



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Bacharelado em Farmácia

Tainara de Menezes Moura

**Agmatina como um potenciador dos efeitos antidepressivos produzidos pela
cetamina: efeitos comportamentais e neuroquímicos**

Florianópolis
2018

Tainara de Menezes Moura

**Agmatina como um potenciador dos efeitos antidepressivos produzidos pela
cetamina: efeitos comportamentais e neuroquímicos**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito para a
conclusão do Curso de Graduação em
Farmácia.**

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientador:

Dr^a. Andiara Espíndola de Freitas

Florianópolis

2018

Resumo

A depressão maior é um sério problema de saúde pública que afeta aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o mundo. A farmacologia atual disponível para o tratamento da depressão maior, apesar de amplamente utilizada, possui várias limitações. A cetamina é um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA que produz efeitos antidepressivos rápidos e persistentes mesmo em pacientes resistentes ao tratamento convencional. Apesar de a cetamina produzir efeitos robustos, seu uso clínico é limitado devido ao fato de produzir efeitos adversos dissociativos causando dependência química. A agmatina, por sua vez, tem surgido como um potencial adjuvante da terapia antidepressiva. É um neuromodulador endógeno cuja atividade antidepressiva tem sido demonstrada tanto em estudos pré-clínicos como clínicos sem causar efeitos adversos severos. Neste sentido, no presente estudo foi avaliado: a) o efeito do tratamento de camundongos com doses crescentes de agmatina (0,01-1 mg/kg, p.o.) no teste preditivo de atividade antidepressiva, teste da suspensão pela cauda (TSC) e teste do campo aberto (TCA); b) o efeito do tratamento de camundongos com doses crescentes de cetamina (0,1-10 mg/kg, i.p.) no TSC e TCA; e c) o efeito do tratamento combinado com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) no TSC e TCA após 1 hora, 24 horas, 7 dias ou 14 dias de tratamento, bem como os mecanismos bioquímicos envolvidos. Os resultados mostraram que a administração de agmatina (0,1 e 1 mg/kg, p.o.) produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem causar nenhuma alteração locomotora no TCA. O tratamento dos animais com cetamina (1 e 10 mg/kg, i.p.) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC sem causar nenhum prejuízo locomotor no TCA. O tratamento combinado com doses sub-efetivas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) produziu um efeito tipo-antidepressivo específico no TSC após 1 hora, 24 horas ou 7 dias de tratamento. O tratamento sinérgico por 24 horas foi capaz de produzir um aumento significativo na fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) no córtex pré-frontal. A coadministração de agmatina e cetamina por 1 hora ou 24 horas foi capaz de aumentar a fosforilação de p70S6K (Thr³⁸⁹) no córtex pré-frontal. O tratamento sinérgico por 1 hora, 24 horas ou 7 dias com agmatina e cetamina aumentou significativamente o imunoconteúdo de PSD95 no córtex pré-frontal. Adicionalmente, a coadministração de agmatina e cetamina não causou nenhum efeito sobre a fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹) ou imunoconteúdo de β -catenina no córtex pré-frontal em nenhum tempo avaliado. Este conjunto de dados sugere que o efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pelo tratamento com agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) é mediado, pelo menos em parte, pela ativação da via mTOR e produção de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal.

Palavras-chave: agmatina, cetamina, depressão maior, mTOR, Wnt/ β -catenina.

Abstract

Major depressive disorder is a serious public health problem that affects approximately 350 millions of people around the world. The current pharmacology available for the treatment of major depressive disorder, although widely used, has several limitations. Ketamine is a glutamate NMDA receptor antagonist which produces rapid and persistent antidepressant effects even in patients resistant to the conventional treatment. Although ketamine produces robust effects, its clinical use is limited due to its dissociative side effects. Agmatine, in turn, has emerged as a potential adjuvant/monotherapy antidepressant. It is an endogenous neuromodulator whose antidepressant activity has been demonstrated in both preclinical and clinical studies without causing severe side effects and chemical dependence. Therefore, in the present study it was evaluated: a) the effect of the treatment of mice with increasing doses of agmatine (0.01-1 mg/kg, po) in the predictive test of antidepressant activity, tail suspension test (TST), and open field test (OFT); b) the effect of the treatment of mice with increasing doses of ketamine (0.1-10 mg / kg, i.p.) in the TST and OFT; and c) the effect of the combined treatment with sub-active doses of agmatine (0.01 mg / kg, po) and ketamine (0.1 mg / kg, ip) in the TST and OFT after 1 hour, 24 hours, 7 days or 14 days of treatment, as well as the biochemical mechanisms involved in such effects. The results showed that administration of agmatine (0.1 and 1 mg / kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect in the TST, without causing any locomotor alteration in the OFT. The treatment of animals with ketamine (1 and 10 mg / kg, i.p.) was able to decrease the immobility-time in the TST without causing any locomotor impairment in the OFT. The combined treatment with sub-effective doses of agmatine (0.01 mg / kg, po) and ketamine (0.1 mg / kg, ip) produced a specific antidepressant-like effect in the TST after 1 hour, 24 hours or 7 days of treatment. The synergistic treatment for 24 hours was able to produce a significant increase in Akt (Ser⁴⁷³) phosphorylation in the prefrontal cortex. The coadministration of agmatine and ketamine for 1 hour or 24 hours was able to increase the phosphorylation of p70S6K (Thr³⁸⁹) in the prefrontal cortex. The synergistic treatment for 1 hour, 24 hours or 7 days with agmatine and ketamine significantly increased the immunoccontent of PSD95 in the prefrontal cortex. In addition, the coadministration of agmatine and ketamine had no effect on GSK-3 β (Ser⁹) phosphorylation or β -catenin immunoccontent in the prefrontal cortex at any time evaluated. This set of data suggests that the synergistic antidepressant-like effect produced by the treatment with agmatine (0.01 mg / kg, po) and ketamine (0.1 mg / kg, ip) is mediated, at least in part, by the activation of mTOR pathway and production of synaptic proteins in the prefrontal cortex.

Key words: agmatine, ketamine, major depression, mTOR, Wnt/ β -catenin.

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração esquemática das vias de sinalização subjacentes aos efeitos antidepressivos da agmatina.

Figura 2: Curva dose-reposta da agmatina

Figura 3: Curva dose-reposta da cetamina

Figura 4: Efeito do tratamento sinérgico com doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 1 hora de tratamento

Figura 5: Efeito do tratamento sinérgico com doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 24 horas de tratamento

Figura 6: Efeito do tratamento sinérgico com doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 7 dias de tratamento

Figura 7: Efeito do tratamento sinérgico com doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 14 dias de tratamento

Figura 8: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

Figura 9: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

Figura 10: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

Figura 11: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

Figura 12: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

Figura 13: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

Figura 14: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

Figura 15: Efeito do tratamento sinérgico com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

Figura 16: Ilustração esquemática da via de sinalização envolvida no efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela combinação de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em camundongos machos.

Lista de abreviaturas e siglas

- 5-HT_{2A}** - Receptor de serotonina do tipo 2A
- ADC** - Arginina descarboxilase
- AGM** - Agmatina
- Akt** - Proteína cinase
- AMPA** - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- AMPc** - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ANOVA** - Análise de variância
- APC** - Polipose adenomatosa coli
- BDNF** - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
- CREB** - Proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico
- DVL** - Disheveled
- ERK1/2** – Cinases reguladas por sinal extracelular 1/2
- GSK-3 β** - Glicogênio sintase cinase-3 β
- i.p.** - Intra-peritonal
- KET** - Cetamina
- LRP** - Proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade
- MEK** - Proteína cinase ativada por mitógeno
- MPP⁺** - 1-Metil-4-fenilpiridínio
- mTORc** - Alvo mamífero do complexo de rapamicina 1
- NDMAR** - Receptor N-metil-D-aspartato
- NOS** - Óxido nítrico sintase
- Nrf2** - Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
- p.o.** - per oral (via oral)
- PI3K** - Fosfatidilinositol 3-quinase
- PKA** - Proteína cinase A
- PKB** - Proteína cinase B
- PSD95** - Proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa
- TCA** - Teste do campo aberto
- TCF** - Fator de células T
- TrkB** - Receptor tropomiosina cinase B
- TSC** - Teste de suspensão pela cauda
- TSC1/2** - Complexo da esclerose tuberosa 1/2

Sumário

1. Introdução	10
1.1 Depressão maior: um sério problema de saúde pública	10
1.2 Homeostasia sináptica e a neurobiologia da depressão	11
1.3 Sinaptogênese e os efeitos antidepressivos rápidos da cetamina	13
1.4 Agmatina: um potencial adjuvante da terapia antidepressiva	15
2. Justificativa	18
3. Objetivo geral	19
4. Materiais e Métodos	20
4.1 Animais	20
4.2 Drogas e tratamentos	20
4.3 Avaliação comportamental	20
4.3.1 Potencial efeito antidepressivo sinérgico de agmatina e cetamina	20
4.3.2 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)	20
4.3.3 Teste do Campo Aberto	21
4.4 Avaliação dos mecanismos moleculares e bioquímicos	21
4.4.1. Western Blot	21
4.5. Análise Estatística	22
5. Resultados	23
5.1 Curva dose-resposta da agmatina	23
5.2 Curva dose-resposta da cetamina	23
5.3 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 1 hora de tratamento	24
5.4 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 24 horas de tratamento	25
5.5 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 7 dias de tratamento	25
5.6 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 14 dias de tratamento	26
5.7 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal	27
5.8 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a via de sinalização Wnt/β-catenina	28

5.9 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal	29
5.10 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a via de sinalização Wnt/β-catenina	30
5.11 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a fosforilação proteínas sinápticas no córtex pré-frontal	31
5.12 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a via de sinalização Wnt/β-catenina.....	32
5.13 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a fosforilação proteínas sinápticas no córtex pré-frontal	33
5.14 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a via de sinalização Wnt/β-catenina.....	34
6. Conclusão e Discussão.....	36
7. Referências Bibliográficas	38

1. Introdução

1.1 Depressão maior: um sério problema de saúde pública

A depressão maior (nomenclatura oficial e que, no presente estudo será denominada de depressão), é considerada uma das principais doenças psiquiátricas do mundo, afetando aproximadamente 350 milhões de pessoas de todas as idades (WHO, 2012a). Essa desordem representa um sério problema de saúde pública pelo fato de ter uma elevada taxa de mortalidade e morbidade. Além disso, é uma importante causa de incapacidade e de morte prematura, sendo o terceiro contribuidor para a carga global da doença – projetada para ser a principal no ano de 2030 (WHO, 2008). Os índices de suicídio são preocupantes, uma vez que aproximadamente 1 milhão de vidas são perdidas anualmente devido à depressão, o que traduz 3000 mortes por suicídio todos os dias (WHO, 2012b).

A depressão é uma desordem de natureza heterogênea e de etiologia diversa que não deve ser tratada apenas como uma doença crônica e recorrente, mas também como uma doença progressiva (Maletic *et al.*, 2007) cujos pacientes apresentam um perfil variado de sintomas, geralmente associados a outras condições psiquiátricas, incluindo ansiedade, distúrbios alimentares e dependência de fármacos (Rang *et al.*, 2012). Trata-se de uma doença de etiologia multifatorial, que resulta da combinação de fatores genéticos, bioquímicos e ambientais (Picchini *et al.*, 2004; Prince *et al.*, 2007; Tsankova *et al.*, 2007). A farmacoterapia atual disponível utilizada para o tratamento da depressão é geralmente segura e efetiva, porém está longe do ideal, uma vez que os antidepressivos atuais disponíveis proporcionam uma remissão completa dos sintomas para apenas 50% dos indivíduos (Nestler *et al.*, 2002; Berton e Nestler, 2006).

Em geral, os antidepressivos tardam algum tempo para iniciar os seus efeitos clínicos (cerca de 3 a 5 semanas após o início do tratamento) (Rang *et al.*, 2012), e podem causar efeitos colaterais severos e distintos, tais como insônia, alteração de peso, arritmia e alterações de libido (Demyttenaere, 1997; Brunello *et al.*, 2002; Morilak e Frazer, 2004; Serretti e Mandelli, 2010; Fava *et al.*, 2015). Diante deste contexto, há uma necessidade crescente de desenvolvimento de medicamentos antidepressivos melhores e mais eficazes, que apresentem um início de ação mais rápido, e que sejam eficazes em pacientes resistentes ao tratamento convencional, isto é, pacientes não responsivos a 2 tipos de antidepressivos de distintas classes (Zanos *et al.*, 2018).

1.2 Homeostasia sináptica e a neurobiologia da depressão

Estudos dos últimos 40 anos têm demonstrado que o principal fator ambiental que predispõe os indivíduos à depressão é o estresse crônico, uma vez que induz alterações de plasticidade sináptica em regiões límbicas que controlam o humor (Ota e Duman, 2013; Pena *et al.*, 2014). Vários estudos indicam que o estresse crônico está associado a alterações na liberação e transmissão glutamatérgica implicando modificações estruturais e funcionais em neurônios hipocampais (Musazzi *et al.*, 2011; Sanacora *et al.*, 2012). Indivíduos que sofrem de depressão apresentam elevados níveis corticais de glutamato, prejudicando as funções sinápticas, reduzindo a densidade, o número de ramificações dendríticas e a conectividade neuronal (Hardingham e Bading, 2010; Kang *et al.*, 2012).

Para que os receptores glutamatérgicos do sub-tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR) sejam ativados, as membranas neuronais também têm que expressar o receptor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA). O aumento da atividade neuronal conduz à ativação do receptor NMDA, que por sua vez, promove a síntese de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*). A ligação de BDNF ao seu receptor TrkB (do inglês "*tropomyosin-related kinase B*") facilita a expressão de AMPA que é responsável pela regulação da plasticidade neuronal (Maletic e Raison, 2009). Essas descobertas levaram à hipótese que a modulação de NMDAR poderia ser um alvo-chave para o desenvolvimento de antidepressivos de ação rápida, promovendo a formação de novas sinapses e revertendo os efeitos deletérios observados na depressão. O forte acoplamento entre a sinalização glutamatérgica e os mecanismos de plasticidade sináptica fornece uma estrutura para a compreensão das bases moleculares da ação terapêutica dos antidepressivos glutamatérgicos (Murrough *et al.*, 2017).

Através de estudos moleculares e celulares, verificou-se que os déficits sinápticos causados pelo estresse e observados na depressão estão associados à expressão reduzida de BDNF (Duman e Monteggia, 2006) e inibição da via de sinalização celular mediada pela proteína cinase mTORC1 (do inglês, *mammalian target of rapamycin complex 1*) cortical (Ota *et al.*, 2014). Estudos pré-clínicos mostraram que a inibição da via da mTORC1 e a redução dos níveis de BDNF induzem um comportamento tipo-depressivo e abolem o efeito de antidepressivos clássicos em modelos animais de depressão (Ota *et al.*, 2014). O tratamento com antidepressivos através da modulação inicial da concentração de monoaminas, ativação de cascatas de sinalização intracelular e expressão de genes-alvo, estimula

a sinalização mediada por BDNF-TrkB reduzindo a atrofia dos neurônios piramidais e restabelecendo a produção normal de novos neurônios, e contribuindo para a atividade antidepressiva (Duman, 2004; Mckinnon *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2018).

A demora do início da ação terapêutica dos antidepressivos envolvem muitos mecanismos adaptativos pré e pós-sinápticos evocados no cérebro, incluindo modulação na expressão ou sensibilidade de receptores, aumento da expressão de fatores neurotróficos e neurogênese, regulação de vias de sinalização, aumento da plasticidade sináptica e complexidade neuronal, na qual resultam remodelação dos circuitos cerebrais envolvidos nos efeitos terapêuticos (Artigas *et al.*, 2018). Em conjunto, estas evidências, indicam que a eficácia da terapia antidepressiva se baseia essencialmente no incremento da regulação de BDNF e da via da mTORC1, o qual estimula a formação de proteínas sinápticas e de novas sinapses (sinaptogênese) e bloqueia a atrofia neuronal e os déficits sinápticos observados na depressão.

Por último, outra via de sinalização intracelular envolvida na fisiopatologia da depressão que merece destaque é a via Wnt/ β -catenina (comumente conhecida como Wnt canônica). Na ausência da glicoproteína Wnt, um complexo de destruição – formado pelas proteínas APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (glicogênio sintase cinase-3 β), e axina, fosforila a β -catenina induzindo sua ubiquitinação e consequente degradação proteossomal (Moon *et al.*, 2004; Kahn, 2014). Alternativamente, na presença de Wnt e sua ligação ao receptor Frizzled e a co-receptores LRP (proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade) 5 e 6 (LRP5 e LRP6), Disheveled (DVL) é fosforilado, o complexo de degradação inibido e a degradação de β -catenina é reduzida (Moon *et al.*, 2004; Kahn, 2014). Em seguida, β -catenina é translocada ao núcleo, associa-se ao fator de células T (TCF) e ativa a transcrição de genes-alvo (Moon *et al.*, 2004; Kahn, 2014).

A via Wnt/ β -catenina desempenha um importante papel em uma gama de processos biológicos, em especial, aqueles relacionados ao desenvolvimento e manutenção da homeostasia de tecidos adultos através da regulação da proliferação celular, migração, estabilidade genética e apoptose (Kahn, 2014). A ligação entre a depressão e a via de sinalização Wnt/ β -catenina, começou com a descoberta de que a enzima GSK-3 é efetivamente inibida por lítio, a qual é utilizado no tratamento de transtornos afetivos bipolares (Chen *et al.*, 1999). Além disso, Wnt/ β -catenina é capaz de ativar mTORC1 através da modulação do complexo da esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2, do inglês, *Tuberous sclerosis complex*) (Choo *et al.*, 2006). Wnt/ β -catenina

suprime a GSK-3 β , que normalmente fosforila e estimula a atividade da TSC2 (Inoki *et al.*, 2006).

1.3 Sinaptogênese e os efeitos antidepressivos rápidos da cetamina

Sabe-se que os antidepressivos convencionais que atuam através do aumento sináptico de monoaminas de maneira aguda, produzem seus efeitos antidepressivos de maneira tardia através do aumento da expressão de BDNF e da formação de proteínas que controlam os eventos sinápticos (Popoli *et al.*, 2012). Neste contexto, os antidepressivos de ação rápida constituem uma alternativa farmacológica promissora, pois atuam diretamente através de rápidas mudanças nos mecanismos de neuroplasticidade mediante a estimulação da via da mTORC1, aumentando a expressão de BDNF, e induzindo a produção de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal de maneira rápida (Duman, 2014; Abdallah *et al.*, 2015). Estudos clínicos recentes têm alcançado significativos progressos em relação as mais importantes limitações da terapia antidepressiva atual.

A cetamina é um antagonista não-competitivo de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA sobre interneurônios inibitórios GABAérgicos. Dessa forma, cetamina proporciona (indiretamente) aumento da atividade de neurônios glutamatérgicos e, portanto, liberação de glutamato sináptico, levando a ativação de receptores AMPA (Zanos *et al.*, 2018). Os efeitos antidepressivos rápidos produzidos pela cetamina levaram a supor que alterações rápidas de plasticidade sináptica estariam envolvidas em suas ações terapêuticas. De fato, através de vários estudos celulares e moleculares foi verificado que uma das vias de sinalização intracelular implicadas nos efeitos da cetamina é a via da mTOR (Hoeffler e Klann, 2010). A cetamina aumenta de maneira rápida (dentro de 30 min) e transitória a ativação por fosforilação de mTOR, o que induz uma rápida e sustentada, indução das proteínas sinápticas PSD95 (proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa) e a subunidade GluA1 do receptor AMPA (por 2 horas a 7 dias), no córtex pré-frontal de camundongos, o que é correspondente a sua resposta terapêutica em pacientes (Zarate *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). Adicionalmente a estas observações, Li *et al.* (2011) reportaram que uma única dose de cetamina é capaz de produzir uma rápida inibição das alterações sinápticas, dendríticas e comportamentais (anedonia) no modelo de estresse crônico imprevisível (induzido por 3 semanas).

Reforçando este paradigma, foi evidenciado que a indução da expressão de proteínas sinápticas, o crescimento de espinhas dendríticas e os efeitos funcionais

antidepressivos de antagonistas de receptores metabotrópicos glutamatérgicos foram bloqueados pela infusão intracerebroventricular de rapamicina (Koike *et al.*, 2011), um inibidor de mTORC1, sugerindo o papel da via mTOR no mecanismo de ação de antidepressivos.

Sabe-se que os antidepressivos convencionais produzem efeitos terapêuticos somente via tratamento crônico (durante pelo menos 3 semanas). Apesar de a cetamina produzir efeitos antidepressivos robustos, os efeitos adversos dissociativos agudos limitam seu uso clínico. Desta maneira, várias estratégias farmacológicas têm sido propostas para remediar tais limitações, desde o desenvolvimento de antagonistas de receptores NMDA mais seletivos e com menos efeitos adversos, até o tratamento combinado de cetamina com outros agentes antidepressivos no intuito de reduzir as doses e os intervalos de administração, e viabilizar seu uso a longo prazo.

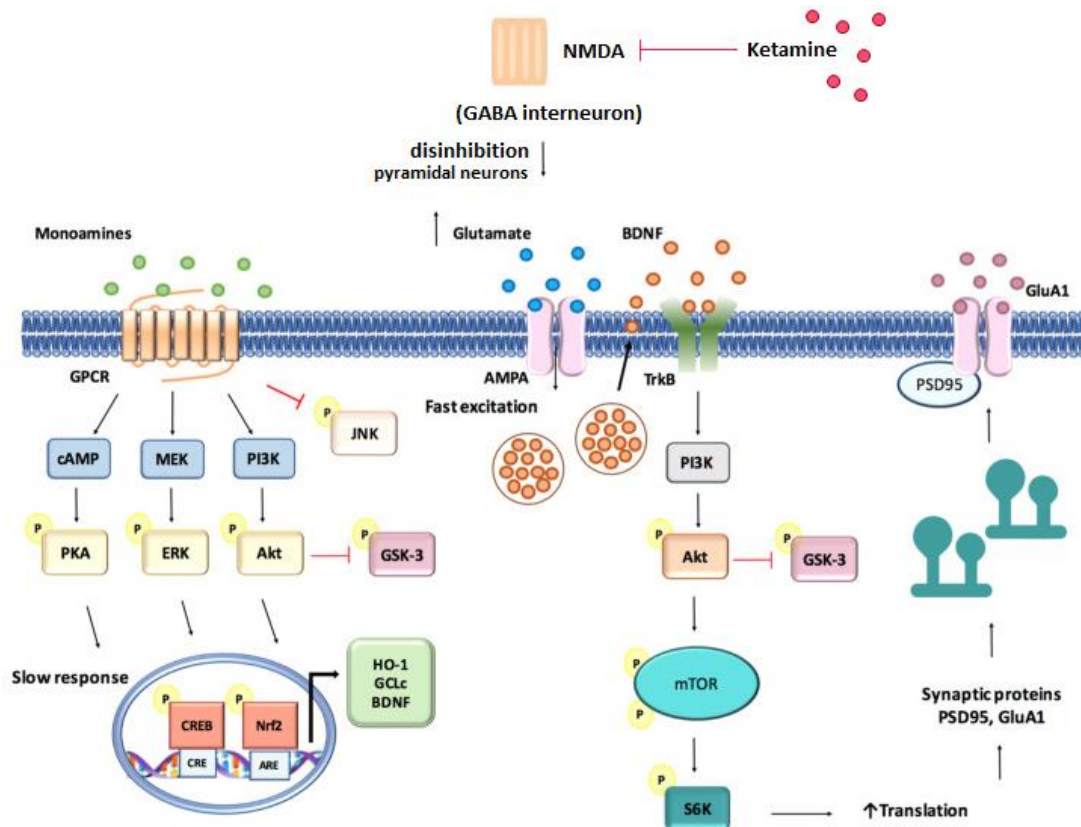


Figura 1: Ilustração esquemática das vias de sinalização subjacentes aos efeitos antidepressivos da cetamina. De acordo com a literatura, a agmatina produz respostas antidepressivas aumentando as monoaminas e regulando múltiplos receptores pós-sinápticos acoplados à proteína G (GPCR), incluindo α -adrenérgicos, receptores 5-HT, que acoplam a uma variedade de sistemas de segundos mensageiros, especialmente o cAMP / PKA, Caminhos MEK / ERK e PI3K / Akt. Os

efeitos antidepressivos provocados pela cetamina, tem início ao bloquear os receptores NMDA, que vai envolver toda via de sinalização por fosforilação de PKA, Akt, GSK-3 e ERK, com a subsequente ativação do fator de transcrição CREB. Após ativação, a CREB liga-se à sequência de DNA dos elementos de resposta a cAMP (CRE), induzindo desse modo a transcrição do fator neurotrófico BDNF. A modulação desses alvos promove a sobrevivência celular, neuroplasticidade e efeitos benéficos no humor. Finalmente, a cetamina pode produzir ações antidepressivas rápidas ativando os receptores AMPA, induzindo a liberação de BDNF dependente da atividade, que subsequentemente estimula o TrkB e a via de sinalização PI3K-Akt-mTOR. Após a ativação, o complexo mTOR ativa a quinase S6, induzindo, assim, a tradução de proteínas sinápticas, incluindo a expressão de PSD95 e da subunidade GluA1 do receptor AMPA. A inserção de receptores AMPA contendo GluA1 é essencial para a sinaptogênese e seus efeitos antidepressivos rápidos. (Adaptado Freitas *et al.*, 2016).

1.4 Agmatina: um potencial adjuvante da terapia antidepressiva

Vários estudos relataram que o óxido nítrico desempenha um papel no mecanismo de ação de alguns antidepressivos e ansiolíticos atualmente em uso (Zhang *et al.*, 2010; Krass *et al.*, 2011). A agmatina é um neuromodulador, cuja atividade antidepressiva tem sido mostrada tanto em ensaios pré-clínicos como clínicos (Freitas *et al.*, 2016). Trata-se de uma amina catiônica, 4-(aminobutil) guanidina, que é estruturalmente análoga ao substrato L-arginina do óxido nítrico sintase (NOS).

A agmatina, é formada através da descarboxilação da L-arginina pela enzima mitocondrial arginina descarboxilase (ADC). Ela é sintetizada no encéfalo, estocada em vesículas sinápticas, acumulada por captação, liberada de maneira dependente de cálcio por despolarização, é captada pelo terminal sináptico, metabolizada e degradada à putrescina pela enzima agmatinase (Reis e Regunathan, 2000). A agmatina tem sido reconhecida como um importante neuromodulador no cérebro que se liga com alta afinidade a adrenoreceptores, sítios de ligação à imidazolina, antagoniza receptores NMDA e inibe competitivamente a NOS (Reis e Regunathan, 2000; Halaris e Plietz, 2007).

O sistema agmatinérgico endógeno parece desempenhar um importante papel nos mecanismos adaptativos em resposta ao estresse (Arıcıoglu e Altunbas, 2003; Piletz *et al.*, 2013). Níveis elevados de agmatina foram encontrados no cérebro de ratos submetidos ao modelo de indução de depressão por estresse de contenção

(Aricioglu e Altunbas, 2003; Zhu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Além disso, a agmatina exibe propriedades anticonvulsivantes, antinociceptivas e anti-inflamatórias (Olmos *et al.*, 1999; Satriano *et al.*, 2001; Demehri *et al.*, 2003; Onal *et al.*, 2003; Moosavi *et al.*, 2012).

Alguns efeitos biológicos da agmatina têm sido descritos, tais como atividade neuroprotetora, evidenciada pela proteção de células hipocâmpais contra a excitotoxicidade induzida por glutamato (Olmos *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006), em modelos de privação de glicose e oxigênio (Kim *et al.*, 2004) e em modelo de neurotrauma (Gilad e Gilad, 2000). Adicionalmente, um estudo de Matheus *et al.* (2012) mostrou que o tratamento sistêmico (via intraperitoneal) e repetido com agmatina é capaz de prevenir danos motores e de memória e a perda de neurônios dopaminérgicos em um modelo experimental de Doença de Parkinson em camundongos envelhecidos. Por último, o trabalho de Moretti *et al.* (2015) descreveu que agmatina produz um efeito tipo-antidepressivo no modelo de depressão induzida pela neurotoxina MPP(+), sugerindo seu potencial uso no tratamento de sintomas depressivos presentes no Parkinson.

Em relação aos efeitos tipo-antidepressivos, Freitas *et al.* (2014a) demonstraram que o tratamento crônico com agmatina durante 21 dias produziu um efeito antidepressivo no teste de suspensão pela cauda (TSC) acompanhado pela ativação das proteínas cinase A (PKA), cinase B (PKB)/Akt, cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), do fator de transcrição responsiva ao AMP cíclico (AMPC) (CREB) e pelo aumento do conteúdo de BDNF e inibição da enzima GSK-3 β hipocâmpais. Em outro estudo, Freitas *et al.* (2014b) verificaram que agmatina é capaz de abolir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse de contenção e que tais efeitos estão associados à sua capacidade de manter o equilíbrio pró/anti-oxidante no hipocampo.

Em células neuronais hipocâmpais murinas, Freitas *et al.* (2015a) mostraram que agmatina é capaz de produzir neuroproteção contra os danos celulares e oxidativos induzidos pela corticosterona através da ativação de receptores α_2 e 5-HT_{2A}, ativação das vias PI3K/Akt e MEK/ERK, translocação nuclear de Nrf2, bem como bloqueio da produção de espécies reativas de oxigênio e de apoptose. Em um estudo subsequente e complementar, foi demonstrado a habilidade da agmatina em produzir um efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido pelo tratamento crônico com corticosterona (Freitas *et al.*, 2015b).

O efeito da agmatina neste modelo farmacológico de depressão parece ser mediado pelo aumento de monoaminas, diminuição dos níveis de glutamato, indução

de BDNF e de proteínas sinápticas, ativação de Nrf2, melhora das defesas antioxidantes intracelulares e manutenção da integridade astrocitária e microglial (Freitas *et al.*, 2015b). É importante citar ainda, um estudo recente do nosso grupo que demonstrou que concentrações sub-ativas de agmatina é capaz de potencializar os efeitos neuroprotetores produzidos pela cetamina frente à citotoxicidade produzida pela corticosterona em uma linhagem de células hipocampais murinas (Tavares *et al.*, 2018). Considerando os estudos realizados em humanos, Bernstein *et al.* (2012) apontaram que indivíduos deprimidos apresentam aumento da expressão da enzima agmatinase – responsável pela degradação da agmatina neuronal hipocampal, sugerindo que esta enzima e/ou níveis neuronais hipocampais alterados de agmatina podem estar implicadas na fisiopatologia da depressão. Além disso, Keynan *et al.* (2010) mostrou que a agmatina (2,670 g via oral, durante 14 dias, n=51) alivia a dor e melhora a qualidade de vida de pacientes que sofrem de dor neuropática. É imprescindível citar o estudo de Shopsin (2013) que mostrou que a administração exógena de agmatina (2-3 mg/dia; 3-4 semanas; n=3 pacientes) é capaz de produzir efeitos antidepressivos em indivíduos diagnosticados com depressão maior. Shopsin (2013) sugere ainda que o efeito observado pode ser mediado pela inibição da excitotoxicidade glutamatérgica, mais especificamente, pela habilidade da agmatina em antagonizar receptores NMDA.

Juntos, todos estes estudos confirmam que a agmatina tem potencial para constituir um adjuvante/monoterapia para auxiliar a terapia antidepressiva convencional. Apesar de os efeitos antidepressivos da agmatina terem sido comprovados em estudos pré-clínicos e clínicos, nenhum estudo anterior se propôs a avaliar o efeito potenciador da agmatina quando combinada à cetamina sobre efeitos comportamentais e neuroquímicos.

2. Justificativa

A depressão é um sério problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, é acompanhada por sérios prejuízos funcionais e ocupacionais e altos custos para a sociedade (WHO, 2012a). Sabe-se que episódios de estresse prolongado são a principal causa de desenvolvimento de depressão, e entre os mecanismos moleculares responsáveis por seus efeitos sobre o cérebro, destaca-se: atrofia cerebral e neuronal; diminuição da neurogênese; diminuição das ramificações dendríticas e do número de espinhas dendríticas. Em conjunto estes eventos causam danos aos contatos sinápticos e conseqüentemente prejudicam a comunicação neuronal e o processo de neuroplasticidade (Duman, 2014; Abdallah *et al.*, 2015).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da depressão, apesar de amplamente utilizados, possuem várias limitações, entre as quais se destacam: efeitos adversos severos, baixa resposta terapêutica e necessidade de longo período de tratamento para se obter respostas clínicas. A cetamina surgiu como uma notável estratégia para o tratamento da depressão, pois produz efeitos antidepressivos rápidos e eficazes mesmo em pacientes resistentes ao tratamento convencional. Os efeitos rápidos produzidos pela cetamina são mediados pela sua capacidade de induzir sinaptogênese e restabelecer o prejuízo entre as conexões neuronais observadas na depressão (Duman, 2014; Abdallah *et al.*, 2015). Por outro lado, o uso clínico de cetamina é limitado devido ao fato de produzir efeitos adversos dissociativos. Agmatina, por sua vez, tem surgido como um potencial adjuvante na terapia antidepressiva. É um neuromodulador endógeno cuja sua atividade antidepressiva tem sido demonstrada tanto em estudos pré-clínicos como clínicos sem causar efeitos adversos importantes (Piletz *et al.*, 2013; Shopsin, 2013).

Apesar da quantidade significativa de estudos que confirmaram os efeitos antidepressivos da agmatina, nenhum estudo anterior avaliou o efeito potenciador da agmatina sobre os efeitos comportamentais e neuroquímicos produzidos pela cetamina. O presente projeto visa caracterizar o mecanismo de ação da agmatina, no intuito de fornecer evidências e bases moleculares para o seu uso como adjuvante ou monoterapia da depressão, e mais especificamente, o potencial uso da agmatina como um adjuvante do tratamento antidepressivo com cetamina.

Neste sentido, a agmatina poderia propiciar a redução das doses de cetamina, aumentar os intervalos de sua administração, de forma a evitar os efeitos dissociativos e viabilizar seu uso clínico a longo termo.

3. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com agmatina isolado ou combinado com cetamina sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos relacionados a depressão maior.

3.1 Objetivos específicos

- a) Determinar as doses sub-efetivas de cetamina e agmatina que não produzem efeitos antidepressivos através de uma curva dose-resposta em camundongos;
- b) Investigar o possível efeito tipo-antidepressivo sinérgico do tratamento combinado com doses sub-efetivas de cetamina e agmatina em testes comportamentais;
- c) Avaliar a participação de proteínas de sinalização intracelular, incluindo Akt, p70S6K, PSD95, GSK-3 β e β -catenina no córtex pré-frontal de camundongos, que coordenam a manutenção e formação de novas sinapses e que podem estar envolvidas no efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela agmatina e cetamina.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Camundongos Swiss adultos pesando entre 40 - 45 g mantidos a 21°C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00 – 19:00h) foram utilizados. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todas as manipulações foram realizadas entre as 9:00 e 17:00h, sendo cada animal utilizado somente uma vez. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA), e protocolado sob o número 3760191016. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2 Drogas e tratamentos

As seguintes drogas foram utilizadas: agmatina e cetamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

4.3 Avaliação comportamental

4.3.1 Potencial efeito antidepressivo sinérgico de agmatina e cetamina

No intuito de estabelecer as doses sub-efetivas de cetamina e agmatina a serem utilizadas no tratamento combinado, uma curva dose-resposta foi realizada. Neste sentido, os camundongos foram tratados com cetamina ou agmatina (0,001 – 10 mg/kg) e após 60 minutos foram avaliados no teste da suspensão pela cauda (TSC) e campo aberto.

Em seguida, o potencial efeito sinérgico de agmatina e cetamina foi investigado. Para isso, doses sub-efetivas de agmatina e de cetamina foram administradas e após 1 hora, 24 horas, 7 dias ou 14 dias, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

4.3.2 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)

O tempo total de duração da imobilidade foi avaliado de acordo com o método descrito por Steru *et al.* (1985). Os camundongos acústica e visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 minutos. Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Steru *et al.*, 1985).

4.3.3 Teste do Campo Aberto

Este teste é utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. O teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados em um período de 6 minutos foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora (Rodrigues *et al.*, 1996).

4.4 Avaliação dos mecanismos moleculares e bioquímicos

4.4.1. Western Blot

Os córtices pré-frontais foram homogeneizados mecanicamente em 300 μ L do tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 35 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e inibidor de proteases AMRESCO código M222). Os lisados celulares foram centrifugados (10.000 x g por 10 minutos, a 4°C) para eliminar restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1/1 (v/v) em solução de Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4mM e SDS 8%, e aquecidos à 100°C por 5 minutos. A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Finalmente, tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção 1:4 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final 8%) (Cordova *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2014a) foi adicionado nas amostras. As proteínas foram isoladas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando gel de separação com concentração de 10% e gel de entrada na concentração de 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 150 V durante aproximadamente 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência usando um sistema *semi-dry* (1,2mA/cm²; 1,5 horas) para que as proteínas fossem transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau Stain (Freitas *et al.*, 2014a; Goncalves *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2012). As membranas foram bloqueadas com 5% de albumina sérica bovina em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 hora e após 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) as membranas foram incubadas *overnight* (4°C) com os anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das proteínas de interesse (Akt, p70S6K, PSD95, GSK-3 β e β -catenina). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, camundongo ou

cabra (ligado à peroxidase) e reveladas por quimiluminescência, através do sistema LumiGlo® (Cell Signaling). O nível de fosforilação das proteínas de interesse foi determinado pela razão entre a D.O. da banda fosforilada e a D.O. da banda total. O imunocconteúdo das proteínas de interesse foi determinado pela razão entre a D.O. da amostra e D.O. de β -actina. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image®.

4.5. Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através de Teste T-Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme o protocolo experimental, seguido pelo teste post-hoc de Tukey, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Curva dose-resposta da agmatina

Os resultados da Figura 2 mostram que o tratamento agudo com agmatina nas doses de 0,1 e 1 mg/kg (p.o.) promoveu uma redução significativa ($P < 0,01$) no tempo de imobilidade no TSC (painel A), sem, todavia, causar nenhuma alteração significativa na atividade locomotora dos animais quando submetidos ao TCA (painel B). Esses resultados indicam um efeito positivo da agmatina (0,1 e 1 mg/kg, p.o.) quando administrada agudamente em camundongos machos, visto que os animais reduziram seu tempo de imobilidade no TSC, o que caracteriza um efeito do tipo antidepressivo (Steru *et al.*, 1985). Adicionalmente, a dose em que a agmatina não produz nenhum efeito tipo-antidepressivo (sub-ativa) no TSC foi determinada (0,01 mg/kg, p.o.).

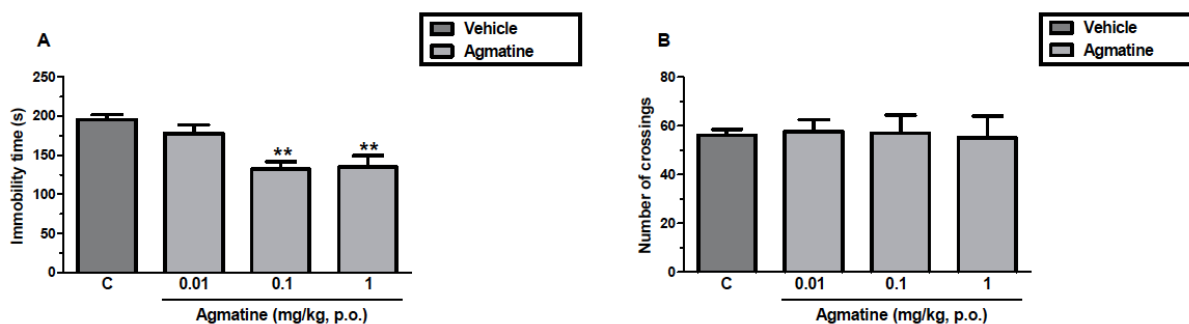


Figura 2. Curva dose-resposta da agmatina (0,01 – 1 mg/kg, p.o.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-8). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A) [$F(3,26) = 7,50$; $P < 0,01$]; B) [$F(3,24) = 0,03$; $P = 0,99$].

5.2 Curva dose-resposta da cetamina

Os resultados da Figura 3 mostram que o tratamento agudo com cetamina nas doses de 1 e 10 mg/kg (i.p.) promoveu uma redução significativa ($P < 0,01$) no tempo de imobilidade no TSC (painel A), sem, todavia, causar nenhuma alteração significativa na atividade locomotora dos animais quando submetidos ao TCA (painel B). De maneira similar aos resultados obtidos com a agmatina, esses resultados indicam um efeito positivo da cetamina (1 e 10 mg/kg, p.o) quando administrada agudamente em camundongos machos, visto que os o tratamento induziu uma redução do tempo de imobilidade no TSC.

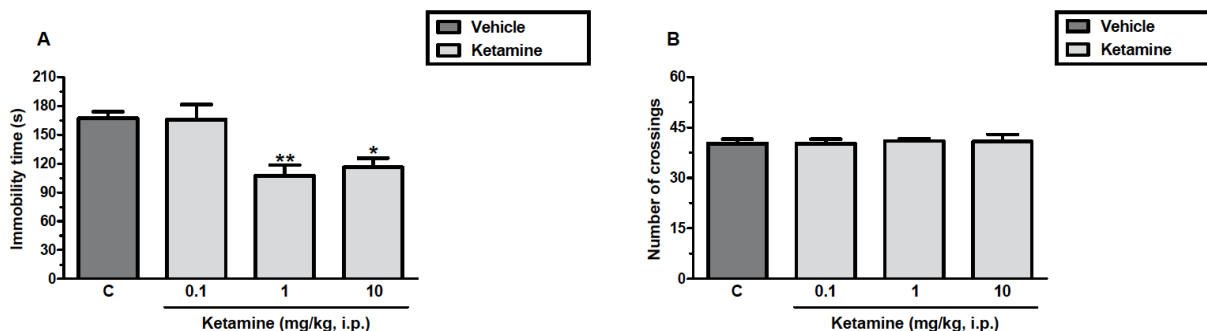


Figura 3. Curva dose-resposta da cetamina (0,1 – 10 mg/kg, p.o.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-8). *P<0,05 e **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A) [F(3,25) = 7,40; P < 0,01]; B) [F(3,27) = 0,08; P = 0,97].

5.3 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 1 hora de tratamento

Os resultados mostrados na Figura 4 (painel A) mostram que a administração combinada com doses sub-efetivas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos foi capaz de produzir um efeito do tipo antidepressivo sinérgico no TSC após 1 hora de tratamento sem causar nenhuma alteração significativa no TCA (painel B). Os resultados mostram que o efeito sinérgico é específico, uma vez que, nenhuma alteração locomotora no TCA foi observada.

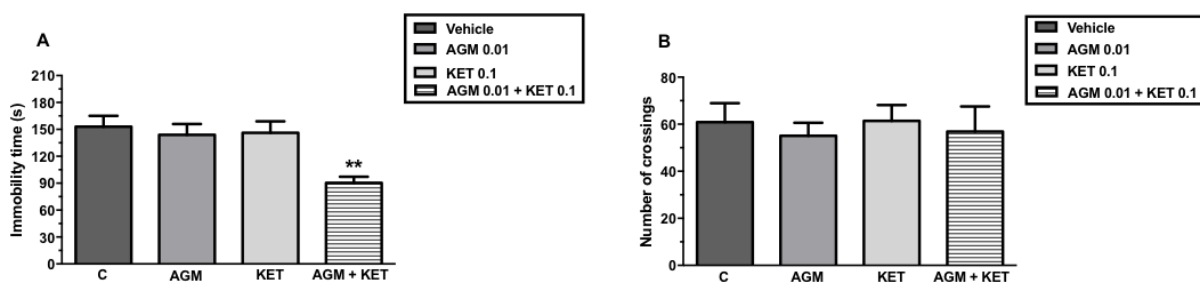


Figura 4. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) após 1 hora de tratamento em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-10). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A)

Agmatina [$F(1,31) = 7,33$; $P < 0,05$], Cetamina [$F(1,31) = 8,39$; $P < 0,01$] e interação entre Agmatina e Cetamina [$F(1,31) = 4,34$; $P < 0,05$]. B) Agmatina [$F(1,26) = 0,02$; $P = 0,89$], Cetamina [$F(1,26) = 0,39$; $P = 0,54$] e interação entre Agmatina e Cetamina [$F(1,26) = 0,01$; $P = 0,94$].

5.4 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 24 horas de tratamento

Os resultados exibidos na Figura 5 (painel A) indicam que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos produz um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC, e persistente, por 24 horas após as administrações. Adicionalmente, nenhuma alteração na ambulação dos animais foi observada (painel B).

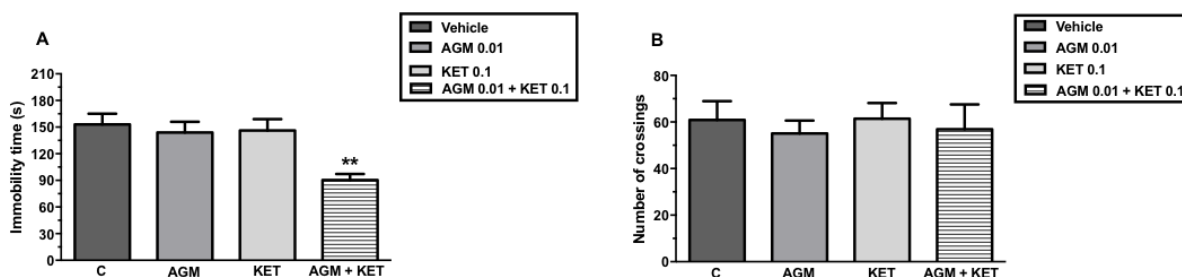


Figura 5. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina, AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) após 24 horas de tratamento em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M ($n = 7-10$). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A) Agmatina [$F(1,31) = 8,11$; $P < 0,01$], Cetamina [$F(1,31) = 2,62$; $P = 0,12$] e interação entre Agmatina e Cetamina [$F(1,31) = 4,84$; $P < 0,05$]. B) Agmatina [$F(1,27) = 0,04$; $P = 0,85$], Cetamina [$F(1,27) = 0,01$; $P = 0,97$] e interação entre Agmatina e Cetamina [$F(1,27) = 0,10$; $P = 0,75$].

5.5 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 7 dias de tratamento

Os resultados exibidos na Figura 6 (painel A) indicam que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos produz um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC,

e persistente, por até 7 dias após as administrações. Adicionalmente, nenhuma alteração na ambulação dos animais foi observada (painel B).

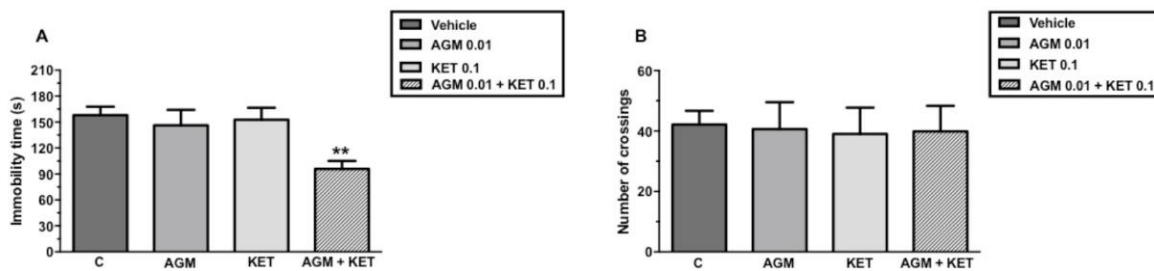


Figura 6. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina, AGM (0,01 mg/kg, p.o) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) após 7 dias de tratamento em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-10). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A) Agmatina [F(1,32) = 4,90; P < 0,05], Cetamina [F(1,32) = 7,45; P < 0,05] e interação entre Agmatina e Cetamina [F(1,32) = 3,23; P = 0,08]. B) Agmatina [F(1,26) = 0,05; P = 0,81], Cetamina [F(1,26) = 0,01; P = 0,97] e interação entre Agmatina e Cetamina [F(1,26) = 0,02; P = 0,88].

5.6 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em testes comportamentais após 14 dias de tratamento

Os resultados exibidos na Figura 7 (painel A) indicam que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos não foi capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC, após 14 dias das administrações. Nenhuma alteração na ambulação dos animais foi observada (painel B).

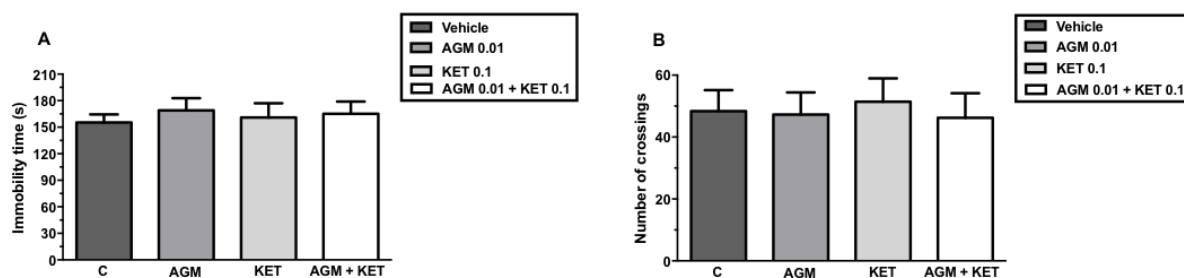


Figura 7. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina, AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) no teste da suspensão pela cauda (painel A) e no teste do campo aberto (painel B) após 14 dias de tratamento em camundongos machos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-10). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (controle). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Tukey HSD. A) Agmatina [F(1,31) = 0,004; P = 0,95], Cetamina [F(1,31) = 0,44; P = 0,51] e interação entre Agmatina e Cetamina [F(1,31) = 0,12; P = 0,73]. B) Agmatina [F(1,27) = 0,02; P = 0,90], Cetamina [F(1,27) = 0,18; P = 0,68] e interação entre Agmatina e Cetamina [F(1,27) = 0,08; P = 0,78].

5.7 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

A Figura 8, mostra que o que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 1 hora não causou nenhum efeito sobre a fosforilação da proteína Akt (Ser⁴⁷³) medida através da razão entre as formas (p-Akt) e total (T-Akt) (painel A) no córtex pré-frontal. Adicionalmente, a administração sinérgica aumentou significativamente (P<0,05) a fosforilação da proteína p70S6K (Thr³⁸⁹) medida através da razão entre as formas (p-p70S6K) e total (T-p70S6K) (painel B) no córtex pré-frontal. Por último, a administração sinérgica produziu um aumento significativo no imunoconteúdo da proteína PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. É importante destacar que o tratamento isolado com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 1 hora não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

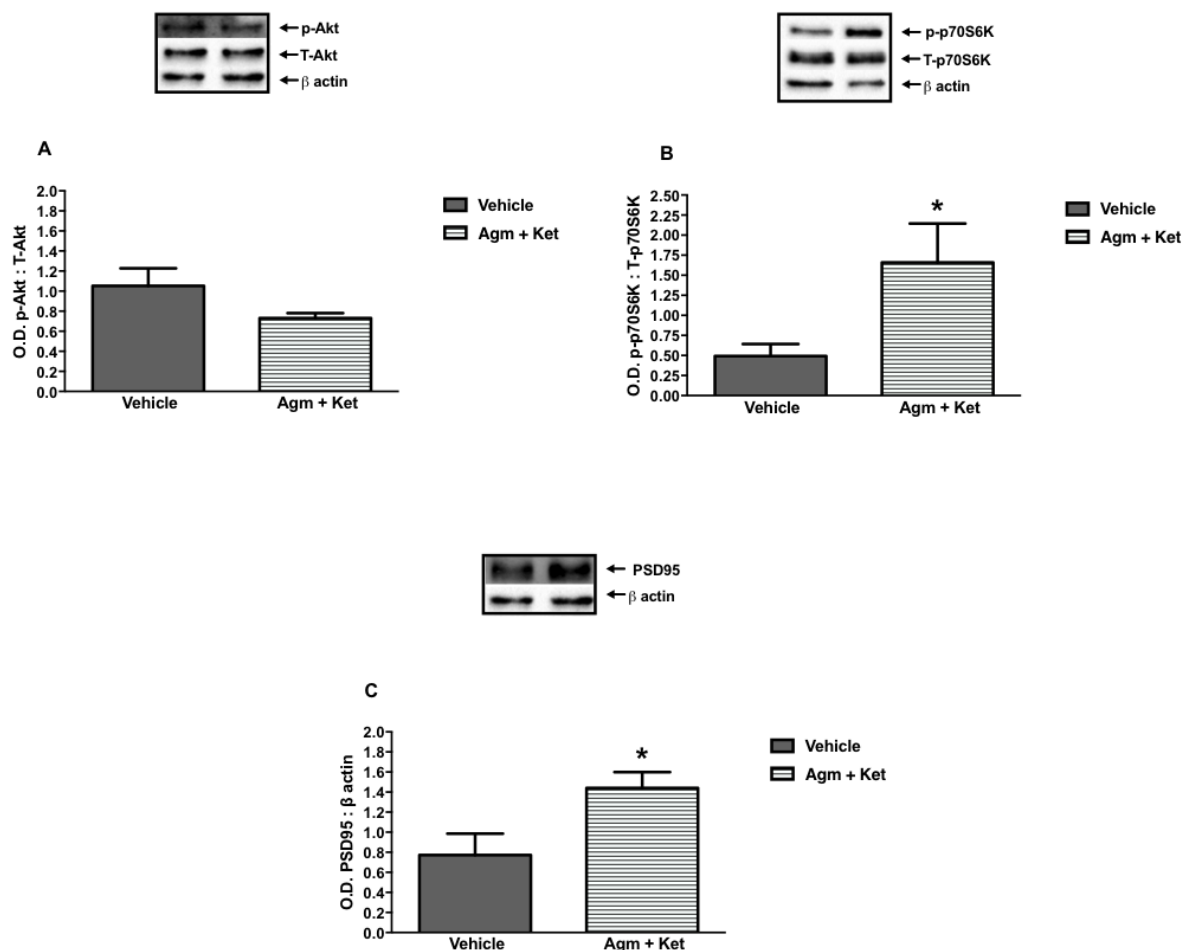


Figura 8. Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 1 hora sobre a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) (painel A), fosforilação de p70S6K (Thr³⁸⁹) (painel B), e imunoconteúdo de PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 5-7). *P<0,05 quando comparado ao tratamento com veículo (controle). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(11)=1,646; P = 0,13]. B) [T(11)=2,453; P < 0,05]. C) [T(7)=2,563; P < 0,05].

5.8 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 1 hora sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

A Figura 9, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 1 hora não causou nenhum efeito sobre a fosforilação da proteína GSK-3 β (Ser⁹), medida através da razão entre as formas (p-GSK-3 β) e total (T-GSK) (painel A), nem sobre o imunoconteúdo de β -catenina (painel B) no córtex pré-frontal. Vale destacar que o tratamento isolado com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg,

p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 1 hora também não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

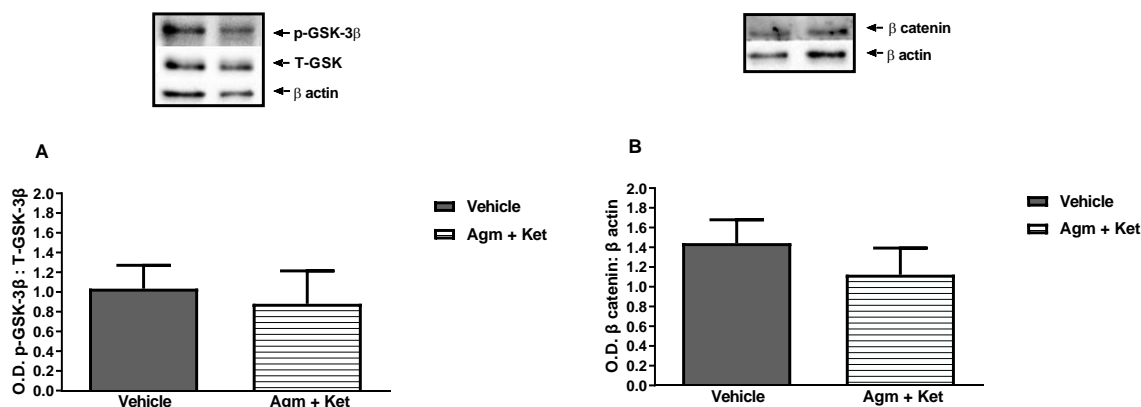


Figura 9. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina, AGM (0,01 mg/kg, p.o) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 1 hora sobre a fosforilação de GSK-3β (Ser⁹) (painel A), e imunocontéudo de β-catenina (painel B) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 5-7). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(8)=0,376; P = 0,72]. B) [T(12)=0,894; P = 0,39].

5.9 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a fosforilação de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

A Figura 10, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 24 horas causou um aumento significativo ($P < 0,05$) na fosforilação das proteínas Akt (Ser⁴⁷³) (painel A) e p70S6K (Thr³⁸⁹) (painel B) medidas através da razão entre as formas (p-Akt) e total (T-Akt) e (p-70S6K) e total (T-70S6K), respectivamente, no córtex pré-frontal. Adicionalmente, o tratamento sinérgico produziu um aumento significativo no imunocontéudo da proteína PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Vale destacar que a administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 24 horas não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

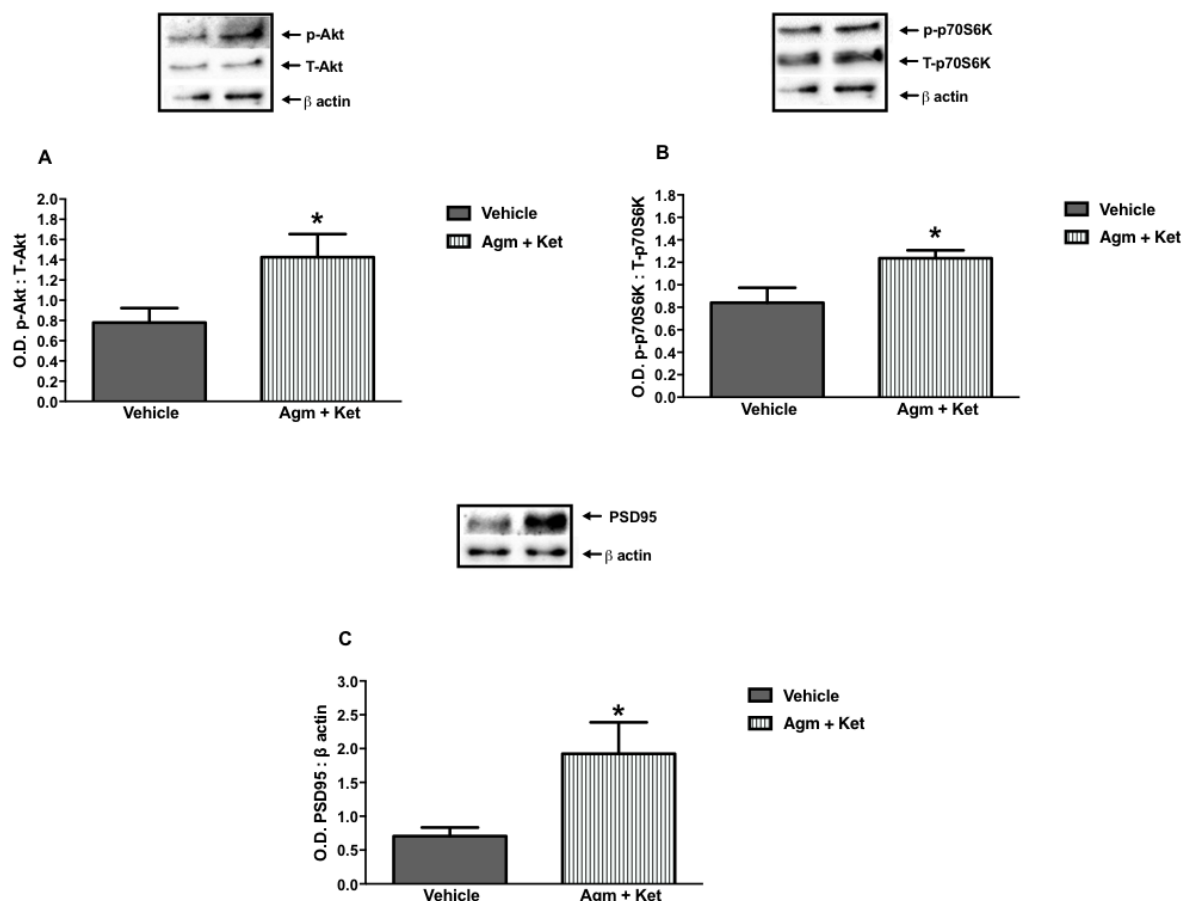


Figura 10. Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 24 horas sobre a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) (painel A), fosforilação de p70S6K (Thr³⁸⁹) (painel B), e imunoconteúdo de PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 5-7). *P<0,05 quando comparado ao tratamento com veículo (controle). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(11)=2,475; P < 0,05]. B) [T(12)=2,636; P < 0,05]. C) [T(9)=2,754; P < 0,05].

5.10 Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina e cetamina por 24 horas sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

A Figura 11, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 24 horas não causou nenhum efeito sobre a fosforilação da proteína GSK-3 β (Ser⁹), medida através da razão entre as formas (p-GSK-3 β) e total (T-GSK) (painel A), nem sobre o imunoconteúdo de β -catenina (painel B) no córtex pré-frontal. A administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 24 horas também não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

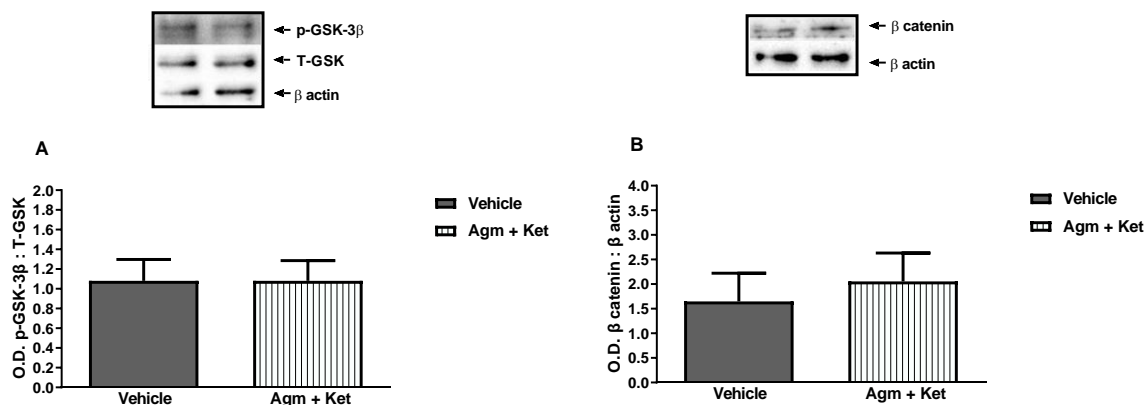


Figura 11. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 24 horas sobre a fosforilação de GSK-3β (Ser⁹) (painel A), e imunocontéudo de β-catenina (painel B) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 8). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(14)=0,003; P = 0,99]. B) [T(14)=0,499; P = 0,62].

5.11 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a fosforilação proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

A Figura 12, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 7 dias causou um aumento significativo ($P < 0,05$) no imunocontéudo da proteína PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Adicionalmente, a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 7 dias não causou nenhum efeito sobre a fosforilação das proteínas Akt (Ser⁴⁷³) (painel A) e p70S6K (Thr³⁸⁹) (painel B) medidas através da razão entre as formas (p-Akt) e total (T-Akt) e (p-70S6K) e total (T-70S6K), respectivamente, no córtex pré-frontal. É importante destacar a administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 7 dias não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

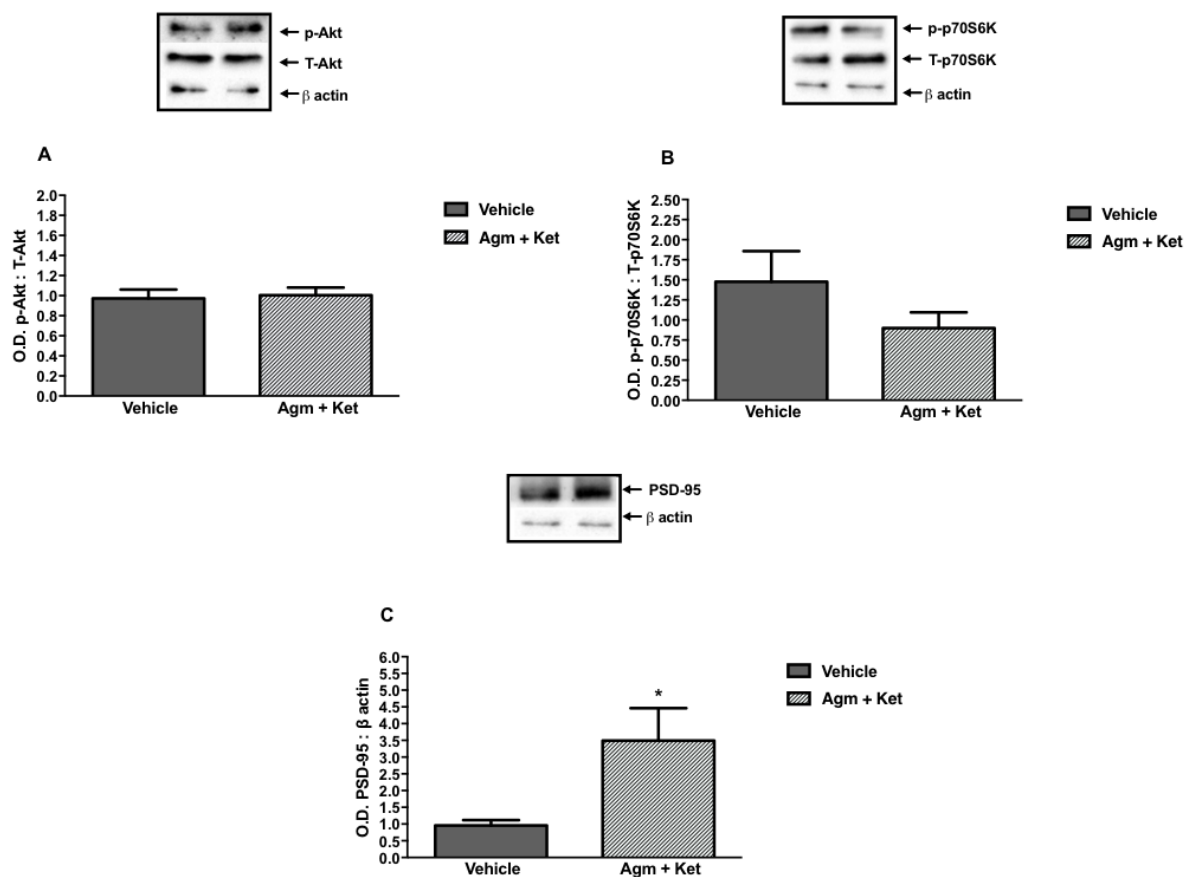


Figura 12. Efeito da administração de doses sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 7 dias sobre a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) (painel A), fosforilação de p70s6K (Thr³⁸⁹) (painel B), e imunoconteúdo de PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-8). *P<0,05 quando comparado ao tratamento com veículo (controle). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(14)=0,265; P = 0,79]. B) [T(13)=1,288; P = 0,22]. C) [T(13)=2,420; P < 0,05].

5.12 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 7 dias sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

A Figura 13, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 7 dias não causou nenhum efeito sobre a fosforilação da proteína GSK-3 β (Ser⁹), medida através da razão entre as formas (p-GSK-3 β) e total (T-GSK) (painel A), nem sobre o imunoconteúdo de β -catenina (painel B) no córtex pré-frontal. A administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 7 dias também não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

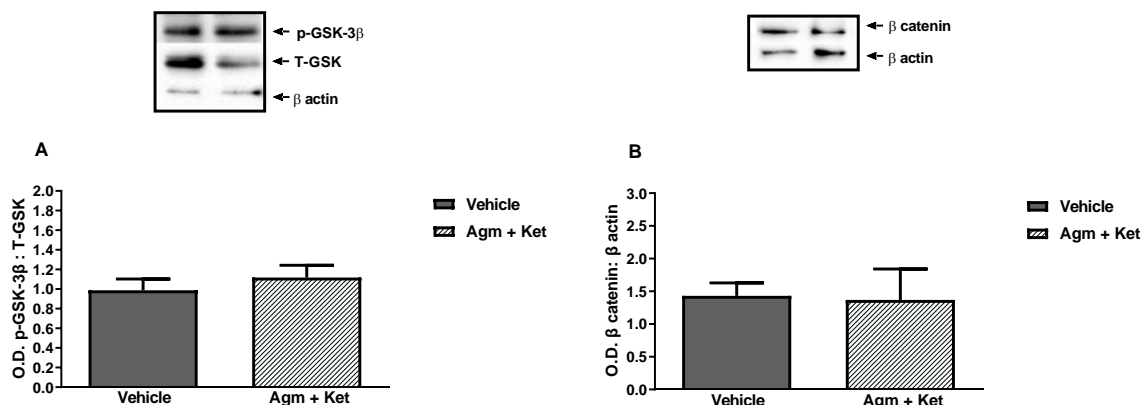


Figura 13. Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 7 dias sobre a fosforilação de GSK-3β (Ser⁹) (painel A), e imunoconteúdo de β-catenina (painel B) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 7-8). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(14)=0,767; P = 0,45]. B) [T(12)=0,121; P = 0,90].

5.13 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a fosforilação proteínas sinápticas no córtex pré-frontal

A Figura 14, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 14 dias não causou nenhum efeito sobre a fosforilação de nenhuma das proteínas analisadas no córtex pré-frontal. Adicionalmente, a administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) por 14 dias também não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

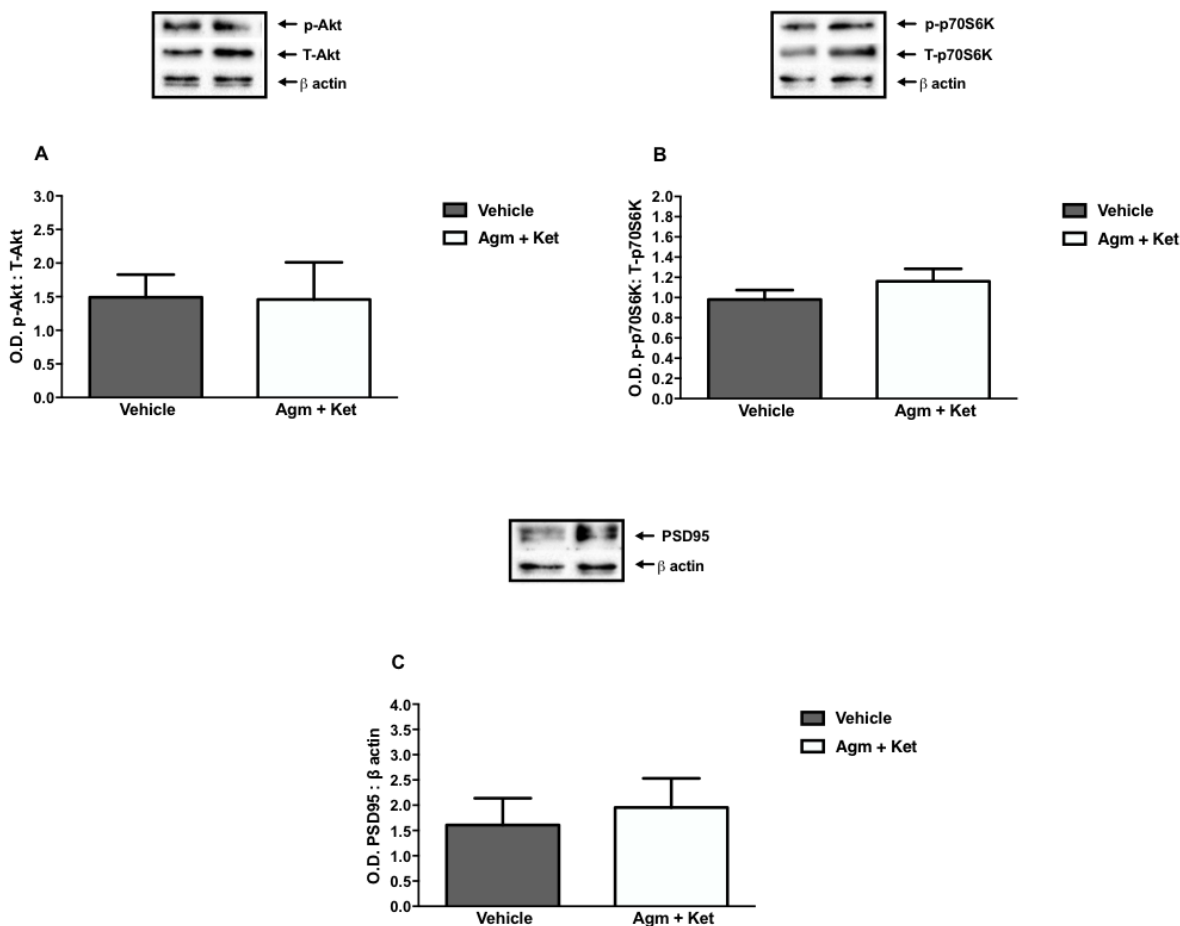


Figura 14. Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 14 dias sobre a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) (painel A), fosforilação de p70s6K (Thr³⁸⁹) (painel B), e imunocontéudo de PSD95 (painel C) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 8). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(14)=0,051; P = 0,96]. B) [T(14)=1,169; P = 0,26]. C) [T(14)=0,442; P = 0,66].

5.14 Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina e cetamina por 14 dias sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina

A Figura 15, mostra que a administração sinérgica com doses sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) em camundongos machos por 14 dias não causou nenhum efeito sobre a fosforilação da proteína GSK-3 β (Ser⁹), medida através da razão entre as formas (p-GSK-3 β) e total (T-GSK) (painel A), nem sobre o imunocontéudo de β -catenina (painel B) no córtex pré-frontal. A administração isolada com concentrações sub-ativas de agmatina (0,01 mg/kg, p.o.) ou de cetamina

(0,1 mg/kg, i.p.) por 14 dias também não causou nenhum efeito sobre as proteínas analisadas (dado não mostrado).

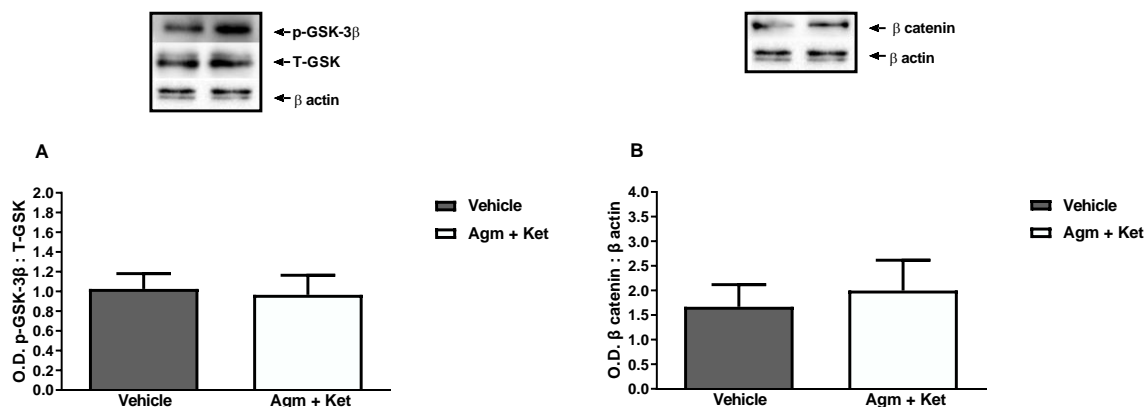


Figura 15. Efeito da administração sinérgica com concentrações sub-ativas de agmatina AGM (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina, KET (0,1 mg/kg, i.p.) por 14 dias sobre a fosforilação de GSK-3β (Ser⁹) (painel A), e imunoconteúdo de β-catenina (painel B) no córtex pré-frontal. Os valores estão expressos como média + E.P.M (n = 8). Resultados avaliados por Teste T-Student. A) [T(14)=0,242; P = 0,81]. B) [T(14)=0,434; P = 0,67].

6. Conclusão e Discussão

Através deste conjunto de resultados, pôde-se verificar: a) as doses ativas e sub-ativas de agmatina e cetamina que produzem efeitos tipo-antidepressivos no teste da suspensão pela cauda em machos; b) o efeito tipo-antidepressivo sinérgico e persistente (por até 7 dias) produzidos pela coadministração de agmatina e cetamina em doses sub-efetivas no teste da suspensão pela cauda em machos; c) o envolvimento da via sinalização intracelular que coordena a produção e manutenção de novas sinapses, mTOR, no efeito tipo-antidepressivo produzido pela agmatina combinada com a cetamina (*ver* Figura 15 *para detalhes*); d) a combinação de doses sub-ativas de cetamina e agmatina não produziu nenhum efeito sobre a fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹) nem sobre o imunoconteúdo de β -catenina em qualquer um dos intervalos de tempo estudados. Desta maneira, o efeito tipo-antidepressivo mediado pela agmatina combinada com a cetamina provavelmente não é mediado pela ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina/GSK-3 β .

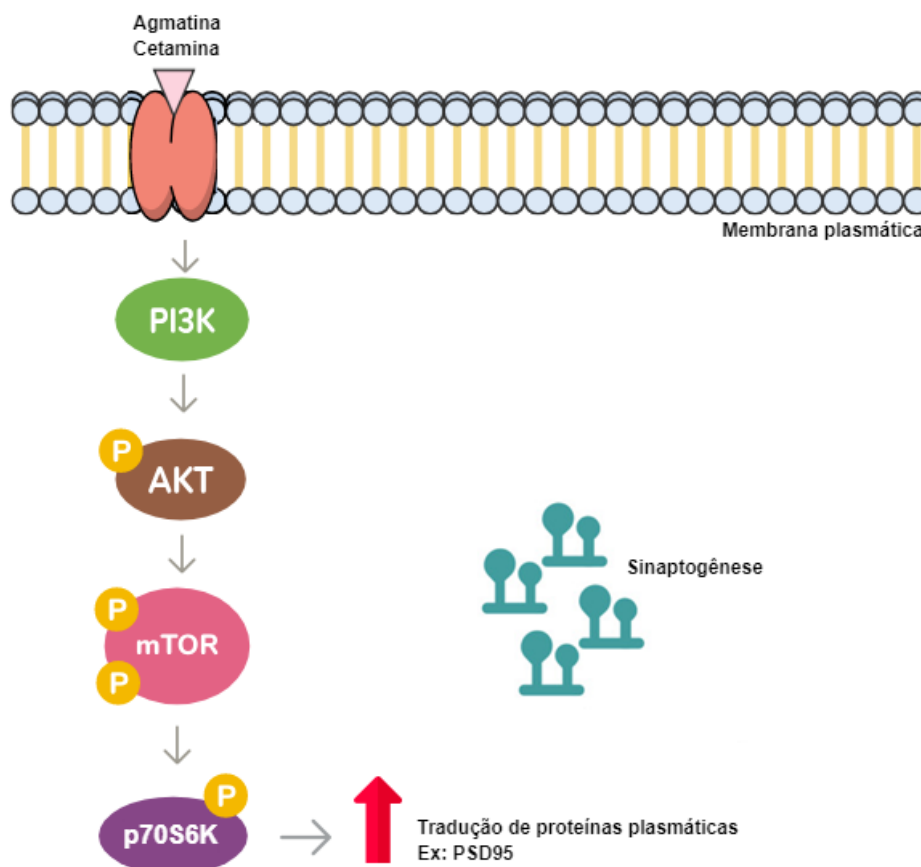


Figura 16: Ilustração esquemática da via de sinalização envolvida no efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pela combinação de doses sub-ativas de agmatina e cetamina em camundongos machos. O presente estudo fornece

evidências para propor que o efeito tipo-antidepressivo sinérgico produzido pelo co-tratamento com agmatina e cetamina é dependente, pelo menos em parte, da ativação de PI3K/AKT, que por sua vez, ativa via fosforilação o complexo 1 da mTOR (mTORC1). Uma vez ativado, mTORC1 ativa a cinase p70S6K, e aumenta a tradução de proteínas sinápticas, como a PSD95. Esse mecanismo é essencial para a produção de novas sinapses (sinaptogênese) e efeitos antidepressivos rápidos.

Estes dados corroboram com dados prévios da literatura que mostram que a cetamina quando administrada na dose de 0,1 mg/kg (i.p.) em machos não produz efeito tipo-antidepressivo (dose sub-ativa) (Ludka *et al.*, 2013). Notavelmente, verificou-se que a agmatina produziu um efeito inédito, robusto, e persistente mediado pela ativação da via da mTORC1.

Tal efeito está de acordo com a literatura que diz que compostos capazes de ativar a via da mTOR podem produzir efeitos antidepressivos rápidos e persistentes (Duman e Aghajanian, 2012; Duman e Duman, 2015). Os benefícios do tratamento sinérgico consistem na redução das doses da cetamina bem como dos intervalados das administrações, e conseqüentemente, dos efeitos adversos dissociativos que produz.

7. Referências Bibliográficas

ABDALLAH, C. G. et al. Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. **Annu Rev Med**, v. 66, p. 509-23, 2015. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-053013-062946> >.

ARICIOGLU, F.; ALTUNBAS, H. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 136-40, Dec 2003. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <https://doi.org/10.1196/annals.1304.014>>.

ARTIGAS, F.; BORTOLOZZI, A.; CELADA, P. Can we increase speed and efficacy of antidepressant treatments? Part I: General aspects and monoamine-based strategies. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 28, n. 4, p. 445-456, Apr 2018. ISSN 0924-977x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.10.032> >.

BERNSTEIN, H. G. et al. Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 237-46, Jan 2012. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.012> >.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, Feb 2006. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1846> >.

BRUNELLO, N. et al. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 5, p. 461-75, Oct 2002. ISSN 0924-977X (Print) 0924-977x. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(02\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(02)00057-3) >.

CARACCI, M. O.; AVILA, M. E.; DE FERRARI, G. V. Synaptic Wnt/GSK3beta Signaling Hub in Autism. **Neural Plast**, v. 2016, p. 9603751, 2016. ISSN 1687-5443. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9603751> >.

CHEN, G. et al. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. **J Neurochem**, v. 72, n. 3, p. 1327-30, Mar 1999. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0721327.x> >.

CHOO, A. Y.; ROUX, P. P.; BLENIS, J. Mind the GAP: Wnt steps onto the mTORC1 train. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 834-6, Sep 8 2006. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.025> >.

CORDOVA, F. M. et al. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. **Arch Toxicol**, v. 87, n. 7, p. 1231-44, Jul 2013. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1017-5> >.

DEMEHRI, S. et al. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 4, p. 534-42, Sep 2003. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00199-0) >.

DEMYTTENAERE, K. Compliance during treatment with antidepressants. **Journal of Affective Disorders**, v. 43, n. 1, p. 27-39, 1997/03/01 1997. ISSN 1573-2517. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(96\)00095-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(96)00095-X) >.

DUMAN, C. H.; DUMAN, R. S. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. **Neurosci Lett**, v. 601, p. 20-9, Aug 5 2015. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.022> >.

DUMAN, R. S. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. **Dialogues Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 157-69, Jun 2004. ISSN 1294-8322 (Print)1294-8322.

DUMAN, R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depress Anxiety**, v. 31, n. 4, p. 291-6, Apr 2014. ISSN 1091-4269. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/da.22227> >.

DUMAN, R. S.; AGHAJANIAN, G. K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 68-72, Oct 5 2012. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222939> >.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, Jun 15 2006. ISSN 0006-3223 (Print)0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013> >.

FAVA, G. A. et al. Withdrawal Symptoms after Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Discontinuation: A Systematic Review. **Psychother Psychosom**, v. 84, n. 2, p. 72-81, Feb 21 2015. ISSN 0033-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000370338> >.

FREITAS, A. E. et al. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **J Psychiatr Res**, v. 58, p. 137-46, Nov 2014a. ISSN 0022-3956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.07.024> >.

FREITAS, A. E. et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 50, p. 143-50, Apr 3 2014b. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.12.012> >.

FREITAS, A. E. et al. Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 3, p. 1504-19, 2015a. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-8827-1> >.

FREITAS, A. E. et al. Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 3030-3045, Jul 2015b. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9182-6> >.

FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine, a potential novel therapeutic strategy for depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 12, p. 1885-1899, Dec 2016. ISSN 0924-977x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.10.013> >.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 296, n. 2-3, p. 97-100, Dec 22 2000. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01625-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01625-6) >.

GONCALVES, F. M. et al. Vatairea macrocarpa lectin (VML) induces depressive-like behavior and expression of neuroinflammatory markers in mice. **Neurochem Res**, v. 38, n. 11, p. 2375-84, Nov 2013. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-013-1150-9> >.

HALARIS, A.; PLIETZ, J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. **CNS Drugs**, v. 21, n. 11, p. 885-900, 2007. ISSN 1172-7047 (Print) 1172-7047. Disponível em: < [DOI: 10.2165/00023210-200721110-00002](https://doi.org/10.2165/00023210-200721110-00002) >.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 682-96, Oct 2010. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2911> >.

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends Neurosci**, v. 33, n. 2, p. 67-75, Feb 2010. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2009.11.003> >.

INOKI, K. et al. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 955-68, Sep 8 2006. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055> >.

KAHN, M. Can we safely target the WNT pathway? **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p. 513-32, Jul 2014. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4233> >.

KANG, H. et al. Decreased Expression of Synapse-Related Genes and Loss of Synapses in Major Depressive Disorder. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1413-7, Sep 2012. ISSN 1078-8956 (Print)1546-170X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2886> >.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. Porto Alegre - RS: AMGH, 2017. 1216.

KEYNAN, O. et al. Safety and Efficacy of Dietary Agmatine Sulfate in Lumbar Disc-associated Radiculopathy. An Open-label, Dose-escalating Study Followed by a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. **Pain Med**, v. 11, n. 3, p. 356-68, Mar 2010. ISSN 1526-2375. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1526-4637.2010.00808.x> >.

KIM, J. H. et al. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. **Exp Neurol**, v. 189, n. 1, p. 122-30, Sep 2004. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.029> >.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1419-23, Dec 2011. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.034> >.

KRASS, M. et al. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. **Behav Brain Res**, v. 218, n. 1, p. 57-63, Mar 17 2011. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.027> >.

LEE, A. L.; OGLE, W. O.; SAPOLSKY, R. M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 2, p. 117-28, Apr 2002. ISSN 1398-5647 (Print) 1398-5647. Disponível em: < <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2002.01144.x> >.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-64, Aug 20 2010. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1190287> >.

LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-61, Apr 15 2011. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.015> >.

LOPES, M. W. et al. Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Res**, v. 37, n. 9, p. 1868-78, Sep 2012. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0797-y> >.

LUDKA, F. K. et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 400-12, May 2013. ISSN 0924-977x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.05.005> >.

MALETIC, V.; RAISON, C. L. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 5291-338, Jun 1 2009. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2741/3598> >.

MALETIC, V. et al. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. **Int J Clin Pract**, v. 61, n. 12, p. 2030-40, Dec 2007. ISSN 1368-5031 (Print)1368-5031. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01602.x> >.

MATHEUS, F. C. et al. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav Brain Res**, v. 235, n. 2, p. 263-72, Dec 1 2012. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.017> >.

MCKINNON, M. C. et al. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. In: (Ed.). **J Psychiatry Neurosci**, v.34, 2009. p.41-54. ISBN 1180-4882 (Print)1488-2434 (Electronic).

MOON, R. T. et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 9, p. 691-701, Sep 2004. ISSN 1471-0056 (Print)1471-0056. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1427> >.

MOOSAVI, M. et al. Agmatine protects against scopolamine-induced water maze performance impairment and hippocampal ERK and Akt inactivation. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 5-6, p. 2018-23, Apr 2012. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.031> >.

MORETTI, M. et al. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). **Neurotox Res**, v. 28, n. 3, p. 222-31, Oct 2015. ISSN 1029-8428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-015-9540-1> >.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 2, p. 193-218, Jun 2004. ISSN 1461-1457 (Print)1461-1457. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/s1461145704004080> >.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. **Nat Rev Drug Discov**, v. 16, n. 7, p. 472-486, Jul 2017. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.16> >.

MUSAZZI, L.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. **Neurochem Int**, v. 59, n. 2, p. 138-49, Aug 2011. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.002> >.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 28 2002. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00653-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00653-0) >.

NUSSE, R.; CLEVERS, H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. **Cell**, v. 169, n. 6, p. 985-999, Jun 1 2017. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016> >.

OKERLUND, N. D.; CHEYETTE, B. N. Synaptic Wnt signaling-a contributor to major psychiatric disorders? **J Neurodev Disord**, v. 3, n. 2, p. 162-74, Jun 2011. ISSN 1866-1947. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11689-011-9083-6> >.

OLMOS, G. et al. Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 6, p. 1317-26, Jul 1999. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702679> >.

ONAL, A. et al. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. **Life Sciences**, v. 73, n. 4, p. 413-28, Jun 13 2003. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00297-2) >.

OTA, K. T.; DUMAN, R. S. Environmental and pharmacological modulations of cellular plasticity: role in the pathophysiology and treatment of depression. **Neurobiol Dis**, v. 57, p. 28-37, Sep 2013. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.022> >.

OTA, K. T. et al. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. **Nat Med**, v. 20, n. 5, p. 531-5, May 2014. ISSN 1078-8956 (Print)1546-170X (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3513> >.

PENA, C. J. et al. Epigenetic signaling in psychiatric disorders. **J Mol Biol**, v. 426, n. 20, p. 3389-412, Oct 9 2014. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.016> >.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, Dec 1977. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4) >.

PICCHINI, A. M.; MANJI, H. K.; GOULD, T. D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 4, p. 419-428, 2004/12/01/ 2004. ISSN 1740-6765. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.11.020> >.

PILETZ, J. E. et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 17-18, p. 880-93, Sep 2013. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.017> >.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, ISSN 1471-003X (Print)1471-0048 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3138> >.

PRINCE, M. et al. No health without mental health. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 859-77, Sep 8 2007. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61238-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61238-0) >.

RANG, H. P.; DALE, M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7° edition. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 808.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 5, p. 187-93, May 2000. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01460-7) >.

RODRIGUES, A. L. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharma Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 150-6, Sep 1996. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928. Disponível em: < <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00259.x> >.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63-77, Jan 2012. ISSN 0028-3908 (Print)1873-7064 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.036> >.

SATRIANO, J. et al. Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. **J Cell Physiol**, v. 188, n. 3, p. 313-20, Sep 2001. ISSN 0021-9541 (Print)0021-9541. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1119> >.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 10, p. 1259-72, Oct 2010. ISSN 0160-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4088/JCP.09r05346blu> >.

SHOPSIN, B. The clinical antidepressant effect of exogenous agmatine is not reversed by parachlorophenylalanine: a pilot study. **Acta Neuropsychiatr**, v. 25, n. 2, p. 113-8, Apr 2013. ISSN 0924-2708. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5215.2012.00675.x> >.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00428203> >.

TAVARES, M. K. et al. Agmatine potentiates neuroprotective effects of subthreshold concentrations of ketamine via mTOR/S6 kinase signaling pathway. **Neurochem Int**, May 12 2018. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2018.05.006> >.

TEO, C. H.; SOGA, T.; PARHAR, I. S. Brain Beta-Catenin Signalling During Stress and Depression. **Neurosignals**, v. 26, n. 1, p. 31-42, Feb 22 2018. ISSN 1424-862x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000487764> >.

TSANKOVA, N. et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 5, p. 355-67, May 2007. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2132> >.

VERKAAR, F.; ZAMAN, G. J. New avenues to target Wnt/beta-catenin signaling. **Drug Discov Today**, v. 16, n. 1-2, p. 35-41, Jan 2011. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.11.007> >.

WANG, W. P. et al. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, v. 1084, n. 1, p. 210-6, Apr 21 2006. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.024> >.

WHO. **The Global Burden of Disease 2004 Update**. World Health Organization. 2008

WHO. **Depression: A Global Public Health Concern**. World Health Organization. 2012a

WHO. **World Suicide Prevention Day**. World Health Organization. 2012b

ZANOS, P. et al. Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action. **CNS Drugs**, v. 32, n. 3, p. 197-227, Mar 2018. ISSN 1172-7047. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40263-018-0492-x> >.

ZARATE, C. A., JR.; SINGH, J.; MANJI, H. K. Cellular plasticity cascades: targets for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1006-20, Jun 1 2006. ISSN 0006-3223 (Print)0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.10.021> >.

ZHANG, J. et al. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT1A receptor in modulating anxiety-related behaviors. **J Neurosci**, v. 30, n. 7, p. 2433-41, Feb 17 2010. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5880-09.2010> >.

ZHOU, W. J. et al. The antidepressant roles of Wnt2 and Wnt3 in stress-induced depression-like behaviors. In: (Ed.). **Transl Psychiatry**, v.6, 2016. p.e892-. ISBN 2158-3188 (Electronic).

ZHU, M. Y. et al. Repeated immobilization stress alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. **Neurochem Int**, v. 53, n. 6-8, p. 346-54, Dec 2008. ISSN 0197-0186 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2008.09.001> >.

ZHU, M. Y. et al. Chronic treatment with glucocorticoids alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. **J Neurochem**, v. 103, n. 5, p. 1811-20, Dec 2007. ISSN 0022-3042 (Print)1471-4159 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04867.x> >.
Electronic).