

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA EM MODELOS ANIMAIS
DE DEPRESSÃO

Andréa Dias Elpo Zomkowski

Florianópolis, 2002

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA EM MODELOS ANIMAIS
DE DEPRESSÃO

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, para obtenção
do grau de Mestre em Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis, 2002

**“EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA EM MODELOS ANIMAIS DE
DEPRESSÃO”**

ANDRÉA DIAS ELPO ZOMKOWSKI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora



Ana Lúcia Severo Rodrigues

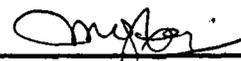
Coordenadora do Curso



Yara Maria Rauh Müller

Banca Examinadora


Ana Lúcia Severo Rodrigues (Presidente)



Mariana Graciela Terenzi


Nelson Horácio Gabilan

AGRADECIMENTOS

À professora e amiga Ana Lúcia Severo Rodrigues pela amizade, dedicação e empenho dispensado na orientação deste trabalho.

Ao professor e colega Adair Roberto Santos, pelo auxílio e ensinamentos.

Ao professor João Batista Calixto, do departamento de Farmacologia da UFSC, pela permissão do uso do laboratório.

Aos colegas de turma pelo companheirismo e amizade.

Aos bolsistas do laboratório de Neurotoxicologia (BQA/UFSC) pelo coleguismo.

Ao Nivaldo, secretário da pós-graduação, por ser sempre atencioso e prestativo.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC.

Ao meu marido e a minha filha, pelo carinho e compreensão.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| Lista de abreviaturas..... | iv |
| Lista de figuras..... | vi |
| Lista de tabelas..... | vii |
| Resumo..... | viii |
| Abstract..... | x |
| | |
| 1.Introdução..... | 1 |
| 1.1 Depressão..... | 1 |
| 1.2. Antidepressivos..... | 5 |
| 1.3. Modelos animais de depressão..... | 6 |
| 1.4. Depressão e o receptor NMDA..... | 7 |
| 1.5. Agmatina..... | 10 |
| 1.6. Agmatina e depressão..... | 15 |
| | |
| 2. Objetivos..... | 18 |
| 2.1. Geral..... | 18 |
| 2.2. Específicos..... | 18 |
| | |
| 3. Justificativa..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 4. Materiais e Métodos | 19 |
| 4.1. Drogas e Reagentes..... | 19 |
| 4.2. Animais e Tratamento..... | 20 |
| 4.3. Testes Comportamentais..... | 20 |
| 4.3.1. Teste do nado forçado (TNF)..... | 20 |
| 4.3.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)..... | 21 |
| 4.3.3. Campo aberto..... | 21 |
| 4.4. Curva-dose-resposta da agmatina..... | 22 |
| 4.4.1. TNF e TSC (i.p.)..... | 22 |
| 4.4.2. TNF (i.c.v.)..... | 22 |
| 4.5. Análise do mecanismo de ação antidepressiva da agmatina através de estudos farmacológicos <i>in vivo</i> | 22 |
| 4.5.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico..... | 23 |
| 4.5.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico..... | 24 |
| 4.5.3. Envolvimento do sistema adrenérgico..... | 25 |
| 4.5.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico..... | 25 |
| 4.5.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico..... | 26 |
| 4.5.6. Envolvimento do sistema opióide..... | 26 |
| 4.6. Análise Estatística..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 5. Resultados | 28 |
| 5.1. Efeito antidepressivo da agmatina..... | 28 |
| 5.1.1. Efeito da administração sistêmica e central de agmatina no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC)..... | 28 |
| 5.2. Estudo do mecanismo de ação antidepressiva da agmatina..... | 30 |
| 5.2.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico..... | 30 |
| 5.2.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico..... | 33 |
| 5.2.3. Envolvimento do sistema adrenérgico..... | 34 |
| 5.2.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico..... | 35 |
| 5.2.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico..... | 39 |
| 5.2.6. Envolvimento do sistema opióide..... | 40 |
| | |
| 6. Discussão | 42 |
| | |
| 7. Conclusões | 55 |
| | |
| 8. Referências Bibliográficas | 57 |

LISTAS DE ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico

ADC – Enzima arginina descarboxilase

AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CREB – Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc

DIPPA – (2-(3,4-diclorofenil)-N-metil-N-[1S-1-(3-isotiocianatofenil)-2-(1-pirrolidinil) etil] acetamida)

DSMIV – Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais

GLU – Glutamato

GMP – Guanosina 5' monofosfato

iMAO – Inibidores da monoamino oxidase

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.p. – Intraperitoneal

ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

KA – Ácido cáinico

LTP – Potenciação de longa duração

MAO – Enzima monoamino oxidase

NMDA – N-metil D-aspartato

NO – Óxido nítrico

NOS – Enzima óxido nítrico sintase

8-OH-DPAT – 8-Hidroxi-dipropilaminotetralina

PCPA – p-clorofenilalanina metil éster

RI – Receptor imidazólico

SNAP – S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNC – Sistema nervoso central

TNF – Teste do nado forçado

TSC – Teste da suspensão da cauda

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Vias metabólicas da agmatina em mamíferos..... | 13 |
| Figura 2 - Esquema de uma sinapse agmatinérgica..... | 17 |
| Figura 3 - Efeito do tratamento com agmatina (i.p.) no TNF e no TSC..... | 29 |
| Figura 4 - Efeito do tratamento com agmatina (i.c.v.) no TNF..... | 30 |
| Figura 5 - Efeito do pré-tratamento dos animais com GMP ou com AA sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 31 |
| Figura 6 - Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina ou com SNAP sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 33 |
| Figura 7 - Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim ou com ioimbina sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 34 |
| Figura 8 - Efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 35 |
| Figura 9 - Efeito do pré-tratamento dos animais com metisergida, com ciproheptadina ou com cetanserina sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 37 |
| Figura 10 - Efeito do pré-tratamento dos animais com pindolol sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 38 |
| Figura 11 - Efeito do pré-tratamento dos animais com sulpirida sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 - Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona, com naltrindol ou com DIPPAs sobre a redução da imobilidade causada pela agmatina no TNF..... | 41 |
| Tabela 1 - Efeito da agmatina, MK-801 e imipramina no TNF..... | 32 |

RESUMO

A agmatina, amina formada pela descarboxilação enzimática da L-arginina, tem sido proposta como um novo neurotransmissor/neuromodulador no sistema nervoso central (SNC). Contudo, seu papel fisiológico no SNC não está bem estabelecido. Foi sugerido, a partir de estudos clínicos, que a agmatina desempenhe um papel na modulação da depressão. O presente estudo investigou o efeito antidepressivo da agmatina no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC) em camundongos e o seu mecanismo de ação. A agmatina nas doses de 0,01-50 mg/kg, i.p. causou uma redução significativa no tempo de imobilidade no TNF e no TSC, sem alterar a atividade locomotora no campo aberto. A injeção i.c.v. de agmatina (1-100 nmol/sítio) também reduziu o tempo de imobilidade no TNF. A agmatina aumentou significativamente o efeito antidepressivo da imipramina, mas não o do MK-801. O efeito antidepressivo da agmatina no TNF foi bloqueado pelo pré-tratamento dos camundongos com GMP, ácido ascórbico (AA), L-arginina, S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) ou ioimbina, mas não foi afetado pelo pré-tratamento com prazosim ou com sulpirida. Nossos resultados também mostram que o pré-tratamento dos camundongos com naloxona ou com naltrindol, mas não com DIPPA, bloqueou o efeito antidepressivo da agmatina no TNF. O pré-tratamento dos animais com PCPA, metisergida, cetancerina ou com ciproheptadina também preveniu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF. Além disso, doses sub-ativas de pindolol potencializaram o efeito antidepressivo da agmatina. Em conjunto os resultados sugerem que o efeito antidepressivo da agmatina envolve uma interação com os sistemas glutamatérgico (receptores NMDA), adrenérgico (α_2 -adrenoceptores), serotoninérgico (receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos e 5-HT_{2A}) e opióide (receptores δ -opioides), bem como com a via L-arginina-óxido nítrico.

ABSTRACT

Agmatine, an amine formed by the enzymatic decarboxylation of L-arginine by arginine decarboxylase, has been proposed as a novel neurotransmitter/neuromodulator in the CNS. The physiological roles of agmatine in the CNS are not well established. A role for agmatine as a modulator of depression has already been suggested from clinical studies. Therefore, agmatine was investigated in the present study in its ability to produce antidepressant effects in the mouse forced swimming test (FST) and in the tail suspension test (TST). The immobility times in the FST and in the TST were significantly reduced by agmatine (dose range 0.01-50 mg/kg, i.p.), without accompanying changes in ambulation in an open-field. I.c.v. injection of agmatine (1-100 nmol/site) also reduced the immobility time in the FST. Agmatine markedly increased the anti-immobility effect of imipramine, but not of MK-801. Agmatine's antidepressant-like effect was completely prevented by pre-treatment of animals with GMP, ascorbic acid (AA), L-arginine or S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), but was not affected by pre-treatment with prazosin or sulpiride. Our results also show that pre-treatment of mice with naloxone or naltrindole, but not with DIPPA, blocked the agmatine antidepressant-like effect in the FST. Pre-treatment of animals with PCPA, methysergide, ketanserin or ciproheptadine also prevented the anti-immobility effect of agmatine in the FST. Moreover, sub-active doses of pindolol potentiated the effects of agmatine. Taken together these data suggest that agmatine elicited a significant antidepressant-like effect that is not due to any psychostimulant action. This effect seems to be mediated through an interaction with the glutamatergic (NMDA receptors), adrenergic (α_2 -adrenoceptors), serotonergic (pre-synaptic 5-HT_{1A} receptors and 5-HT_{2A} receptors), and opioid (δ -opioid receptors) systems as well as the L-arginine-nitric oxide pathway.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

Os transtornos de humor são doenças comuns, severas, crônicas e muitas vezes, ameaçadoras de vida. Eles incluem transtornos unipolares (transtornos depressivos) e transtornos bipolares (doença maniaca depressiva). Os transtornos unipolares (por exemplo, depressão maior e distímia) se distinguem dos transtornos bipolares, pelo fato de não terem históricos de episódios maníacos (American Psychiatric Association, 1994). O suicídio tem sido a causa de morte em aproximadamente 15% de indivíduos com depressão maior (Musselman et al., 1998). A depressão maior é uma doença sistêmica e representa um alto fator de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, bem como para a morte depois do infarto do miocárdio (Musselman et al., 1998).

Os critérios para a depressão maior incluem cinco ou mais dos seguintes sintomas: humor depressivo; anedonia (perda de interesse ou satisfação em quase todas as atividades); perda ou ganho de peso ou de apetite; insônia ou hipersônia; retardo ou agitação psicomotora; fadiga ou perda de energia; sentimentos de desvalia ou culpa; diminuição da concentração ou indecisão e pensamentos ou tentativa de suicídio. Estes sintomas devem estar presentes por pelo menos duas semanas, sendo que pelo menos um deve ser humor depressivo ou anedonia quase todos os dias (American Psychiatric Association, 1994). A dor crônica é frequentemente observada em pacientes com depressão (50% dos pacientes) (Akiskal, 1995). A depressão é mais frequente em mulheres (uma proporção de 5 mulheres para 2 homens) (Wong e Licinio, 2001). A prevalência vitalícia é de 4,4-19,6% para a depressão maior e de 3,1-3,9% para a distímia (Angst, 1992). Uma variedade de métodos,

tais como psicoterapia, e terapias farmacológicas, eletroconvulsivante e magnética, podem ser usados para o tratamento da depressão, mas com sucessos limitados (Ressler e Nemeroff, 1999).

O custo com a depressão na economia dos Estados Unidos é cerca de 43 bilhões de dólares por ano (Greenberg et al., 1993). O suicídio, o qual é usualmente uma consequência da depressão, é o oitavo lugar na causa de morte nos Estados Unidos. A taxa de suicídio é alarmante quando comparado por faixa etária. O suicídio é a sexta causa de morte entre 5-14 anos, a terceira causa de morte entre 15-24 anos, e a quarta causa entre 25-44 anos. A incidência da depressão maior esta aumentando, e o início desta condição ocorre agora em indivíduos mais jovens quando comparado com gerações anteriores (Murphy, 2000).

A depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. Estudos básicos e clínicos apontam evidências da participação do sistema monoaminérgico na depressão (Duman et al., 1997). A compreensão das vias e mecanismos responsáveis pela ação dos antidepressivos pode contribuir substancialmente para o entendimento dos transtornos depressivos e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o seu tratamento (Wong e Licinio, 2001).

A hipótese monoaminérgica da depressão postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina ou noradrenalina ou receptores ineficientes (Mann et al., 1996; Wong e Licinio, 2001). Várias evidências suportam esta hipótese. Muitos antidepressivos aumentam a concentração de serotonina ou noradrenalina na fenda sináptica, pois bloqueiam a recaptação de serotonina e/ou noradrenalina (Baldessarini, 1996). O tratamento com antihipertensivos, tal como a reserpina, o qual depleta catecolaminas, pode causar sintomas de depressão em indivíduos susceptíveis (Duman et al., 1997; Wong e Licinio, 2001).

A relação entre o sistema serotoninérgico e a depressão tem sido amplamente estudada. Baixos níveis de serotonina no plasma têm sido observados em pacientes com depressão endógena. Dados de vários estudos *pos-mortem* mostram níveis de serotonina diminuídos em vítimas suicidas comparado com indivíduos normais. Alguns estudos também demonstraram que o nível do ácido 5-hidroxiindolacético, metabólito da serotonina, no líquor de pacientes deprimidos é menor do que em indivíduos controles saudáveis (Yadid et al., 2000). A teoria serotoninérgica da depressão propõe uma diminuição na atividade serotoninérgica. Um aumento de serotonina na sinapse causada por drogas antidepressivas suporta esta hipótese. Contudo, a hipótese monoaminérgica falha em explicar porque os efeitos terapêuticos dos antidepressivos inibidores de recaptção de monoaminas se manifestam somente após algumas semanas após o início do tratamento, apesar do aumento de monoaminas ocorrer quase que imediatamente após o início do tratamento (Wong e Licinio, 2001).

Vários estudos têm postulado um papel importante da noradrenalina na fisiopatologia e subsequente no tratamento dos transtornos do humor (Ressler e Nemeroff, 1999). Os efeitos psicofisiológicos da noradrenalina no sistema nervoso central (SNC) parecem estar ligados à motivação, enquanto que a serotonina está envolvida com a expressão do humor (irritabilidade e impulso) (Leonard, 2000). Além disso, foi demonstrado que o nível do metoxi-hidroxi-fenilglicol, um metabólito da noradrenalina, no líquor é menor em vítimas suicidas (Leonard, 2000). A determinação da concentração do HMPG no plasma sugere que a função noradrenérgica está diminuída na depressão (Leonard, 2000).

A transmissão dopaminérgica reduzida também tem sido implicada na fisiopatologia da depressão maior (Rampello et al., 2000). Os tratamentos com antidepressivos parecem

potencializar as respostas comportamentais estimulantes dos agonistas dopaminérgicos. Entre outros sintomas, as síndromes depressivas humanas são caracterizadas pela perda da capacidade de sentir prazer e pela perda de motivação. Os antidepressivos potenciam a transmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico, a qual é crucial nos mecanismos de recompensa e motivação (D'Aquila et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado níveis baixos do ácido homovanílico, um metabólito da dopamina, no liquor de pacientes deprimidos com retardo psicomotor e vítimas suicidas (Leonard, 2000).

Mais recentemente, pesquisas para o tratamento e fisiopatologia da depressão maior têm focalizado as vias de sinalização intracelular. Estas interagem em vários níveis, desse modo formando cadeias de sinalização complexas, permitindo que o neurônio receba, processe e responda a informação e module o sinal gerado por múltiplos sistemas de neurotransmissores e neuropeptídeos (Manji et al., 2001). Essas vias de sinalização estão evidentemente envolvidas nos eventos neuroplásticos que regulam os complexos processos fisiológicos e cognitivos, bem como as diversas funções vegetativas.

Pesquisas têm demonstrado que a administração crônica de antidepressivos super regula a via do AMPc em vários níveis, incluindo a expressão aumentada da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Skolnick, 1999). Entre os múltiplos alvos gênicos que poderia ser regulado pelo CREB e que poderia estar envolvido nas ações antidepressivas e na fisiopatologia da depressão está o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Estudos recentes demonstram que o estresse crônico diminui a expressão do BDNF no hipocampo de ratos (Smith et al., 1995; Duman, 1997). Isto poderia contribuir para a atrofia ou morte dos neurônios no hipocampo. Os níveis elevados de glicocorticóides diminuem a sobrevivência dos neurônios no hipocampo (Duman et al., 1997; Manji et al., 2001). O tratamento crônico com antidepressivos aumentou a expressão do BDNF no

hipocampo de rato (Duman et al., 1997), e poderia portanto reverter a atrofia induzida pelo estresse ou proteger os neurônios hipocampais de danos.

Estudos recentes tem associado a depressão maior com reduções regionais no volume no SNC, bem como, com o número ou o tamanho de células da glia e neurônios no hipocampo (Manji et al., 2001).

1.2 ANTIDEPRESSIVOS

Os antidepressivos têm sido amplamente usados nas últimas quatro décadas. A introdução dos inibidores da monoamino oxidase (iMAOs) e dos antidepressivos tricíclicos na década de 1950, seguido pelos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) na década de 1980, redefiniu o tratamento da depressão (Wong e Licinio, 2001).

Os antidepressivos tricíclicos, tais como a imipramina, a clomipramina e a desipramina potenciam as ações das aminas biogênicas por bloquear o mecanismo fisiológico de inativação das mesmas, a qual envolve um mecanismo de recaptção pré-sináptica. Os inibidores da enzima MAO, tais como fenelzina e selegilina são agentes antidepressivos por inibir a inativação das monoaminas, aumentando a sua concentração no cérebro. Contudo, os efeitos colaterais e a sua baixa eficácia em alguns pacientes, têm levado à procura de novas drogas mais seletivas e com menos efeitos colaterais (Skolnick, 1999). Os antidepressivos atípicos, tais como o bupropion (inibidor da recaptção de noradrenalina/dopamina) particularmente efetivo na depressão bipolar e a nafazedona (inibidor da recaptção de serotonina e bloqueador do receptor 5-HT₂) não provocam disfunção sexual, um dos mais comuns efeitos colaterais dos antidepressivos clássicos (Yadid et al., 2000).

Os inibidores da recaptação de serotonina, tais como a fluoxetina, são os agentes terapêuticos mais freqüentemente usados nos dias de hoje. Suas ações terapêuticas são diversas, pois além de tratar vários tipos de depressão, também são usados no transtorno obsessivo compulsivo, na doença do pânico, na bulimia e em outras condições (Stahl, 1998). Estes compostos aumentam a concentração de serotonina na fenda sináptica. A eficácia dessa classe antidepressiva, especialmente em pacientes deprimidos severamente, não é maior do que os antidepressivos tricíclicos (Yadid et al., 2000). Embora os antidepressivos que inibem a recaptação de serotonina sejam efetivos clinicamente, os seus efeitos adversos, tais como náusea, disfunção sexual e distúrbios do sono, são bastante indesejados. Além disto, o seu efeito terapêutico demora de 3 a 6 semanas e aproximadamente 30% dos pacientes não se beneficiam do tratamento (Yadid et al., 2000).

1.3 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Os modelos animais de depressão são ferramentas indispensáveis na identificação de novas drogas antidepressivas. Eles também são úteis para contribuir na compreensão da neuropatologia da depressão (Cryan et al., 2002). Os modelos comumente usados são diversos e foram desenvolvidos baseados nas conseqüências comportamentais do estresse, drogas, lesão ou manipulações genéticas (Cryan et al., 2002).

O teste do nado forçado (TNF) (Porsolt et al., 1977) e o teste da suspensão da cauda (TSC) (Steru et al., 1985), são comumente usados para detectar drogas com propriedades antidepressivas. No TNF os animais são forçados a nadar em um espaço restrito do qual não existe forma de escapar, e no TSC os animais são suspensos pela cauda. Em ambos os testes, os animais inicialmente executam movimentos vigorosos na tentativa de escapar e

depois de alguns minutos adotam uma postura de imobilidade (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade dos animais em ambos os testes. Estes testes são sensíveis para diferentes classes de drogas antidepressivas, incluindo tricíclicos, inibidores da monoamino oxidase e antidepressivos atípicos (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985).

Embora estes modelos não reflitam adequadamente a sintomatologia da depressão em humanos, eles parecem ter um alto valor preditivo na investigação de drogas antidepressivas (Willner, 1984). Entretanto, compostos que aumentam a atividade locomotora podem produzir resultados falso positivos nestes testes (Willner, 1984; Borsini e Meli, 1988). Desta forma, na procura de drogas com propriedades antidepressivas, substâncias que diminuem a imobilidade nestes modelos animais de depressão, devem também ser testados quanto à sua atividade locomotora no campo aberto ou em caixas de locomoção (da Silva et al., 2000; Eckeli et al., 2000), a fim de se excluir a possibilidade que o efeito antidepressivo de uma determinada droga seja devido a um aumento da atividade motora, como ocorre com as anfetaminas (Porsolt et al., 1977).

1.4 DEPRESSÃO E O RECEPTOR NMDA

O glutamato (GLU) é o neurotransmissor excitatório predominante no SNC de mamíferos. Ele é responsável por diversas funções cerebrais, incluindo plasticidade neuronal, aprendizagem e memória (Cotman et al., 1995). Quando os terminais glutamatérgicos são despolarizados, o GLU vesicular é liberado na fenda sináptica de forma cálcio dependente e age sobre receptores pós-sinápticos (Obrenovitch e Urenjak, 1997). Os receptores de GLU estão divididos em duas categorias: os ionotrópicos, que

medeiam a abertura de canais iônicos e os metabotrópicos, os quais estão associados à proteína G. Os receptores ionotrópicos são subdivididos em três categorias: NMDA (ativados pelo N-metil D-aspartato), AMPA (sensíveis ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) e KA (respondem ao ácido caínico) (Pláteník et al., 2000).

O receptor NMDA está envolvido na indução da potenciação de longa duração (LTP), e tem um papel importante na aprendizagem e memória (Akhondzadeh, 1999). Drogas que bloqueiam o receptor NMDA, comprometem a aprendizagem e memória (Akhondzadeh, 1999). A farmacologia do receptor NMDA é complexa, pois este receptor tem vários sítios modulatórios. Além de um sítio para o GLU, existem também sítios estimulatórios para a glicina e para a D-serina. A ligação da glicina no receptor NMDA parece ser essencial para a abertura do canal, e por isto é conhecida como um co-agonista. A ativação do receptor também é modulada pelas poliaminas, tal como a espermina e espermidina (Akhondzaeh, 1999; Pláteník et al., 2000). Embora o sítio de poliaminas não precise ser ocupado para a ativação do receptor, a presença de poliaminas aumenta a capacidade do GLU e da glicina de abrir o canal iônico do receptor NMDA. O receptor NMDA também pode ser antagonizado por drogas que atuam dentro do canal iônico para bloquear o fluxo de corrente, tal como o MK-801 e a fenciclidina (Akhondzaeh, 1999). Dentro do canal do receptor NMDA há um sítio de ligação para o magnésio, o qual bloqueia a entrada de cálcio. O bloqueio pelo íon magnésio é removido pela despolarização da membrana. O receptor NMDA também é bloqueado pelo zinco em um sítio específico (Akhondzaeh, 1999). O receptor NMDA contém centros regulatórios sensíveis ao estado redox (Choi e Lipton, 2000). Alguns redutores, tais como o ácido ascórbico (AA), inibem a

função deste receptor (Majewska et al., 1990). Além disto, o receptor NMDA também é diretamente regulado pelo NO (Choi e Lipton, 2000).

Vários estudos têm demonstrado que o receptor NMDA pode ser o local de ação de antidepressivos. Tem sido demonstrado que antagonistas funcionais do complexo receptor NMDA, tais como o MK-801, exibem ações antidepressivas em modelos animais de depressão (Skolnick, 1999; Petrie et al., 2000). Skolnick (1999) propôs que os inibidores da ativação do receptor NMDA podem se constituir em uma nova classe de antidepressivos, com efeito terapêutico mais breve que os antidepressivos clássicos. No entanto, os antagonistas clássicos do receptor NMDA possuem efeitos colaterais indesejados (Kornhuber e Weller, 1997). Existem evidências de que os antidepressivos clássicos diminuem a ativação do receptor NMDA por diminuir a expressão das sub-unidades deste receptor (Skolnick, 1999). Também foi demonstrado que tratamentos com antidepressivos inibem funções do receptor NMDA, como a liberação de acetilcolina evocada por NMDA (Kiefer et al., 1999) e os antidepressivos tricíclicos parecem bloquear a ação do NMDA *in vitro* (Petrie et al., 2000). Desta forma, drogas que modulam a neurotransmissão glutamatérgica, particularmente em receptores NMDA, apresentam um eventual potencial terapêutico como antidepressivos.

Acredita-se que drogas moduladoras do receptor NMDA e do óxido nítrico possam ter várias indicações clínicas, incluindo dano cerebral isquêmico, trauma crânio-encefálico, epilepsia, analgesia e doenças neurodegenerativas (Yun et al., 1997; Trist, 2000). No entanto, o uso dessas substâncias, como analgésico e antidepressivo, é ainda limitado devido particularmente aos seus efeitos psicotomiméticos e alterações motoras.

1.5 AGMATINA

A agmatina é uma amina, que é sintetizada por descarboxilação da L-arginina pela enzima arginina descarboxilase (ADC). Ela foi primeiramente descoberta em 1910, por Kossel e é conhecida como um intermediário no metabolismo de poliaminas de várias bactérias, fungos, parasitas e fauna marinha, onde as poliaminas têm uma importante função no crescimento celular (Reis e Regunathan, 2000).

Em formas de vidas inferiores, a agmatina é metabolizada por hidrólise em putrescina e em outras poliaminas pela agmatina uril hidrolase (agmatinase). Como a putrescina é o precursor metabólico para a biossíntese de poliaminas (espermidina e espermina), a agmatina, portanto, representa um precursor metabólico importante para estas moléculas. A putrescina também pode ser gerada, em mamíferos, pela descarboxilação da ornitina pela enzima ornitina descarboxilase (Reis e Regunathan, 2000) (Fig.1).

Até meados de 1990, acreditava-se que a agmatina, a ADC e a agmatinase não fossem encontradas em mamíferos. Contudo, em 1994, durante a pesquisa para um ligante endógeno para o sítio de ligação imidazólico (I), uma molécula foi isolada do cérebro de mamíferos, a qual foi identificada como agmatina (Li et al., 1994). A ADC e, subsequentemente, agmatinase (Sastre et al., 1996) foram também identificadas no cérebro de mamíferos.

A agmatina não está presente somente no cérebro, mas também é amplamente encontrada em tecidos e soro (Raasch et al., 1995, 2001). Usando cromatografia líquida de alta performance, a agmatina foi demonstrada em quase todos os órgãos de ratos, nos quais, altas concentrações de agmatina são encontradas no estômago, seguido pela aorta, intestino

delgado e grosso; e em menores concentrações no pulmão, vaso deferente, adrenal, rim, coração, fígado, músculo esquelético, cérebro e testículo (Raasch et al., 1995, 2001).

Usando a técnica de imunohistoquímica, com anticorpos específicos contra a agmatina (Wang et al., 1995), a agmatina foi encontrada no cérebro de rato, regionalmente distribuída no córtex cerebral, tronco encefálico, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo. A distribuição de neurônios contendo agmatina se correlaciona com o padrão de distribuição de α_2 -adrenoceptores e sítios de ligação imidazólicos visto que: 1) na maior parte das regiões contendo agmatina também são expressos os α_2 -adrenoceptores e sítios de ligação imidazólicos (Raasch et al., 2001) e 2) os neurônios agmatinérgicos são encontrados em regiões do cérebro (por exemplo: córtex cerebral), na qual projetam-se para áreas que contêm α_2 -adrenoceptores e sítios de ligação imidazólicos (Raasch et al., 2001).

As células da glia não somente expressam sítios de ligação imidazólicos, mas também sintetizam a agmatina (Reis e Regunathan, 2000). Portanto, a agmatina pode ser sintetizada na glia, liberada para o espaço extracelular e depois transportada e armazenada nos neurônios para subsequente liberação. Esta possibilidade é suportada, pelo fato de que a agmatina está contida no fluido extracelular e depois é transportada e armazenada nos neurônios. Desta forma, a agmatina é sintetizada no cérebro, estocada em vesículas sinápticas, liberada mediante despolarização e inativada pela enzima agmatinase (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001) (Fig.2). Portanto a agmatina preenche a maioria dos critérios para ser considerada como um novo neurotransmissor/neuromodulador no SNC.

A biossíntese da agmatina pela ADC depende da disponibilidade da L-arginina, a qual é transportada para dentro do neurônio ou da glia, por um transportador específico. Dentro do tecido, a L-arginina é um substrato importante para a enzima ADC formar a

agmatina ou para a enzima óxido nítrico sintase (NOS) formar o óxido nítrico (NO) (Reis e Regunathan, 2000) (Fig.2).

Em fatias do cérebro de ratos e sinaptossomas, uma liberação de agmatina, mas nenhuma de putrescina pode ser mostrada em resposta à despolarização com cloreto de potássio (Reis e Regunathan, 1998). Na ausência de cálcio, a liberação de agmatina foi significativamente reduzida, sugerindo um mecanismo dependente de cálcio.

A agmatina pode ser biologicamente inativada no cérebro de mamíferos por captação, a qual é saturável somente em altas concentrações, e é dependente da temperatura e energia. Algumas drogas que atuam no sítio de ligação imidazólico (por exemplo: idazoxan ou fentolamina) são inibidores não competitivos da captação de agmatina (Sastre et al., 1997).

A agmatina tem várias ações farmacológicas. Periféricamente, a agmatina modula o metabolismo de insulina e glicose; causa liberação de insulina dependendo da dose das células da ilhota exposta à glicose, tem propriedades semelhantes à insulina nos adipócitos isolados, inibe a liberação de catecolaminas das células cromafins da adrenal e no rim, a agmatina é natriurética (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001). No SNC, a agmatina libera o hormônio liberador do hormônio luteinizante do hipotálamo e antagoniza alguns estados hiperalgésicos sem alterar a dor (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001). Dependendo da dose, a agmatina aumenta a analgesia da morfina, e cronicamente previne a tolerância à morfina (Kolesnikov et al., 1996). A agmatina mostrou ser neuroprotetora, reduzindo a quantidade de infartos isquêmicos ou perda de neurônios do hipocampo em modelos de isquemia focal ou global em roedores, respectivamente (Gilad et al., 1996; Olmos et al., 1999).

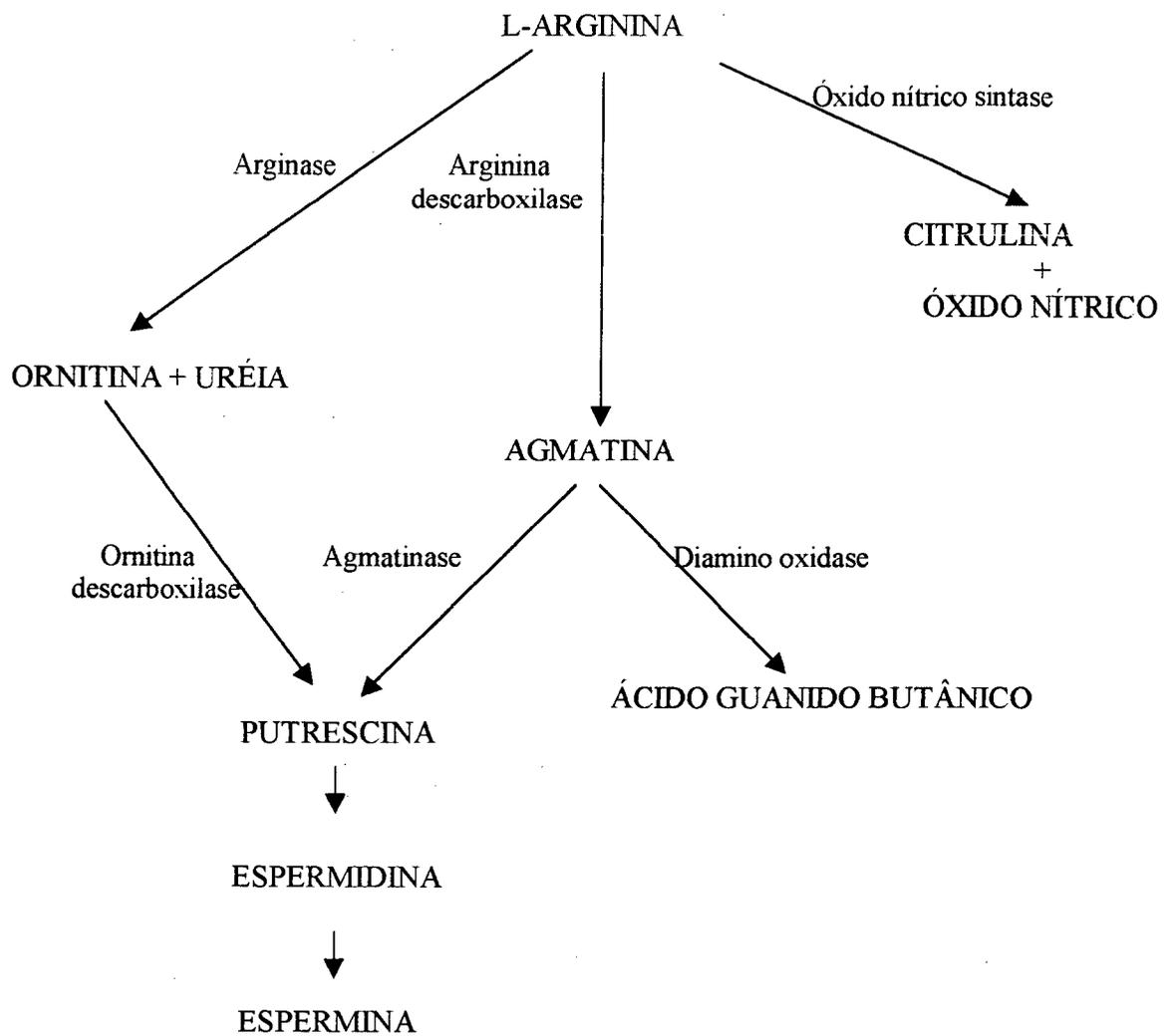


Fig.1. Vias metabólicas da agmatina em mamíferos. A agmatina é produzida a partir da L-arginina pela ação da enzima arginina descarboxilase. A agmatina pode depois ser metabolizada e produzir espermina durante a biossíntese de poliaminas, ou o ácido guanido butânico (Reis e Regunathan, 2000).

A agmatina liga-se com alta afinidade aos α_2 -adrenoceptores e aos receptores imidazólicos (RI) (Li et al., 1994; Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001). Os RI, uma nova família de receptores não-adrenérgicos, estão presentes no cérebro, especialmente no sistema límbico. Tem sido postulado que estes receptores, entre outras funções, possam atuar modulando a depressão e a nocicepção (Boronat et al., 1998; Halaris e Piletz, 2001). Foram identificados dois subtipos de sítios de ligação imidazólicos. O sítio de ligação I₁ está localizado no córtex frontal e no bulbo ventrolateral em área associada à regulação da pressão sanguínea. Funcionalmente, o sítio de ligação I₁ está associado com a regulação central da pressão sanguínea. O sítio de ligação I₂ tem sido demonstrado em vários tecidos como o cérebro, o fígado e o rim. Funcionalmente, o sítio de ligação I₂ tem sido caracterizado como um regulador da enzima monoamino oxidase (MAO) (Raasch et al., 2001). Estudos *in vitro* têm mostrado que ligantes seletivos do sítio I₂ reduzem a atividade da MAO (Raasch et al., 1999). O tratamento crônico com ligantes específicos I₂ reduz a atividade da MAO em vários órgãos do rato (Raasch et al., 1999). Além disto, a agmatina tem baixa afinidade por receptores α_1 e β -adrenérgicos, D₂-dopaminérgicos e 5-HT₃ (Li et al., 1994) (Fig.2).

Alguns trabalhos demonstram que a agmatina também é capaz de bloquear os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA e outros canais iônicos ativados por ligantes (ex. receptor nicotínico e 5-HT₃ ativado pela acetilcolina e serotonina, respectivamente), bem como inibir a enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Reis e Regunathan, 2000). A agmatina pode entrar pós-sinápticamente no neurônio via receptor nicotínico ou possivelmente através do canal do receptor NMDA, podendo se ligar no sítio de ligação I₂

ou inibir a NOS ou ainda, ser metabolizada a putrescina (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001) (Fig. 2).

A agmatina aplicada extracelularmente em culturas de neurônios hipocâmpais produziu um bloqueio das correntes iônicas evocadas por NMDA dependente de voltagem e de concentração, mas não alterou o fluxo iônico evocado por AMPA ou cainato. A análise do bloqueio do receptor NMDA pela agmatina sugere que esta se liga no sítio dentro do poro do canal (Yang e Reis, 1999).

É interessante observar que a agmatina é também um inibidor de todas as isoformas da NOS (Galea et al., 1996). A inibição é dependente da dose de agmatina, a qual compete com o substrato L-arginina.

A capacidade da agmatina de gerar poliaminas, de bloquear alguns tipos de canais iônicos e de inibir a síntese de óxido nítrico (NO), pode explicar os seus efeitos neuroprotetores em modelos de injúria cerebral (Gilad et al., 1996; Reis e Regunathan, 2000).

1.6 AGMATINA E DEPRESSÃO

Recentes evidências sugerem que a agmatina, um intermediário da biossíntese de poliaminas, pode ser um importante neurotransmissor em mamíferos, sendo capaz de modular vários estados fisiopatológicos envolvidos na depressão e na dor (Reis e Regunathan, 2000).

Vários achados indicam um potencial papel fisiopatológico dos sítios de ligação imidazólico no desenvolvimento da depressão: a densidade do sítio de ligação I₁ na membrana plasmática de plaquetas humanas está aumentada em pacientes com depressão,

em comparação com pacientes saudáveis, mas se normaliza após terapia com antidepressivos (Piletz e Halaris, 1995; Piletz et al., 1996). Os sítios de ligação imidazólico I₂ também se encontravam aumentados no córtex frontal de vítimas suicidas (Piletz et al., 1995).

Recentemente, foi demonstrado por Halaris et al. (1999) que a concentração plasmática de agmatina está elevada significativamente em pacientes com depressão, em comparação com indivíduos saudáveis (grupo controle). Neste estudo, o tratamento com o antidepressivo bupropion normalizou a concentração de agmatina no plasma.

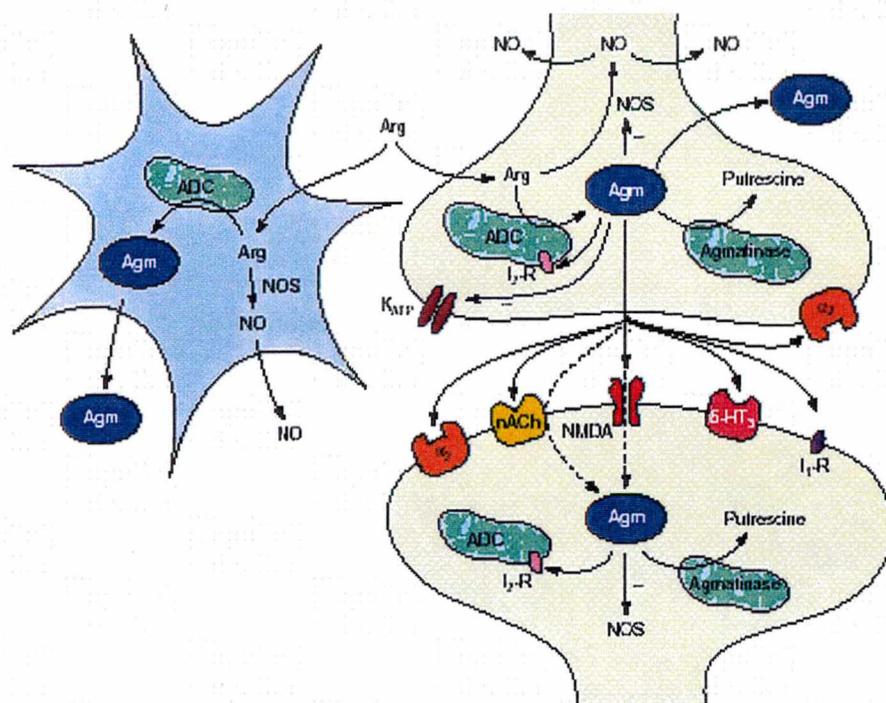


Fig.2. Esquema de uma sinapse agmatinérgica. A arginina entra no terminal ou na glia via um transportador e pode atuar como um substrato para a arginina descarboxilase (ADC) formar a agmatina ou para a óxido nítrico sintase formar o óxido nítrico (NO). A agmatina, tanto é sintetizada nos neurônios ou na glia e liberada para a fenda sináptica, ou armazenada em vesículas, é degradada pela agmatinase em putrescina. A agmatina pode também bloquear a NOS, interagir com receptores imidazólicos do sub-tipo I_2 (I_2 -R), inibir o canal de K_{ATP}^+ ou ser liberada do neurônio e interagir com vários receptores ligados ao canal iônico (incluindo NMDA, nicotínico ou $5-HT_3$), ou ligar aos receptores imidazólicos do sub-tipo I_1 (I_1 -R) ou α_2 -adrenoceptores. Ela pode também entrar pós-sinápticamente nos neurônios via receptores nicotínicos e possivelmente por receptor NMDA para ligar nos receptores I_2 , inibir a NOS ou ser metabolizada em putrescina. Abreviaturas: Agm, agmatina; Arg, arginina; nACh, receptor nicotínico de acetilcolina (Reis e Regunathan, 2000).

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar a ação antidepressiva da agmatina em modelos animais de depressão e seu mecanismo de ação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar o efeito da administração da agmatina por via intraperitoneal (i.p.) sobre o teste do nado forçado e o teste da suspensão da cauda em camundongos.
- Verificar o efeito da administração da agmatina por via intracerebroventricular (i.c.v.) sobre o teste do nado forçado.
- Investigar o envolvimento dos sistemas glutamatérgico, adrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, opióide e a via L-arginina-óxido nítrico na ação antidepressiva da agmatina no teste do nado forçado.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que a agmatina bloqueia o receptor NMDA e inibe todas as isoformas da NOS e considerando o conhecido envolvimento do receptor NMDA (Skolnick, 1999) e da via L-arginina óxido nítrico na modulação da depressão (da Silva et al., 2000; Yildiz et al., 2000), este trabalho se propôs a estudar o efeito antidepressivo da agmatina em modelos animais de depressão. Parte dos resultados foram recentemente publicados: ZOMKOWSKI, A.D.E., HAMMES, L., LIN, J., CALIXTO, J.B., SANTOS, A.R.S. e RODRIGUES, A.L.S. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *NeuroReport* 13(4): 387-391, 2002.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Drogas e reagentes

Foram utilizados ácido ascórbico, agmatina, ciproheptadina, fluoxetina, guanosina 5'-monofosfato (GMP), imipramina, ioimbina, L-arginina, metisergida, naloxona, naltrindol, p-clorofenilalanina metil éster (PCPA), pindolol, prazosin, cetanserina, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e sulpirida (Sigma, USA); DIPPA (2-(3,4-diclorofenil)-N-metil-N-[1S-1-(-3-isotiocianatofenil)-2-(-1-pirrolidinil) etil] acetamida) (Tocris, USA) e MK-801 (RBI, USA).

4.2. Animais e tratamentos

Foram utilizados camundongos Swiss, (n= 737) de ambos os sexos, pesando 30-40 g (60-80 dias de idade), mantidos com acesso livre à água e comida, em ciclo claro escuro de 12 horas (7:00-19:00) em temperatura de 22-27°C. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todas as observações foram feitas entre 9:00 e 16:00 horas, sendo que cada animal foi usado somente uma vez. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA).

Todas as drogas utilizadas (ácido ascórbico, agmatina, ciproheptadina, fluoxetina, GMP, imipramina, ioimbina, L-arginina, MK-801, metisergida, naloxona, naltrindol, PCPA, prazosim, cetanserina, SNAP e sulpirida) foram diluídas em salina, com exceção do

pindolol que foi diluído em salina com 1% de tween 80 e do DIPPA que foi diluído em salina com 10% de DMSO. As drogas foram administradas nos camundongos pela via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg de peso corporal. A agmatina foi administrada pela via i.p. 30 minutos antes do teste do nado forçado (TNF), do teste da suspensão da cauda (TSC) ou do teste do campo aberto. Alternativamente, a agmatina foi administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.) 15 minutos antes do TNF ou do teste do campo aberto. A administração por via i.c.v. foi realizada com a inserção da agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno à microseringa Hamilton de 10 µl, em camundongos levemente anestesiados com éter, diretamente no ventrículo lateral com a fissura bregma como referência (1 mm lateral e 1mm posterior ao bregma e 2,4 mm de profundidade). Salina, agmatina ou SNAP, foram injetadas em um volume de 5 µl durante 30 s, e a cânula permaneceu no local da injeção por mais 30 s, conforme descrito por Eckeli et al. (2000).

4.3. Testes comportamentais

4.3.1. Teste do nado forçado (TNF)

O tempo de imobilidade dos camundongos foi avaliado durante um período de 6 minutos, em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água a temperatura de 25°C ± 1°C de acordo com o método descrito por Porsolt et al. (1977).

4.3.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)

Os camundongos isolados acústica e visualmente, foram suspensos pelo menos 50 cm acima do chão e suspensos com fita adesiva pela extremidade da cauda. O tempo de imobilidade foi avaliado durante um período de 6 minutos de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985).

4.3.3. Campo aberto

A fim de excluir a possibilidade de que um eventual efeito antidepressivo, ou seja, uma diminuição do tempo de imobilidade no TNF e no TSC seja devido a um aumento na atividade locomotora, os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto, como descrito por Rodrigues et al. (1996).

O teste foi realizado em caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com chão dividido em 12 quadrados iguais. A parte frontal da caixa é de vidro, para facilitar o trabalho do observador. O número de quadrados cruzados com todas as patas por sessão foi o parâmetro usado para avaliar a atividade locomotora. Cada sessão teve a duração de 6 minutos.

4.4. Curva-dose-resposta da agmatina

4.4.1. TNF e TSC (i.p.)

A fim de investigar o efeito antidepressivo da agmatina no TNF e no TSC, os animais receberam injeções de salina (grupo controle) ou de agmatina (0,01-50 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF ou TSC.

4.4.2. TNF (i.c.v.)

Com o objetivo de verificar se o efeito antidepressivo da agmatina é devido a um mecanismo central, os animais receberam injeções de salina (controle) ou de agmatina (1-100 nmol/sítio, i.c.v.). Decorridos 15 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

4.5. Análise do mecanismo de ação antidepressiva da agmatina através de estudos farmacológicos *in vivo*

A fim de analisar os possíveis mecanismos de ação pelos quais a agmatina possa estar produzindo efeito antidepressivo, os seguintes sistemas foram analisados:

4.5.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico:

Para investigar o possível efeito da guanosina 5'-monofosfato (GMP) na ação antidepressiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou GMP (100 mg/kg, i.p., nucleotídeo que antagoniza várias ações induzidas por ativação do receptor NMDA, dose que não produziu efeito *per se* no TNF) (Eckeli et al., 2000). Decorridos 30 minutos, os animais receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina e foram testados 30 minutos depois no TNF.

Com o objetivo de investigar o efeito do ácido ascórbico na ação antidepressiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p., antioxidante que modula o sítio redox do receptor NMDA) ou salina. Decorridos 30 minutos, os animais receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina e 30 minutos depois foram testados no TNF.

Para verificar um possível efeito aditivo entre a agmatina/MK-801, agmatina/imipramina ou imipramina/MK-801 e reforçar a hipótese de a ação da agmatina ser devido ao bloqueio dos receptores NMDA, os animais foram tratados com salina, agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p., inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina). Decorridos 15 minutos, os animais receberam injeção de salina, ou MK-801 (0,01 mg/kg, i.p., antagonista não competitivo do receptor NMDA), conforme a tabela abaixo.

| Tratamento | Dose (mg/kg, i.p.) | Tempo de administração antes do teste |
|---------------------|-----------------------|--|
| Salina/salina | - / - | 30min/15min |
| Imipramina/salina | 15 / - | 30min/15min |
| Agmatina/salina | 10 / - | 30min/15min |
| Salina/MK-801 | - / 0,01 | 30min/15min |
| Agmatina/MK-801 | 10 / 0,01 | 30min/15min |
| Imipramina/MK-801 | 15 / 0,01 | 30min/15min |
| Agmatina/Imipramina | 10 / 15 | 30min |

4.5.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico:

Com o objetivo de evidenciar o envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico sobre na atividade antidepressiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou L-arginina (750 mg/kg i.p., um precursor do óxido nítrico, dose que não produziu efeito *per se* no TNF) (da Silva et al., 2000; Rodrigues et al., 2002). Depois de 30 minutos receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, do tratamento os animais foram submetidos ao TNF. Em um experimento independente, para certificar se a ação da agmatina é devido a uma interação com a via L-arginina-óxido nítrico, os animais foram pré-tratados com SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., doador de óxido nítrico) ou salina. Decorridos 15 minutos, os animais receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina e 30 minutos depois foram testados no TNF.

4.5.3. Envolvimento do sistema adrenérgico:

A fim de investigar o envolvimento do sistema adrenérgico no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina (grupo controle), prazosim (62,5 µg/kg, i.p., antagonista α_1 -adrenérgico), ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., antagonista α_2 -adrenérgico) e depois de 15 minutos receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

4.5.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico:

A fim de investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva da agmatina, os animais foram tratados com p-clorofenilalanina metil éster (PCPA) conforme descrito previamente (Eckeli et al., 2000; Rodrigues et al., 2002). O tratamento consiste em tratar os animais uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos com PCPA, inibidor da síntese de serotonina, na dose de 100 mg/kg, i.p. Quinze minutos após a última injeção de PCPA, a agmatina (10 mg/kg, i.p.), fluoxetina (32 mg/kg, i.p., inibidor da recaptção de serotonina, controle positivo) ou salina foram injetadas e o TNF foi realizado após 30 minutos.

Com o objetivo de investigar o envolvimento de receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou metisergida (5 mg/kg, i.p., antagonista serotoninérgico não seletivo) ou ciproheptadina (3 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT₂) ou cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT_{2A}) e depois de 30 minutos receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Após 30 minutos os

animais foram submetidos ao TNF. Alternativamente, para investigar se o pindolol potencia o efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou pindolol em dose sub-ativa (32 mg/kg, i.p., bloqueador beta adrenérgico com atividade antagonista 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}) (Redrobe et al., 1996) e após 15 minutos receberam injeção de salina ou doses subativas de agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (12 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF.

4.5.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico:

Com o objetivo de investigar o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou sulpirida (50 mg/kg, i.p., um antagonista seletivo de receptores dopaminérgicos-D₂) e depois de 30 minutos receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

4.5.6. Envolvimento do sistema opióide:

Com o objetivo de evidenciar o envolvimento do sistema opióide na atividade antidepressiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina ou naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de receptores opióides). Depois de 15 minutos receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

A fim de investigar a participação de sub-tipos de receptores opióides no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina, naltrindol (3mg/kg

i.p., antagonista de receptores δ -opioides). Após 30 minutos, receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF. Alternativamente, os animais foram pré-tratados com DIPPA (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores κ -opioides) (Kuzmin et al., 2000) e após 48 horas, receberam injeção de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos, foram submetidos ao TNF.

4.6. Análise estatística

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

5. RESULTADOS

5.1. Efeito antidepressivo da agmatina

5.1.1. Efeito da administração sistêmica e central de agmatina no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC)

A administração i.p. de agmatina produziu efeito antidepressivo tanto no TNF quanto no TSC em camundongos nas doses de 0,01-50 mg/kg (Figura 3a e 3b, respectivamente). O efeito da agmatina em ambos os testes foi semelhante ao efeito produzido pelo antidepressivo tricíclico imipramina na dose de 15 mg/kg, i.p. A agmatina não causou alteração significativa na locomoção no campo aberto nas doses de 0,01 a 50 mg/kg, i.p., quando comparada ao grupo controle (dados não mostrados).

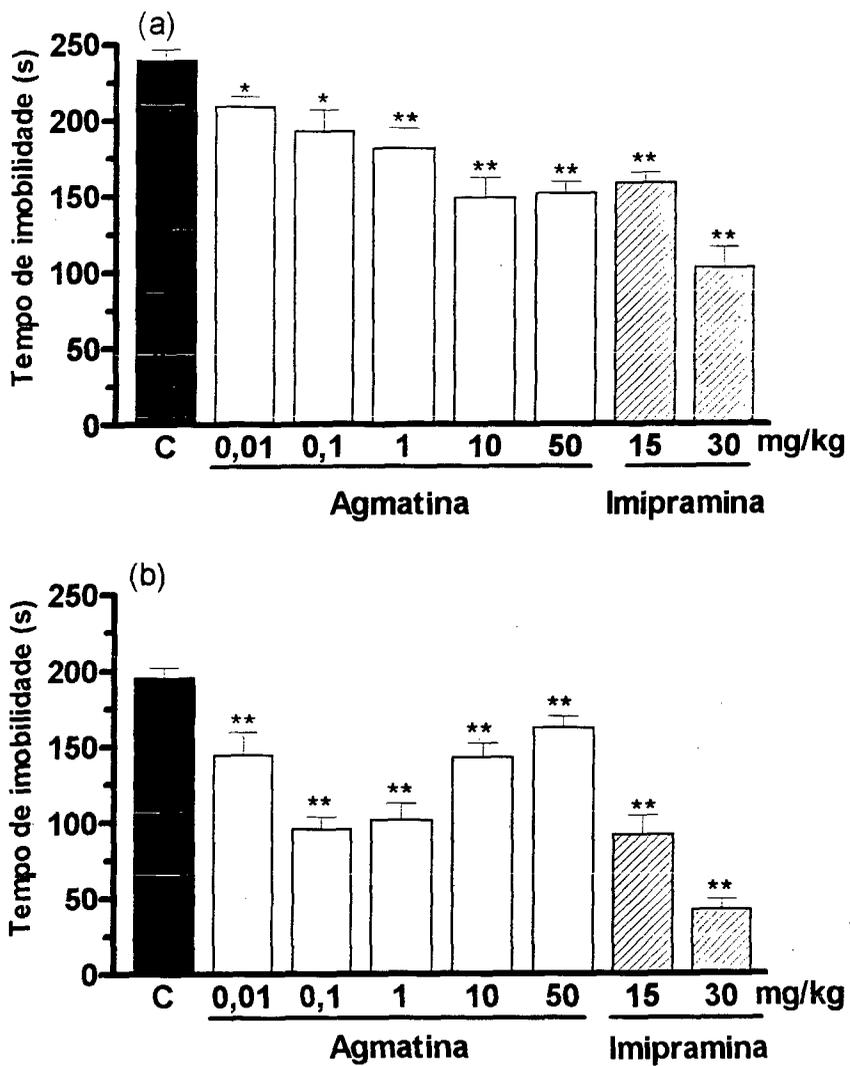


Figura 3. Efeito do tratamento com agmatina (0,01-50 mg/kg, i.p.) no teste do nado forçado (a) e no teste da suspensão da cauda (b) em camundongos. A agmatina foi administrada 30 min antes dos testes. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8-14). *p < 0,05 e ** p < 0,01 comparado com o grupo controle (C; salina).

A fim de verificar o efeito da administração central de agmatina sobre o tempo de imobilidade no TNF, os camundongos receberam injeções de agmatina nas doses de 0,1, 1, 10 e 100 nmol/sítio. A figura 4 mostra que a agmatina também produziu efeito antidepressivo quando administrada por via i.c.v., sendo seu efeito significativo nas doses de 1-100 nmol/sítio. A agmatina administrada i.c.v. (1 a 100 nmol/sítio) não causou efeito significativo na atividade locomotora dos animais no campo aberto, quando comparada ao grupo controle (dados não mostrados).

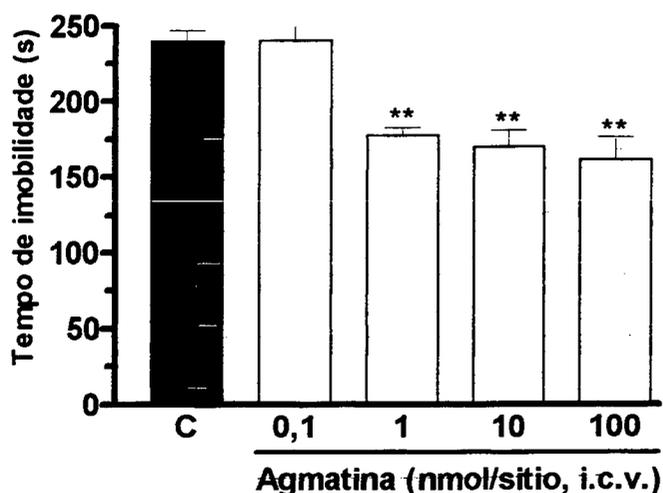


Figura 4. Efeito do tratamento com agmatina (0,1-100 nmol/sítio, i.c.v.) no teste do nado forçado em camundongos. Agmatina foi administrada 15 min antes do teste. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8-9). **p < 0,01 comparado com o grupo controle (C; salina).

5.2. Estudo do mecanismo de ação antidepressiva da agmatina

5.2.1. Envolvimento do sistema glutamatérgico:

Com o objetivo de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito antidepressivo da agmatina no TNF, os camundongos foram pré-tratados com GMP ou com ácido ascórbico. O pré-tratamento dos animais com GMP ou com ácido ascórbico, reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figuras 5a e 5b , respectivamente).

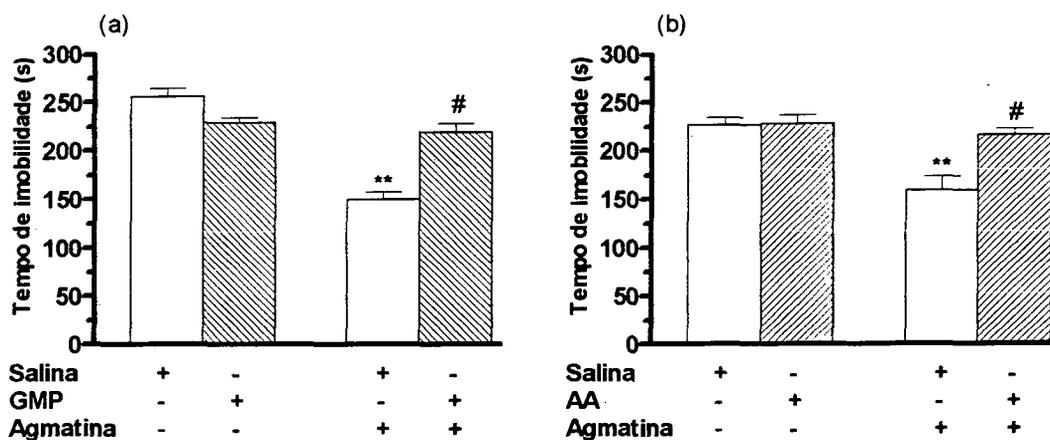


Figura 5. Efeito do pré-tratamento dos animais com GMP (100mg/kg, i.p.) (a) ou com ácido ascórbico (AA, 100 mg/kg, i.p.) (b) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com GMP ou com AA 30 minutos antes da administração de agmatina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 6-8). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina na ausência de GMP ou de AA.

A fim de verificar se o efeito da agmatina é devido ao bloqueio do receptor NMDA, a agmatina, o MK-801 e a imipramina foram administrados sozinhos ou em combinação no TNF. A imipramina, um antidepressivo tricíclico, e o antagonista não competitivo do receptor NMDA,

MK-801, diminuíram significativamente o tempo de imobilidade no TNF, assim como a agmatina. O tempo de imobilidade dos camundongos tratados com MK-801 + agmatina não foi significativamente diferente do tempo de imobilidade dos camundongos tratados apenas com MK-801 ou com agmatina. Por outro lado, o tratamento combinado de agmatina com imipramina, bem como do MK-801 com imipramina, induziu um efeito maior no TNF do que a administração de cada droga sozinha (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da agmatina, MK-801 e imipramina sozinhas ou em combinação no tempo de imobilidade do TNF.

| Tratamento | Dose (mg/kg, i.p.) | Tempo de imobilidade (s / 6 min) |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Salina/salina | - / - | 240,8 ± 3,5 |
| Imipramina/salina | 15 / - | 142,3 ± 8,2** |
| Agmatina/salina | 10 / - | 159,1 ± 8,7** |
| Salina/MK-801 | - / 0,01 | 169,7 ± 8,1** |
| Agmatina/MK-801 | 10 / 0,01 | 174,0 ± 8,2** ^a |
| Imipramina/MK-801 | 15 / 0,01 | 113,5 ± 7,7** ^b |
| Agmatina/Imipramina | 10 / 15 | 104,4 ± 7,5** ^c |

Agmatina e imipramina foram administradas 30 min antes do teste. O MK-801 foi injetado 15 min antes do teste. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n = 7-9). ** p<0,01 em relação ao controle tratado com salina, ^a p<0,01 comparado com os grupos imipramina/salina, imipramina/MK-801 e agmatina/imipramina, ^b p<0,01 comparado com o grupo salina/MK-801 e p<0,05 comparado com o grupo imipramina/salina, ^c p<0,01 comparado com o grupo imipramina/salina e agmatina/salina.

5.2.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico:

O pré-tratamento dos animais com L-arginina (precursora de óxido nítrico) reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figura 6a). Em um experimento independente, para fornecer evidências adicionais de que a ação antidepressiva da agmatina no TNF pode ser devido a uma interação com a via L-arginina-óxido nítrico, os animais foram pré-tratados com SNAP para verificar a possível reversão do efeito da agmatina no TNF. O pré-tratamento dos animais com SNAP reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figura 6b).

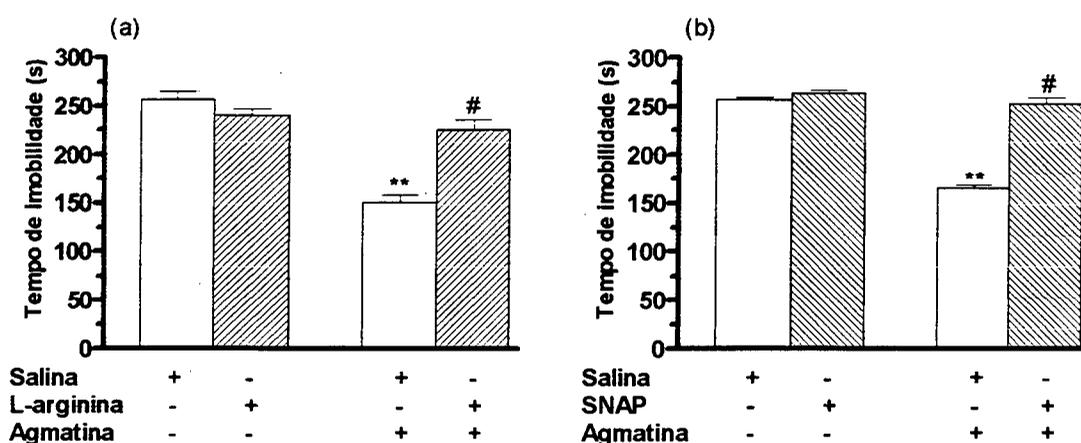


Figura 6. Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p.) (a) ou com SNAP (25 µg/sítio, i.c.v.) (b) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com L-arginina ou com SNAP 30 minutos ou 15 minutos, antes da administração de agmatina, respectivamente. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 6-8). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina na ausência da L-arginina ou de SNAP.

5.2.3. Envolvimento do sistema adrenérgico:

Com o objetivo de investigar o envolvimento do sistema adrenérgico no efeito antidepressivo da agmatina no TNF, os camundongos foram pré-tratados com prazosim ou com ioimbina. O pré-tratamento dos animais com prazosim não reverteu a diminuição do tempo de imobilidade causada pela agmatina no TNF (Figura 7a). Por outro lado, o pré-tratamento com ioimbina reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figuras 7b)

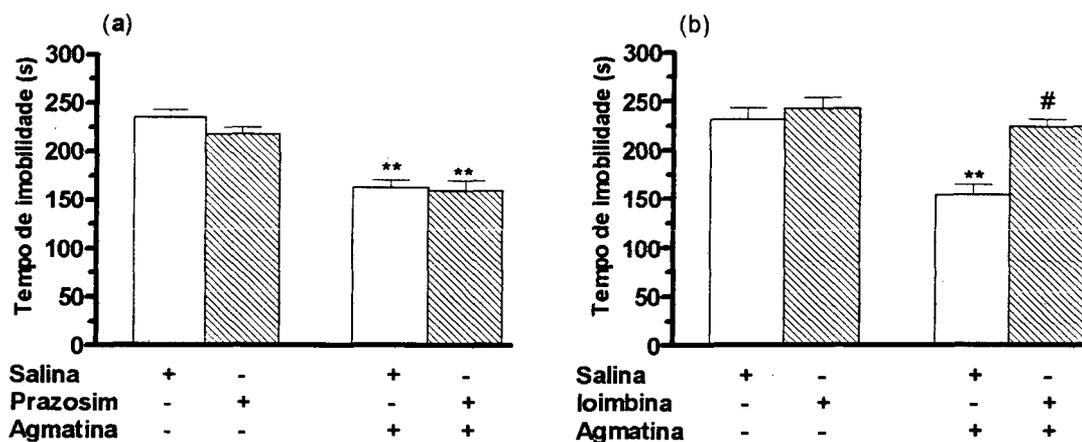


Figura 7. Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim (62,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) (a) ou com ioimbina (1 mg/kg, i.p.) (b) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com prazosim ou ioimbina 15 minutos antes da administração de agmatina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina na ausência de ioimbina.

5.2.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico:

Com a finalidade de estudar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo da agmatina, os camundongos foram pré-tratados com p-clorofenilalanina metil éster (PCPA). O pré-tratamento dos animais com PCPA reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF. Os animais também foram tratados com fluoxetina (controle positivo). O pré-tratamento dos camundongos com PCPA reverteu o efeito antidepressivo da fluoxetina (Figura 8).

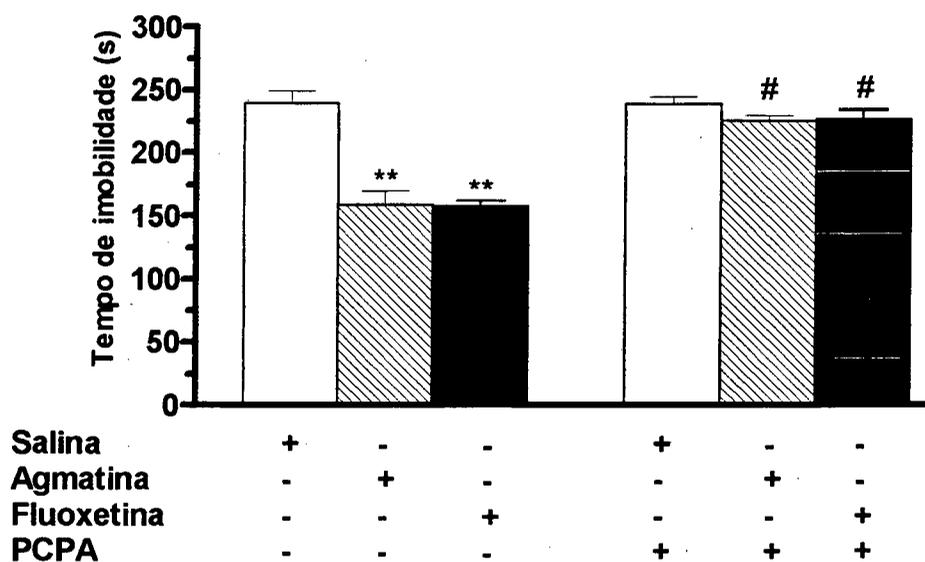


Figura 8. Efeito do pré-tratamento dos animais com PCPA (100 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com PCPA durante 4 dias consecutivos. Quinze minutos após a última injeção de PCPA a agmatina ou fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) foram injetadas. O TNF foi realizado após 15 minutos. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8-10). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina ou fluoxetina na ausência do PCPA.

A fim de evidenciar o envolvimento de sub-tipos de receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com salina, metisergida, ciproheptadina ou cetanserina para verificar a possível reversão do efeito da agmatina no TNF. O pré-tratamento dos animais com metisergida, ciproheptadina ou cetanserina, reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figuras 9a, 9b e 9c, respectivamente).

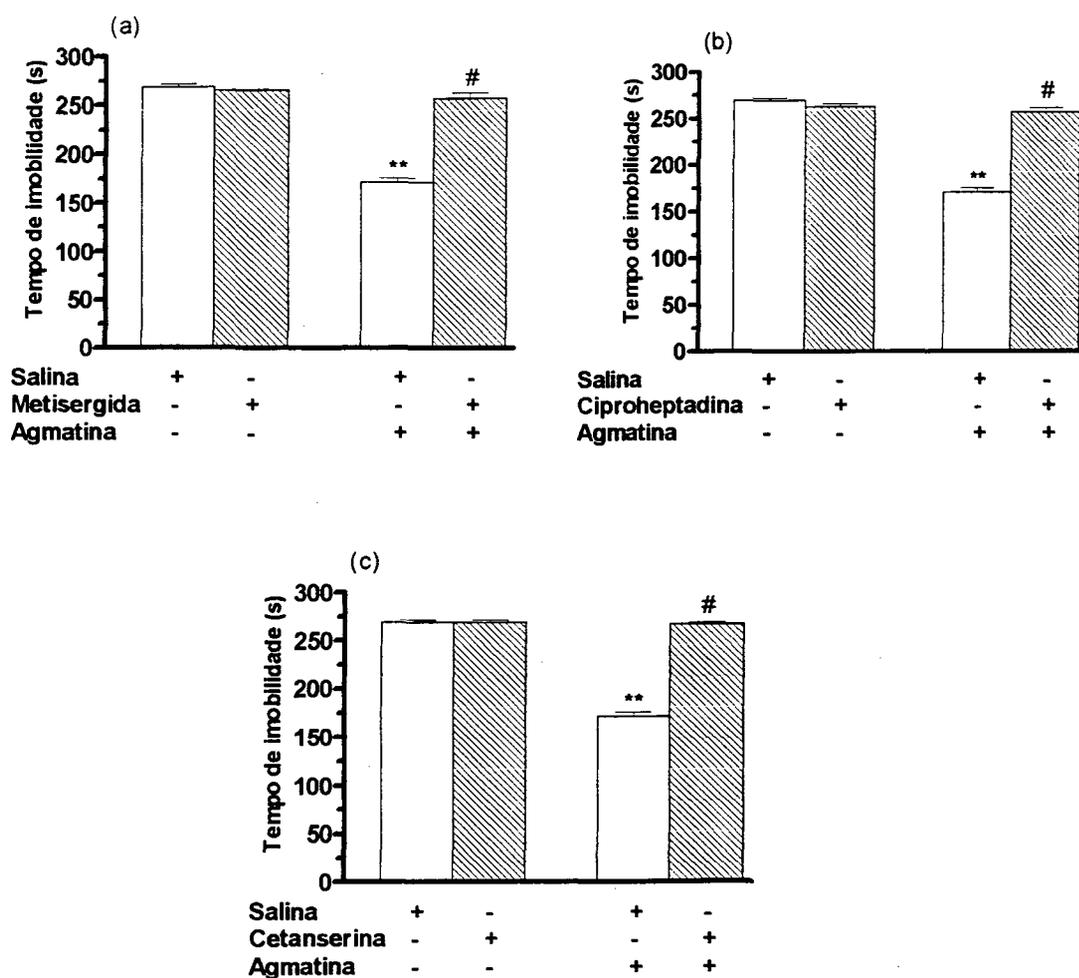


Figura 9. Efeito do pré-tratamento dos animais com metisergida (5 mg/kg, i.p.) (a), com ciproheptadina (3 mg/kg, i.p.) (b) ou com cetanserina (5 mg/kg, i.p.) (c) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com metisergida, ciproheptadina ou cetanserina 30 minutos antes da administração de agmatina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 6). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina na ausência do antagonista.

Em um outro experimento, os animais foram pré-tratados com pindolol. O pré-tratamento dos animais com pindolol potencializou o efeito antidepressivo da agmatina e da fluoxetina (controle positivo) no TNF (Figura 10).

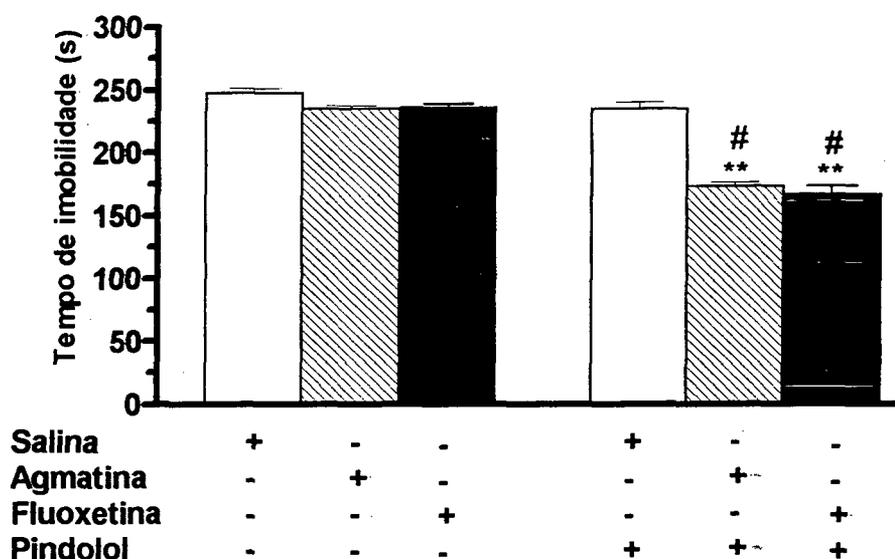


Figura 10. Efeito do pré-tratamento dos animais com pindolol (32 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com pindolol 15 minutos antes da administração de agmatina ou da fluoxetina (12 mg/kg, i.p.). O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina ou fluoxetina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 6). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina ou fluoxetina na ausência do antagonista.

5.2.5. Envolvimento do sistema dopaminérgico:

Com o objetivo de evidenciar o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antidepressivo da agmatina no TNF, os camundongos foram pré-tratados com sulpirida. O pré-tratamento dos animais com sulpirida não reverteu a diminuição do tempo de imobilidade causada pela agmatina no TNF (Figura 11).

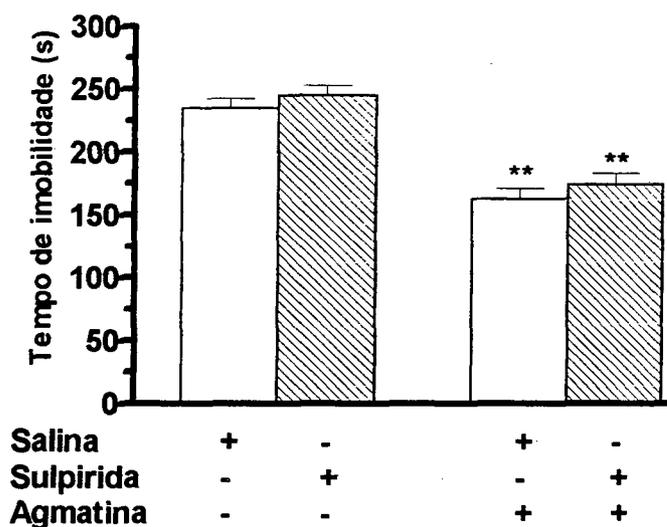


Figura 11. Efeito do pré-tratamento dos animais com sulpirida (50 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com sulpirida 30 minutos antes da administração de agmatina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n = 8). **p < 0,01 quando comparado com grupo controle (salina).

5.2.6. Envolvimento do sistema opióide:

A fim de verificar o envolvimento do sistema opióide no efeito antidepressivo da agmatina no TNF, os camundongos foram pré-tratados com naloxona. O pré-tratamento dos animais com naloxona reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figura 12a). Com o objetivo de investigar a participação de sub-tipos de receptores opióides no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram pré-tratados com naltrindol ou com DIPPA. O pré-tratamento dos animais com naltrindol, mas não com DIPPA, reverteu o efeito antidepressivo da agmatina no TNF (Figuras 12b e 12c, respectivamente).

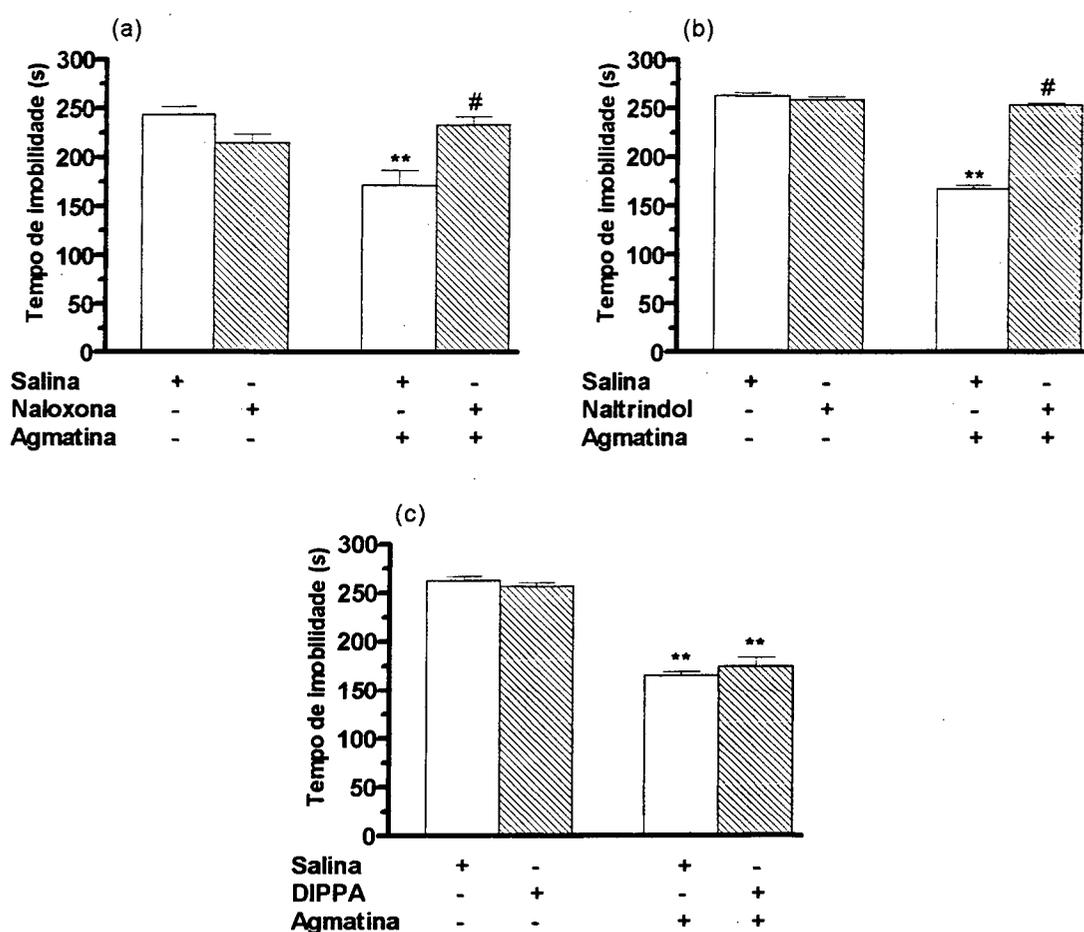


Figura 12. Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) (a), com naltrindol (3 mg/kg, i.p.) (b) ou com DIPPA (1 mg/kg, i.p.) (c) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com naloxona, naltrindol ou DIPPA 15 minutos, 30 minutos ou 48h, antes da administração de agmatina, respectivamente. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. (n =7-11). **p < 0,01 quando comparado com o grupo controle (salina), # p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com agmatina na ausência do antagonista.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostram pela primeira vez que a agmatina administrada sistemicamente (por via i.p.) ou centralmente (por via i.c.v.), é efetiva em produzir um efeito antidepressivo, quando avaliada no TNF, um modelo animal de depressão em camundongos. A ação antidepressiva da agmatina administrada i.p. foi confirmada no TSC.

Tanto o TNF como o TSC, são aceitos como modelos de depressão amplamente usados para a triagem de novas drogas antidepressivas. Estes testes são sensíveis e relativamente específicos para a maioria das drogas antidepressivas incluindo tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, inibidores da monoamino oxidase e atípicos (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). No TNF, os camundongos são forçados a nadar em um espaço restrito, do qual não têm como escapar, e depois de um período inicial de agitação, cessa a tentativa de escape e tornam-se imóveis. De forma semelhante, no TSC, os camundongos suspensos pela cauda inicialmente executam movimentos vigorosos para escapar, seguido por imobilidade. A imobilidade dos camundongos após este período de estresse tem sido considerada como resultado de um estado de desespero ou falha para a adaptação ao estresse. Esta condição parece ser semelhante à depressão humana (Steru et al., 1985; Willner, 1991). Os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade dos camundongos em ambos os testes (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). Foram relatadas diferenças de sensibilidade entre os dois testes em relação ao efeito de redução do tempo de imobilidade de alguns antidepressivos (Vaugeois et al., 1997). O TSC parece ser menos estressante que o TNF e possui maior sensibilidade farmacológica (Thierry et al., 1986). No presente estudo o TSC foi mais sensível para avaliar os efeitos antidepressivos da agmatina. No entanto, o TNF apresenta resultados mais reprodutíveis e por ser o modelo animal de

depressão mais usado na literatura (Cryan et al., 2002), foi escolhido para o estudo do mecanismo de ação da agmatina, utilizando antagonistas farmacológicos.

É importante notar que o efeito antidepressivo da agmatina foi também demonstrado depois da administração por via i.c.v., similar ao produzido pela sua administração sistêmica. Este fato sugere que a agmatina exerce sua ação antidepressiva por mecanismos centrais e não por mecanismos periféricos.

O efeito antidepressivo da agmatina não está associado a nenhum efeito motor, pois as doses nas quais a agmatina causou uma marcada ação antidepressiva, não afetaram significativamente a locomoção no teste do campo aberto. Isto indica que um efeito psicoestimulante não é responsável pela diminuição da imobilidade da agmatina no TNF e no TSC, indicando que o seu efeito antidepressivo é específico. Este achado é de potencial relevância fisiológica, visto que a agmatina pode ser um importante modulador da depressão. O papel da agmatina como modulador da depressão tem sido sugerido em estudos clínicos. Foi recentemente demonstrado que a concentração de agmatina no plasma estava significativamente elevada em pacientes com depressão, comparados com os indivíduos saudáveis (Halaris et al., 1999). Atualmente, apesar do fato de a agmatina ser reconhecida como um neurotransmissor/neuromodulador no SNC, suas funções fisiológicas no SNC não estão bem estabelecidas (Reis e Regunathan, 1999). A agmatina tem sido proposta como um agonista endógeno de receptores imidazólicos (Reis e Regunathan, 1999; Raasch et al., 2001). Contudo, alguns de seus efeitos no SNC, parecem ser mediados através do bloqueio do receptor NMDA e/ou inibição da NOS (Reis e Regunathan, 1999; Raasch et al., 2001).

Portanto, considerando que a agmatina bloqueia o receptor NMDA e inibe todas as isoformas da NOS e considerando a participação do receptor NMDA (Skolnick, 1999) e da

via L-arginina óxido nítrico na modulação da depressão (Harkin et al., 1999; da Silva et al., 2000; Yildiz et al., 2000), foi testada a hipótese de estes alvos moleculares serem importantes para o papel modulatório da agmatina na depressão.

O envolvimento do receptor NMDA na diminuição do tempo de imobilidade causada pela agmatina pode ser inferido pela demonstração de que o pré-tratamento dos camundongos com GMP, em uma dose que não produziu efeito no TNF (Eckeli et al., 2000), bloqueou completamente o efeito antidepressivo da agmatina no TNF. O GMP é um nucleotídeo da guanina endógeno, presente em altas concentrações no SNC (Regner et al., 1997), que antagoniza algumas ações do GLU e seus agonistas (Malcon et al., 1997; Regner et al., 1998; Schmidt et al., 2000). Eckeli et al. (2000), recentemente demonstraram que o tratamento agudo com GMP, dependendo da sua dose, produz efeitos antidepressivos no TNF e TSC, provavelmente através da inibição do receptor NMDA. Deste modo, é possível que o pré-tratamento com este nucleotídeo tenha diminuído a ativação do receptor NMDA como previamente sugerido (Eckeli et al., 2000) e, desta forma, tenha prevenido a ligação da agmatina ao receptor NMDA. Tem sido demonstrado que a agmatina e drogas imidazólicas exercem efeito modulatório *in vitro* sobre o receptor NMDA, como evidenciado pela sua capacidade de inibir a união específica (“binding”) do MK-801 no córtex cerebral e por ser neuroprotetora em relação à morte celular induzida por NMDA (Olmos et al., 1999). A agmatina aplicada extracelularmente em cultura de neurônios hipocâmpais produziu um bloqueio do receptor NMDA dependente de voltagem e concentração, mas não afetou os receptores AMPA e cáinato, por interagir com o sítio localizado dentro do poro do canal NMDA (Yang e Reis, 1999).

Nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos animais com ácido ascórbico (AA), em uma dose que não produziu efeito no TNF, reverteu o efeito antidepressivo da

agmatina. Estudos sugerem que o receptor NMDA contém centros regulatórios sensíveis ao estado redox. O fenômeno redox modula a atividade do receptor NMDA (Choi e Lipton, 2000). Alguns redutores, tais como o AA e a hidroquinona, inibem a função dos receptores NMDA, enquanto que outros como o mercaptoetanol e penicilamina potenciam a função deste receptor (Majewska et al., 1990). Além disso, o AA em concentrações fisiológicas antagoniza as funções do receptor NMDA e é possível que o AA possa funcionar como um agente neuroprotetor (Majewska et al., 1990). Deste modo, o AA poderia estar inibindo a função do receptor NMDA e, desta forma, impedindo que a agmatina ligue-se ao receptor. Como foi anteriormente demonstrado por Yang e Reis (1999) a agmatina bloqueia o receptor NMDA ligando-se dentro do poro do canal. Nossos dados em conjunto sugerem que a agmatina possa produzir sua ação antidepressiva por bloquear o receptor NMDA, visto que o pré-tratamento com AA, assim como com GMP, já mencionado anteriormente, bloqueou sua ação. O AA protege neurônios corticais em culturas dos efeitos tóxicos do GLU por atuar no receptor NMDA (Majewska et al., 1990). Este efeito neuroprotetor também foi demonstrado pela agmatina (Olmos et al., 1999).

Nossos dados mostram que não houve efeito sinérgico ou aditivo no tempo de imobilidade dos camundongos tratados com o antagonista do receptor NMDA, o MK-801, depois da administração de agmatina. Estes resultados reforçam a idéia que a agmatina pode exercer seu efeito antidepressivo por bloquear a ativação do receptor NMDA, deste modo prevenindo a ligação do MK-801 ao receptor NMDA. É bem conhecido que o MK-801 preferencialmente liga ao receptor NMDA ativado (Javitt e Zukin, 1989), interagindo com o sítio localizado dentro do poro do canal do NMDA, de forma semelhante ao demonstrado para a agmatina (Yang e Reis, 1999). Nossos dados também mostram um efeito aditivo da agmatina com a imipramina, assim como do MK-801 com a imipramina, na redução do tempo

de imobilidade no TNF, de forma similar aos resultados previamente demonstrados com o tratamento de GMP com imipramina e do MK-801 com a imipramina (Eckeli et al., 2000). Dados da literatura também mostram um efeito antidepressivo aditivo do tratamento combinado do MK-801 com a imipramina (Maj et al., 1992). Deste modo, o efeito aditivo da agmatina com a imipramina e do MK-801 com a imipramina pode ser devido a um mecanismo de ação diferente dessas drogas. Portanto, a agmatina parece exercer seu efeito antidepressivo no TNF por um mecanismo similar ao MK-801 e GMP. Este mecanismo pode ser primariamente dependente da inibição do receptor NMDA. A agmatina, o MK-801 e o GMP compartilham a mesma propriedade de atuar como agentes neuroprotetores sob condições excitotóxicas (Olmos et al., 1999; Eckeli et al., 2000). Considerando que a depressão maior foi recentemente associada ao comprometimento na sinalização de vias que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (Manji et al., 2001), o papel neuroprotetor desses agentes pode ter um significado fisiológico para a modulação da depressão.

O envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico na modulação da depressão tem sido estudado. Estudos têm demonstrado que inibidores da NOS, dependendo de sua dose, produzem efeito antidepressivo em modelos animais de depressão (Yildiz et al., 2000; da Silva et al., 2000). Nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos camundongos com o substrato da NOS, L-arginina, em dose que não produziu efeito no TNF, bloqueou a redução da imobilidade causada pela agmatina, sugerindo que, ao menos em parte, o efeito antidepressivo da agmatina, pode ser devido à inibição da NOS. Evidências experimentais demonstram que o NO está envolvido com funções neuronais fisiológicas, tais como, plasticidade sináptica, incluindo aprendizagem e memória *in vivo*, bem como uma variedade de desordens neurológicas na qual uma produção excessiva de NO induz dano

neuronal (Yun et al., 1997). No cérebro o NO é produzido principalmente em estruturas pós-sinápticas em resposta à ativação do receptor NMDA (Denninger e Marletta, 1999). A ativação da NOS é consequência da estimulação do receptor NMDA e está ligada ao influxo de cálcio através deste receptor (Yun et al., 1997). A agmatina pode entrar no neurônio pós-sináptico via receptor nicotínico e possivelmente através do canal do receptor NMDA para competitivamente inibir a NOS (Reis e Regunathan, 1999, 2000).

Em um outro experimento, o pré-tratamento dos animais com um doador de óxido nítrico, o SNAP, em dose que não produziu efeito no TNF, bloqueou a redução da imobilidade causada pela agmatina. Este resultado reforça a idéia que a agmatina pode exercer seu efeito antidepressivo por inibir a formação de NO, visto que o SNAP doa óxido nítrico diretamente sem envolver a enzima NOS. Como foi anteriormente citado, estudos têm demonstrado o papel do óxido nítrico na modulação da depressão (Harkin et al., 1999; Yildiz et al., 2000; da Silva et al., 2000).

Vários estudos têm demonstrado alterações na transmissão noradrenérgica na depressão (Ressler e Nemeroff, 1999; Wong e Licinio, 2001). Portanto, a noradrenalina tem um papel importante na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (Ressler e Nemeroff, 1999).

A ausência de efeito do prazosim (antagonista de α_1 -adrenoceptores) em bloquear o efeito antidepressivo da agmatina no TNF está de acordo com o fato que a agmatina tem baixa afinidade para α_1 -adrenoceptores (Li et al., 1994). Este resultado sugere provavelmente que sua ação antidepressiva não seria mediada por receptores α_1 -adrenérgicos.

Em outro experimento, nossos resultados mostram que o efeito antidepressivo da agmatina envolve, pelo menos em parte, uma interação com α_2 -adrenoceptores, uma vez que a ioimbina (antagonista de α_2 -adrenoceptores) na dose que não produziu efeito no TNF, significativamente bloqueou o efeito antidepressivo da agmatina. De fato, tem sido mostrado que a agmatina se liga a α_2 -adrenoceptores (Raasch et al., 2001). Um recente estudo demonstrou que a capacidade da agmatina de potencializar o efeito analgésico induzido pela morfina, foi também bloqueada pela ioimbina (Yesilyurt e Uzbay, 2001), indicando que, neste caso, a agmatina atua por um mecanismo mediado por α_2 -adrenoceptores. Além disso, um recente estudo demonstrou que a ioimbina bloqueou o efeito analgésico da agmatina na segunda fase do teste de formalina em camundongos (Onal e Soykan, 2001). Em concordância com nossos achados, foi recentemente demonstrado que a clonidina, que assim como a agmatina é um agonista adrenérgico com alta afinidade para α_2 -adrenoceptores e receptores imidazólicos, reduziu o tempo de imobilidade no TNF, por um efeito mediado por α_2 -adrenoceptores (O'Neill et al., 2001).

O envolvimento do sistema serotoninérgico na redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina foi investigado através de vários experimentos com antagonistas serotoninérgicos e com o inibidor da síntese de serotonina, PCPA. Nossos resultados mostraram que o efeito antidepressivo da agmatina foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com PCPA em dose que inibe a síntese de serotonina (Pini et al., 1996), sugerindo que o efeito da agmatina no TNF seja mediado, ao menos em parte, pela modulação do sistema serotoninérgico. A relação entre o sistema serotoninérgico e a depressão tem sido amplamente estudada. A patogênese da depressão está relacionada com o sistema monoaminérgico, particularmente com os mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos, e

portanto, drogas que afetam a neurotransmissão serotoninérgica são efetivas no tratamento da depressão (Dunan et al., 1997). Além disso, vários estudos têm demonstrado um papel importante dos receptores NMDA na modulação das funções serotoninérgicas. Antagonistas do receptor NMDA, podem liberar serotonina e estimular sua renovação em várias regiões do cérebro (Loscher e Honack, 1992). Foi demonstrado que o PCPA atua pré-sinápticamente (Luscombe et al., 1993). Eckeli et al. (2000) demonstraram que o pré-tratamento dos camundongos com PCPA bloqueou o efeito antidepressivo do GMP e do MK-801 no TNF. Neste mesmo estudo, o PCPA bloqueou o efeito da fluoxetina, a qual atua pré-sinápticamente (Redrobe et al., 1996). Além disso, alguns efeitos comportamentais do MK-801 são revertidos por antagonistas dos receptores 5HT_{1A} (Loscher e Honack, 1992; Boast et al., 1999). Um recente estudo demonstrou que antagonistas dos receptores NMDA, incluindo o MK-801, aumentaram a resposta de “head-twitch”, um comportamento mediado por receptores 5HT₂, em camundongos (Kim et al., 1998). Deste modo, muitos estudos têm mostrado a interação entre o glutamato e a serotonina, a qual pode ser importante para o controle de muitas atividades neurais.

A reversão do efeito antidepressivo da agmatina pelo pré-tratamento com metisergida, antagonista não seletivo de receptores serotoninérgicos, reforça o envolvimento do sistema serotoninérgico na sua ação. O efeito antidepressivo da agmatina também foi abolido em camundongos pré-tratados com ciproheptadina (antagonista 5-HT₂ não seletivo) ou com cetanserina (antagonista 5-HT_{2A}). Estes resultados sugerem que, provavelmente, seu efeito antidepressivo possa ser mediado pela ativação de receptores 5-HT_{2A}. Os receptores 5-HT₂ pós-sinápticos modulam o comportamento motor, funções sensoriais, cognição, emoção, ingestão alimentar e sono (Staley et al., 1998). O envolvimento dos receptores 5-HT₂ na ação de vários antidepressivos tem sido demonstrado (Redrobe e

Bourin, 1997). Yamada e Sugimoto (2001), demonstraram que o efeito antidepressivo da imipramina foi aumentado por antagonistas de receptores 5-HT₂. Tem sido demonstrado que a clonidina potencializou o efeito de várias classes diferentes de antidepressivos (antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e antidepressivos atípicos) em camundongos no TNF (Bourin et al., 1996), sendo este efeito atribuído a uma ação nos receptores serotoninérgicos 5-HT₂ (Bourin et al., 1996).

O efeito antidepressivo da agmatina, administrada em dose sub-ativa, foi potencializado pelo pré-tratamento dos camundongos com uma dose sub-ativa de pindolol, um antagonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A/1B}, no TNF. Nossos resultados sugerem que, provavelmente, o efeito antidepressivo da agmatina possa ser mediado por sua interação com os receptores 5-HT_{1A}. Eles estão intimamente envolvidos no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (Artigas et al., 2001). Os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} podem existir pré-sinápticamente (autoreceptores controlando a liberação de serotonina) e pós-sinápticamente (acoplados a adenilato ciclase). A estimulação de autoreceptores 5-HT_{1A} diminui o disparo de neurônios serotoninérgicos (O'Connor e Kruk, 1992). O bloqueio de autoreceptores 5-HT_{1A} aumenta a função serotoninérgica pré-sináptica (Artigas et al., 1996). De fato, um estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A/1B} pelo pindolol potencializou o efeito dos ISRS, como a fluoxetina, em camundongos no TNF. Este estudo sugere que o efeito antidepressivo de ISRS no TNF é mediado por receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos (Redrobe et al., 1996). Pruus et al. (2002) também demonstraram que os receptores 5-HT_{1A} medeiam os efeitos de ISRS, como o citalopram, no TNF. Estudos clínicos também mostraram que o pindolol, o qual ocupa preferencialmente os receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, acelera ou, em alguns casos aumenta os efeitos dos ISRS (Artigas et al., 2001). Além disso, foi recentemente demonstrado que o efeito antidepressivo da

clonidina pode ser mediado por receptores 5-HT_{1A}, bem como por receptores 5-HT_{2C} e α_2 -adrenoceptores (Redrobe e Bourin, 1998). Hascoet et al. (1994) mostraram que compostos com alta afinidade por receptores 5-HT_{1A}, como o 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A}), diminuíram a imobilidade no TNF. Além disto, o tratamento dos animais com PCPA, a qual atua pré-sinápticamente, não tem efeito na redução da imobilidade induzida pelo 8-OH-DPAT, indicando que os receptores 5-HT_{1A} que medeiam a diminuição da imobilidade, estão localizados pós-sinápticamente (Luscombe et al., 1993). Por outro lado, no presente estudo, o efeito antidepressivo da agmatina foi revertido por PCPA e potencializado pelo pindolol, provavelmente por envolver receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos. Duas possibilidades de mecanismo de ação da agmatina poderiam ser propostas para explicar este resultado. 1) A agmatina poderia atuar como inibidora da recaptação de serotonina, de forma semelhante à fluoxetina, e por “feed-back” negativo causar a ativação dos autoreceptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, o que levaria a uma diminuição da liberação de serotonina. Neste caso, o pindolol, antagonista 5-HT_{1A} pré-sináptico, evitaria este “feed-back” negativo, conforme proposto para explicar a potencialização do efeito antidepressivo da fluoxetina pelo pindolol (Artigas et al., 2001). Esta hipótese, no entanto, necessita de confirmação futura com experimentos de recaptação de serotonina. 2) A agmatina poderia atuar como antagonista de receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, o que levaria a um aumento de liberação de serotonina. Estes mecanismos também poderiam explicar a reversão do efeito antidepressivo da agmatina obtido com os antagonistas de receptores 5-HT₂.

Estudos têm postulado que a função dopaminérgica reduzida está implicada na fisiopatologia da depressão (Rampello et al., 2000; D’Aquila et al., 2000). O tratamento com antidepressivos aumenta a transmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico, deste

modo induzindo uma melhora nos sintomas da depressão, tal como a anedonia (Rampello et al., 2000). Portanto o sistema dopaminérgico mesolímbico funciona como uma importante via de recompensa no SNC (Rampello et al., 2000).

O pré-tratamento dos camundongos com sulpirida, um antagonista D₂-dopaminérgico, em dose que não produziu efeito TNF, não bloqueou a redução do tempo de imobilidade induzida pela agmatina no TNF. Portanto, nossos dados estão de acordo com o fato de a agmatina ter baixa afinidade por receptores D₂-dopaminérgicos (Li et al., 1994), sugerindo provavelmente que sua ação antidepressiva não seria mediada por receptores D₂-dopaminérgicos.

A reversão do efeito antidepressivo da agmatina pela naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, administrada em uma dose que não produziu efeito *per se* no TNF), indica que a agmatina exerce seu efeito antidepressivo no TNF por interagir, pelo menos em parte, com receptores opióides. Além do seu papel na modulação da dor, os opióides têm sido implicados nos transtornos depressivos. A alta concentração de peptídeos opióides e seus receptores em áreas límbicas envolvidas na regulação do humor suporta esta hipótese (Waksman et al., 1986). Os antidepressivos tricíclicos têm sido usados no tratamento da dor severa em pacientes que não tem depressão (Tura e Tura, 1990). Cerca de 50% de pacientes com depressão sofrem de dor crônica (Akiskal, 1995). Os antidepressivos são conhecidos por influenciar a liberação de peptídeos opióides, tal como as β -endorfinas, as quais são potentes analgésicos (Sacerdote et al., 1987; Brown e Bottomley, 1990). Tem sido sugerido que a ação analgésica de antidepressivos pode ser mediada pelo sistema opióide no SNC (Valverde et al., 1994; Schreiber et al., 1999). Portanto, tem sido demonstrado que drogas antidepressivas têm influência sobre o sistema opióide (Hamon et

al., 1987; Gray et al., 1998). Além disto, vários estudos têm demonstrado que o efeito analgésico de antidepressivos foi bloqueado pela naloxona (Valverde et al., 1994; Gray et al., 1998; Schreiber et al., 1999). Conforme mencionado anteriormente, a agmatina potencializou o efeito analgésico da morfina, mostrando o envolvimento do sistema opióide no seu efeito (Kolesnikov et al., 1996; Horvath et al., 1999; Yesilyurt e Uzbay, 2001). De forma semelhante aos antagonistas de receptores NMDA e inibidores da NOS, a agmatina bloqueou a tolerância à morfina em camundongos (Kolesnikov et al., 1996). Além disso, um estudo demonstrou que a agmatina dependendo de sua dose, atenuou todos os sinais da síndrome de abstinência da morfina precipitada pela naloxona em ratos dependentes de morfina (Arıcıoglu-Kartal e Uzbay, 1997). A naloxona é antagonista não seletivo de receptores opióides com ação preferencial sobre receptores μ opióides (Rang et al., 1994). Estudos futuros com um antagonista μ opióide serão realizados para investigar o envolvimento destes receptores na ação antidepressiva da agmatina.

A fim de investigar os subtipos de receptores opióides envolvidos na ação antidepressiva da agmatina, os camundongos foram pré-tratados com um antagonista de receptores δ opióides, o naltrindol. Este administrado em dose que não produziu efeito no TNF, bloqueou a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina, sugerindo provavelmente que seu efeito antidepressivo possa ser devido, pelo menos em parte, a uma interação com receptores δ opióides. Gray et al. (1998) mostraram que antidepressivos, dependendo da dose, produziram analgesia, sendo este efeito revertido por antagonistas de receptores opióides, como a naloxona e o naltrindol. Em concordância com os nossos resultados, foi demonstrado que a agmatina potencializou o efeito analgésico da morfina, mediado por receptores δ opióides (Kolesnikov et al., 1996). Além disso, semelhante aos

antagonistas de receptores NMDA e inibidores da NOS, a agmatina bloqueou a tolerância à morfina mediada por receptores δ e μ opióides (Kolesnikov et al., 1996; Elliot et al., 1994).

Por outro lado, o pré-tratamento dos camundongos com um antagonista do receptor κ opióide, DIPP, em uma dose que não produziu efeito no TNF, não bloqueou a redução do tempo de imobilidade induzida pela agmatina. Este resultado sugere provavelmente que o efeito antidepressivo da agmatina não seria mediado por receptores κ opióides. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, visto que a agmatina potencializou o efeito analgésico da morfina mediado por receptores δ opióides, mas não por κ_1 e κ_3 (Kolesnikov et al., 1996). Além disso, a agmatina bloqueou a tolerância à morfina, mediada por receptores opióides δ e μ , mas não por κ_3 em camundongos (Kolesnikov et al., 1996; Elliot et al., 1994).

Concluindo, nossos resultados em conjunto, sugerem que o efeito antidepressivo da agmatina é dependente do bloqueio do receptor NMDA e da inibição da NOS. Além disso, nossos resultados também mostram o envolvimento dos sistemas adrenérgico (α_2 -adrenoceptores), serotoninérgico (receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_2) e opióide (receptores δ e possivelmente μ opióides) na ação antidepressiva da agmatina.

7. CONCLUSÕES

- A agmatina, uma amina endógena, proposta como um novo neurotransmissor/neuromodulador no SNC, produz efeito antidepressivo no TNF e TSC, quando administrada por via i.p. e i.c.v., sem alterar a atividade locomotora.
- Nossos resultados indicam que o efeito antidepressivo da agmatina é dependente do bloqueio do receptor NMDA e da inibição da NOS.
- Os resultados também indicam um possível sinergismo entre antidepressivos tricíclicos e a agmatina.
- A redução no tempo de imobilidade induzida pela agmatina no TNF foi prevenida pela ioimbina, indicando o envolvimento de α_2 -adrenoceptores na sua ação.
- O efeito antidepressivo da agmatina no TNF não foi prevenido pelo prazosim e pela sulpirida, sugerindo que sua ação provavelmente não seja mediada por receptores α_1 -adrenérgicos e D_2 -dopaminérgicos.
- O efeito antidepressivo da agmatina foi completamente revertido pelo PCPA no TNF, sugerindo provavelmente que este efeito possa ser mediado pela modulação do sistema serotoninérgico.
- Nossos resultados também mostram que o efeito antidepressivo da agmatina foi prevenido pela metisergida, ciproheptadina e cetanserina no TNF, indicando o envolvimento de receptores serotoninérgicos 5-HT₂, particularmente do tipo 5-HT_{2A} na sua ação.
- A potencialização do efeito antidepressivo da agmatina pelo pindolol, associado à reversão do seu efeito pelo PCPA, sugere o envolvimento de receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos na sua ação.

- Nossos resultados também mostram que o efeito antidepressivo da agmatina foi prevenido pela naloxona no TNF, indicando o envolvimento de receptores opióides na sua ação.
- Além disso, a redução no tempo de imobilidade induzido pela agmatina no TNF foi prevenida pelo naltrindol, mas não pelo DIPP, indicando o envolvimento de receptores δ opióides, mas não κ opióides na sua ação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHONDZADEH, S. Hippocampal synaptic plasticity and cognition. *J. Clin. Pharm Ther.* 24: 241-248, 1999.
- AKISKAL, H. S. Mood disorders: introduction and overview. In: Kaplan, H. I., Sadock, B. J. (Eds.), *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Williams e Wilkins, Baltimore, pp. 1067-1068, 1995.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Washington, DC. 4th ed., 1994.
- ANGST, J. Epidemiology of depression. *Psychopharmacology (Berl.)* 106 (Suppl.): S71-S74. 1992.
- ARICIOGLU-KARTAL, F. E UZBAY, I. T. Inhibitory effect of agmatine on naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats. *Life Sci.* 61 (18): 1775-1781, 1997.
- ARTIGAS, F., CELADA, P., LARUELLE, M. e ADELL, A. How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 224-228, 2001.
- ARTIGAS, F., ROMERO, L., de MONTIGNY, C. e BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.* 19: 378-383, 1996.
- BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders – depression and mania. In: Limbird, L. E., Hardman, J. G. (Eds.), *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 431-459, 1996.

- BOAST, C., BARTOLOMEO, A. C., MORRIS, H. e MOYER, J. A. 5HT antagonists attenuate MK-801-impaired radial arm maze performance in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71: 259-271, 1999.
- BORONAT, M. A. OLMOS, G. e GARCIA –SEVILLA, J. A. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and I₂-imidazoline ligands. *Br. J. Pharmacol.* 125: 175-185, 1998.
- BORSINI, F. e MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94: 147-161, 1988.
- BOURIN, M., HASCOET, M., COLOMBEL, M. C., REDROBE, J. P. e BAKER, G. B. Differential effects of clonidine, lithium and quinine in the forced swimming test in mice for antidepressants: possible roles of serotonergic systems. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 6: 231-336, 1996.
- BROWN, R. e BOTTOMLEY, W. K. Utilization and mechanism of action of tricyclic antidepressants in the treatment of chronic facial pain: a review of the literature. *Anesth. Prog.* 37: 223-229, 1990.
- CHOI, Y. B. e LIPTON, S. A. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1535-1541, 2000.
- COTMAN, C. W., KALHE, J. S., MILLER, E. S., ULAS, J. e BRIDGES, R. J. Excitatory amino acid neurotransmission. In *Psychopharmacology. The Fourth Generation of Progress*. Ed. Bloom, F. E. e Kupfer, D. J. 19: 75-85, 1995.
- CRYAN, I. F., MARKOU, A. e LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents; recent development and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 238-245, 2002.

- D'AQUILA, P. S., CPLLU, M., GESSA, G. L. e SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 405: 365-373, 2000.
- da SILVA, G. L., MATTEUSSI, A. S., SANTOS, A. R., CALIXTO, J. B. e RODRIGUES, A. L. S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *NeuroReport* 11: 3699-3702, 2000.
- DENNINGER, J. W. e MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-350, 1999.
- DUMAN, R. S., HENINGER, G. R. e NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psych.* 54: 597-606, 1997.
- ECKELI, A. L., DACH, F. e RODRIGUES, A. L. S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. *NeuroReport* 11: 839-843, 2000.
- ELLIOTT, K., MINAMI, N., KOLESNIKOV, Y. A., PASTERNAK, G. W. e INTURISSI, C. E. The NMDA receptor antagonists, LY274614 e MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the μ -opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 56: 69-75, 1994.
- GALEA, E., REGUNATHAN, S., ELIOPOULOS, V., FEINSTEIN, D. L. e REIS, D. J. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem. J.* 316: 247-249, 1996.
- GILAD, G. M., GILAD, V. H. e RABEY, J. M. Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain - coincidental changes during development and after ischemia. *Neurosci. Lett.* 216: 33-36, 1996.

- GRAY, A. M., SPENCER, P. S. J. e SEWELL, R. D. E. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br. J. Pharmacol.* 124: 669-674, 1998.
- GREENBERG, P. E., STIGLIN, L. E., FINKELSTEIN, S. N. e BERNDT, E. R. The economic burden of depression in 1990. *J. Clin. Psych.* 54: 405-418, 1993.
- HALARIS A. e PILETZ, J. E. Imidazoline receptors: Possible involvement in the pathophysiology and treatment of depression. *Hum. Psychopharmacol.* 16: 65-69, 2001.
- HALARIS, A., ZHU, H.E., FENG, Y., e PILETZ, J. E. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 881: 445-451, 1999.
- HAMON, M., GOZLAN, H., BOURGOIN, S., BENOLIEL, J. J., MAUBORGNE, A., TAQUET, H., CESSÉLIN, F. e MICO, J. A. Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. *Neuropharmacology* 26: 531-539, 1987.
- HARKIN, A. J., BRUCE, K. H. e CRAFT, B. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. Acute treatments are active in the forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 372: 207-213, 1999.
- HASCOET, M., BOURIN, M. e KHIMAKE, S. Additive effect of lithium and clonidine with 5-TH_{1A} agonists in the forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 18: 381-396, 1994.
- HORVATH, G., KEKESI, G., DOBOS, I., SZIKSZAY, M., KLIMSCHA, W. e BENEDEK, G. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 368: 197-204, 1999.

- JAVITT, D. C. e ZUKIN, S. R. Biexponential kinetics of [³]MK-801 binding: evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Mol. Pharmacol.* 35: 387-393, 1989.
- KIEFER, G., FISCHER, W. e FEUERSTEIN, T. J. Effects of amitriptyline, amitriptylinoxide, doxepine and clozapine on N-methyl-D-aspartate evoked release of [³H]acetylcholine in rat caudato putamen. *Arzneimittelforschung* 49: 820-823, 1999.
- KIM, HS., PARK, IS. e PARK, WK. NMDA receptor antagonists enhance 5-HT₂ receptor-mediated behavior, head-twitch response, in mice. *Life Sci.* 63: 2305-2311, 1998.
- KOLESNIKOV, Y., JAIN, S. e PASTERNAK, G. W. Modulation of opioid analgesia by agmatine. *Eur. J. Pharmacol.* 296: 17-22, 1996.
- KORNHUBER, J. e WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implication for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol. Psych.* 41: 135-144, 1997.
- KUZMIN, A., SANDIN, J., TERENIUS, L. e OGREN, S. Dose- and time-dependent bimodal effects of κ opioid agonists on locomotor activity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 1031-1042, 2000.
- LEONARD, B. E. Neurotransmitter receptors, endocrine response and the biological substrates of depression : a review. *Human Psychopharmacol.* 1: 3-18, 1986.
- LEONARD, B. E. Clinical implications of mechanisms of action of antidepressants. *Adv. Psych. Treat.* 6: 178-186, 2000.
- LI, G., REGUNATHAN, S., BARROW, C. J., ESHRAGHI, J., COOPER, R. e REIS, D. J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263: 966-969, 1994.

- LOSCHER, W. e HONACK, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 215: 199-208, 1992.
- LUSCOMBE, G. P., MARTIN, K. F., HUTCHINS, I. J., GOSDEN, J. e HEAL, D. J. Mediation of the antidepressant-like effects of 8-OHDPAT in mice by postsynaptic 5-HT1A receptors. *Br. J. Pharmacol.* 108: 669-677, 1993.
- MAJ, J., ROGOZ, Z., SKUZA, G. e SOWINSKA, H. Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2: 37-41, 1992.
- MAJEWSKA, M.D., BELL, J.A. e LONDON, E. D. Ascorbic acid protects neurons from injury produced by glutamate and NMDA. *NeuroReport* 1: 194-196, 1990.
- MALCON, C., ACHAVAL, M. KOMLOS, F., PARTATA, W., SAURESSIG, M., RAMIREZ, G. e SOUZA, D. O. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 225: 145-148, 1997.
- MANJI, H. K. DREVETS, W. P. e CHARMEY D. S. The cellular neurobiology of depression. *Nature Med.* 7: 541-547, 2001.
- MANN, J. J., MALON E, K.M., DIEHL, D. J., PEREL, J., COOPRE, T. B. e MINTUN, M. A. Demonstration *in vivo* of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. *Am. J. Psych.* 153: 174-181, 1996.
- MURPHY, S. L. Deaths: Final data for 1998. National Vital Statistics Reports (CDC) 48: 1-106, 2000.

- MUSSELMAN, D. L., EVANS, D. L. e NEMEROFF, C. B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch. Gen. Psych.* 55: 580-592, 1998.
- OBRENOVITCH, T. P. e URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51: 39-87, 1997.
- O'CONNOR, J. J. e KRUK, Z. L. Pharmacological characteristics of 5-hydroxytryptamine autoreceptors in rat brain slices incorporating the dorsal raphe or the suprachiasmatic nucleus. *Br. J. Pharmacol.* 106: 524-532, 1992.
- OLMOS, G., DeGREGORIO-ROCASOLANO, N., REGALADO, M. P., GASULL, T., BORONAT, M. A., TRULLAS, R., VILLARROEL, A., LERMA, J. e GARCÍA-SEVILLA, J. A. Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1317-1326, 1999.
- ONAL, A. e SOYKAN, N. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69: 93-97, 2001.
- O'NEILL, N. F., OSBORNE, D. J., WOODHOUSE, H. M. e CONWAY, M. W. Selective imidazoline I₂ ligands do not show antidepressant-like activity in the forced swim test in mice. *Psychopharmacology* 15: 18-22, 2001.
- PETRIE, R. X. A., REID, I. C. e STEWART, C. A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol. Ther.* 87: 11-25, 2000.
- PILETZ, J. E. e HALARIS, A. Involvement of II-imidazoline receptors in mood disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 763: 510-519, 1995.

- PILETZ, J. E., EMSBERGER P. R. e HALARIS, A. Psychopharmacology of imidazoline and $[\alpha]_2$ -adrenergic receptors: implications for depression. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9: 29-66, 1995.
- PILETZ, J. E., HALARIS, A. E., NELSON, J., QU, Y. e BARI, M. Platelet I_1 -imidazoline binding sites are elevated in depression but not generalized anxiety disorder. *J. Psych. Res.* 30: 147-168, 1996.
- PINI, L. A., SANDRINI, M. e VITALE, G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 308: 31-40, 1996.
- PLÁTENÍK, J., KURAMOTO, N. e YONEDA, Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* 67: 335-364, 2000.
- PORSOLT, R. D., BERTIN, A. e JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229: 327-336, 1977.
- PRUUS, K., VAARMANN, A., RUDISSAAR, R., ALLKMETS, L. e MATTO, V. Role of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of acute citalopram effects. A 8-OH-DPAT challenge study. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.* 26: 227-232, 2002.
- RAASCH, W., MUHLE, H. e DOMINIAK, P. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 881: 313-331, 1999
- RAASCH, W., REGUNATHAN, S., LI, G. e REIS, D. J. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci.* 56: 2319-2330, 1995.
- RAASCH, W., SCHÄFER, U., CHUN, J. e DOMINIAK, P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br. J. Pharmacol.* 133: 755-780, 2001.

- RAMPELLO, L., NICOLETTI, F. e NICOLLETTI, F. Dopamine and depression. Therapeutic implications. *CNS Drugs* 13: 36-45, 2000.
- RANG, H. P., DALE, M. M. e RITTER, J. M. Pharmacology (3ed). Edinburgh. Churchill Livingstone. Cap. 23: 609-631, 1994.
- REDROBE, J. P. e BOURIN, M. Clonidine potentiates the effects of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A/2C} antagonists and 8-OH-DPAT in the mouse forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 8: 169-173, 1998.
- REDROBE, J. P. e BOURIN, M. Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 325: 129-135, 1997.
- REDROBE, J. P., MacSWEENEY, C. P. e BOURIN, M. The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors with antidepressant drugs in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 318: 213-220, 1996.
- REGNER A., CRESTANA, R. E., SILVEIRA, J. P. J., FRIEDMAN, G. CHEMALE, I. e SOUZA, D. O. Guanine nucleotides are present in human CSF. *NeuroReport* 8: 3771-3774, 1997.
- REGNER, A., RAMIREZ, G., BELLO-KLEIN, A. e SOUZA, D. O. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. *Neurochem. Res.* 23: 519-524, 1998.
- REIS, D. e REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain?. *Trends Pharmacol Sci.* 21: 187-193, 2000.
- REIS, D. J. e REGUNATHAN, S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 881: 65-80, 1999.

- REIS, D.J. e REGUNATHAN, S. Agmatine: A novel neurotransmitter? *Adv. Pharmacol.*, 42: 645-649, 1998.
- RESSLER, K. J. e NEMEROFF, C. B. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol. Psych.* 46: 1219-1233, 1999.
- RODRIGUES A.L.S., ROCHA, J.B.T., MELLO, C.F. e SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 150-156, 1996.
- RODRIGUES, A. L. S., da SILVA, G., MATEUSSI, A. S., FERNANDES, E. F., MIGUEL, O. G., YUNES, R. A, CALIXTO, J. B. e SANTOS A. R. S. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci.* 70: 1347-58, 2002.
- SACERDOTE, P., BRINI, A. e PANERAI, A. E. A role for serotonin and β -endorphin in the analgesia induced by some tricyclic antidepressant drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 153-158, 1987.
- SASTRE, M.; REGUNATHAN, S. e REIS, D. J. Uptake of agmatinase into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. *J. Neurochem.* 69: 2421-2426, 1997.
- SASTRE, M.; REGUNATHAN, S.; GALEA, E. e REIS, D. J. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. *J. Neurochem.* 67: 1761-1765, 1996.
- SCHMIDT, A. P., LARA, D. R., MARASCHIN, J. D., PERLA, A. D. e SOUZA, D. O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* 864: 40-43, 2000.

- SCHREIBER, S., BACKER, M. M. e PICK, C. G. The antinociceptive effect of venlafaxine in mice is mediated through opioid and adrenergic mechanisms. *Neurosci. Lett.* 273: 85-88, 1999.
- SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 31-40, 1999.
- SMITH, M. A., MAKINO, S., KVETNANSKY, R. e POST, R. M. Stress alters the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J. Neurosci.* 15: 1768-1777, 1995.
- STAHL, S. M. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J. Affect. Dis* 51: 215-235, 1998.
- STALEY, J. K., MALISCEN e INNIS, R. B. Imaging of the serotonergic system: implications of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol. Psych.* 44: 534-549, 1998.
- STÉRU, L., CHERMAT, R., THIERY, B. e SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85: 367-370, 1985.
- THIERRY, B., STÉRU, L., SIMON, P. e PORSOLT, R. D. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology* 90: 284-285, 1986.
- TRIST, D. G. Excitatory amino acid agonists and antagonists: pharmacology and therapeutic applications. *Pharm. Acta Helv.* 74: 221-229, 2000.
- TRULLAS, R. e SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur. J. Pharmacol.* 185: 1-10, 1990.

- TURA, B. e TURA, S. M. The analgesic effect of tricyclic antidepressants. *Brain Res.* 518: 19-22, 1990.
- VALVERDE, O. MICÓ, J. A., MALDONADO, R., MELLADO, M. e GILBERT RAHOLA, J. Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induced by tricyclic antidepressants in two behavioural pain tests in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 518: 19-22, 1994.
- VAUGEOIS, J., PASSERA, G., ZUCCARO, F. e COSTENTIN, J. Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* 134: 387-391, 1997.
- WAKSMAN, G., HAMEL, H., FOURNIÉ-ZALUSKIE, M. C. e ROQUES, B. P. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase enkephalinase and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1523-1527, 1986.
- WANG, H., REGUNATHAN, S., YOUNSON, C., BRAMWELL, S. e REIS, D. J. An antibody to agmatine localizes the amine in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 183: 17-21, 1995.
- WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 131-136, 1991.
- WILLNER, P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83: 1-16, 1984.
- WONG, M e LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nature Rev.* 2: 343-351, 2001.

- YADID, G., NAKASH, R., TAMAR, DERI, I., TAMAR, G., KINOR, N., GISPAN, I. e ZANGEM, A. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Prog. Neurobiol.* 62: 353-378, 2000.
- YAMADA, J. e SUGIMOTO, Y. Effects of 5-HT₂ receptor antagonists on the anti-immobility effects of imipramine in the forced swimming test with mice. *Eur. J. Pharmacol.* 427: 221-225, 2001.
- YANG, X. C. e REIS, D. J. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 544-549, 1999.
- YESILYURT, O. e UZBAY, T. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an α 2-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. *Neuropsychopharmacology* 25: 98-103, 2001.
- YILDIZ, F., ERDEN, B. F., ULAK, G., UTKAN, Y. e GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology* 149: 41-44, 2000.
- YUN, H., DAWSON, V. S. e DAWSON, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol. Psych.* 2: 300-310, 1997.