therapeutic role to combat oxidative stress in individuals that suffer from anxiety (Gautam *et al.*, 2012). The aim of this study was to assess whether an important antioxidant like vitamin C exerts an anxiolytic-like effect in high school students. Anxiety levels of the students were evaluated by a validated instrument known as the Beck Anxiety Inventory which allowed to investigate the potential therapeutic role of vitamin C on anxiety-related human cognitive behavior.

MATERIALS AND METHODS

Participants: High school students of both sexes from Ceilândia, Distrito Federal, Brazil were invited to participate in this study. All participants were told the details of the study and signed forms indicating their informed consent. The experimental protocol and assessments of anxiety are in accordance with the Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guide and had been approved by the Ethics Committee on Human Research, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, under the number, 022/12.

Inclusion and exclusion criteria: All students in good physical health were included. There was no history of smoking among participants. Students were excluded if they were pregnant, regularly taking vitamin C supplements or prescription drugs, regularly taking restricted medications (psychiatric patients), or if they had a history of illness including: psychiatric conditions, diabetes, hypertension, heart problems, lung, predisposition to kidney disease, as well as conditions related to malnutrition: rickets, low body weight for their age and mental problems.

Experimental procedures: Forty-two students were recruited and randomly assigned (n = 21 for each group) to receive either vitamin C or placebo. There were no drop outs. Participants took either placebo capsules or 500 mg vitamin C supplement capsules every day for 14 days. Only the nutritionist responsible for monitoring and

distribution of capsules was, aware of the capsules' composition. Students were evaluated by a multidisciplinary team with expertise in biochemistry, nutrition, psychology and neuroscience. The team conducted interviews with all students. Students were informed of the purpose and procedures of the trial. The first day of the experiment began at 8:00 AM with the reception of students in the laboratory, where they received a kit from a nutritionist containing either placebo or vitamin C capsules. Vitamin C and placebo capsules were obtained from Pharmacy Medicines, Brasilia, Distrito Federal, Brazil (Pharmacotechniques). Placebo capsules were identical in appearance to vitamin C capsules (both in green and white colors). Next, students' systolic and diastolic blood pressure and heart rate were measured and blood samples were collected (5 mL). All students had been informed that the collection of blood samples required eight hours of fasting and that blood collection would start at 9:00 AM. The procedures were conducted by the staff of the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF), using recommendations from the State Department of Health of the Federal District, Brazil. Blood collection ended at 10:00 AM and all samples were prepared to be forwarded to LACEN-DF for analysis. After blood collection, the students and the team were offered breakfast. Students were then assessed by the team psychologist in a random order with the BAI, a neuropsychological test of anxiety. These tests on day 1 constituted the baseline measures. These experimental procedures were repeated on 15 day (post-treatment), following the supplementation.

Blood pressure measurements: Before the blood samples were collected, students' systolic and diastolic blood pressure and heart rate were recorded with an automatic self-inflating portable sphygmomanometer (Powerpack MS-918). The procedure was repeated on 15th day (post-treatment).

Blood sample and laboratory procedures: Plasma ascorbic acid concentration was initially based on the oxidation of ascorbic acid by diketogulonic and dehydroascorbic acids. These products react with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form 2,4-dinitrophenylhydrazone. This compound, after reacting with sulfuric acid (H_2SO_4), forms a product with an absorption band that can be measured at 520 nm. In this study, the ascorbic acid concentration in plasma was assessed following the protocol proposed by Bessey (1960) with methodology similar to previous studies (Marim *et al.*, 2012; Garlipp-Picchi *et al.*, 2013). Venous blood samples (5 mL) were collected from all students with use of hypodermic needle. A 100 mL solution containing 2,4-dinitrophenylhydrazine (2%), thiourea (5%) and copper sulfate (0.6%), DTC was prepared. Immediately

following this, a 0.4 mL sample (serum) was removed and added to 1.6 mL of 5% Trichloroacetic Acid (TCA) mix for 30 sec and centrifuged at 2,500 rpm for 10 min. Then, 0.2 mL of DTC reagent was added to 0.6 mL of supernatant and the solution was subsequently shaken for 30 sec. This procedure was performed in triplicate. In order to complete the standard solution, 1 mL of 65% H_2SO_4 was added and the samples were shaken for 30 sec. After 30 min, in protection from light, the reading was taken in a spectrophotometer (SpectraMax M5, Molecular Devices) at 520 nm. The ascorbic acid concentration in the plasma was calculated using a calibration curve.

Anxiety behavior test: The Beck Anxiety Inventory (BAI) was designed by Beck, Brown, Steer and Epstein in 1986 (Beck *et al.*, 1988; Cunha, 2001). Twenty-one items were designed to reflect the somatic, affective and cognitive symptoms characteristic of anxiety. This inventory was built to avoid confusion with depression symptoms. Scores between 8 and 15 are interpreted as mild anxiety, between 16 and 25 as moderate anxiety and between 25 and 63 as severe anxiety.

Statistical analysis: The program software Graph Pad Prism was used for building figures for this experiment. Statistical analyses were conducted using IBM SPSS version 20.0 for Windows (IBM Corp. NY, USA). Data are expressed as Means±Standard Deviation (SD). To assess the normality of the variable distributions, Kolmogorov-Smirnov tests was conducted. When results were normally distributed, differences between groups were assessed using parametric Student's t-tests. When the results were not normally distributed, non-parametric Wilcoxon signed-rank tests and Mann-Whitney U test were used. Categorical variables were analyzed using Chi-square tests. Significance levels were set at $p < 0.05$.

RESULTS

The demographic characteristics of the students are summarized in Table 1. The mean age of the vitamin C group was 30.43 ± 14.35 years and the mean age of the placebo control group was 24.24 ± 11.07 years. A student's t-test indicated that there was no difference between the vitamin C group compared the placebo control group ($p = 0.125$). There was no difference across gender

Table 1: Demographic characteristics of the study participants⁽¹⁾ group (n = 21)

Characteristics	Vitamin C	Placebo control	p-value
Age (years)	30.43±14.35	24.24±11.07	0.125 ⁽²⁾
Sex N (female/male)	21 (16/5)	21 (16/5)	1.000 ⁽³⁾
Height (m)	1.62±0.09	1.63±0.09	0.930 ⁽⁴⁾
Weight (kg)	61.43±14.46	59.00±11.59	0.624 ⁽⁴⁾
BMI ($kg\ m^{-2}$)	23.32±4.77	22.27±3.76	0.513 ⁽⁴⁾

N: No. of participants, BMI: Body Mass Index, ¹All values are Means±SDS, ²Student's t-test, ³Chi-square test and ⁴Mann-Whitney U test

($p = 1.000$). Assessments of height, weight and Body Mass Index (BMI) revealed no significant differences between the vitamin C compared the placebo; in short, the two groups no differ from one another regarding the descriptive characteristics.

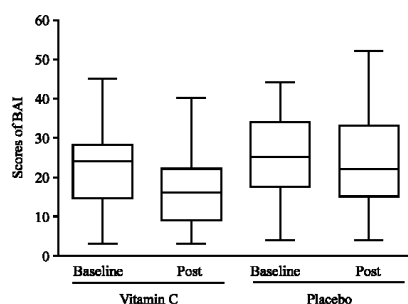


Fig. 1: Effects of vitamin C or placebo on anxiety assessed by BAI, Box plots of student anxiety scores in the vitamin C ($n = 21$) and placebo ($n = 21$) groups. Baseline and post-treatment anxiety assessed by BAI in both groups. ($p = 0.010$) were calculated by using Wilcoxon's signed-rank test. Post, refers to after the 14-day treatment

The mean scores of anxiety, plasma vitamin C concentration, systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate are shown in Table 2, both at baseline and after experimental intervention (post-treatment). A Wilcoxon signed-rank test revealed that there was a significant decrease among vitamin C group post-treatment in comparison to baseline treatment ($p = 0.010$). As shown in Fig. 1, anxiety scores after the intervention were significantly lower for the vitamin C than the placebo control group ($p = 0.010$), indicating that oral vitamin C supplements improved the anxiety levels of students. Plasma vitamin C concentration was greater in the vitamin C group than the placebo group following the intervention period ($p = 0.001$). Likewise, there was a significant difference in the mean heart rate of the vitamin C group compared to placebo control group ($p = 0.032$). However, there was no significant difference between the groups vitamin C and placebo either pre- or post-treatment in mean systolic blood pressure ($p = 0.933$) and diastolic blood pressure ($p = 0.698$). These results suggest that the experimental vitamin C group had better physiological response compared with placebo control group, only on the mean heart rate, indicate that vitamin C improved this parameter that is involved with anxiety symptoms.

Additionally, in terms of nutrition students were assessed using dietary recall data are available in Table 3. In general, students were considered euthrophic. There

Table 2: Anxiety scores baseline and post-treatment either vitamin C supplementation or placebo, biochemical and physiological parameters or profiles⁽¹⁾

Variables	Vitamin C group ($n = 21$)		Placebo control group ($n = 21$)		p-value ⁽²⁾
	Baseline	Post	Baseline	Post	
BAI scores	22.33±10.35	16.86±10.19	25.43±10.56	24.95±13.11	0.010
PCVC (mg dL ⁻¹)	1.09±0.52	1.85±0.46	1.19±0.38	1.31±0.53	0.001
SBP (mm Hg)	121.70±23.84	119.00±13.16	114.30±11.85	114.20±9.41	0.933
DBP (mm Hg)	76.10±13.03	75.70±8.49	73.20±10.57	72.00±9.50	0.698
HR (bpm)	79.20±11.98	74.70±9.36	81.50±13.85	81.00±12.90	0.032

BAI: Beck anxiety inventory, PCVC: Plasma concentrations of vitamin C, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, HR: Heart rate, Post, refers to after the 14-day treatment, ⁽¹⁾All values are Means±SDS, ⁽²⁾Wilcoxon signed-rank test

Table 3: Dietary recall from the students⁽¹⁾

Variables	Vitamin C ($n = 21$)		Placebo ($n = 21$)		Total ($n = 42$)		p ⁽²⁾
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Name of meals							
Breakfast	15	19.23	19	21.83	34	20.60	0.569
Morning snack	11	14.10	7	8.04	18	10.90	
Lunch	18	23.07	20	22.98	38	23.03	
Afternoon snack	16	20.51	14	16.09	30	18.18	
Dinner	15	19.23	19	21.83	34	20.60	
Supper	3	3.84	8	9.19	11	6.67	
Subtotal	78	100.00	87	100.00	165	100.00	
Food							
Salads	16	57.14	19	65.51	35	61.40	
Fruits	7	25.00	6	20.68	13	22.80	
Greens	5	17.85	4	13.79	9	15.78	
Sub total	28	100.00	29	100.00	57	100.00	0.807
Beverages							
Soft drinks	10	71.42	15	75.00	25	73.52	
Juices	4	28.57	5	25.00	9	26.47	0.816
Total	120	100.00	136	100.00	256	100.00	

⁽¹⁾All values are expressed as averages. N: No. of participants, %: Frequency, ⁽²⁾Chi-square test

was no difference between the groups vitamin C and placebo on the meals ($p = 0.569$); food ($p = 0.807$) and beverages ($p = 0.816$), indicating that the groups are homogeneous in relation the nutritional aspects.

DISCUSSION

The present study evaluated the effects of oral vitamin C supplementation on anxiety in high school students. Vitamin C showed an anxiolytic-like effect, as indicated by the reduction of BAI anxiety scores. In addition, vitamin C also decreased heart rate compared to placebo. These results are in agreement with a previous study that investigated the effects of six weeks of vitamin C (1.000 mg per day) and vitamin E (400 IU per day) supplementation on anxiety levels, depression and stress, in type-2 diabetic patients. The results of this study showed that vitamin C significantly reduced anxiety scores compared to vitamin E and placebo. In contrast, vitamin E significantly increased anxiety scores. Similarly, this study found that vitamin C significantly decreased stress levels compared to the placebo group. In this sense, vitamin C had improved anxiety levels in diabetic patients by reducing oxidative damage in the brain which had been causing nervous system impairment (Mazloom *et al.*, 2013).

The data found from this search are convergent in another study that examined the effect of an intervention designed to reduce anxiety and improve academic performance in engineering students (Vitasari *et al.*, 2011). This study used breaths per-minute (bpm) to measure anxiety. Each student received six two-hour-long sessions of treatment consisting in breathing retreatment, relaxation and in studying coping skills. The results indicated that all participants had reduced anxiety and probably as a consequence, improved academic performance. This style of intervention, therefore, was considered an effective approach to reducing anxiety among students. Taken together these results suggest that oral vitamin C supplementation can reduce levels of anxiety among high school students and may improve academic performance. Likewise, vitamin C may be a possible adjunct treatment for anxiety.

Anxiety and depression are common, stress-induced, psychiatric disorders (Gautam *et al.*, 2012). Deficiencies of vitamin C can trigger depressive symptoms. Low levels of ascorbic acid have been associated with depressive symptoms and higher mortality rates in older people (Hamer *et al.*, 2011). Additionally, Amr *et al.* (2013) demonstrated that vitamin C improved the efficiency of fluoxetine to treat depression and, given the lack of substantial adverse effects in a pediatric patients

diagnosed with major depressive disorder, can be considered an attractive therapeutic adjuvant. The authors highlighted the need for more large-scale clinical trials to assess the therapeutic efficacy of vitamin C for the treatment of depression and its action as adjuvant treatment associate to antidepressant medications (Amr *et al.*, 2013). Epidemiological studies have shown that early-onset anxiety disorders can contribute as triggers for development of depression and other mood disorders arising later in life (Beesdo *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2013). Likewise, anxiety disorders and mood disorders are associated with pathogenic mechanisms involved with the oxidative pathway (Guney *et al.*, 2014). For these authors vitamin C supplementation can act as an antioxidant leading to biochemical and behavioral changes, reducing anxiety, similarly in mechanism to its effects on depressive symptoms, fatigue and mood state. Thus, data collected here support these hypotheses.

In terms of nutrition, there is an additional demand on the body in a condition of stress, such as increase in adrenal production and mobilization of vitamins and minerals that accelerate metabolism of carbohydrates, proteins and fats, occurring production of energy to normalize stress situation (Gautam *et al.*, 2012). There are abnormalities that can alter the function of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis which is involved with stress responses and anxiety disorder and implicated in emotional response (Masood *et al.*, 2008; Mathew *et al.*, 2008). For example, chronic stress exposure has been shown to trigger oxidative damage, activating the HPA axis (Aschbacher *et al.*, 2013). Another study found that high anxiety levels significantly increase oxidative stress (Rammal *et al.*, 2008). Moreover, oxidative stress is an excessive production of free radicals and failure of the antioxidant defense mechanism (McCord, 1993). The deficit of antioxidants can decrease the protection against Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) which are highly reactive and toxic causing damage to proteins, lipids, carbohydrates, DNA and mitochondria (Maes *et al.*, 2011; Sindhi *et al.*, 2013). Antioxidants neutralize the effects of ROS and exert action preventing several diseases (Sindhi *et al.*, 2013). These authors suggests that the supplementation of antioxidant compounds may be a new strategy for prevention or reduction of anxiety levels but also that individuals with anxiety disorders may be deficient in antioxidants, with indications of increased oxidative stress.

The results of this study showed that after the intervention, the vitamin C group had a decreased heart rate compared to the placebo group. The neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) is involved in cardiovascular

regulation. Intracerebroventricular administration of GABA agonists decreases arterial blood pressure and heart rate and vitamin C stimulates 3H-GABA binding (Grigor'ev and Neokesariiskii, 1986). Another study found an increase in blood pressure and heart rate after microinjection of glutamate into the paraventricular nucleus. The N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5) blocked these responses (Li *et al.*, 2006). In contrast, a high level of traumatic anxiety indicated by elevated heart rate triggers increase catecholamine release (Aburawi *et al.*, 2014). Ascorbic acid can modulate catecholaminergic activity and decrease stress reactions (Aburawi *et al.*, 2014). This hypothesis is based on several findings. Ascorbic acid has been described as a regulating factor of Na^+/K^+ -ATPase through the modulation of catecholamines. It also acts on neurotransmitter turnover in the central nervous system (Wiglusz *et al.*, 1983), demonstrated by a study in which OCD was treated with vitamin C (Jorm *et al.*, 2004). Likewise, Vitamin C may reduce anxiety and relieve stress either by stimulated GABA binding and block NMDA-gated channel function (Rebec and Pierce, 1994), or act through activation of dopaminergic and glutamatergic systems (Aburawi *et al.*, 2014). Reduced anxiety levels can be associated with decreased heart rates which are indicative of decreased catecholamine release. As previously suggested ascorbic acid can modulate catecholaminergic activity and consequently may be responsible for this lowered heart rate found in our study.

Bruno *et al.* (2012) investigated the effect of acute vitamin C administration on muscle sympathetic activity and cardiac sympathovagal balance in hypertensive patients, vitamin C was able to reduce cardiovascular adrenergic drive in hypertensive patients which indicates that oxidative stress may contribute to sympathetic activation in hypertension. Therefore, this study suggests that antioxidants may be able to restore vagal control of heart rate. Additionally, high-doses of vitamin C have been shown to reduce systolic and diastolic blood pressure, subjective stress and anxious responses to an acute interpersonal psychological stressor and, following the stress, vitamin C promoted faster recovery of salivary cortisol (Brody *et al.*, 2002). However, the results of current study do not suggest any significant differences in blood pressure (systolic and diastolic) between the vitamin C group and the placebo group, although the participants in this study had no history of hypertension. Vitamin C significantly lowered blood pressure in hypertensive patients but not in normotensive individuals (Bruno *et al.*, 2012) which were similar to the results found

in the present study, since that vitamin C was administered to normotensive high school students.

In addition the data presented here are in accordance with the results found by Brody *et al.* (2002) which showed that plasma vitamin C levels increased significantly for the vitamin C group (from a means of 1.55-2.65 mg dL⁻¹) but not placebo group (from a mean of 1.36-1.40 mg dL⁻¹). Moreover, treatment with vitamin C increased blood plasma levels of vitamin C, suggesting that vitamin C deficiency is involved with psychological abnormalities (Chang *et al.*, 2007; Kinsman and Hood, 1971). Additionally, another study found that there is an increase in plasma vitamin C concentration by about 50% after vitamin C supplementation at a dose of 500 mg day⁻¹ for eight weeks (Khassaf *et al.*, 2003) and also the average half-life of vitamin C in an adult is about 10-20 days (Naidu, 2003). Thus, these results are similar to the current study (Table 2).

In future research, further study should be done to evaluate changes in serum oxidative stress parameters in patients with anxiety or other neuropsychiatric disorders and investigate the relationship between vitamin C supplementation, oxidative stress and antioxidants in the treatment of these conditions. The supplemental intake of nutrients such as vitamin C is likely to have an impact on eating habits for prolonged periods, with the intensity of the effect being modulated by the frequency and different degrees of promoting health, mood and well-being, as well as controlling anxiety levels of individuals differentially.

CONCLUSION

This study not only adds to the evidence that vitamin C plays an important therapeutic role on anxiety but also points to the possible use of antioxidants in the prevention and reduction of anxiety levels. The authors recommend the implementation of nutritional programs in high schools that include healthy foods rich in micronutrients such as the antioxidant, vitamin C. It is also recommend the use of vitamin C as an adjunct treatment for anxiety and for improving academic performance among students. In conclusion, this study suggests that a diet rich in vitamin C can help to reduce anxiety levels and possibly increase academic performance among anxious students.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the psychologists and nutritionists. The authors would also like to thank all the staff of LACEN-DF, for their multidisciplinary work in this research.

REFERENCES

- Aburawi, S.M., F.A. Ghambirlou, A.A. Attumi, R.A. Altubuly and A.A. Kara, 2014. Effect of ascorbic acid on mental depression drug therapy: Clinical study. *J. Psychol. Psychother.*, Vol. 4.
- Amr, M., A. El-Mogy, T. Shams, K. Vieira and S.E. Lakhan, 2013. Efficacy of vitamin C as an adjunct to fluoxetine therapy in pediatric major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutr. J.*, Vol. 12. 10.1186/1475-2891-12-31
- Aronen, E.T., V. Vuontela, M.R. Steenari, J. Salmi and S. Carlson, 2005. Working memory, psychiatric symptoms and academic performance at school. *Neurobiol. Learn. Memory*, 83: 33-42.
- Aschbacher, K., A. O'Donovan, O.M. Wolkowitz, F.S. Dhabhar, Y. Su and E. Epel, 2013. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, 38: 1698-1708.
- Bates, C.J., C.M. Walmsley, A. Prentice and S. Finch, 1998. Does vitamin C reduce blood pressure? Results of a large study of people aged 65 or older. *J. Hypertens.*, 16: 925-932.
- Beck, A.T., N. Epstein, G. Brown and R.A. Steer, 1988. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. *J. Consult. Clin. Psychol.*, 56: 893-897.
- Beesdo, K., A. Bitner, D.S. Pine, M.B. Stein, M. Hofler, R. Lieb and H.U. Wittchen, 2007. Incidence of social anxiety disorder and the consistent risk for secondary depression in the first three decades of life. *Arch. Gen. Psychiatry*, 64: 903-912.
- Bessey, O.A., 1960. Ascorbic Acid: Microchemical Methods. In: *Vitamin Methods*, Wright, L.D., H.R. Skeggs and P. Gybrgy (Eds.). Academic Press, New York, pp: 303.
- Binfare, R.W., A.O. Rosa, K.R. Lobato, A.R.S. Santos and A.L.S. Rodrigues, 2009. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: Evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33: 530-540.
- Bouayed, J., H. Rammal and R. Soulimani, 2009. Oxidative stress and anxiety: Relationship and cellular pathways. *Oxidat. Med. Cell. Longev.*, 2: 63-67.
- Brody, S., R. Preut, K. Schommer and T.H. Schurmeyer, 2002. A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol and subjective responses to psychological stress. *Psychopharmacol.*, 159: 319-324.
- Bruno, R.M., E. Daghini, L. Ghiadoni, I. Sudano and I. Rugani *et al.*, 2012. Effect of acute administration of vitamin C on muscle sympathetic activity, cardiac sympathovagal balance and baroreflex sensitivity in hypertensive patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96: 302-308.
- Cassady, J.C. and R.E. Johnson, 2002. Cognitive test anxiety and academic performance. *Contemp. Educ. Psychol.*, 27: 270-295.
- Chang, C.W., M.J. Chen, T.E. Wang, W.H. Chang, C.C. Lin and C.Y. Liu, 2007. Scurvy in a patient with depression. *Dig. Dis. Sci.*, 52: 1259-1261.
- Cunha, J.A., 2001. [Beck Scale Manual Portuguese Version: Translation and Adaptation]. Casa do Psicologo, Sao Paulo, Brazil, (In Portuguese).
- Duffy, A., J. Horrocks, S. Doucette, C. Keown-Stoneman, S. McCloskey and P. Grof, 2013. Childhood anxiety: An early predictor of mood disorders in offspring of bipolar parents. *J. Affect. Disorders*, 150: 363-369.
- Evans-Olders, R., S. Eintracht and L.J. Hoffer, 2010. Metabolic origin of hypovitaminosis C in acutely hospitalized patients. *Nutrition*, 26: 1070-1074.
- Garlipp-Picchi, M., R. Deminice, P.P. Ovidio and A.A. Jordao, 2013. Effects of ascorbic acid on oxidative stress biomarkers of elite swimmers. *Revista Brasileira Medicina Esporte*, 19: 394-398.
- Gautam, M., M. Agrawal, M. Gautam, P. Sharma, A.S. Gautam and S. Gautam, 2012. Role of antioxidants in generalised anxiety disorder and depression. *Indian J. Psychiatry*, 54: 244-247.
- Grigor'ev, I.P. and A.A. Neokesariiskii, 1986. [Effect of ascorbic acid on the binding of 3H-GABA and 3H-glutamic acid to synaptosomes of the rat cerebral cortex]. *Biulleten Eksperimental'noi Biologii Meditsiny*, 102: 288-289, (In Russian).
- Guney, E., M.F. Ceylan, A. Tektas, M. Alisik and M. Ergin *et al.*, 2014. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *J. Affect. Disorders*, 156: 62-66.
- Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J. Neurochem.*, 97: 1634-1658.
- Hamer, M., C.J. Bates and G.D. Mishra, 2011. Depression, physical function and risk of mortality: National diet and nutrition survey in adults older than 65 years. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, 19: 72-78.
- Hamzah, M.H., 2007. Language anxiety among first year Malay students of the international Islamic college: An investigation of 12 skills, sources of anxiety and L2 performance. Master's Thesis, International Islamic University of Malaysia, Malaysia.
- Hovatta, I., J. Juhila and J. Donner, 2010. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. *Neurosci. Res.*, 68: 261-275.

- Jorm, A.F., H. Christensen, K.M. Griffiths, R.A. Parslow, B. Rodgers and K.A. Blewitt, 2004. Effectiveness of complementary and self-help treatments for anxiety disorders. *Med. J. Aust.*, 181: S29-S46.
- Khassaf, M., A. McArdle, C. Esanu, A. Vasilaki and F. McArdle *et al.*, 2003. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J. Physiol.*, 549: 645-652.
- Kinsman, R.A. and J. Hood, 1971. Some behavioral effects of ascorbic acid deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24: 455-464.
- Kuloglu, M., M. Atmaca, E. Tezcan, O. Gecici, H. Tunckol and B. Ustundag, 2002a. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology*, 46: 27-32.
- Kuloglu, M., M. Atmaca, E. Tezcan, B. Ustundag and S. Bulut, 2002b. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology*, 46: 186-189.
- Li, Y.F., K.L. Jackson, J.E. Stern, B. Rabeler and K.P. Patel, 2006. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291: H2847-H2856.
- Maes, M., P. Galecki, Y.S. Chang and M. Berk, 2011. A review on the Oxidative and Nitrosative Stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35: 676-692.
- Marim, R.G., A.S.D. Gusmao, R.E.P. Castanho, R. Deminice and A.L.S. Therezo *et al.*, 2012. Effects of vitamin C supplementation on acute phase Chagas disease in experimentally infected mice with *Trypanosoma cruzi* QM1 strain. *Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo*, 54: 319-323.
- Masood, A., A. Nadeem, S.J. Mustafa and J.M. O'Donnell, 2008. Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, 326: 369-379.
- Mathew, S.J., R.B. Price and D.S. Charney, 2008. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: Implications for novel therapeutics. *Am. J. Med. Genet. Part C: Semin. Med. Genet.*, 148C: 89-98.
- Mazloom, Z., M. Ekramzadeh and N. Hejazi, 2013. Efficacy of supplementary vitamins C and E on anxiety, depression and stress in type 2 diabetic patients: A randomized, single-blind, placebo-controlled trial. *Pak. J. Biol. Sci.*, 16: 1597-1600.
- Mazzone, L., F. Ducci, M.C. Scoto, E. Passaniti, V.G. D'Arrigo and B. Vitiello, 2007. The role of anxiety symptoms in school performance in a community sample of children and adolescents. *BMC Public Health*, Vol. 7. 10.1186/1471-2458-7-347
- McCord, J.M., 1993. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem.*, 26: 351-357.
- McCraty, R., 2007. When anxiety causes your brain to jam, use your heart. Heart Math Research Center, Institute of Heart Math, Boulder Creek, CA., USA.
- Moretti, M., A.E.D. Freitas, J. Budni, S.C.P. Fernandes, G.D.O. Balen and A.L.S. Rodrigues, 2011. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav. Brain Res.*, 225: 328-333.
- Moretti, M., J. Budni, C.M. Ribeiro and A.L.S. Rodrigues, 2012a. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.*, 687: 21-27.
- Moretti, M., A. Colla, G. de Oliveira Balen, D.B. dos Santos and J. Budni *et al.*, 2012b. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J. Psychiatr. Res.*, 46: 331-340.
- Moretti, M., J. Budni, D.B. dos Santos, A. Antunes and J.F. Daufenbach *et al.*, 2013. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *J. Mol. Neurosci.*, 49: 68-79.
- Moretti, M., J. Budni, A.E. Freitas, P.B. Rosa and A.L.S. Rodrigues, 2014. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. *J. Psychiatr. Res.*, 48: 16-24.
- Naidu, A.K., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery: An overview. *Nutr. J.*, Vol. 2, 10.1186/1475-2891-2-7
- Ness, A.R., D. Chee and P. Elliott, 1997. Vitamin C and blood pressure: An overview. *J. Hum. Hypertens.*, 11: 343-350.
- Ng, F., M. Berk, O. Dean and A.I. Bush, 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 11: 851-876.
- Rammal, H., J. Bouayed, C. Younos and R. Soulimani, 2008. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 589: 173-175.

- Ranjana, S.K., R. Negi, D. Pande, S. Khanna and H.D. Khanna, 2012. Markers of oxidative stress in generalized anxiety psychiatric disorder: Therapeutic implications. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 8: 32-38.
- Rebec, G.V. and R.C. Pierce, 1994. A vitamin as neuromodulator: Ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog. Neurobiol.*, 43: 537-565.
- Sena, J.D.W., P.A. Lowe and S.W. Lee, 2007. Significant predictors of test anxiety among students with and without learning disabilities. *J. Learn. Disabil.*, 40: 360-376.
- Sindhi, V., V. Gupta, K. Sharma, S. Bhatnagar, R. Kumari and N. Dhaka, 2013. Potential applications of antioxidants: A review. *J. Pharm. Res.*, 7: 828-835.
- Suh, S.Y., W.K. Bae, H.Y. Ahn, S.E. Choi, G.C. Jung and C.H. Yeom, 2012. Intravenous Vitamin C administration reduces fatigue in office workers: A double-blind randomized controlled trial. *Nutr. J.*, Vol. 11 10.1186/1475-2891-11-7 .
- Vitasari, P., M.N.A. Wahab, T. Herawan, A. Othman and S.K. Sinnadurai, 2011. A pilot study of pre-post anxiety treatment to improve academic performance for engineering students. *Proc. Soc. Behav. Sci.*, 15: 3826-3830.
- Wang, Y., X.J. Liu, L. Robitaille, S. Eintracht, E. MacNamara and L.J. Hoffer, 2013. Effects of vitamin C and vitamin D administration on mood and distress in acutely hospitalized patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 98: 705-711.
- Weinberger, D.R., 2001. Anxiety at the frontier of molecular medicine. *New Engl. J. Med.*, 344: 1247-1249.
- Wiglusz, Z., A. Nasal, B. Damasiewicz and A. Radwanska, 1983. Possible role of ascorbic acid in catecholamines-stimulated $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -adenosine triphosphatase activity of the central nervous tissues. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 36: 313-321.
- Zhang, M., L. Robitaille, S. Eintracht and L.J. Hoffer, 2011. Vitamin C provision improves mood in acutely hospitalized patients. *Nutrition*, 27: 530-533.