



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

MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA

Cristiane Felisbino Silva

Florianópolis, 2006.



MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Horacio Gabilan
Co-Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia S. Rodrigues

Florianópolis, 2006.

Este trabalho é dedicado aos meus sogros, Ondivaldo e Marilene que fizeram o possível e o impossível para a realização de mais esta etapa da minha vida. Vocês são muito especiais! Muito obrigada por tudo.

Ao meu filho Pedro que suportou a minha ausência durante o período da realização da dissertação e ao meu marido Júnior, que com sacrifício, amor, compreensão, companheirismo e incentivo tornaram possível a realização de mais uma etapa de nossas vidas.

Ao professor Dr. Nelson H. Gabilan, por toda a dedicação, incentivo, amizade, confiança, simplicidade, paciência e educação. O senhor é um exemplo como pessoa e profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha sogra Marilene que na minha ausência foi a incansável avó.

Ao professor Dr. Nelson H. Gabilan, meu especial agradecimento pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela dedicação, apoio e paciência.

À professora Dra. Ana Lúcia Rodrigues, pela orientação científica, prestatividade, e principalmente pelo exemplo de dedicação.

As amigas Dani, Rúbia e Andréa que fizeram do laboratório um lugar agradável para trabalhar.

À minha amiga Rossana, sempre companheira, simples e prestativa, obrigado por compartilhar experimentos comigo.

Aos professores Alcir, Rodrigo e Ana juntamente com os alunos Jéferson, Taís, Manuela, Patrícia e Ricardo pela amizade e por me cederem o laboratório para a realização de experimentos.

Ao grande ser humano e funcionário Nivaldo da secretaria da neurociências, muito obrigado.

À minha família, que sempre esteve torcendo por mim em todos os momentos.

Aos meus amores, Júnior e Pedro.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização desta pesquisa

Lista de abreviaturas, 9

Resumo, 10

Abstract, 11

1. Introdução

1.1. Depressão, 12

1.2. Agmatina e depressão, 13

1.3. Antidepressivos e proteínas neuroprotetoras, 16

1.4. Vias de sinalização celulares envolvidas na depressão, 21

1.5. Depressão e glutamato, 25

Justificativa, 28

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral, 29

2.2. Objetivos Específicos, 29

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais, 30

3.2. Drogas e reagentes, 30

3.3. Vias de administração, 31

3.4. Testes Comportamentais, 31

3.4.1. Teste do nado forçado (TNF), 31

3.4.2. Teste do campo aberto (TCA), 32

3.5. Protocolos experimentais, 32

3.5.1. Tratamento crônico com agmatina e fluoxetina, 32

3.5.2. Preparação de amostras do cérebro de camundongos, 33

3.5.3. Imunodeteção de proteínas, 33

3.5.4. Estudo das vias de sinalização envolvidas no efeito

antidepressivo agudo da agmatina e fluoxetina, 34

3.6 Liberação de glutamato sinaptossomal, 34

3.6.1. Preparação dos sinaptossomas, 34

3.6.2. Ensaio de liberação de [³H]glutamato, 35

3.6.3. Tratamento dos sinaptossomas, 36

3.7. Análise estatística, 37

4. Resultados

4.1. Efeito antidepressivo com administração crônica da agmatina ou fluoxetina, 38

4.2. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína BDNF, 39

4.3. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína Bcl2, 39

4.4. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína calbindina-28K, 42

4.5. Vias de sinalização envolvidas no efeito antidepressivo agudo da agmatina, 42

4.6. Vias de sinalização envolvidas no efeito antidepressivo agudo da fluoxetina, 44

4.7. Efeito da administração de inibidores de proteínas quinases e agmatina ou fluoxetina no teste do campo aberto, 48

4.8. Efeito da agmatina na liberação de glutamato sinaptossomal, 50

4.9. Vias de sinalização celular envolvidas na liberação sinaptossomal de glutamato induzida pela agmatina, 50

5. Discussão, 55

6. Conclusões, 74

7. Referências bibliográficas, 75

8. Anexo 01

Lista de abreviaturas

CaMKII – proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina

ERK – proteína quinase regulada por sinal extracelular

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

L-[³H]GLU - Glutamato tritiado

GLU - Glutamato

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

PI3K – proteína quinase fosfatidilinositol 3

PKA - Proteína quinase ativada por AMP cíclico

PKC - Proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípídeo C

E.P.M. – Erro padrão da média

TNF – Teste do nado forçado

CREB – Proteína ligante ao elemento responsivo monofosfato adenosina cíclica

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

SNC – Sistema Nervoso Central

A agmatina é uma amina endógena presente no cérebro que apresenta, dentre outras ações, um efeito antidepressivo e neuroprotetor, por mecanismos não bem conhecidos. Neste trabalho foi investigado: i) o efeito do tratamento crônico (21 dias) de camundongos com agmatina na expressão de proteínas neuroprotetoras (BDNF, Bcl2 e calbindina-28K); ii) as vias de sinalização celular envolvidas na ação antidepressiva aguda da agmatina e fluoxetina; iii) a participação das vias de proteínas quinases na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela agmatina. O tratamento crônico com agmatina (1 e 3 mg/kg, i.p.) induziu um aumento na expressão das proteínas Bcl2 (no cerebelo) e de calbindina-28K (no hipocampo e cerebelo), mas não afetou a expressão de BDNF. A redução do tempo de imobilidade causada pela administração aguda de agmatina (10 mg/kg, i.p.) no teste do nado forçado (TNF) em camundongos foi prevenido pelo pré-tratamento (i.c.v.) dos animais com PD98059 (inibidor da via MAPK/ERK), KN-62 (inibidor da CaMKII) e queleritrina (inibidor da PKC), mas não pelo H-89 (inibidor da PKA). O efeito antidepressivo da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF foi revertido pelo pré-tratamento com H-89, PD98059 e queleritrina, mas não pelo KN-62. O teste do campo aberto mostrou que os efeitos dos inibidores de proteínas quinases na ação anti-imobilidade produzida pela agmatina e fluoxetina, não foram devido a alterações na atividade locomotora dos animais. Agmatina (100, 300 e 1000 μ M) induziu a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos, de modo dependente da concentração e do tempo de incubação. H89, PD98059 e KN-62, mas não queleritrina, estauroporina e LY204002 bloquearam a liberação de glutamato provocada por agmatina (1000 μ M). Em conjunto, estes dados indicam que o tratamento crônico com agmatina induz a expressão da proteína neuroprotetora calbindina-28K. Os resultados também sugerem que o efeito antidepressivo agudo da agmatina parece envolver a participação das vias de sinalização mediadas por MAPK/ERK, CaMKII e PKC. No efeito antidepressivo da fluoxetina parecem estar envolvidas as vias de sinalização celular da PKA, MAPK/ERK e PKC. Além disso, os dados sugerem que a agmatina induz a liberação de glutamato sinaptossomal através da ativação das vias de sinalização da PKA, MAPK/ERK e CaMKII.

Agmatine is an endogenous amine, present in the brain, that has been reported to produce antidepressant-like and neuroprotective effects, through mechanisms that are still not clear. In this work we investigated: i) the effect of chronic treatment (21 days) of mice with agmatine on the expression of neuroprotective proteins (BDNF, Bcl2 and calbindin-28K); ii) the cellular signaling pathways involved in the acute antidepressant-like action of agmatine and fluoxetine; iii) the involvement of protein kinases signaling in the synaptosomal glutamate release induced by agmatine. Chronic administration of agmatine (1 and 3 mg/kg, i.p.) increased the Bcl2 (in cerebellum) and calbindin-28K (in hippocampus and cerebellum) content, without affecting BDNF expression. The immobility time in the forced swimming test (FST) in mice was reduced by acute administration of agmatine (10 mg/kg, i.p.). This antidepressant-like effect was prevented by the pretreatment (i.c.v.) of mice with PD98059 (a MAPK/ERK inhibitor), KN-62 (a CaMKII inhibitor) and chelerythrine (a PKC inhibitor), but not with H-89 (a PKA inhibitor). The anti-immobility effect of fluoxetine in the FST was reversed by the pretreatment with H-89, PD98059 and chelerythrine, but not with KN-62. The reversal of the agmatine and fluoxetine antidepressant-like effects by these protein kinases inhibitors was not due to any alteration in the locomotor activity of mice, as assessed in the open-field test. Agmatine (100, 300 and 1000 μ M) evoked a synaptosomal glutamate release in a dose and time-dependent manner. H89, PD98059 e KN-62 but no chelerythrine, staurosporine and LY204002 blocked the agmatine-induced glutamate release. In conclusion, our findings indicate that chronic treatment with agmatine increases the expression of the neuroprotective protein calbindin-28K. Moreover, our results suggest the involvement of MAPK/ERK, CaMKII and PKC in the acute antidepressant-like effect of agmatine. In addition, the acute antidepressant-like effect of fluoxetine seems to be dependent of PKA, MAPK/ERK and PKC. Finally, our data suggest the involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII in the synaptosomal glutamate release induced by agmatine.

1.1. Depressão

A depressão tem origem devido a uma complexa interação de suscetibilidade múltipla a fatores genéticos e ambientais. A expressão fenotípica dessa doença inclui não apenas episódios e freqüentes distúrbios profundos de humor, mas também um conjunto de anormalidades cognitivas, motoras, autonômicas, endócrinas e no ciclo sono/vigília (Manji et al., 2003). Apesar do profundo efeito que a depressão tem sobre a vida de milhões de pessoas, ainda existem poucas informações sobre sua etiologia e patofisiologia (Manji et al., 2003). Tem sido proposto que os transtornos depressivos, possam resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos (Duman et al., 1997; Skolnick, 1999; Manji et al., 2001a, 2003). Estudos básicos e clínicos têm levado a várias hipóteses sobre o mecanismo de ação dos antidepressivos e da fisiopatologia da depressão, que tem focalizado alterações nos níveis das monoaminas e de seus receptores (Duman et al., 1997). A hipótese monoaminérgica postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina, ou noradrenalina, ou de receptores ineficientes (Mann e Kapur, 1995; Wong e Licinio, 2001). Assim, drogas com ação antidepressiva bloqueiam a recaptação de serotonina e/ou noradrenalina, aumentando a concentração das mesmas na fenda sináptica (Baldessarini, 1996). Contudo, apesar do aumento nos níveis de monoaminas ocorrer quase que imediatamente após o início do tratamento, os efeitos terapêuticos dos antidepressivos se manifestam somente após algumas semanas de tratamento (Wong e Licinio, 2001). A resposta para esta questão ainda não é clara, mas sabe-se que o tratamento com antidepressivos aumenta os níveis

de monoaminas no cérebro e ativa mecanismos de transdução de sinal envolvendo segundo mensageiros o que resulta em alterações na expressão de genes (Lesch, 2001).

Evidências de neuroimagem e estudos *post-mortem* mostraram que os transtornos de humor severos, os quais têm sido conceituados como transtornos neuroquímicos, são associados com a diminuição da plasticidade celular (Manji et al., 2003). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que os principais fatores envolvidos na sinalização neurotrófica: a proteína ligante ao elemento responsivo ao AMP_c (CREB), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a proteína anti-apoptótica Bcl2 e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), são alvos, a longo prazo, de agentes antidepressivos (Altar, 1999; Manji et al., 2003). Isto sugere que o tratamento antidepressivo providencia tanto suporte trófico como neuroquímico, que serve para aumentar e manter a conectividade sináptica normal, permitindo a sinalização química para restabelecer o funcionamento cerebral normal. Para os pacientes refratários, as drogas que direta ou indiretamente alteram os níveis de monoaminas, podem ter um benefício limitado, visto que, a depressão envolve além das monoaminas, alterações na conectividade normal (Manji et al., 2003).

1.2. Agmatina e depressão

A agmatina foi primeiramente descoberta em 1910, por Kossel e é conhecida com um intermediário no metabolismo de poliaminas de várias bactérias, fungos, parasitas, plantas e invertebrados marinhos, onde as poliaminas têm uma importante função no crescimento celular. A agmatina é sintetizada pela descarboxilação da L-arginina pela arginina descarboxilase (ADC) e hidrolisada para putrescina e uréia pela agmatinase (Tabor e Tabor, 1984; Grillo e Colombatto,

2004). Até meados de 1990, acreditava-se que a agmatina, a enzima arginina descarboxilase (ADC) e a agmatinase não fossem encontradas em mamíferos. Em 1994, através de uma pesquisa para um ligante endógeno para o sítio de ligação imidazólico (I), uma molécula foi isolada do encéfalo de mamíferos, a qual foi identificada como agmatina (Li et al., 1994). A ADC e, subseqüentemente, a agmatinase foram, também, identificadas no encéfalo de mamíferos (Sastre et al., 1996). Alguns autores demonstraram que a agmatina não estava presente apenas no encéfalo, mas também era amplamente distribuída em tecidos e principalmente no estômago e no soro (Raasch et al., 1995; Feng et al., 1997). Ela também foi detectada na medula espinhal, indicando um possível papel de modulador endógeno na regulação da dor (Fairbanks et al., 2000).

Neste sentido, a agmatina pode ser considerada como um novo neurotransmissor/neuromodulador no sistema nervoso central (SNC) (Reis e Regunathan, 2000). Além disso, possui um sítio ligante, sua síntese ocorre no encéfalo, é estocada em vesículas sinápticas em diferentes neurônios com distribuição seletiva no SNC, acumulada por recaptção, liberada mediante despolarização e inativada por recaptção seletiva ou degradada pela enzima agmatinase (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Berkels et al., 2004). Os neurônios que contém agmatina estão localizados em regiões cerebrais relacionadas com o controle visceral e neuroendócrino, processamento das emoções, percepção da dor e cognição (Reis e Regunathan, 2000). Através de técnicas de imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para a agmatina, foi demonstrado que ela está amplamente distribuída no cérebro de ratos, principalmente no córtex cerebral, tronco encefálico, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo (Otake et al., 1998).

Vários autores demonstraram que a agmatina possui alta afinidade aos receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos (Li et al., 1994; Reis e Regunathan,

2000; Raasch et al., 2001; Santos et al., 2005). Os receptores imidazólicos, uma nova família de receptores não adrenérgicos, estão presentes no encéfalo, especialmente no sistema límbico, plaquetas e outros órgãos (Halaris e Piletz, 2001). Tem sido demonstrado que estes receptores, entre outras funções, podem atuar modulando a depressão e a nocicepção (Halaris e Piletz, 2001).

Alguns trabalhos demonstraram 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) (Gilad e Gilad, 2000; Reis e Regunathan, 2000; Weng et al., 2003).

Também é importante salientar que a agmatina apresenta várias ações farmacológicas; entre elas a capacidade de estimular a liberação de insulina das ilhotas de Langerhans pancreáticas, promover a liberação de adrenalina e noradrenalina das células cromafins da glândula adrenal, além de funções em nível gastrointestinal e um importante papel no controle da pressão arterial (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001).

No SNC, a agmatina apresenta propriedades antinociceptiva (Santos et al., 2005), ansiolítica (Lavinsky et al., 2003) e anticonvulsante (Feng et al., 2005). Além disso, o papel da agmatina na modulação do humor tem sido sugerido por estudos pré-clínicos (Zomkowski et al., 2002; 2004; 2005, Li et al., 2003) e clínicos (Halaris et al., 1999).

Halaris et al. (1999) observaram que a concentração plasmática de agmatina era elevada em pacientes com depressão e que o tratamento com o antidepressivo bupropion normalizava os níveis de agmatina. Além disso, Zomkowski e colaboradores (2002) demonstraram que a agmatina administrada sistêmica e centralmente foi efetiva em produzir um efeito antidepressivo quando avaliada no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC).

A administração oral e sub-cutânea de agmatina em camundongos e ratos, também produziu um efeito antidepressivo (Li et al., 2003). Mais recentemente, Zomkowski e colaboradores (2002) demonstraram que o efeito antidepressivo agudo da agmatina seria mediado, ao menos em parte, por uma interação com os subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A/1B} e 5HT_{2A} e α_2 -adrenérgicos (Zomkowski et al., 2002).

1.3. Antidepressivos e proteínas neuroprotetoras

Ainda não é conhecido se a atrofia hipocampal no cérebro de indivíduos com depressão constitui a causa ou a consequência da depressão (Lenox et al., 2002). A expressão de fatores neurotróficos com ação neuroprotetora é importante para reduzir a morte celular observada no cérebro de pacientes depressivos (Eilat et al., 1999; Drevets, 2001; Beyer e Krishnan 2002).

A agmatina apresenta efeito neuroprotetor, reduzindo a perda de neurônios do hipocampo (Gilad et al., 1996; 2005; Gilad e Gilad, 2000), córtex e da área de infarto cerebral (Kim et al., 2004) em modelos de isquemia em roedores. Também reduziu a toxicidade do glutamato em culturas de neurônios cerebelares (Olmos et al., 1999). Estes efeitos parecem estar associados com a redução dos níveis de óxido nítrico (NO) e da atividade da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Gilad et al., 1996; Li et al., 2003; Kim et al., 2004). A capacidade da agmatina em bloquear os receptores NMDA e canais iônicos, como os canais de cálcio dependentes de voltagem na neurohipófise contribui para a neuroproteção da agmatina (Reis e Regunathan, 2000; Wang et al., 2002). Li e colaboradores (2003) também demonstraram que o tratamento com agmatina produziu neuroproteção "in vitro". O pré-tratamento de células PC12 com agmatina protegeu-às da morte celular pela

toxicidade do NMDA. Após o tratamento com agmatina, os níveis de Ca^{2+} intracelular induzido pelo NMDA foram reduzidos, além de provocar o aumento das monoaminas norepinefrina, epinefrina ou dopamina em células PC12 (Li et al., 2003).

O tratamento de ratos com os antidepressivos desipramina e fluoxetina (Prozac) induzem a expressão de fatores neurotróficos, como o BDNF, a neurotrofina mais abundante do SNC, no hipocampo e córtex (Siuciak et al., 1997; Altar, 1999; Lang et al., 2004). As neurotrofinas são uma família de fatores que medeiam a diferenciação e sobrevivência de neurônios, bem como a modulação da transmissão e plasticidade sináptica (Patapoutian e Reichardt, 2001; Poo, 2001). A família das neurotrofinas inclui, entre outros, o fator de crescimento do nervo (NGF), BDNF, neurotrofina 3 (NT-3), NT-4/5 e NT-6 (Patapoutian e Reichardt, 2001). Essas proteínas se ligam e ativam receptores tirosina quinase pertencentes à família dos receptores Trk (Patapoutian e Reichardt, 2001; Poo, 2001). Recentes observações sugerem que as neurotrofinas são secretadas nos dendritos e atuam retrogradamente nos terminais pré-sinápticos, onde eles induzem modificações de longa duração (Poo, 2001).

A neurotrofina BDNF é um potente fator fisiológico de sobrevivência que também tem sido implicado em uma variedade de condições patofisiológicas (Riccio et al., 1999). As ações celulares do BDNF são mediadas através de dois tipos de receptores: um receptor tirosina quinase de alta afinidade (TrkB) e um receptor de baixa afinidade (p75). O BDNF é conhecido por seus efeitos neurotróficos e neuroprotetores os quais podem ter um papel principal na patofisiologia e tratamento dos transtornos de humor (Riccio et al., 1999). Embora os fatores neurotróficos aumentem a sobrevivência celular por promover o suporte trófico necessário, agora sabe-se, que seus efeitos de promoção de sobrevivência são mediados, em grande parte, pela inibição da cascata de morte celular (Riccio et al.,

1999). Várias evidências sugerem que os fatores neurotróficos inibem a cascata de morte celular por ativar as vias de sinalização MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e a PI3K (proteína quinase fosfatidilinositol 3) (Bonni et al., 1999). Um importante mecanismo pelo qual a cascata de sinalização MAPK quinase inibe a morte celular é pelo aumento da expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 (Bonni et al., 1999; Finkbeiner, 2000).

Além disso, a injeção de BDNF no hipocampo de ratos produz efeito antidepressivo (Conti et al., 2002; Shirayama et al., 2002). Deste modo, o BDNF parece modular a atividade de sistemas neuroquímicos envolvidos na depressão e pode ter um importante papel na neuropatologia e tratamento da doença. Recentemente, os níveis dessa neurotrofina no plasma foram propostos como um possível marcador biológico da depressão (Shimizu et al., 2003; Lang et al., 2004). Vários autores sugerem que os antidepressivos atuam na neuroproteção por modularem a via de sinalização celular do CREB (Skolnick, 1999; D'Sa e Duman, 2002; Koch et al., 2003). Dentre os vários alvos gênicos regulados pelo CREB e que poderiam estar envolvidos nas ações antidepressivas e na fisiopatologia da depressão, está o BDNF e a proteína antiapoptótica Bcl2, o que explicaria o efeito a longo prazo de certos antidepressivos (ver Figura 1).

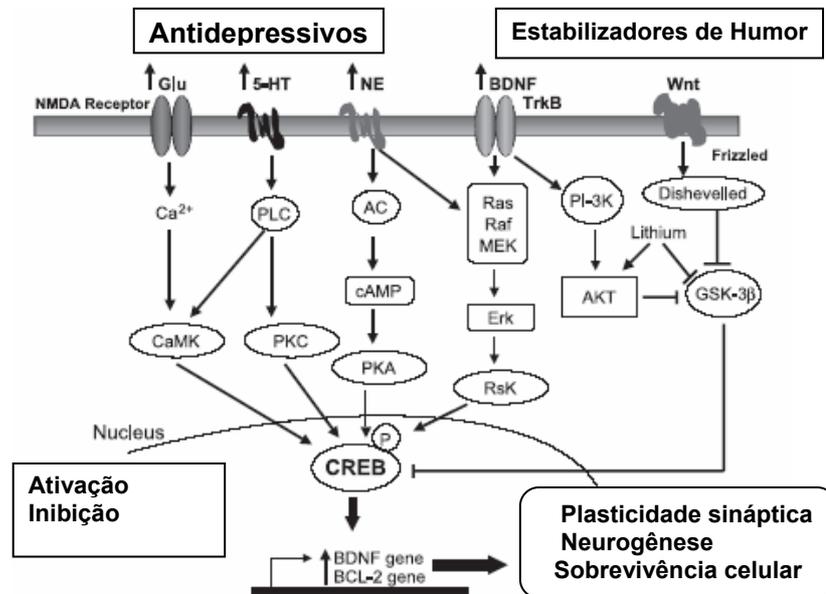


Figura 1. **Vias de sinalização celular envolvidas na ação de antidepressivos e estabilizadores de humor.** Esta figura apresenta como os antidepressivos ativam as vias de sinalização intracelular da CaMKII, PKC, PKA e MAPK/ERK, que levaria à fosforilação de CREB e ativação de genes para a expressão de BDNF e da proteína antiapoptótica Bcl2. A ação dos antidepressivos resultaria na plasticidade sináptica, neurogênese e sobrevivência celular (retirado de Hashimoto et al., 2004).

A proteína Bcl2 foi o primeiro membro identificado de uma grande família de proteínas regulatórias da apoptose viral e celular (Merry e Korsmeyer 1997; Adams e Cory, 1998; Bruckheimer et al., 1998). A família de proteínas envolvidas na regulação da morte celular apoptótica que é melhor caracterizada inclui as proteínas antiapoptóticas: Bcl-2 e Bcl-XL e as pró-apoptóticas: Bax e Bad, ambas são expressas no SNc de roedores e de mamíferos (Adams e Cory, 1998; Bruckheimer et al., 1998). A mitocôndria tem um papel importante no processo apoptótico, a Bcl2 atua nessa organela impedindo a formação de poros na membrana e a consequente liberação do citocromo C (Adams e Cory, 1998; Bruckheimer et al., 1998). A proteína Bcl2 é reconhecida como a principal proteína neuroprotetora, porque a sua superexpressão protege os neurônios de diversos insultos como isquemia, MPTP (droga utilizada para induzir modelos animais de Parkinson), proteína β -amilóide (modelos de Alzheimer), radicais livres, excitotoxicidade (glutamato) e deprivação de fatores de crescimento (Manji et al., 2001b). Vários trabalhos mostraram que a cascata de sinalização dos fatores neurotróficos/MAPK/Bcl2 está envolvida na manutenção da proporção entre os níveis dos fatores de sobrevivência e de morte celular. Alterações modestas nesta cascata de sinalização ou nos níveis das proteínas da família Bcl2 (devido a doenças genéticas ou fatores relacionados a insultos) podem afetar a viabilidade celular (Young, 2002).

A calbindina-28K é a principal proteína que se liga ao cálcio (“calcium-binding protein”) no cérebro e está presente no citosol constituindo entre 0,1–1,5% do total de proteínas solúveis (Christakos et al., 1989; Celio, 1990). Christakos e Liu (2004) demonstraram que a calbindina-28K protege diferentes tipos celulares da morte celular apoptótica. A expressão da calbindina-28K em células neurais suprime as ações pró-apoptóticas da presenilina-1, a qual está correlacionada com

as doenças de Alzheimer por prevenir o dano mitocondrial mediado pelo cálcio e a subsequente liberação do citocromo C (Guo et al., 1998). Estudos anteriores demonstraram uma relação entre a diminuição da calbindina neuronal e a neurodegeneração (Heizmann e Braun, 1992). Assim, isto explicaria a resistência para excitotoxicidade e injúria isquêmica em neurônios hipocampais com imunoreatividade para calbindina (Goodman et al., 1993; Mattson et al., 1991; Rami et al., 1992). Além disso, neurônios positivos para calbindina exibem redução dos níveis de cálcio intracelular livre em resposta a aminoácidos excitatórios e a ionóforos para cálcio (Mattson et al., 1991). Isto sugere um papel para a calbindina na redução dos níveis de cálcio intracelular e na prevenção da morte neuronal mediada pelo cálcio. Evidências diretas do papel neuroprotetor da calbindina têm sido obtidas de estudos em culturas de neurônios ou pela superexpressão de calbindina em linhagens celulares (Dowd et al., 1992; Mattson et al., 1995). A superexpressão de calbindina resulta em resistência para a degeneração induzida por uma variedade de insultos os quais envolvem eventos dependentes de cálcio (Dowd et al., 1992). Esses estudos indicam que a calbindina é um importante regulador dos eventos dependentes de cálcio na função neuronal e demonstram os mecanismos que podem ocorrer, em parte, pela capacidade da calbindina em proteger contra a neurotoxicidade mediada pelo cálcio (Mattson et al., 1991).

1.4. Vias de sinalização celulares envolvidas na depressão

Durante vários anos a depressão foi considerada como tendo uma origem neuroquímica, mas, recentemente tem sido associada com alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular. Agentes que atuam diretamente em fatores alvo nestas vias poderiam ser novos compostos

promissores para a terapia da depressão (Popoli et al., 2000; Manji et al., 2001a; D'Sa e Duman, 2002; Malberg e Blendy, 2005; Taylor et al., 2005).

Apesar da depressão ser tratada farmacologicamente por três décadas, apenas recentemente a compreensão sobre os mecanismos de ação dos antidepressivos têm registrado os maiores avanços. Estudos anteriores baseavam-se na ação primária das drogas nos transportadores de monoaminas, nas enzimas metabólicas e receptores, hoje o foco de estudo são as mudanças adaptativas nas vias de sinalização pós-receptor. Evidências indicam que o tratamento de longa duração com antidepressivos afeta a fosforilação de proteínas em várias vias de sinalização (Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Malberg e Blendy, 2005; Taylor et al., 2005).

Além disso, uma variedade de estudos tem mostrado que o tratamento crônico com antidepressivos regula vários fatores envolvidos nas vias de sobrevivência celular, dentre eles, CREB, BDNF, Bcl2 e MAPK (Manji et al., 2000; Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Einat et al., 2003; Malberg e Blendy, 2005; Taylor et al., 2005). Fumagalli et al. (2005) demonstraram que os antidepressivos alteram os mecanismos de sinalização intracelular o que resulta em alterações sinápticas de longa duração, as quais provavelmente explicam a necessidade de um prolongado período para essas drogas apresentarem ações clínicas. Vários trabalhos mostraram também que os antidepressivos ativam as vias proteína quinase dependente de AMPc (PKA), da proteína quinase C (PKC) e modulam as vias da proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos/proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (MAPK/ERK) (Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Einat et al., 2003; Malberg e Blendy, 2005; Taylor et al., 2005) (ver Figura 1). Essas proteínas quinases fosforilam o CREB, o qual, aumenta a expressão de genes como o BDNF (Duman et al., 1997; 1999; 2000).

A PKA está funcionalmente envolvida na fisiologia do cérebro, na síntese e liberação de neurotransmissores, expressão de genes, atividade de canais iônicos, plasticidade sináptica, memória, diferenciação e sobrevivência celular (Duman, 2002; Gould e Manji, 2002). A PKA é uma holoenzima tetramérica que consiste em duas subunidades catalíticas ligadas a um dímero de subunidades regulatórias. Trabalhos anteriores demonstraram uma significativa diminuição da atividade da PKA em células de indivíduos com depressão maior, em comparação com voluntários normais (controles) (Manier et al., 2000; Shelton et al., 1996, 1999). Em um estudo de cérebros *post-mortem*, Dwivedi et al. (2002b) demonstraram que pacientes depressivos vítimas de suicídio apresentaram uma diminuição da atividade da PKA no córtex pré-frontal.

A via MAPK/ERK é uma cascata de sinalização que regula vários processos celulares como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Esta via também pode fosforilar o CREB (Schaeffer e Weber, 1999). Portanto, a via MAPK/ERK poderia representar um alvo importante para a atividade dos antidepressivos. Mercier e colaboradores (2004) demonstraram que a fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) ativa rapidamente os genes de proteínas envolvidos na neuroproteção (BDNF e o fator neurotrófico derivado de glia, GDNF) através da via MAPK em culturas de astrócitos. Por outro lado, a administração crônica de fluoxetina em cérebros de ratos causou uma inibição da fosforilação de ERK 1 e 2 (Fumagalli et al., 2005). O lítio e o valproato, dois fármacos utilizados no tratamento da fase maníaca do transtorno bipolar, parecem atuar modulando a via de sinalização da MAPK/ERK e também a PKC (Einat et al., 2003).

A CaMKII é a proteína quinase mais abundante do cérebro (Popoli et al., 2001; Lisman et al., 2002). Os substratos fosforilados pela CaMKII estão envolvidos em várias funções celulares como a síntese (tirosina hidroxilase e triptofano

hidroxilase) e a liberação de neurotransmissores (sinapsina I e sinaptotagmina), organização do citoesqueleto (tau e proteínas associadas com microtúbulos), homeostase do cálcio intracelular (receptor IP3, Ca²⁺/ATPase) (Soderling, 2000; Soderling e Stull, 2001). A tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase são enzimas chaves na síntese de norepinefrina, dopamina e serotonina. Como a CaMKII fosforila essas enzimas, mudanças na atividade da CaMKII podem resultar em alterações na neurotransmissão monoaminérgica (conhecida por seu envolvimento nas desordens depressivas). Outros estudos demonstraram que a CaMKII também representa um alvo para o tratamento com antidepressivos. O tratamento crônico com paroxetina, fluvoxamina ou venlafaxina aumentaram a auto-fosforilação e atividade da CaMKII no hipocampo (Duman et al., 2000; Thome et al., 2000; Manji et al., 2001a; Popoli et al., 2001; Popoli et al., 2002; Tiraboschi et al., 2004a).

A proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípido C (PKC) é uma proteína quinase serina-treonina ativada por lipídeos e cálcio, com um papel fundamental na transdução de sinal (Parker e Murray-rust, 2004). As vias que levam à ativação de PKC tem sido estudadas, revelando uma clara relação entre a sinalização da PI3K e a função das PKCs (Toker, 2000). A via da fosfolipase C (PLC)–PKC também parece estar envolvida nos transtornos de humor (Dwivedi et al., 2002a; Hrdina e Du, 2001; Pandey et al., 2001, 2002). A ativação da PKC resulta na fosforilação do CREB com uma ação similar a da PKA (Hoeffler et al., 1989). A atividade da PKC nos transtornos de humor é controversa. Um estudo mostrou um aumento da atividade da PKC em plaquetas (Pandey et al., 1998) e que a administração crônica de antidepressivos diminuiu a atividade da PKC no córtex e hipocampo de ratos (Mann et al., 1995; Chen et al., 1999). Em outro estudo, foram verificadas alterações na expressão da PLC e PKC em plaquetas de pacientes bipolares, mas não de unipolares (Pandey et al., 2002). Entretanto, estudos constataram uma diminuição da PKC em cérebros de pacientes

depressivos vítimas de suicídio, sugerindo que essa proteína esteja associada à patofisiologia de comportamentos suicidas (Pandey et al., 1997; 2003; 2004).

A proteína quinase fosfatidilinositol-3 (PI3K) pertence a uma família de enzimas de sinalização lipídica estimuladas por agonistas que iniciam a cascata de sinalização pela geração de três lipídeos de membrana: fosfatidilinositol fosfato (PI3), fosfatidilinositol bisfosfato (PI3,4) e fosfatidilinositol trifosfato (PI3,4,5) (Toker, 2000). Alguns trabalhos demonstraram que a PI3K modula a liberação de neurotransmissores (Hong e Chang, 1999; Yang et al., 2001; Rizzoli e Betz, 2002). O sistema fosfoinositol é uma via de sinalização envolvida na dinâmica do cálcio. Em muitos tipos de células, a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) produz diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). O IP₃ é um segundo mensageiro conhecido por regular vários processos celulares como a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático liso (Berridge, 1993; Xia e Yang, 2005). Este cálcio regula a liberação de neurotransmissores, como por exemplo, a liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos colinérgicos (Brailoiu e Miyamoto, 2000; Chameau et al., 2001).

1.5. Depressão e glutamato

Evidências indicam que os transtornos de humor estão associados com reduções regionais no volume cerebral, bem como no número, tamanho e densidade da glia e neurônios em discretas áreas do cérebro (Zarate et al., 2003). Embora a patofisiologia envolvida nessas mudanças morfométricas precisam ser elucidadas, os dados sugerem que os transtornos de humor severos estão associados com diminuições da plasticidade sináptica (Zarate et al., 2003). Neste contexto, o sistema glutamatérgico o qual é conhecido por desempenhar um papel

principal na plasticidade neuronal pode estar envolvido na patofisiologia e tratamento dos transtornos de humor (Zarate et al., 2003). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que o sistema glutamatérgico representa um alvo (frequentemente indireto) para a ação dos antidepressivos e estabilizadores de humor (Zarate et al., 2003).

O glutamato é o principal neurotransmissor sináptico excitatório no cérebro e possui um papel importante na regulação de vários processos importantes no sistema nervoso central, incluindo a aprendizagem e memória (Watkins e Collingridge, 1994). O glutamato é encontrado em aproximadamente 80% dos neurônios e em altas concentrações nos tecidos cerebrais (aproximadamente 8-10 mmol/kg, em contraste com as monoaminas, que estão na ordem de $\mu\text{mol/kg}$). Devido ao papel do glutamato na plasticidade neuronal, a modulação do sistema glutamatérgico tem sido investigada em estudos sobre desordens neuropsiquiátricas que apresentam diminuição do humor, concentração, atenção e memória (Zarate et al., 2002).

As ações a nível pré e pós-sináptico do glutamato ocorrem através da estimulação de receptores que são classificados por suas características estruturais; o primeiro grupo, receptores de glutamato ionotrópicos, incluem o N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), e a família dos receptores cainato. Estes receptores quando estimulados abrem o poro do canal para o influxo de sódio, potássio e cálcio. Este influxo de íons muda a polarização da superfície neuronal e ativa as vias de sinalização intracelular. O segundo grupo, os metabotrópicos são receptores acoplados a proteína G que mostram suas ações através de vias de segundo mensageiros (Manji et al., 2003).

A ativação dos receptores NMDA tem sido relacionada aos mecanismos de plasticidade neuronal, processos de aprendizagem e memória, desenvolvimento

neuronal (Dingledine et al., 1999; Petrie et al., 2000). Contudo, a ativação excessiva destes receptores têm sido associada com a neurotoxicidade presente em muitas doenças neuropsiquiátricas e neurológicas, tanto agudas como crônicas (Kornhuber e Weller, 1997). A influência dos receptores NMDA na liberação de neurotransmissores tem sido estudada com grande interesse, pois parece estar relacionada com alguns distúrbios psiquiátricos comuns como a esquizofrenia, demência, dependência alcoólica e a depressão (Le e Lipton, 2001; Palucha e Pilc, 2005).

Abordagens promissoras para o tratamento dos transtornos de humor envolvem a modulação do sistema de neurotransmissão glutamatérgica, via bloqueio ou potenciação do receptor pós-sináptico e inibição da liberação vesicular pré-sináptica (Mathew et al., 2005). Várias preparações neurais foram desenvolvidas como modelo para o estudo dos mecanismos moleculares da neurotransmissão, sendo um dos mais utilizados o sinaptossoma (Cousin e Robinson, 2000). O sinaptossoma é um terminal nervoso isolado que mimetiza uma célula neuronal e possui toda a maquinária necessária para a liberação de neurotransmissores de vesículas sinápticas (Nicholls, 2003).

Várias proteínas quinases estão envolvidas na regulação da liberação de neurotransmissores, dentre as quais a PKA (Nguyen e Woo, 2003), MAPK/ERK (Thomas e Huganir, 2004), CaMKII (Lisman et al., 2002) e PKC (Van der Zee e Douma, 1997). Todas essas proteínas quinases ativadas por segundos-mensageiros são expressas no terminal pré-sináptico, e várias proteínas envolvidas na liberação e reciclagem de vesículas sinápticas são substratos dessas quinases (Turner et al., 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que algumas dessas proteínas afetam a exocitose, mostrando a importância desses fatores na plasticidade pré-sináptica (Leenders e Sheng, 2005).

Justificativa

O estudo do mecanismo neuroquímico da depressão e a pesquisa de novos compostos e suas ações para o controle dos sintomas associados com os transtornos depressivos é necessário devido à: i) a alta incidência desta doença na população; ii) ao fato da terapia antidepressiva não ser totalmente eficaz, pois apenas 60% dos pacientes são responsivos aos tratamentos (Gareri et al., 2000); e iii) aos vários efeitos colaterais indesejados dos atuais antidepressivos (Nestler et al., 2002). Recentes evidências indicam que a depressão está relacionada, dentre outros fatores, com a morte neuronal, alterações na sinalização celular e a diminuição da neuroplasticidade. Por outro lado, o glutamato tem um papel fundamental na plasticidade neuronal e parece estar envolvido em alguns transtornos neuropsiquiátricos. Além disso, vários compostos antidepressivos são também neuroprotetores por induzirem a expressão de proteínas envolvidas na sobrevivência celular. A agmatina, uma amina endógena presente no SNC, apresentou atividade antidepressiva (Zomkowski et al., 2002) e uma ação neuroprotetora em vários modelos experimentais de insultos, por mecanismos não bem compreendidos (Gilad et al., 1996; 2005; Gilad e Gilad, 2000; Kim et al., 2004). Portanto, é necessário investigar os seguintes aspectos sobre o mecanismo de ação da agmatina: i) o seu efeito na expressão de proteínas neuroprotetoras; ii) as vias de sinalização celular que medeiam a sua ação antidepressiva; e iii) a sua ação na neurotransmissão glutamatérgica. O conhecimento sobre os “alvos” de ação da agmatina e dos antidepressivos pode auxiliar a compreensão sobre como estes compostos afetam direta ou indiretamente a sobrevivência celular e a neuroplasticidade (Santarelli et al., 2003).

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação antidepressivo da agmatina através de estudos "in vitro" e "in vivo".

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Analisar o hipocampo e o cerebelo de animais tratados cronicamente com agmatina ou fluoxetina, para verificar e comparar a expressão de proteínas envolvidas na sobrevivência celular: neurotrofina BDNF, anti-apoptótica Bcl2 e calbindina-28K;
- ❖ Investigar o envolvimento das vias de sinalização celular PKA, MAPK/ERK, CaMKII e PKC na ação antidepressiva aguda da agmatina e fluoxetina no teste do nado forçado em camundongos;
- ❖ Verificar o efeito da agmatina na liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos;
- ❖ Investigar a participação das vias de sinalização celular PKA, MAPK/ERK, CaMKII, PKC e PI3K na liberação sinaptossomal de glutamato induzida por agmatina.

3.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos (peso 30-40 g, com cerca de 60 dias), fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. As observações foram feitas entre 09h00 e 16h00h, sendo que cada animal foi usado somente uma vez. Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo de N^o. 300/CEUA (07/07/2004). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

3.2. Drogas e reagentes

Agmatina, estauroporina, fluoxetina, Percoll, anticorpo primário de calbindina-28K, anticorpos secundários (IgG) unidas a peroxidase, N-[2-(p-bromocinnamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89) e 4-[2-[(5-isoquinolinil-sulfonil) metilamino]-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil) propil] fenil ester (KN-62) e PD98059 foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Queleritina e LY294002 foram gentilmente doados pela Alomone Labs (Jerusalém, Israel). [H^3]glutamato foi adquirido da Amersham (UK) e o líquido de cintilação obtido da Perkin-Elmer. Anticorpos primários de BDNF e Bcl2 (monoclonal mouse) obtidos da Santa Cruz Biotechnology.

3.3. Vias de administração

Agmatina e fluoxetina foram dissolvidos em salina e administradas nos camundongos pela via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes dos testes comportamentais. A fluoxetina, um inibidor seletivo da captação de serotonina com ação antidepressiva, foi utilizada como controle.

H-89, PD98059, KN-62, LY294002 e estauroporina foram dissolvidas em salina com 1% de DMSO. A queleritina foi dissolvida em salina. Os compostos H-89, PD98059, KN-62 e queleritina foram administradas pela via intracerebroventricular (i.c.v.) em camundongos, como descrito por Eckeli et al. (2000). Para a injeção, uma agulha foi conectada a uma cânula de polipropileno acoplada a uma microseringa *Hamilton* de 50 µl. Os animais foram levemente anestesiados com éter e a administração, em um volume de 5 µl, realizada com a inserção da agulha diretamente no ventrículo lateral com a fissura bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma e 2,4 mm de profundidade). O grupo controle foi tratado com o mesmo volume de solução veículo.

3.4. Testes Comportamentais

3.4.1. Teste do nado forçado (TNF)

O teste do nado forçado foi desenvolvido por Porsolt et al., em 1977, para auxiliar na pesquisa de drogas antidepressivas. O objetivo foi criar um modelo animal que reproduzisse um comportamento semelhante à depressão e que fosse sensível a drogas utilizadas clinicamente no tratamento desta patologia. O modelo foi baseado na observação de que ratos e camundongos quando forçados a nadar, numa situação em que não poderiam escapar, após um curto período de agitação,

adotam uma postura de imobilidade, flutuando ou fazendo apenas movimentos necessários para manter a sua cabeça acima da água.

Os camundongos foram forçados a nadar individualmente, em um cilindro plástico aberto de 10 cm de diâmetro e 25 cm de altura, contendo 19 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo total de imobilidade, durante 6 minutos, foi medido conforme utilizado por Eckeli et al. (2000).

3.4.2. Teste do campo aberto (TCA)

Com a finalidade de excluir a possibilidade de que um eventual efeito antidepressivo, isto é, uma diminuição do tempo de imobilidade no TNF 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 uma 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.

3.5. Protocolos experimentais

3.5.1. Tratamento crônico com agmatina e fluoxetina

O tratamento crônico (21 dias) de camundongos com agmatina foi realizado para verificar a expressão de proteínas neuroprotetoras: BDNF, Bcl2 e calbindina-28K no hipocampo e cerebelo. A agmatina (doses de 0,1 a 3 mg/Kg; Zeidan, 2004)

ou fluoxetina (5 mg/Kg) foram administradas pela via i.p., durante 21 dias em camundongos. Após 24 horas da última injeção de agmatina ou fluoxetina, os animais foram avaliados no TNF e amostras dos cérebros processadas conforme os itens 3.5.2 e 3.5.3, descritos abaixo.

3.5.2. Preparação de amostras do cérebro de camundongos

Após o tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina, os animais foram decapitados e o cérebro dissecado para a retirada do hipocampo e cerebelo. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise (50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 2 µg/ml de aprotinina, 2 mM de benzamidina, 0,1 mM de PMSF, 2 mM de Na₃VO₄, 100 mM de NAF, pH 7,0), na relação de 0,25 g de tecido/ml de tampão. As amostras foram centrifugadas (1.000 X g, durante 10 minutos, a 4°C) e o sobrenadante alíquotado e congelado a -80°C. A concentração de proteína nas alíquotas foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Kit BCA, da Pierce, USA), utilizando albumina bovina sérica (BSA) como padrão.

3.5.3. Imunodeteção de proteínas

A expressão de proteínas foi detectada por *Western blot* como descrito por Xia et al. (1999). As amostras foram submetidas a uma eletroforese (100 volts, 2 horas) em gel de poliacrilamida a 12% com SDS (SDS-PAGE) em um sistema mini-gel (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas (230 mA, a 4°C, 20 horas) para uma membrana de nitrocelulose (Amersham), utilizando um sistema de transferência líquido. As proteínas foram detectadas utilizando os anticorpos primários: BDNF (diluição 1:1000), Bcl-2 (diluição 1:4000) ou calbindina-28K

(diluição 1:4000). A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (IgG) unida a peroxidase (diluição 1:2000). As bandas de proteínas foram visualizadas por reação de quimioluminescência (ECL, Amersham). A intensidade das bandas foi analisada por densitometria utilizando o programa Scion Image. A intensidade das bandas dos animais controle foi considerada como 100%.

3.5.4. Estudo das vias de sinalização envolvidas no efeito antidepressivo agudo da agmatina e da fluoxetina

Para investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito antidepressivo agudo da agmatina e fluoxetina, foram utilizados inibidores de proteínas quinases. Os animais foram pré-tratados (i.c.v.) com veículo ou com os seguintes compostos: H-89 (um inibidor da PKA, na dose de 1 µg/sítio, como descrito por Sato et al., 2004), PD98059 (um inibidor da MEK 1/2, na dose de 5 µg/sítio, como descrito por Vianna et al., 2000), KN-62 (um inibidor da CaMKII, na dose de 1 µg/sítio, como descrito por Vianna et al., 2000), queleritrina (um inibidor da PKC, na dose de 1 µg/sítio, como descrito por Cervo et al., 1997). Depois de 15 minutos, os camundongos receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) e decorridos 30 minutos, eles foram submetidos ao TNF. As doses de H-89, PD98059, KN-62 e queleritrina foram utilizadas por Almeida et al. (2006).

3.6 Liberação de glutamato sinaptossomal

3.6.1. Preparação de sinaptossomas

Camundongos foram decapitados com uma guilhotina e o cérebro dissecado para a retirada do córtex. Os sinaptossomas foram obtidos utilizando um gradiente

descontínuo de Percoll (Dunkley et al., 1988), como descrito por Miguez et al. (1999). O tecido dissecado foi homogeneizado em 10 volumes de solução de sacarose (0,32 M), EDTA (1 mM) e ditioneitol (0,25 mM), pH 7,4. O homogenado foi centrifugado a 1.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado com pipeta Pasteur sobre gradientes descontínuos de Percoll (3, 7, 15 e 23 %) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. As frações sinaptossomais obtidas nas interfaces 7%-15% e 15%-23% foram coletadas, reunidas e centrifugadas a 17.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi novamente ressuspensão e centrifugado a 17.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ("pellet") final ressuspensão em tampão SETH (solução salina tamponada com HEPES), com a seguinte composição: HEPES 28 mM; NaCl 133,5 mM; KCl 2,5 mM; KH₂PO₄ 20 mM; CaCl₂ 1 mM e glicose 1,2 mM. Esta suspensão de sinaptossomas foi utilizada para os ensaios de liberação de glutamato.

3.6.2. Ensaio de liberação de [³H]glutamato

O ensaio de liberação de glutamato foi realizado como descrito por Miguez et al. (1999). O "pellet" sinaptossomal foi ressuspensão em 900 µl de tampão HEPES. Nesta suspensão foram adicionados 100 µl de uma solução de [³H]glutamato, contendo 2 µCi de L-[³H]glutamato (atividade específica 53 Ci/mmol) e glutamato não-radioativo (concentração final de 5 x 10⁻⁷ M). A preparação sinaptossomal foi incubada por 15 minutos a 37°C para captação de [³H]glutamato e glutamato não-radioativo. Após a incubação, alíquotas dos sinaptossomas foram lavadas três vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de HEPES, a temperatura de 4°C. Este tampão foi utilizado para descartar o excesso de glutamato (não captado) e

alcançar o nível de liberação basal de glutamato. Após, a liberação de glutamato foi induzida através do tratamento ou pré-tratamento dos sinaptossomas em diversas condições. Ao término do tratamento, os sinaptossomas foram centrifugados a 4 °C durante 1 minuto. Os precipitados (P) e os sobrenadantes (S) foram coletados em tubos eppendorfs para medidas do [³H]glutamato. A cada tubo foi adicionado 1 ml de líquido de cintilação. A contagem da radioatividade (cpm) contida em P e S foram realizadas num cintilador líquido (Packard). A quantidade de [³H]glutamato liberado foi calculada como porcentagem do total, da seguinte maneira:

$$[{}^3\text{H}]\text{glutamato liberado (\%)} = \frac{\text{cpm em S}}{\text{cpm no S + P}} \times 100$$

3.6.3. Tratamento dos sinaptossomas

- ❖ Para verificar o efeito da agmatina na liberação de glutamato, os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto na presença de HEPES, solução despolarizante de KCl (33 mM) ou diferentes concentrações de agmatina (100, 300 e 1000 μM);
- ❖ Para verificar o efeito do tempo de incubação na liberação de glutamato, os sinaptossomas foram incubados na presença de HEPES, KCl (33 mM) e agmatina (300 e 1000 μM) durante 1, 2 e 5 minutos;
- ❖ Para investigar o envolvimento de proteínas quinases na liberação de glutamato induzida pela agmatina, os sinaptossomas foram pré-incubados durante 15 ou 20 minutos com os seguintes inibidores: PD98059 (30 μM, inibidor da MEK 1/2; Pereira et al., 2002; Raiteri et al., 2003); estaurosporina, inibidor de proteínas quinases (100 nM; Risso et al., 2004); queleritrina, inibidor da PKC (6 μM, Tuz et al., 2004); H89, inibidor da PKA (0,5 μM, Page et al., 2001; Risso et al., 2004);

LY294002, inibidor da PI3K seletivo para os subtipos I, II e III (10 μ M, Goggi et al., 2003; Okkenhaug e Vanhaesebroeck, 2001) ou KN-62, inibidor da CaMKII (1 μ M, Sihra e Pearson, 1995). Após os tratamentos, a liberação de glutamato sinaptossomal foi induzida durante 1 minuto na presença de HEPES (basal), KCl (33 mM) ou agmatina (1000 μ M).

3.7. Análise estatística

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

4.1. Efeito antidepressivo com administração crônica da agmatina ou fluoxetina

A Figura 2 foi obtida por Zeidan (2004) e mostra o efeito do tratamento crônico durante 21 dias com salina, agmatina (0,1; 0,3; 1 e 3 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (5 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento [$F(5,47) = 3,04$; $P < 0,05$]. O teste *post hoc* indicou um efeito antidepressivo da agmatina administrada cronicamente nas doses 0,3; 1 e 3 mg/kg (i.p.) e fluoxetina (5 mg/kg, i.p.) no TNF.

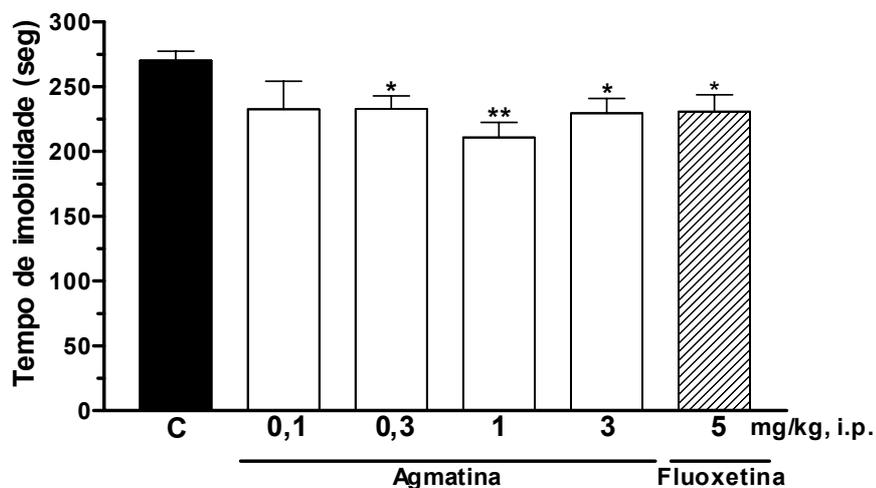


Figura 2. Efeito do tratamento crônico durante 21 dias (i.p.) com agmatina (0,1 a 3 mg/kg) ou fluoxetina (5 mg/kg), na redução do tempo de imobilidade no TNF em camundongos. Os resultados estão apresentados como média + EPM (n = 5-8). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparados com o grupo salina (controle, C) (análise por ANOVA seguido de *post-hoc* Newman Keuls) (retirado de Zeidan, 2004).

4.2. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína BDNF

A Figura 3 mostra o efeito do tratamento crônico, durante 21 dias, com salina, agmatina (1 e 3 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (5 mg/kg, i.p.) na expressão da proteína BDNF, no hipocampo e cerebelo de camundongos. As Figuras 3B (hipocampo) e 3C (cerebelo) mostram que o tratamento crônico com agmatina não afetou a expressão da proteína BDNF. Entretanto, o tratamento crônico com a fluoxetina aumentou de modo significativo ($10 \pm 2\%$), a expressão de BDNF no cerebelo dos animais (Figura 3C).

4.3. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína Bcl2

A Figura 4 mostra o efeito do tratamento crônico, durante 21 dias, com salina, agmatina (1 e 3 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (5 mg/kg, i.p.) na expressão da proteína Bcl2, no hipocampo e cerebelo de camundongos. As Figuras 4B e 4C mostram que o tratamento crônico com fluoxetina não afetou a expressão da proteína Bcl2. Entretanto, o tratamento crônico com a agmatina (3 mg/kg, i.p.) aumentou de modo significativo ($16 \pm 3\%$) a expressão da proteína Bcl2 no cerebelo dos animais (Figura 4C).

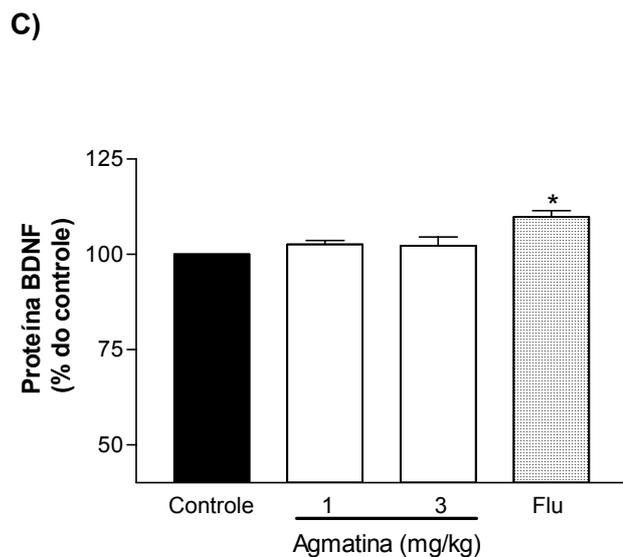
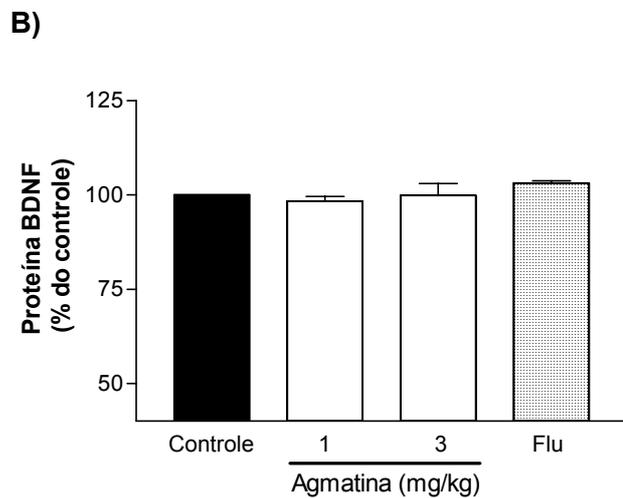
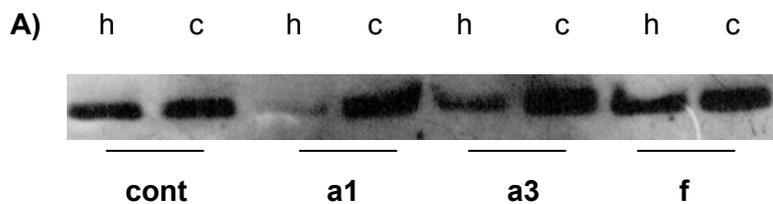
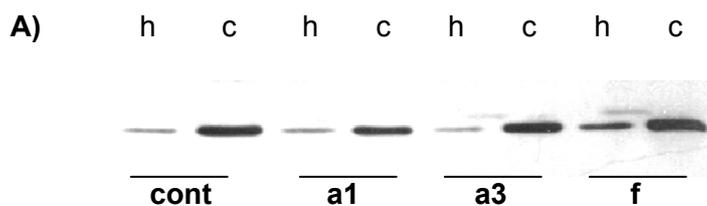
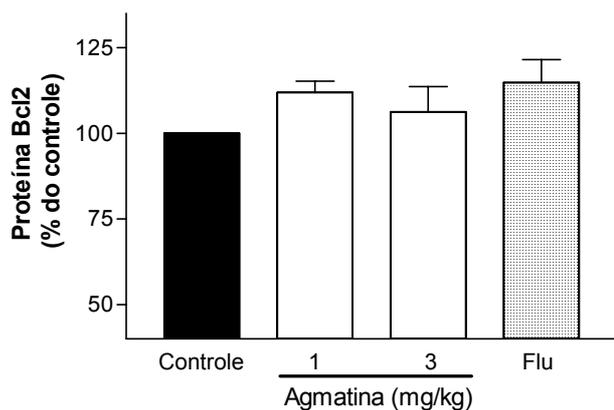


Figura 3. **(A)** Imunodeteccção representativa da proteína BDNF no hipocampo (h) e cerebelo (c) de animais controle (**cont**), tratados cronicamente (i.p.) durante 21 dias com agmatina (1 mg/kg, **a1**; 3 mg/kg, **a3**) ou fluoxetina (5 mg/kg, **f**). Quantificação do imunocontéudo da proteína BDNF no hipocampo (**B**) e cerebelo (**C**) de camundongos tratados cronicamente com agmatina ou fluoxetina (Flu). Os resultados foram obtidos através da medida da densidade das bandas em **A**) (ver métodos) e estão expressos como média + EPM (n = 3). *P < 0,05, quando comparado ao controle (análise por ANOVA seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).



B)



C)

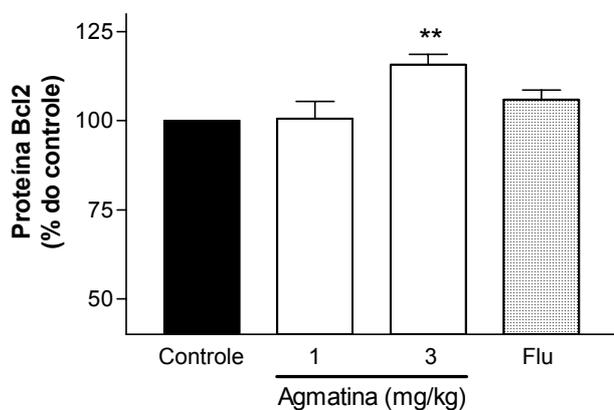


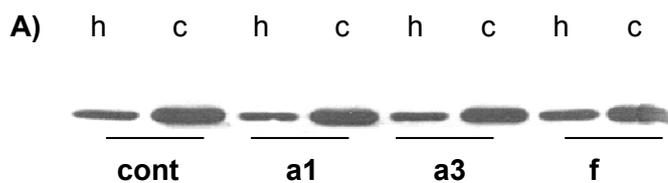
Figura 4. **(A)** Imunodeteção representativa da proteína Bcl2 no hipocampo (h) e cerebelo (c) de animais controle (**cont**), tratados cronicamente (i.p.) durante 21 dias com agmatina (1 mg/kg, **a1**; 3 mg/kg, **a3**) ou fluoxetina (5 mg/kg, **f**). Quantificação do imunocontéudo da proteína Bcl2 no hipocampo (**B**) e cerebelo (**C**) de camundongos tratados cronicamente com agmatina ou fluoxetina (**Flu**). Os resultados foram obtidos através da medida da densidade das bandas em **A** (ver métodos) e estão expressos como média + EPM (n = 3). *** P < 0,001, quando comparado ao controle (análise por ANOVA seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

4.4. Efeito do tratamento crônico com agmatina ou fluoxetina na expressão da proteína calbindina-28K

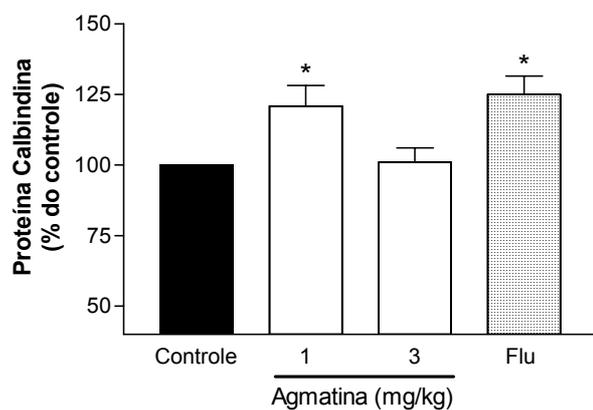
A Figura 5 mostra o efeito do tratamento crônico, durante 21 dias, com salina, agmatina (1 e 3 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (5 mg/kg, i.p.) na expressão da proteína calbindina-28K, no hipocampo e cerebelo de camundongos. O tratamento crônico com agmatina (1 mg/kg) ou fluoxetina (5 mg/kg) aumentou de modo significativo em $21 \pm 8\%$ e $25 \pm 7\%$, respectivamente, a expressão da proteína calbindina-28K no hipocampo (Figura 5B). Além disso, a expressão da calbindina-28K no cerebelo também foi aumentada de modo significativo ($28 \pm 12\%$) pelo tratamento com agmatina na dose de 3 mg/kg (Figura 5C).

4.5. Vias de sinalização celular envolvidas no efeito antidepressivo agudo da agmatina

A Figura 6 mostra que a agmatina (10 mg/kg, i.p.) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TNF) em camundongos. O pré-tratamento dos camundongos com o inibidor da PKA, o composto H-89 (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) não reverteu a redução do tempo de imobilidade causado pela agmatina (Figura 6A). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento ($F(1,25) = 66,38$; $P < 0,01$), mas não do pré-tratamento ($F(1,25) = 1,76$; $P = 0,19$) nem da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,25) = 0,19$; $P = 0,66$). Como mostrado na Figura 6B o pré-tratamento com o inibidor da MEK 1/2, PD98059 (5 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.), preveniu o efeito anti-imobilidade da agmatina no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do tratamento ($F(1,19) = 71,15$; $P < 0,01$), pré-tratamento ($F(1,19) = 37,31$; $P < 0,01$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,19) = 40,75$; $P < 0,01$).



B)



C)

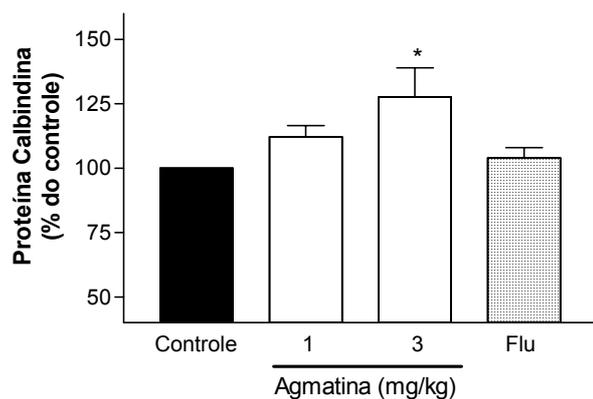


Figura 5. **(A)** Imunodeteção representativa da proteína calbindina-28K no hipocampo (**h**) e cerebelo (**c**) de animais controle (**cont**), tratados cronicamente (i.p.) durante 21 dias com agmatina (1 mg/kg, **a1**; 3 mg/kg, **a3**) ou fluoxetina (5 mg/kg, **f**). Quantificação do imunoconteúdo da proteína calbindina-28K no hipocampo (**B**) e cerebelo (**C**) de camundongos tratados cronicamente com agmatina ou fluoxetina (**Flu**). Os resultados foram obtidos através da medida da densidade das bandas em **A** (ver métodos) e estão expressos como média + EPM ($n = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparado ao controle (análise por ANOVA seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

O resultado apresentado na Figura 6C mostra que o KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor da CaMKII) preveniu a redução do tempo de imobilidade causado pela agmatina no TNF. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do tratamento ($F(1,23) = 38,86$; $P < 0,01$), pré-tratamento ($F(1,23) = 27,36$; $P < 0,01$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,23) = 39,00$; $P < 0,01$). O pré-tratamento dos camundongos com queleritrina (1 µg/sítio, i.c.v., um inibidor da PKC) reverteu a redução do tempo de imobilidade causado pela agmatina no TNF (Figura 6D). A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do tratamento ($F(1,22) = 47,98$; $P < 0,01$), pré-tratamento ($F(1,22) = 57,95$; $P < 0,01$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,22) = 69,24$; $P < 0,01$). A análise *post hoc* indicou que o efeito anti-imobilidade da agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF foi revertido pelo pré-tratamento dos camundongos com PD98059 (inibidor da MEK), KN-62 (inibidor da CaMKII) e queleritrina (inibidor de PKC), mas não com o H-89 (inibidor da PKA).

4.6. Vias de sinalização envolvidas no efeito antidepressivo agudo da fluoxetina

A Figura 7A mostra que a fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) reduziu o tempo de imobilidade no TNF em camundongos. O pré-tratamento dos camundongos com o inibidor da PKA, o composto H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.) reverteu o tempo de imobilidade causado pela fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do pré-tratamento ($F(1,20) = 70,61$; $P < 0,01$), tratamento ($F(1,20) = 74,93$; $P < 0,01$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,20) = 61,28$; $P < 0,01$).

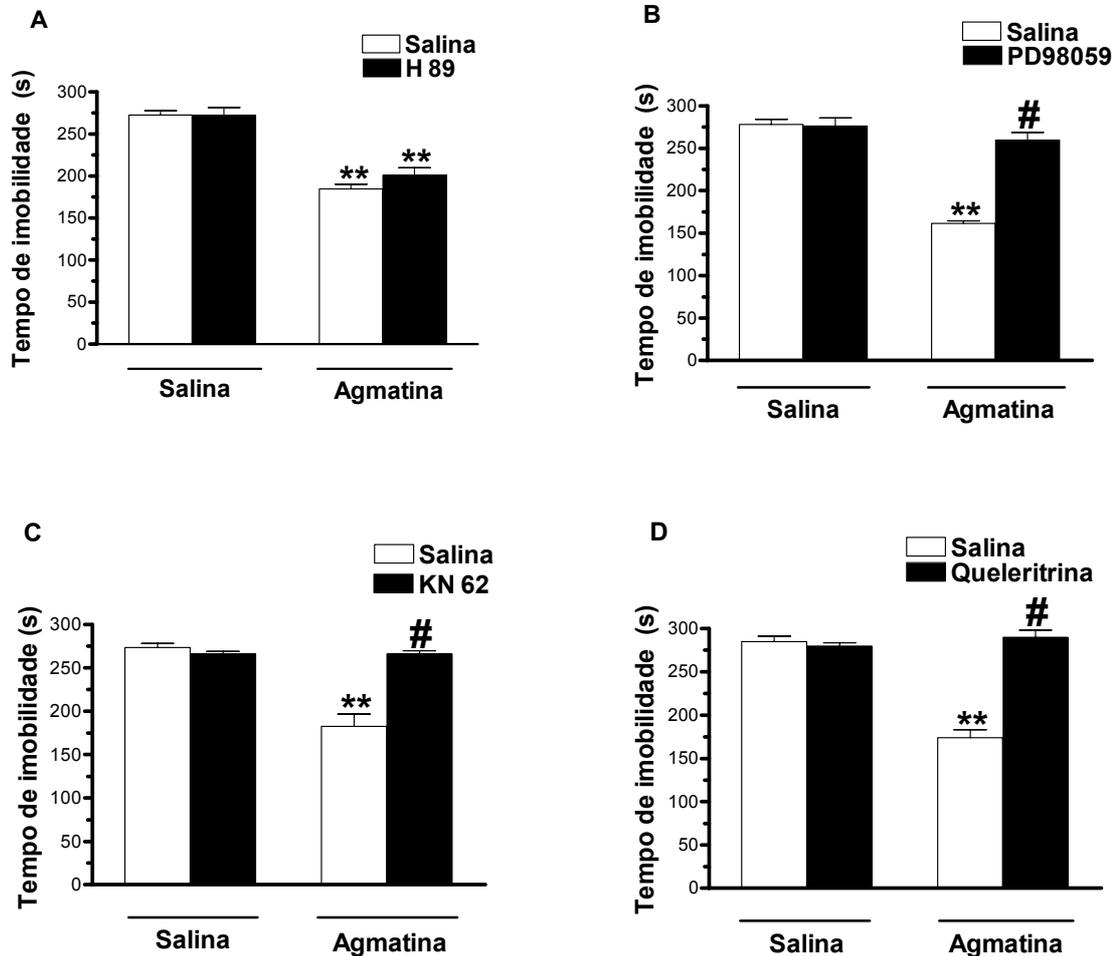


Figura 6. Efeito do pré-tratamento (i.c.v.) com H-89 (1 µg/sítio, **A**), PD98059 (5 µg/sítio, **B**), KN-62 (1 µg/sítio, **C**) ou quelerritrina (1 µg/sítio, **D**) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com os inibidores e depois de 15 minutos tratados com agmatina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com agmatina. Os resultados estão expressos como média + EPM (n = 6-8). **P < 0,01, quando comparado ao grupo controle (salina). #P < 0,01 quando comparado ao grupo agmatina versus agmatina e inibidores de proteínas quinases (análise por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

A Figura 7B mostra que o pré-tratamento com PD98059 (5 µg/site, i.c.v., um inibidor da MEK) reverteu parcialmente a redução tempo de imobilidade elicito pela fluoxetina (32 mg/kg, i.p.). A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento ($F(1,20) = 23,14$; $P < 0,01$), tratamento ($F(1,20) = 128,01$; $P < 0,01$), e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,20) = 22,71$; $P < 0,01$). Na Figura 7C pode ser observado que o pré-tratamento com o inibidor da CaMKII, o KN-62 (1 µg/sítio, i.c.v.) não reverteu o efeito anti-imobilidade da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento ($F(1,20) = 367,11$; $P < 0,01$), mas não do pré-tratamento ($F(1,20) = 0,11$; $P = 0,73$) nem da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,20) = 1,64$; $P = 0,21$). O pré-tratamento dos camundongos com o inibidor da PKC, a queleritrina (1 µg/sítio, i.c.v.) reverteu parcialmente a redução tempo de imobilidade causado pela fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF (Figura 7D). A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento ($F(1,22) = 20,37$; $P < 0,01$), tratamento ($F(1,22) = 231,13$; $P < 0,01$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(1,22) = 14,82$; $P < 0,01$). A análise *post hoc* indicou que o efeito anti-imobilidade da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) foi prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com H-89 (inibidor da PKA), PD98059 (inibidor da MEK) e queleritrina (inibidor da PKC), mas não com KN-62 (inibidor da CaMKII).

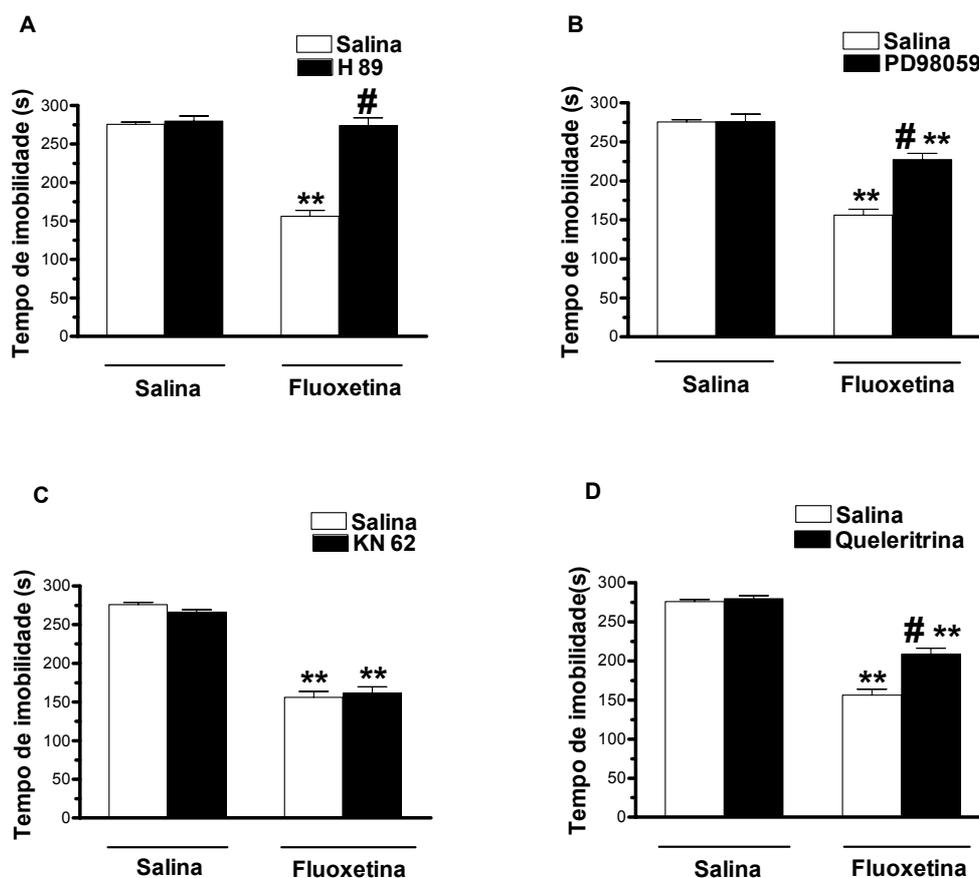


Figura 7. Efeito do pré-tratamento (i.c.v) com H-89 (1 µg/sítio, **A**), PD98059 (5 µg/sítio, **B**), KN-62 (1 µg/sítio, **C**) ou queleritrina (1 µg/sítio, **D**) sobre a redução do tempo de imobilidade causado pela fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF. Os camundongos foram pré-tratados com os inibidores e depois de 15 minutos tratados com fluoxetina. O TNF foi realizado 30 minutos após o tratamento com fluoxetina. Os resultados estão expressos como média + EPM (n = 6-8). **P < 0,01, quando comparado ao grupo controle (salina). #P < 0,01 quando comparado ao grupo fluoxetina versus fluoxetina e inibidores de proteínas quinases (análise por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

4.7. Efeito da administração de inibidores de proteínas quinases e agmatina ou fluoxetina no teste do campo aberto

A Figura 8A mostra a influência do pré-tratamento (i.c.v.) dos camundongos com salina, H-89 (1 µg/sítio), PD98059 (5 µg/sítio), KN-62 (1 µg/sítio) ou queleritrina (1 µg/sítio) seguido da administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas do pré-tratamento ($F(4,53) = 0,28$; $P = 0,88$), tratamento ($F(1,53) = 0,20$; $P = 0,65$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(4,53) = 0,20$; $P = 0,93$). O pré-tratamento dos camundongos com os inibidores H-89 (inibidor da PKA), PD98059 (inibidor da MEK), queleritrina (inibidor da PKC) e KN-62 (inibidor da CaMKII) seguido pelo tratamento com agmatina não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto.

A Figura 8B mostra a influência do pré-tratamento (i.c.v.) dos camundongos com salina, H-89 (1 µg/sítio), PD98059 (5 µg/sítio), KN-62 (1 µg/sítio) ou queleritrina (1 µg/sítio) seguido da administração de fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas do pré-tratamento ($F(4,53) = 0,17$; $P = 0,95$), tratamento ($F(1,53) = 1,18$; $P = 0,28$) e da interação tratamento x pré-tratamento ($F(4,53) = 0,15$; $P = 0,96$). O pré-tratamento dos camundongos com os inibidores H-89 (inibidor da PKA), PD98059 (inibidor da MEK), queleritrina (inibidor da PKC) e KN-62 (inibidor da CaMKII) seguido pelo tratamento com fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto.

A agmatina, fluoxetina e os inibidores de proteínas quinases *per se* também não causaram alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto.

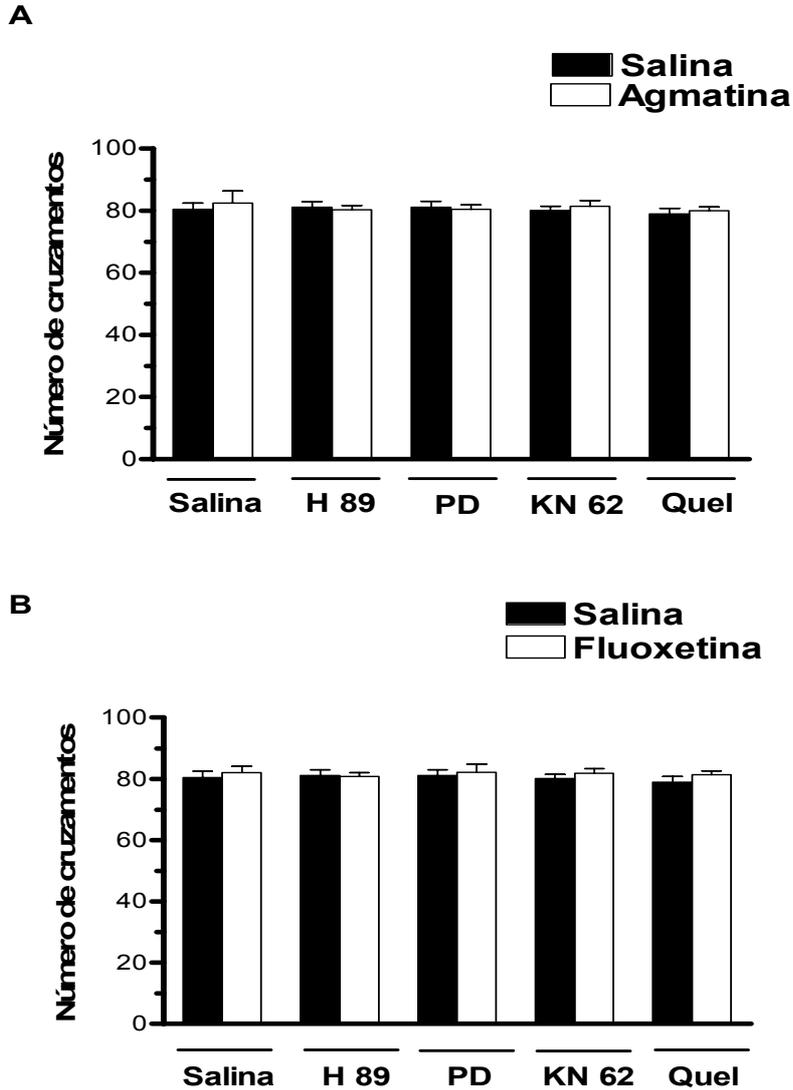


Figura 8. Efeito do pré-tratamento (i.c.v.) dos camundongos com salina, H-89 (1 $\mu\text{g/sítio}$), PD98059 (5 $\mu\text{g/sítio}$), KN-62 (1 $\mu\text{g/sítio}$) ou queleritina (1 $\mu\text{g/sítio}$) seguido por agmatina (10 mg/kg, i.p., **A**) ou fluoxetina (32 mg/kg, i.p., **B**) no número de cruzamentos no teste do campo aberto (TCA). Os camundongos foram pré-tratados com os inibidores e depois de 15 minutos tratados com agmatina ou fluoxetina. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao TCA. Os resultados estão expressos como média + EPM (n = 6).

4.8. Efeito da agmatina na liberação de glutamato sinaptossomal

A liberação de glutamato induzida pelo KCl foi de $221,6 \pm 2,5\%$. Agmatina (100, 300 e 1000 μM) induziu uma liberação de glutamato de: $125,0 \pm 8,3$; $145,8 \pm 4,2$ e $158,3 \pm 7,5\%$ do controle, respectivamente (Figura 9). A liberação de glutamato induzida pela agmatina (300 μM) foi também realizada em 1, 2 e 5 minutos: $145,8 \pm 4,2$; $160,8 \pm 24,2$ e $205,0 \pm 11,7\%$. Na concentração de 1000 μM , a agmatina induziu uma liberação de glutamato em 1, 2 e 5 minutos de: $158,3 \pm 7,5$; $167,5 \pm 5,0$ e $207,5 \pm 4,2\%$, respectivamente (Figura 10).

4.9. Vias de sinalização celular envolvidas na liberação sinaptossomal de glutamato induzida pela agmatina

Para investigar o envolvimento da PKA na liberação de glutamato induzida pela agmatina (1000 μM), os sinaptossomas foram pré-tratados com o inibidor da PKA, o H89 (0,5 μM). O H89 reduziu a liberação de glutamato induzida por KCl (de $191,4 \pm 2,3\%$ para $131,9 \pm 5,4\%$) e pela agmatina ($183,8 \pm 5,9\%$ para $136,4 \pm 11,7\%$) (Figura 11A). Este resultado sugere a participação da PKA na liberação de glutamato induzida pela agmatina.

O envolvimento da via MAPK/ERK na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela agmatina foi verificada usando um inibidor desta via, o PD98059. O pré-tratamento com PD98059 (30 μM) inibiu a liberação de glutamato evocada por KCl (33 mM) (de $191,4 \pm 2,3\%$ para $124,0 \pm 4,0\%$) e pela agmatina ($183,8 \pm 5,9\%$ para $143,2 \pm 3,4\%$) (Figura 11B). Este resultado sugere o envolvimento da via MAPK/ERK na liberação de glutamato induzida pela agmatina.

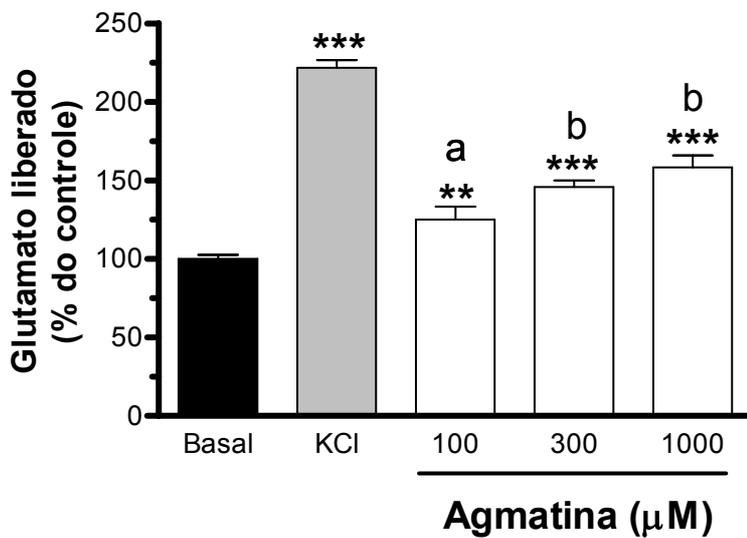


Figura 9. Efeito da agmatina na liberação de glutamato sinaptossomal. Sinaptossomas obtidos de córtex de camundongos foram incubados durante 1 minuto na presença de HEPES (Basal), solução despolarizante de KCl (33 mM) ou de agmatina nas concentrações de 100, 300 e 1000 µM. A liberação de [³H]glutamato foi determinada como porcentagem do total (n = 3). Os resultados estão apresentados como média + EPM (n = 3). **P < 0,01, ***P < 0,001 indicam dados significativos quando comparados ao basal (H, HEPES). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si (análise por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

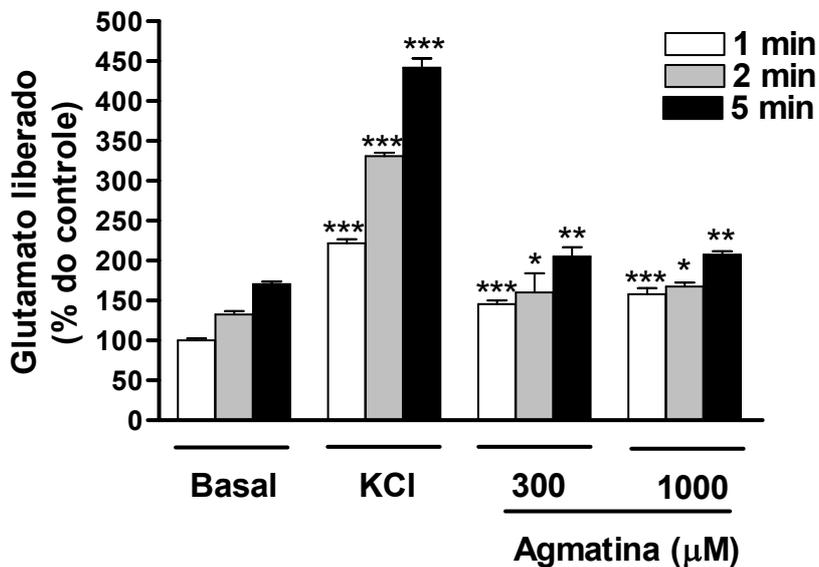


FIGURA 10. Efeito do tempo de incubação na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela agmatina. Sinaptossomas obtidos de córtex de camundongos foram incubados durante 1, 2 ou 5 minutos, na presença de HEPES (Basal), solução despolarizante de KCl (33 mM) ou agmatina (300 e 1000 μM). A liberação de [³H]glutamato foi determinada como porcentagem do total. Os resultados estão apresentados como média + EPM (n = 3). *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 em relação ao basal nos mesmos tempos de incubação (análise por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Newman Keuls).

O pré-tratamento dos sinaptossomas com o inibidor da CaMKII, o KN-62 (1 μ M) bloqueou a liberação de glutamato induzida pelo KCl (de $191,4\% \pm 2,3\%$ para $131,8 \pm 7,9\%$) e pela agmatina ($183,8 \pm 5,9\%$ para $158,1 \pm 9,0\%$) (Figura 11C). Este resultado sugere o envolvimento da CaMKII na liberação de glutamato induzida pela agmatina.

Para verificar o papel da PI3K na liberação de glutamato induzida pela agmatina, os sinaptossomas foram pré-tratados com o inibidor da PI3K, o LY294002 (10 μ M). O LY294002 não afetou a liberação de glutamato induzida pelo KCl e agmatina (Figura 11D). Este resultado sugere que a PI3K não estaria envolvida na liberação de glutamato induzida pela agmatina.

Para verificar o papel da PKC na liberação evocada pela agmatina, foram utilizados, a queleritrina (inibidor seletivo da PKC) e estauroporina (inibidor de proteínas quinases). O pré-tratamento dos sinaptossomas com queleritrina (6 μ M) bloqueou a liberação de glutamato induzida pelo KCl (33 mM) (de $191,4 \pm 2,3\%$ para $155,9 \pm 6,4\%$), mas não mostrou efeito sobre a agmatina (Figura 11E). O pré-tratamento dos sinaptossomas com estaurosporina (100 nM) inibiu a liberação de glutamato induzida pelo KCl (de $191,4 \pm 2,3\%$ para $139,7 \pm 12,1\%$) mas não preveniu o efeito da agmatina (Figura 11F). Estes resultados sugerem que a PKC não estaria envolvida na liberação de glutamato induzida pela agmatina.

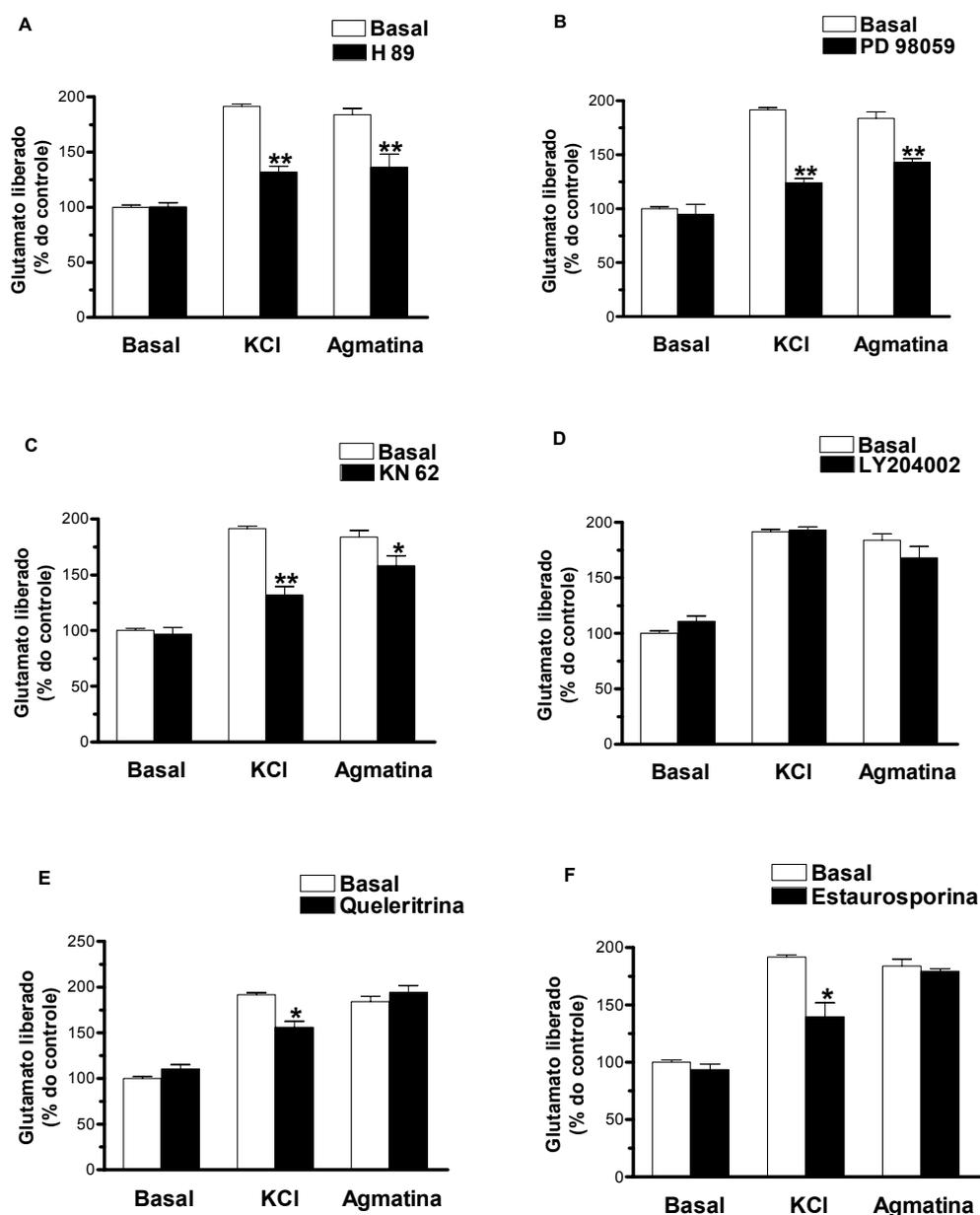


FIGURA 11. Efeito do H89, PD98059, KN-62, LY294002, quercetina e estaurosporina na liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela agmatina. Sinaptossomas obtidos de córtex de camundongos foram pré-tratados durante 15 ou 20 minutos, na presença de HEPES, H89 (6 μ M, **A**), PD98059 (30 μ M, **B**), KN-62 (1 μ M, **C**), LY294002 (10 μ M, **D**), quercetina (6 μ M, **E**) ou estaurosporina (100 nM, **F**). Após os pré-tratamentos, os sinaptossomas foram incubados durante 1 minuto na presença HEPES (basal), KCl (33 mM) ou agmatina (1000 μ M). Os resultados estão apresentados como média + EPM (n = 3). *P < 0,05 e **P < 0,01 quando comparado à ausência de pré-tratamento com os inibidores.

Neste trabalho foi confirmado que a administração aguda (i.p.) de agmatina e fluoxetina produziu um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em camundongos. Os resultados mais relevantes deste trabalho foram: 1) o tratamento crônico com agmatina induziu um aumento na expressão de Bcl2 (no cerebelo) e de calbindina-28K (no hipocampo e cerebelo), mas não afetou a expressão de BDNF; 2) o efeito antidepressivo da agmatina no TNF é mediado pelas vias de sinalização celular da MAPK/ERK, CaMKII e PKC; 3) as vias de sinalização celular da PKA, MAPK/ERK e PKC estão envolvidas no efeito antidepressivo da fluoxetina no TNF; 4) a agmatina induziu a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos de modo dependente da concentração e do tempo de incubação; 5) na liberação de glutamato induzida pela agmatina estão envolvidas as vias de sinalização celular da PKA, MAPK/ERK e CaMKII.

Vários trabalhos têm demonstrado diferentes atividades biológicas para a agmatina: antinociceptiva (Santos et al., 2005), neuroprotetora (Gilad et al., 2005), ansiolítica (Lawinsky et al., 2003) e anticonvulsivante (Feng et al., 2005). Além disso, o papel da agmatina na modulação de humor tem sido verificado em estudos pré-clínicos (Zomkowski et al., 2002; 2004; 2005, Li et al., 2003) e clínicos (Halaris et al., 1999). O trabalho de Zomkowski et al. (2002) foi o primeiro a demonstrar que o tratamento agudo de camundongos com agmatina (por via intraperitoneal ou intracerebroventricular) produziu um efeito antidepressivo no TNF.

O teste do nado forçado (TNF) é um modelo amplamente utilizado e aceito para testar novas drogas antidepressivas, porque é sensível a todas as principais classes de drogas, como os antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e inibidores da MAO (Porsolt et al., 1977; Steru et al.,

1985). Além disso, este teste apresenta grande reprodutibilidade e é de fácil aplicabilidade (Cryan et al., 2002). No TNF, os animais são submetidos a um período de nado forçado em um espaço restrito, uma situação inescapável de estresse. Os animais executam inicialmente movimentos vigorosos na tentativa de escapar e depois de alguns minutos apresentam apenas pequenos movimentos que o impeçam de submergir, adotando uma postura de imobilidade (Porsolt et al., 1977). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade dos animais (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). O TNF apresenta resultados mais reprodutíveis e por ser o modelo animal de depressão mais utilizado na literatura (Cryan et al., 2002), foi escolhido para avaliar o mecanismo de ação da agmatina. Os modelos animais de depressão podem não refletir exatamente a sintomatologia da depressão em humanos, mas têm um importante papel na investigação de drogas antidepressivas. Além disso, vários estudos demonstraram que sua efetividade se correlaciona significativamente com o potencial clínico destas drogas (Willner, 1984).

Embora os antidepressivos venham sendo utilizados há várias décadas, as bases neurobiológicas para explicar a sua eficácia ainda são pouco compreendidas. Mais recentemente, tem sido proposto que a necessidade de longo tratamento para que os antidepressivos possam exercer seus efeitos terapêuticos, é por ativar mecanismos celulares que promovam a plasticidade neuronal. Por outro lado, a neuroplasticidade e a sobrevivência celular são reguladas por diferentes vias de sinalização, que podem estar alteradas na depressão (Manji et al., 2001a; Manji et al., 2003). Vários estudos básicos e clínicos observaram reduções regionais do número (morte celular) ou do tamanho de glias e neurônios no hipocampo (atrofia neuronal) de pacientes depressivos (Eilat et al., 1999; Manji et al., 2001). Os antidepressivos bloqueiam ou revertem estes comprometimentos celulares através da ativação de vias de sinalização que regulam fatores envolvidos na sobrevivência celular ("neuroproteção"), como o CREB, BDNF e Bcl2 (Duman et al., 2000; Manji

et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002). O aumento da expressão de BDNF no hipocampo está envolvido no mecanismo de ação neuroprotetor de vários compostos antidepressivos, como os antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e inibidores da recaptação de serotonina/noradrenalina (Nibuya et al., 1995; Russo-Neustadt et al., 2000; Ivy et al., 2003; Coppell et al., 2003; Duman, 2004).

A agmatina mostrou ser neuroprotetora em vários modelos "in vivo" (Gilad et al., 1996; 2005; Gilad e Gilad, 2000; Kim et al., 2004) e "in vitro" (Olmos et al., 1999; Li et al., 2003). Estes autores sugeriram que a ação neuroprotetora da agmatina seria devido à sua capacidade de bloquear os receptores NMDA e canais de cálcio (Reis e Regunathan, 2000; Wang et al., 2000) e reduzir os níveis de NO e da atividade da nNOS (Gilad et al., 1996; Li et al., 2003; Kim et al., 2004). Entretanto, a questão é: será que a agmatina, assim como os compostos antidepressivos (e a agmatina apresenta esta ação) seria neuroprotetora também por afetar a expressão de proteínas de sobrevivência celular? Assim, para compreender o mecanismo de ação deste composto, camundongos foram tratados (i.p.) durante 21 dias com agmatina ou fluoxetina (utilizada como controle) e ao final, avaliada a expressão das proteínas BDNF, Bcl2 e calbindina-28K, no hipocampo e cerebelo. Os cérebros dos animais foram analisados 24 horas após a última injeção de agmatina ou fluoxetina. Este tempo foi escolhido porque um recente estudo (Coppel et al., 2003) mostrou que a administração crônica (14 dias, via i.p.) dos antidepressivos fluoxetina, paroxetina e sertralina (inibidores da recaptação de serotonina) e tranilcipromina (inibidor de monoamina oxidase) resultou em uma resposta bi-fásica da expressão de RNA mensageiro de BDNF (RNAm-BDNF). A análise do cérebro, 4 horas após a última injeção dos antidepressivos, mostrava uma diminuição do RNAm-BDNF no hipocampo de ratos. Entretanto, os níveis de RNAm-BDNF estavam aumentados no hipocampo (giro denteado e região CA1), se os cérebros

fossem analisados 24 horas após a última injeção destes antidepressivos. Estes autores também mostraram que os antidepressivos desipramina e maprotilina (inibidores da recaptção de noradrenalina) e a mianserina (antidepressivo atípico) não afetaram a expressão de RNAm-BDNF. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que após o tratamento crônico (i.p.) durante 21 dias com agmatina (1 e 3 mg/kg) ou fluoxetina, apenas a fluoxetina aumentou a expressão da proteína BDNF no cerebelo. Assim, o tratamento de 21 dias com duas doses de agmatina não afetou a expressão da proteína BDNF, sugerindo o não envolvimento desta neurotrofina no seu efeito neuroprotetor. O efeito dos antidepressivos sobre o BDNF foi também avaliado por Dias et al. (2003), que sugeriram mecanismos distintos para a ativação da expressão (RNAm) e a tradução (proteína BDNF). De acordo com estes autores, serão ainda necessários estudos para compreender os mecanismos envolvidos na regulação do BDNF pelos antidepressivos.

O BDNF exerce a sua ação neurotrófica e neuroprotetora através de uma cascata composta do receptor Trk (tirosina quinase), a via de sinalização celular MAPK/ERK e a ativação da expressão da proteína antiapoptótica Bcl2 (Finkbeiner, 2000; Manji et al., 2001; D'Sa e Duman, 2002; Hashimoto et al., 2004). A Bcl2 é uma proteína reguladora da apoptose e que controla o número de neurônios e células gliais no sistema nervoso central e periférico. A morte celular por apoptose parece estar envolvida em várias doenças neurodegenerativas crônicas (Adams e Cory, 1998). Desta maneira, o BDNF possui um efeito trófico para a sobrevivência celular, mas seu efeito neuroprotetor é principalmente devido à inibição da cascata de morte celular pela expressão de Bcl2. O tratamento crônico com lítio e valproato, dois compostos utilizados para o tratamento da fase maníaca do transtorno bipolar, aumentou a expressão e o número de células positivas para Bcl2 no córtex frontal de ratos (Chen et al., 1999). Esses dois compostos também aumentaram a expressão de Bcl2 no hipocampo e estriado de ratos e em culturas de células

neuronal (Manji e Chen, 2002). Xu et al. (2003) foram os primeiros a investigar o efeito do tratamento crônico (i.p.) com antidepressivos na expressão da proteína Bcl2 em várias sub-regiões do hipocampo de ratos. Os antidepressivos tricíclicos amitriptilina e venlafaxina (dose de 5 mg/kg, durante 21 dias) induziram o aumento da expressão de Bcl2 nas fibras musgosas (“mossy fibers”) da região CA3 do hipocampo. Este tratamento também aumentou a expressão de BDNF nas células granulares das regiões CA1 a CA4. Na dose de 10 mg/kg, os dois antidepressivos não provocaram efeito; venlafaxina inclusive reduziu o conteúdo de BDNF em todas as regiões do hipocampo avaliadas. Assim, o tipo de antidepressivo e os distintos tratamentos parecem influenciar os diferentes padrões de resposta da expressão de Bcl2 (Xu et al., 2003). Neste trabalho foi demonstrado que o tratamento crônico de camundongos durante 21 dias com agmatina (3 mg/kg, i.p.) aumentou a expressão da Bcl2 apenas no cerebelo. O tratamento com agmatina (1 mg/kg) ou fluoxetina não mostrou efeito no hipocampo e cerebelo. No trabalho de Xu et al. (2003) foi analisado o efeito dos antidepressivos apenas no hipocampo de ratos, assim, o efeito da agmatina é o primeiro a demonstrar a presença de Bcl2 no cerebelo de camundongos. Além disso, se poderia especular que a presença de Bcl2 poderia explicar o efeito neuroprotetor da agmatina em reduzir a toxicidade do glutamato em cultura de neurônios cerebelares (Olmos et al., 1999).

Além dos efeitos descritos anteriormente, o BDNF estimula a expressão da proteína calbindina-28K em culturas de neurônios do hipocampo e córtex (Fiumelli et al., 2000) e do estriado (Gavalda et al., 2004). A calbindina-28K é uma proteína que seqüestra o cálcio livre no citosol, impedindo que ele alcance concentrações que possam causar danos à célula (Rintoul et al., 2001; Christakos e Liu, 2004). Como o cálcio participa de uma maneira fundamental na morte celular (necrose ou apoptose), a calbindina exerce uma importante função neuroprotetora (Mattson et al., 1991). Além disso, a calbindina é capaz de inibir a caspase-3, uma das

proteínas da cascata de morte celular por apoptose, indicando que ela pode ser chamada de proteína antiapoptótica (Christakos e Liu, 2004). Estes autores também mostraram que o efeito antiapoptótico da calbindina envolve a ativação da ERK 1/2 (via MAPK/ERK) e da PKC (Christakos e Liu, 2004). Apesar dos vários estudos demonstrando o envolvimento do cálcio na morte celular por apoptose (Ojcius et al., 1991; McConkey e Orrenius, 1996), um aumento no cálcio intracelular não necessariamente está relacionado com a indução da morte apoptótica (Koh e Cotman, 1997; Chiesa et al., 1998). Em neurônios corticais, os antagonistas de canais de cálcio induzem apoptose (Koh e Cotman, 1997). Assim, as evidências sugerem que níveis intermediários de cálcio são necessários para o funcionamento de neurônios e astrócitos e que uma elevação ou uma marcante redução podem resultar na degeneração celular (Koike et al., 1989; Chiesa et al., 1998). A morte celular por apoptose tem sido associada com os transtornos de humor e as doenças neurodegenerativas (Manji et al., 2001a). Apesar de exercer também um papel importante na neuroproteção, não foram encontrados na literatura trabalhos relacionando os compostos antidepressivos com a calbindina. Recentemente, foi investigada a presença desta proteína em amostras "*post-mortem*" de indivíduos com transtorno bipolar. Shamir et al. (2005) não encontraram diferenças no conteúdo de calbindina no córtex de cérebros entre indivíduos controle e com transtorno bipolar. Contudo, nos pacientes que tinham recebido tratamento com lítio, os níveis de calbindina foram 100% maiores do que nos pacientes não tratados. Estes autores também verificaram que o tratamento sub-crônico (11 dias) e crônico (30 dias) de camundongos com lítio não afetou a expressão de calbindina no cérebro total ou no hipocampo. O conteúdo de calbindina no córtex frontal foi reduzido pelo tratamento crônico com lítio (Shamir et al., 2005). Entretanto, neste trabalho, os resultados mostraram que o tratamento crônico (i.p.) de camundongos durante 21 dias com agmatina, aumentou a expressão de calbindina no hipocampo

(dose de 1 mg/kg) e no cerebelo (dose de 3 mg/kg). Assim, este é o primeiro trabalho a demonstrar que a agmatina, um composto que apresenta várias atividades biológicas e também uma ação antidepressiva pode influenciar na expressão da proteína neuroprotetora calbindina. Além disso, um resultado interessante é que a fluoxetina também aumentou a expressão desta proteína no hipocampo. Li et al. (2003) demonstraram que o pré-tratamento de células PC12 com agmatina durante 24 horas, protegeu da morte celular provocada pela toxicidade do NMDA. Além disso, estes autores observaram que após o tratamento com agmatina, os níveis de Ca^{2+} intracelular induzido pelo NMDA foram reduzidos, sugerindo um bloqueio dos receptores NMDA (Li et al., 2003). Como o presente trabalho demonstra que a agmatina induz a expressão de calbindina, o efeito neuroprotetor e a redução dos níveis de cálcio poderia ser explicado pelo bloqueio de receptores NMDA, como sugerem Li et al. (2003), e/ou devido ao efeito da calbindina.

Apesar dos resultados não “homogêneos”, pôde ser observada uma grande variação nos dados de expressão de proteínas, geralmente comuns em experimentos “in vivo”. Entretanto, é bom salientar que nos vários trabalhos citados, os tratamentos induziram a expressão das proteínas analisadas em determinadas áreas bem específicas, por exemplo, em sub-regiões do hipocampo. De Foubert et al. (2004) comentaram que o tratamento de ratos durante 21 dias com fluoxetina aumentou o número de células positivas para o BDNF nas regiões CA1 e CA3, mas não em outras áreas do hipocampo. Entretanto, quando o hipocampo (isto é, todo o hipocampo) foi analisado, o tratamento não afetou os níveis da proteína BDNF. De acordo com estes autores, e também pode ter ocorrido neste trabalho com a agmatina, as variações regionais dentro do hipocampo podem não ser detectadas quando todo o hipocampo é analisado. Estes experimentos poderiam ser melhor analisados utilizando técnicas de imunohistoquímica.

A depressão tem sido associada com alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (Manji et al., 2001a). Os efeitos crônicos de alguns compostos antidepressivos têm sido bem investigado, mas os eventos moleculares rapidamente ativados por estas drogas ainda são pouco estudados. Assim, a relação entre o mecanismo de ativação imediata (as vias de sinalização, os alvos celulares e ativação de genes) e os efeitos crônicos ainda não são bem compreendidos. Apesar dos vários estudos sobre a agmatina, as vias de sinalização celular que medeiam os seus diferentes efeitos ainda não foram investigadas. O conhecimento da sinalização celular poderia auxiliar na compreensão do efeito neuroprotetor, da ação antidepressiva e das outras funções da agmatina. Assim, o objetivo deste grupo de experimentos foi investigar a participação das proteínas quinases PKA, MAPK/ERK, CaMKII e PKC, na ação antidepressiva aguda da agmatina no TNF. A fluoxetina, um conhecido antidepressivo, foi utilizado nos experimentos como controle positivo. Zomkowski et al. (2002; 2004) demonstraram que o efeito antidepressivo da agmatina no TNF é mediado pela sua interação com receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT₂) e α_2 -adrenérgicos. Estes receptores ativam as cascatas de sinalização da via MAPK/ERK (Mendez et al., 1999; Errico et al., 2001), CaMKII (Duman, 1998; Shaywitz e Greenberg, 1999), PKC e PKA (Liu e Albert, 1991).

Vários estudos demonstraram que a administração crônica de diferentes antidepressivos causa um aumento na atividade da via AMP cíclico-proteína quinase dependente de AMPc-CREB (cAMP-PKA-CREB) (Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002). A PKA está envolvida na fosforilação e regulação de várias proteínas, como canais iônicos, citoesqueleto, fatores de transcrição e enzimas (Gould e Manji, 2002). Vários destes efeitos da PKA foram demonstrados utilizando inibidores seletivos desta proteína quinase. Um deles é o composto H-89, uma

isoquinolinesulfonamida que atua como um inibidor competitivo do ATP por se ligar à subunidade catalítica da PKA (Chijiwa et al., 1990). Os resultados deste trabalho demonstraram que a redução do tempo de imobilidade no TNF causado pela agmatina não foi bloqueado pelo H-89, indicando que a PKA não está envolvida na sua ação antidepressiva. Entretanto, a mesma dose de H-89 foi capaz de bloquear a redução do tempo de imobilidade causada pela fluoxetina no TNF, indicando o envolvimento da PKA na sua ação antidepressiva. Além disso, Almeida et al. (2006), utilizando esta dose de H-89, demonstraram a participação da PKA no efeito antidepressivo da memantina no TNF. O resultado observado com a fluoxetina está de acordo com vários trabalhos, demonstrando o aumento da atividade da via PKA pelo tratamento agudo com fluoxetina (Rausch et al., 2002) e crônico com antidepressivos tricíclicos (imipramina), inibidores da MAO (tranilcipromina) ou choque electroconvulsivo (Nestler et al., 1989). O rolipram, um inibidor da fosfodiesterase 4, com ação antidepressiva também ativa a cascata da cAMP-PKA (Itoh et al., 2004).

A via MAPK/ERK é uma cascata de sinalização que regula vários processos celulares como a regeneração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Schaeffer e Weber, 1999) e também parece mediar eventos presentes nos transtornos de humor (Einat et al., 2003). Vários antidepressivos ativam a cascata de sinalização celular da MAPK/ERK, provocando efeitos benéficos na plasticidade e na sobrevivência neuronal (Chen et al., 1999; D'Sa e Duman, 2002; Einat et al., 2003). Mercier et al. (2004) já haviam demonstrado que a fluoxetina promove uma rápida ativação da cascata MAPK/ERK em culturas de astrócitos. Além disso, a administração crônica de fluoxetina também aumentou a expressão da MAPK/ERK no córtex pré-frontal e frontal de ratos (Tiraboschi et al., 2004a). De acordo com Sweatt (2001) esta via pode representar uma integração de sinalizações multifuncionais envolvidas na regulação da transcrição gênica, um passo crucial

para mudanças adaptativas que ocorrem após a administração crônica de antidepressivos. Neste trabalho foi demonstrado que o PD98059, um inibidor da proteína quinase MEK1/2 (um componente da via MAPK/ERK) (Dudley et al., 1995) reverteu o efeito antidepressivo da agmatina e fluoxetina no TNF, sugerindo o envolvimento da via MAPK/ERK. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (2006) que demonstraram a participação da via MAPK/ERK no efeito anti-imobilidade da memantina no TNF. No trabalho de Zomkowski et al. (2002; 2004) foi demonstrado que o efeito antidepressivo agudo da agmatina no TNF é mediado, ao menos em parte, pela interação com receptores 5-HT_{1A/1B} e α_2 -adrenérgicos. Por outro lado, vários estudos demonstraram que a cascata da via MAPK/ERK pode ser ativada por compostos que atuam via receptores 5-HT_{1A} (Mendez et al., 1999; Errico et al., 2001). Desde modo, o efeito da agmatina poderia ser devido à interação com estes receptores serotoninérgicos e ativação da via MAPK/ERK. Estes resultados estão em acordo com a ativação da via MAPK/ERK ser um alvo terapeuticamente relevante dos antidepressivos (Sweatt, 2001).

A ativação por fosforilação do substrato CREB pode ocorrer através da via PKA e pela proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina (CaMKs) (Montminy, 1997). A via da CaMKII está envolvida nos efeitos de vários antidepressivos; o tratamento crônico com paroxetina, fluvoxamina ou venlafaxina aumentou a autofosforilação e a atividade da CaMKII no hipocampo (Popoli et al., 2002). Neste trabalho, o KN-62, um inibidor que interage com o domínio regulatório da CaMKII (Tokomitsu et al., 1990), reverteu o efeito anti-imobilidade da agmatina, sugerindo que sua ação antidepressiva possa ser devido a ativação desta proteína quinase. Almeida et al. (2006) também utilizaram o KN-62 e mostraram o envolvimento da CaMKII no efeito antidepressivo da memantina no TNF. Estudos anteriores demonstraram que a interação com os receptores 5-HT₂ ativam a CaMK (Chen e

Reith, 1995; Shaywitz e Greenberg, 1999). Assim, os compostos antidepressivos que interagem com estes receptores poderiam diretamente induzir a ativação de CREB (Duman, 1998). Portanto, uma possível explicação para a participação da CaMKII no efeito da agmatina, é que o seu efeito antidepressivo no TNF envolve uma interação com os receptores 5-HT₂, como foi demonstrado por Zomkowski et al. (2004). O efeito anti-imobilidade da fluoxetina não tem sido relacionado aos receptores 5-HT₂ (Yamada e Sugimoto, 2002) e devido a isso pode não ter sido revertido pelo KN-62. O composto LY 53857, um antagonista de receptores 5-HT₂, não foi capaz de antagonizar o efeito da fluoxetina no TNF (Yamada e Sugimoto, 2002). Além disso, Popoli et al. (2000) demonstraram que o tratamento crônico, mas não agudo com os antidepressivos, fluoxetina, desipramina e reboxetina, aumentaram a atividade enzimática da Ca²⁺/calmodulina quinase II no córtex pré-frontal de ratos. Estes resultados estão de acordo com o fato da CaMKII, um importante regulador da plasticidade sináptica, estar envolvida na patofisiologia e farmacologia dos transtornos psiquiátricos (Tiraboschi et al., 2004b).

O estudo de Pandey et al. (1997) verificou que a PKC estava diminuída em cérebros *postmortem* de vítimas de suicídio, sugerindo a participação desta proteína quinase na patofisiologia das doenças do humor. Posteriormente, vários trabalhos demonstraram que as drogas antidepressivas ativam cascatas de transdução de sinal que envolvem também a PKC (Chen et al., 1999; Popoli et al., 2000; Dwivedi et al., 2002a; Pandey et al., 2001, 2002; Hashimoto et al., 2004). A PKC, assim como a PKA, fosforila fatores de transcrição como o CREB, c-Fos e c-Jun, além de outros substratos (Pandey et al., 2003). Neste trabalho, o efeito antidepressivo da agmatina foi prevenido pela queleritrina, um composto que inibe o sítio de ligação do substrato/ATP no domínio catalítico da PKC (Breukel et al., 1998). Estes dados indicam a participação da PKC no efeito antidepressivo da agmatina. Zomkowski et al. (2004) demonstraram que o efeito antidepressivo da

agmatina no TNF parece ser mediado ao menos em parte, pela interação com receptores 5-HT₂. Estes receptores favorecem a entrada de cálcio, o qual ativa o sistema de sinalização fosfatidilinositol (PI) que fosforila a PKC (Liu e Albert, 1991). A ativação da PKC ocorre via PI após a junção do ligante em seu receptor extracelular. A ligação do GTP induz a hidrólise do fosfotidil-inositol-difosfato (PIP₂) para diacilglicerol (DAG) e inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP₃). A hidrólise do PIP₂ para DAG e IP₃ é controlada pela enzima conhecida como fosfolipase C. Estes produtos atuam como segundos mensageiros em duas cascatas separadas de segundos mensageiros. O DAG ativa a fosforilação da proteína quinase C (PKC), uma enzima que possui efeitos diretos nos sistemas celulares e que está envolvida na fosforilação de outras proteínas na célula (Kanashiro e Khalil, 1998). A PKC não está apenas envolvida em importantes funções celulares e fisiológicas, mas, é também um componente chave no sistema de sinalização do PI do qual, os receptores 5-HT₂ e outros receptores como o α 1-adrenérgico e o M1 muscarínico estão ligados (Conn e Sanders-Bush, 1986). O envolvimento da PKC na ação terapêutica de várias drogas antidepressivas, como fluoxetina e desipramina já havia sido demonstrada (Mann et al., 1995b). Além disso, a administração aguda de fluoxetina resulta na “up-regulation” da PKC (Rausch et al., 2002). A fluoxetina também aumenta a atividade da PKC em sinaptoneurossomas corticais de ratos (Giambalvo e Price, 2003).

A reversão do efeito antidepressivo da agmatina e da fluoxetina no TNF pelo H-89, PD98059, KN-62 e queleritrina não está associada a nenhum efeito motor, pois a administração dos antidepressivos e dos inibidores de proteínas quinases, isoladamente ou em combinação, não alterou a atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA), indicando que o efeito observado é específico.

Embora o exato mecanismo pelo qual a agmatina exerce seu efeito antidepressivo no TNF pela ativação das vias MAPK/ERK, CaMKII e PKC, não seja

claro, esta ação pode ser devido à sua interação com os receptores 5-HT_{1A}, α_2 -adrenérgicos e 5-HT₂, os quais ativam as cascatas MAPK/ERK (Mendez et al., 1999; Errico et al., 2001), CaMKII (Duman, 1998; Shaywitz e Greenberg, 1999), PKC (Liu e Albert, 1991). Os resultados deste trabalho pela primeira vez, apresentaram também evidências do envolvimento das vias PKA, MAPK/ERK e PKC, no efeito agudo antidepressivo da fluoxetina no TNF. De acordo com vários autores, os antidepressivos que aumentam os níveis de serotonina nas sinapses ativam CREB através das vias de transdução de sinal PKA, MAPK e CaMKII (D'Sa e Duman, 2002; Hashimoto et al., 2004).

Várias evidências indicam que os transtornos de humor estão associadas com reduções regionais no volume cerebral, bem como no número, tamanho e densidade da glia e neurônios em discretas áreas do cérebro (Zarate et al., 2003). Embora a patofisiologia envolvida nessas mudanças morfométricas precise ser elucidada, os dados sugerem que as desordens de humor severas estão associadas com a redução da neuroplasticidade. Neste contexto, o sistema glutamatérgico o qual é conhecido por desempenhar o papel principal na plasticidade neuronal parece estar envolvido na patofisiologia e tratamento das desordens de humor (Zarate et al., 2002). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que o sistema glutamatérgico representa um alvo (frequentemente indireto) para a ação dos antidepressivos e estabilizadores de humor (Zarate et al., 2003).

A localização da agmatina em sinapses excitatórias no hipocampo (Reis et al., 1998) sugere que a agmatina possa regular a neurotransmissão glutamatérgica. O envolvimento da agmatina com a neurotransmissão glutamatérgica tem sido investigada recentemente por Abe et al. (2003) e Feng et al (2005). Apesar dos trabalhos anteriores, demonstrando a ação neuroprotetora da agmatina, Abe et al. (2003) mostraram que a agmatina (400 μ M) induzia a morte de células granulares

cerebelares de ratos. A incubação de agmatina entre 200 a 800 μM , durante 24 horas, reduziu a viabilidade celular. Estes autores demonstraram que a morte celular era causada pela liberação de glutamato induzida por agmatina. O efeito citotóxico provocada pela agmatina (400 μM) era observado somente após 6 horas, apesar da liberação de glutamato iniciar após 90 minutos na presença do composto. Por outro lado, Feng et al. (2005) demonstraram que a ação anticonvulsivante da agmatina seria por reduzir os níveis de glutamato no córtex frontal de ratos. Os compostos antidepressivos como a imipramina e desipramina, em concentrações de 100 μM ou maiores, ativaram a via fosfolipase C-IP3, que provoca o aumento dos níveis de cálcio intracelular que induz a liberação de neurotransmissores (Fukuda et al., 1994; Bouron e Chatton, 1999). Assim, neste trabalho foi investigado se a agmatina, em concentrações maiores do que 100 μM induz a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos. A agmatina induziu uma rápida liberação sinaptossomal de glutamato de modo dependente do tempo e da concentração (100 a 1000 μM). Como os sinaptossomas foram incubados até 5 minutos com a agmatina, a liberação de glutamato verificada não seria resultante da lise sinaptossomal. A liberação de glutamato induzida pela agmatina foi bem menor do que a induzida por despolarização com KCl. Assim, é possível especular que esta quantidade de glutamato não provoque um processo de excitotoxicidade, pelo contrário, pode atuar auxiliando na melhoria da neuroplasticidade. Entretanto, também tem sido demonstrado que a agmatina pode inibir a liberação de noradrenalina de terminais nervosos (Wang et al., 2002). A capacidade da agmatina em bloquear os receptores NMDA (Reis e Regunathan, 2000) parece não explicar a sua ação neurosecretora. Contudo, vários estudos têm demonstrado que a administração sistêmica de antagonistas NMDA aumenta a liberação de glutamato (Moghaddam

et al., 1997; Moghaddam e Adams, 1998; Zuo et al., 2005). Estes autores sugerem que o bloqueio do receptor NMDA pode estimular a neurotransmissão glutamatérgica através de outros receptores como os receptores AMPA e cainato, além de outros receptores de glutamato metabotrópicos (Moghaddam e Jackson, 2003). A relação entre a liberação de glutamato e os compostos antidepressivos ainda não é bem compreendido. O antidepressivo desipramina aumentou a liberação de glutamato em culturas de neurônios hipocâmpais de ratos (Bouron e Chatton, 1999). Entretanto, Golembiowska e Dziubina (2001) e Bobula (2003) mostraram que a imipramina e a desipramina inibem a liberação de glutamato no córtex frontal de ratos. Até recentemente, os autores não estiveram de acordo, pois Ferrero et al. (2005) demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta a liberação de glutamato no hipocampo de ratos. Ao contrário, Bonanno et al. (2005) demonstram que os antidepressivos diminuem a liberação de glutamato em sinaptossomas hipocâmpais.

Finalmente, foi investigado o mecanismo de liberação de glutamato pela agmatina. A neurotransmissão é regulada positiva ou negativamente de múltiplas maneiras e acredita-se que esta regulação seja um dos mais importantes mecanismos de plasticidade sináptica, que leva ao aprendizado e memória. Diferentes proteínas quinases têm sido envolvidas na regulação pré-sináptica em vários tipos de preparações neuronais.

Assim, neste trabalho foi investigado o papel das vias de sinalização PKA, MAPK/ERK, CaMKII, PI3K e da PKC na liberação de glutamato induzida pela agmatina. A PKA é uma via conhecida por potenciar a transmissão sináptica, aumentando a liberação de glutamato em várias preparações neuronais, como fatias hipocâmpais e sinaptossomas (Millán et al., 2003). Marabese et al. (2005) demonstraram que a liberação de glutamato requer a participação do acoplamento da adenilato ciclase e a subsequente ativação da PKA. Neste trabalho, o H89 inibiu

em cerca de 68% a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por KCl, um resultado semelhante aos obtidos por Grilli e colaboradores (2004), nos quais a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por KCl foi inibida em 50% pelo H89. De acordo com estes autores, a liberação de glutamato dependente de Ca^{2+} induzida pela depolarização com KCl consiste de dois componentes: um diretamente ligado à entrada de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) e outro componente indireto através da via adenilato ciclase-PKA-CCDV (Grilli et al., 2004). O H-89 também inibiu a liberação de glutamato sinaptossomal induzida pela agmatina, sugerindo o envolvimento da PKA na sua ação neurosecretora. Este resultado está de acordo com Wang (2006a) que demonstrou que o rolipram, um inibidor de fosfodiesterase, que possui efeito antidepressivo, ativou a PKA e induziu a liberação de glutamato em sinaptossomas.

Trabalhos recentes demonstraram a participação da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) que leva à ativação das proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1 e 2), no controle da liberação de neuropeptídeos, hormônios e aminas (Coxon et al., 2003; Park et al., 2005). No presente trabalho foi demonstrado que o PD98059, um inibidor da MEK diminuiu a liberação de glutamato induzida pela agmatina e KCl. Pereira et al. (2002) haviam demonstrado que o PD98059 inibe a liberação de glutamato em sinaptossomas hipocampais estimulados por despolarização com KCl. Como já havia sido comentado, a agmatina por atuar sobre os receptores $5-HT_{1A}$ (Zomkowski et al., 2002; 2004) poderiam ativar a cascata MAPK/ERK (Mendez et al., 1999; Errico et al., 2001). A regulação da liberação de neurotransmissores pela via MAPK/ERK foi demonstrado por Jovanovic et al. (2000) utilizando o PD98059. A inibição desta via diminuiu a fosforilação da sinapsina I e conseqüentemente reduziu a liberação de neurotransmissores.

Embora o mecanismo exato pelo qual a agmatina induz a liberação de glutamato sinaptossomal via MAPK/ERK ainda não está esclarecido, uma possível explicação para esta ação é que a agmatina induza o influxo de Ca^{2+} (Shepherd et al., 1996). Vários trabalhos têm demonstrado que o aumento nos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ em resposta à despolarização e estimulação dos receptores glutamatérgicos ativa a via MAPK/ERK (Atherfold et al., 1999; Egea et al., 1999; Pereira et al., 2002).

Os níveis de Ca^{2+} têm um papel fundamental na regulação da função dos terminais nervosos, através da ativação de enzimas dependentes de calmodulina, como as proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKs) (Lennders e Sheng, 2005). A CaMKII é abundante no cérebro e participa de importantes processos no sistema nervoso central, como a regulação da síntese, liberação e sinalização de neurotransmissores (Braun e Schulman, 1995, Soderling et al., 2001b, Hudmon e Schulman, 2002a; Hudmon e Schulman, 2002b). A CaMKII fosforila proteínas envolvidas no tráfego, ancoramento e fusão de grânulos secretores. No cérebro, a isoforma α -SNAP possui um papel importante na regulação da liberação de neurotransmissores via fosforilação da sinapsina I pela associação com vesículas sinápticas (Yamamoto et al., 2003). O papel da CaMKII na excitose já havia sido demonstrado por Sihra e Pearson (1995), em um trabalho no qual KN-62, um inibidor específico da CaMKII, diminuiu a liberação de glutamato sinaptossomal induzida por despolarização com KCl e 4-aminopiridina. Neste trabalho, o KN62, um inibidor da CaMKII, inibiu a liberação de glutamato induzida pela agmatina, sugerindo o envolvimento desta proteína quinase na sua ação neurosecretora. A agmatina parece atuar via receptores 5-HT₂ (Zomkowski et al., 2004) e estes podem ativar a CaMKII (Duman, 1998; Shaywitz e Greenberg, 1999) que conseqüentemente estimularia a liberação de glutamato. Portanto, a agmatina pode iniciar cascatas de sinalização celular que poderiam convergir em

alvos comuns resultando na modulação da plasticidade sináptica, como tem sido demonstrado para os diversos compostos antidepressivos (Popoli et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Hashimoto et al., 2004).

A proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) regula a síntese proteica, a migração celular, a mitogênese e participa de vias anti-apoptóticas (Brunet et al., 2001; Cantrell et al., 2001; Maffucci et al., 2005). A PI3K fosforila e ativa a proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt, que como uma proteína quinase lipídica aumenta o conteúdo de fosfoinosítídeos fosforilados na membrana (Cantrell, 2001). Contudo, o envolvimento direto desta proteína quinase e de seus produtos lipídicos na neuroexocitose tem sido questionado, com base em vários resultados mostrando nenhuma ou pouca inibição da exocitose sinaptossomal pelos seus inibidores seletivos, wortmanina e LY294002 (Chasserot-Golaz et al., 1998; Meunier et al., 2005; Milosevic et al., 2005). Amino e colaboradores (2002) demonstraram que NGF (fator de crescimento do nervo) aumenta a liberação de neurotransmissores em células PC12, através da ativação das proteínas quinases ERK e PI3K. Goggi e colaboradores (2003) demonstraram que o LY294002, um inibidor de PI3K, diminuiu a liberação sinaptossomal de dopamina induzida pelo KCl e BDNF em sinaptossomas. No presente trabalho, a liberação de glutamato induzida pela despolarização por KCl e pela agmatina não foi alterada pelo pré-tratamento com LY294002, indicando que a via PI3K parece não estar envolvida na liberação de glutamato induzida pela agmatina e KCl.

Várias isoformas da PKC foram detectadas em sinaptossomas (Ryves et al., 1996; Shearman et al., 1991). A ativação da PKC pode aumentar a liberação de neurotransmissores por vários mecanismos como: aumento na atividade dos canais de Ca^{2+} , inibição dos canais de K^+ , alterações na maquinaria exocitótica, aumento no "pool" de vesículas prontas e aumento da sensibilidade da maquinaria de liberação ao Ca^{2+} (Millán et al., 2003). O aumento da liberação de glutamato

dependente da PKC ocorreu durante a despolarização induzida pelo 4-aminopiridina, mas não durante a estimulação com altas concentrações de KCl (Coffey et al., 1993). O alvo da PKC parece ser o canal de K⁺ pré-sináptico que controla a duração do potencial de ação. O bloqueio deste canal causa um aumento da despolarização que induz a entrada de Ca⁺², resultando no aumento da liberação de glutamato (Cousin e Robinson, 2000). No presente estudo, a liberação de glutamato induzida pelo KCl foi inibida pela estauroporina, um inibidor de PKC de amplo espectro, e pela queleritrina, um inibidor específico de PKC, resultados semelhantes aos de Cousin e Robinson (2000). Entretanto, a queleritrina e a estaurosporina não mostraram efeito na liberação de glutamato induzida pela agmatina. A PKC, por sua vez, pode ser ativada por cálcio e fosfolípidos (Luo e Weinstein, 1993). A agmatina bloqueia canais de cálcio dependentes de voltagem em culturas de neurônios hipocámpais (Zheng et al., 2004) o que pode estar interferindo na ativação da PKC. Esses resultados demonstram que a via da PKC parece não estar envolvida no efeito neurosecretor da agmatina.

Além disso, pode ser especulado que durante o tratamento crônico com a agmatina, a liberação de glutamato poderia atuar sobre receptores NMDA, o que induziria um constante influxo de cálcio, com a conseqüente ativação da síntese e expressão de BDNF e/ou também da proteína calbindina. O conjunto destes efeitos poderiam resultar na neuroproteção induzida pela agmatina.

Em conclusão, os resultados deste trabalho mostram que o efeito antidepressivo e a liberação sinaptossomal de glutamato induzida pela agmatina envolvem em comum, as vias de sinalização celular da MAPK/ERK e CaMKII. Estes resultados obtidos de experimentos "*in vivo*" e "*in vitro*" auxiliam a compreensão do mecanismo de ação antidepressivo e neuroprotetor da agmatina e de seu possível papel nas desordens de humor, como a depressão.

6. Conclusões

- ❖ A administração (i.p.) de agmatina e fluoxetina produziu um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em camundongos;
- ❖ O tratamento crônico de camundongos com agmatina induziu um aumento na expressão das proteínas Bcl2 (no cerebelo) e de calbindina-28K (no hipocampo e cerebelo), mas não afetou a expressão de BDNF;
- ❖ O efeito anti-imobilidade da agmatina no TNF parece envolver as vias de sinalização da MAPK/ERK, CaMKII e PKC, mas não a da PKA;
- ❖ As vias de sinalização da PKA, MAPK/ERK e PKC, mas não a da CaMKII, parecem estar envolvidas no efeito antidepressivo da fluoxetina no TNF;
- ❖ A agmatina, fluoxetina e os inibidores de proteínas quinases não causaram alterações na atividade locomotora quando testadas no campo aberto;
- ❖ A agmatina induziu a liberação de glutamato em sinaptossomas corticais de camundongos de modo dependente da concentração e do tempo de incubação;
- ❖ A liberação de glutamato induzida pela agmatina envolve as vias de sinalização PKA, MAPK/ERK e CaMKII.

7. Referências bibliográficas

ABE, K., ABE, Y., SAITO, H. Agmatine induces glutamate release and cell death in cultured rat cerebellar granule neurons. *Brain Res.*, **990**: 165-171, 2003.

ADAMS, J.M. e CORY, S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, **281**: 1322-1326, 1998.

ALMEIDA, R.C., SOUZA, D.G., SOLETTI, R.C., LOPEZ, M.G., RODRIGUES, A.L., GABILAN, N.H. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. *Neurosci. Lett.*, **395**: 93-97, 2006.

ALT, A., NISENBAUM, E.S., BLEAKMAN, D., WITKIN, J.M. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol.*, 2006. (in press)

ALTAR, C.A. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**: 59-61, 1999.

AMINO, S., ITAKURA, M., OHNISHI, H., TSUJIMURA, J., KOIZUMI, S., TAKEI, N., TAKAHASHI, M. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca²⁺-responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biochem.*, **131**: 887-894, 2002.

ATHERFOLD, P.A., NORRIS, M.S., ROBINSON, P.J., GELFAND, E.W., FRANKLIN, R. A. Calcium-induced ERK activation in human-T lymphocytes. *Mol. Immunol.*, **36**: 543-549, 1999.

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.

BERKELS, R., TAUBERT, D., GRUNDEMAN, D., SCHOMIG, E. Agmatine signaling: odds and threads. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **22**: 7-16, 2004.

BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**: 315-325, 1993.

BEYER, J.L. e KRISHNAN, K.R. Volumetric brain imaging findings in mood disorders. *Bipolar Disord.*, **4**: 89-104, 2002.

BRAILOIU, E. e MIYAMOTO, M.D. Inositol trisphosphate and cyclic adenosine diphosphate-ribose increase quantal transmitter release at frog motor nerve terminals: possible involvement of smooth endoplasmic reticulum. *Neuroscience*, **95**: 927-931, 2000.

- BOBULA, B., TOKARSKI, K., HESS, G. Repeated administration of antidepressants decreases field potentials in rat frontal cortex. *Neuroscience*, **120**: 765-769, 2003.
- BONANNO, G., GIAMBELLI, R., RAITERI, L., TIRABOSCHI, E., ZAPPETTINI, S., MUSAZZI, L., RAITERI, M., RACAGNI, G., POPOLI, M. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J. Neurosci.*, **25**: 3270-3279, 2005.
- BONNI, A., BRUNET, A., WEST, A.E., DATTA, S.R., TAKASU, M.A., GREENBERG, M.E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*, **286**: 1358-1362, 1999.
- BOURON, A. e CHATTON, J.Y. Acute application of the tricyclic antidepressant desipramine presynaptically stimulates the exocytosis of glutamate in the hippocampus. *Neuroscience*, **90**: 729-736, 1999.
- BRAILOIU, E. e MIYAMOTO, M.D. Inositol trisphosphate and cyclic adenosine diphosphate-ribose increase quantal transmitter release at frog motor nerve terminals: possible involvement of smooth endoplasmic reticulum. *Neuroscience*, **95**: 927-931, 2000.
- BRAUN, A.P. e SCHULMAN, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol.*, **57**: 417-445, 1995.
- BREUKEL, A.I., WIEGANT, V.M., LOPES, D.A., SILVA, F.H., GHIJSEN, W.E. Presynaptic modulation of cholecystokinin release by protein kinase C in the rat hippocampus. *J. Neurochem.*, **70**: 341-348, 1998.
- BRUCKHEIMER, E.M., CHO, S.H., SARKISS, M., HERRMANN, J., MCDONNELL, T.J. The Bcl-2 gene family and apoptosis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **62**: 75-105, 1998.
- BRUNET, A., DATTA, S.R., GREENBERG, M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**: 297-305, 2001.
- CANTRELL, D.A. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J. Cell Sci.*, **114**: 1439-1445, 2001.
- CELIO, M.R. Calbindin and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, **35**: 375-475, 1990.
- CERVO, L., MUKHERJEE, S., BERTAGLIA, A., SAMANIN, R. Protein kinases A and C are involved in the mechanisms underlying consolidation of cocaine place conditioning. *Brain Res.*, **775**: 30-36, 1997.
- CHAMEAU, P., VAN DE VREDE, Y., FOSSIER, P., BAUX, G. Ryanodine-, IP3- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Arch.*, **443**: 289-296, 2001.

- CHASSEROT-GOLAZ, S., HUBERT, P., THIERSE, D., DIRRIG, S., VLAHOS, C.J., AUNIS, D., BADER, M.F. Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J. Neurochem.*, **70**: 2347-2356, 1998.
- CHEN, N.H. e REITH, M.E. Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated sistemically with (+/-)-8-hydroxyl-2-di-n-propylamino)tetralin. *J. Neurochem*, **64**: 1685-1597.
- CHEN, G., ZENG, W.Z., YUAN, P.X., HUANG, L.D., JIANG, Y.M., ZHAO, Z.H., MANJI, H.K. The mood stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J. Neurochem.*, **72**: 879-882, 1999.
- CHIESA, R., ANGERETTI, N., DELBO, R., LUCCA, E., MUNNA, E., FORLONI, G. Extracellular calcium deprivation in astrocytes: regulating of mRNA expression and apoptosis. *J. Neurochem.*, **70**: 1474-1483, 1998.
- CHIJIWA, T., MISHIMA, A., HAGIWARA, M., SANO, M., HYASHI, K., INOUE, T., NAITO, K., TOSHIOKA, T., HIDAKA, H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-romocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, **265**: 5267-5272, 1990.
- CHRISTAKOS, S., GABRIELIDES, C., RHOTEN, W.B. Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations and molecular biology, *Endocr. Rev.*, **10**: 3-26, 1989.
- CHRISTAKOS, S. e LIU, Y. Biological actions and mechanism of action of calbindin in the process of apoptosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **89**: 401-404, 2004.
- COFFEY, E.T, SIHRA, T.S., NICHOLLS, D.G. Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, **268**: 1060-2105, 1993.
- CONN, P.J. e SANDERS-BUSH, E. Regulation of serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis: relation to the serotonin 5-HT-2 binding site. *J. Neurosci.*, **6**: 3669-3675, 1986.
- CONTI, A.C., CRYAN, J.F., DALVI, A., LUCKI, I., BLENDY, J.A. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrphic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J. Neurosci.*, **22**: 3262-3268, 2002.
- COPPELL, A.L., PEI, Q., ZETTERSTROM, T.S. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment, *Neuropharmacology*, **44**: 903-910, 2003.

COUSIN, M.A. e ROBINSON, P.J. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals. *J. Neurochem.*, **75**: 1645-1653, 2000.

COXON, P.Y., RANE, M.J., URIARTE, S., POWELL, D.W., SINGH, S., BUTT, W., CHEN, Q., MCLEISH, K.R. MAPK-activated protein kinase-2 participates in p38 MAPK-dependent and ERK-dependent functions in human neutrophils. *Cell Signal.*, **15**: 993-1001, 2003.

CRYAN, I.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents; recent development and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**: 238-245, 2002.

DE FOUBERT G, CARNEY SL, ROBINSON CS, DESTEXHE EJ, TOMLINSON R, HICKS CA, MURRAY TK, GAILLARD JP, DEVILLE C, XHENSEVAL V, THOMAS CE, O'NEILL MJ, ZETTERSTROM TS. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience*, **128**: 597-604, 2004.

DIAS, B.G., BANERJEE, S.B., DUMAN, R.S., VAIDYA, V.A. Differential regulation of brain derived neurotrophic factor transcripts by antidepressant treatments in the adult rat brain. *Neuropharmacology*, **45**: 553-563, 2003.

DINGLEDINE, R., BORGES, K., BOWIE, D., TRAYNELIS, S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, **51**: 1-55, 1999.

DOWD, D.R., MACDONALD, P.N., KOMM, B.S., HAUSSLER, M.R., MIESFELD, R.L. Stable expression of the calmodulin-D complementary 28k DNA interferes with the apoptotic pathway in lymphocytes. *Mol. Endocrinol.*, **6**: 1843-1848, 1992.

DREVETS, W.C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: Implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**: 240-249, 2001.

D'SA, C. e DUMAN, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord.*, **4**: 183-194. 2002.

DUDLEY, D.T., PANG, L., DECKER, S.J., BRIDGES, A.J., SALTIEL, A.R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7686-7689, 1995.

DUMAN, R.S., HENINGER, G.R., NESTLER, E.J. A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, **54**: 597-606, 1997.

DUMAN, R.S., MALBERG, J., NAKAGAWA, S., D'SA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol. Psychiatry*, **48**: 732-739, 2000.

DUMAN, R.S., MALBERG, J., THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol. Psychiatry*, **46**: 1181-1191, 1999.

DUMAN, R.S. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol. Psychiatry*, **44**: 324-335, 1998.

DUMAN, R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med.*, **5**: 11-25, 2004.

DUMAN, R.S. Structural alterations in depression: cellular mechanisms underlying pathology and treatment of mood disorders. *CNS Spectr.*, **7**: 140-142, 2002.

DUNKLEY, P.R., HEATH, J., HARRISON, S.M., JARVIE, P.E., GLENFIEKD, P.J., ROSTAS, J.A.P. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.*, **441**: 59-71, 1988.

DWIVEDI, Y., AGRAWAL, A.K., RIZAVI, H.S., PANDEY, G.N. Antidepressants reduce phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) activity and the mRNA and protein expression of selective PLC beta 1 isozyme in rat brain. *Neuropharmacology*, **43**: 1269-1279, 2002a.

DWIVEDI, Y., CONLEY, R.R., ROBERTS, R.C., TAMMINGA, C.A., PANDEY, G.N. [³H]cAMP binding sites and protein kinase A activity in the prefrontal cortex of suicide victims. *Am. J. Psychiatry*, **159**: 66-73, 2002b.

ECKELI, A.L., DACH, F., RODRIGUES, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. *NeuroReport*, **11**: 839-843, 2000.

EGEA, J., ESPINET, C., COMELLA, J.X. Calcium influx activates extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway through a calmodulin-sensitive mechanism in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 75-85, 1999.

EILAT, E., MENDLOVIC, S., DORON, A., ZAKUTH, V., SPIRER, Z. Increased apoptosis in patients with major depression: a preliminary study. *J. Immunol.*, **163**: 533-534, 1999.

EINAT, H., YUAN, P., GOULD, T.D., LI, J., DU, J.H., ZHANG, L., MANJI, H.K., CHEN, G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J. Neurosci.*, **23**: 7311-7316, 2003.

ERRICO, M., CROZIER, R.A., PLUMMER, M.R., COWEN, D.S. 5-HT₇ receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*, **102**: 361-367, 2001.

FAIRBANKS, C.A., POSTHUMUS, I.J., KITTO, K.F., STONE, L.S., WILCOX, G.L. Moxonidine, a selective imidazoline/ α_2 -adrenergic receptor agonist, synergizes with morphine and deltorphin II to inhibit substance P-induced behavior in mice. *Pain*, **84**: 13-20, 2000.

- FENG, Y., HALARIS, A.E., PILETZ, J.E. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, **691**: 277-286, 1997.
- FENG, Y., LEBLANC, M.H., REGUNATHAN, S. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylentetrazole-induced seizures in rat brain: A potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci. Lett.*, **390**: 129 - 133, 2005.
- FERRERO, A.J., CERESETO, M., REINES, A., BONAVIDA, C.D., SIFONIOS, L.L., RUBIO, M.C., WIKINSKI, S.I. Chronic treatment with fluoxetine decreases seizure threshold in naive but not in rats exposed to the learned helplessness paradigm: Correlation with the hippocampal glutamate release. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**: 678- 686, 2005.
- FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron*, **25**: 11-14, 2000.
- FIUMELLI, H., KIRALY, M., AMBRUS, A., MAGISTRETTI, P. J., MARTIN, J. Opposite regulation of calbindin and calretinin expression by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. *J. Neurochem.*, **74**: 1870-1877, 2000.
- FUKUDA, H., NISHIDA, A., SAITO, h., SHIMIZU, M., YAMAKAWA, S. Imipramine stimulates phospholipase C activity in rat brain. *Neurochem. Int.* **518**: 567-571.
- FUMAGALLI, F., MOLteni, R., CALABRESE, F., FRASCA, A., RACAGNI, G., RIVA, M.A. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J. Neurochem.*, **93**: 1551-1560, 2005.
- GARERI, P., FALCONI, U., DE FAZIO, P., DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog. Neurobiol.*, **61**: 353-396, 2000.
- GAVALDA, N., PEREZ-NAVARRO, E., GRATACOS, E., COMELLA, J.X., ALBERCH, J. Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and p42/p44 mitogen activated protein kinase pathways in brain-derived neurotrophic factor-induced trophic effects on cultured striatal neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, **25**: 460-468, 2004.
- GIAMBALVO, C.T. e PRICE, L.H. Effects of fenfluramine and antidepressants on protein kinase C activity in rat cortical synaptoneurosome. *Synapse*, **50**: 212-222, 2003.
- GILAD, G.M. e GILAD V.H. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, **296**: 97-100, 2000.
- GILAD, G.M., GILAD, V.H., FINBERG, J.P., RABEY, J.M. Neurochemical evidence for agmatine modulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, **30**: 713-719, 2005.

- GILAD, G.M., GILAD, V.H., RABEY, J.M. Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain - coincidental changes during development and after ischemia. *Neurosci. Lett.*, **216**: 33-36, 1996.
- GOGGI, J., PULLAR, I.A., CARNEY, S.L., BRADFORD, H.F. Signalling pathways involved in the short-term potentiation of dopamine release by BDNF. *Brain Res.*, **968**: 156-161, 2003.
- GOLEMBIOWSKA, K. e DZIUBINA, A. Involvement of adenosine in the effect of antidepressants on glutamate and aspartate release in the rat prefrontal cortex. *Naunyn Schmiede. Arch. Pharmacol.*, **363**: 663-670, 2001.
- GOODMAN, J.H., WASTERLAIN, C.G., MASSARWEH, W.F., DEAN, E., SOLLAS, A.L., SLOVITER, R.S. Calbindin-D28k immunoreactivity and selective vulnerability to ischemia in the dentate gyrus of the developing rat. *Brain Res.*, **606**: 309-314, 1993.
- GOULD, T.D. e MANJI, H.K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J. Psychosom. Res.*, **53**: 687-697, 2002.
- GONZALEZ, C., REGUNATHAN, S., REIS, D.J., ESTRADA, C. Agmatine is an endogenous modulator of noradrenergic neurotransmission in the rat tail artery. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 677-684, 1996.
- GRILLI, M., RAITERI, L., PITTALUGA, A. Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst₂ receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. *Neuropharmacology*, **46**: 388-396, 2004.
- GRILLO, M.A. e COLOMBATTO, S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *AminoAcids*, **26**: 3-8, 2004.
- GUO, Q., CHRISTAKOS, S., ROBINSON, N., MATTSON, M.P. Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**: 3227-3232, 1998.
- HALARIS, A. e PILETZ, J.E. Imidazoline receptors: possible involvement in the pathophysiology and treatment of depression. *Human Psychopharmacol.*, **16**: 65-69, 2001.
- HALARIS A., ZHU, H., FENG, Y., PILETZ J.E. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **881**: 445-451, 1999.
- HASHIMOTO, K., SHIMIZU, E., IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res. Rev.*, **45**: 104-114, 2004.
- HEIZMANN, C.W. e BRAUN, K. Changes in Ca⁺² binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.*, **15**: 259-264, 1992.

HOEFFLER, J.P., DEUTSCH, P.J., LIN, J., HABENER, J.F. Distinct adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester-responsive signal transduction pathways converge at the level of transcriptional activation by the interactions of DNA-binding proteins. *Mol. Endocrinol.*, **5**: 868-880, 1989.

HONG, S.J. e CHANG, C.C. Inhibition of quantal release from motor nerve by wortmannin. *Br. J. Pharmacol.*, **128**: 142-148, 1999.

HRDINA, P.D. e DU, L. Levels of serotonin receptor 2A higher in suicide victims? *Am. J. Psychiatry*, **158**: 147-148, 2001.

HUDMON, A. e SCHULMAN, H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**: 473-510, 2002a.

HUDMON, A. e SCHULMAN, H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.*, **364**: 593-611, 2002b.

IVY, A.S., RODRIGUEZ, F.G., GARCIA, C., CHEN M.J., RUSSO-NEUSTADT, A.A. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **75**: 81-88, 2003.

ITOH, T., TOKUMURA, M., ABE, K. Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **498**: 135-142, 2004.

JOVANOVIC, J.N., CZERNIK, A.J., FIENBERG, A.A., GREENGARD, P., SIHRA, T.S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.*, **3**: 323-329, 2000.

KANASHIRO, C.A. e KHALIL, R.A. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**: 974-985, 1998.

KIM, J.H., YENARI, M.A., GIFFARD, R.G., CHO, S.W., PARK, K.A., LEE, J.E. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp. Neurol.*, **189**: 122-130, 2004.

KOCH, J.M., KELL, S., ALDENHOFF, J.B. Differential effects of fluoxetine and imipramine on the phosphorylation of the transcription factor CREB and cell-viability. *J. Psychiatry Res.*, **37**: 53-59, 2003.

KOIKE, T., MARTIN, D., JOHNSON, E.M. Role of Ca channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic factor deprivation: evidence that levels of internal calcium determine growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6421-6425, 1989.

KOH, J.Y. e COTMAN, C.W. Programmed cell death: its possible contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res.*, **587**: 233-240, 1997.

- KORNHUBER, J. e WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implication for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol. Psychiatry.*, **41**: 135-144, 1997.
- LANG, U.E., HELLWEG, R., GALLINAT, J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are association with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology*, **29**: 795-798, 2004.
- LAVINSKY, D., ARTENI, N.S., NETTO, C.A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav. Brain Res.*, **141**: 19-24, 2003.
- LE, D.A. e LIPTON, S.A. Potential and use of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonists in disease of aging. *Drugs Aging*, **18**: 717-724, 2001.
- LEENDERS, A.G.M. e SHENG, Z.H. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol. Ther.*, **105**: 69-84, 2005.
- LENOX, R.H., GOULD, T.D., MANJI, H.K. Endophenotypes in bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet.*, **114**: 391-406, 2002.
- LESCH, K.P. Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J. Affect. Disord.*, **62**: 57-76, 2001.
- LI, G., REGUNATHAN, S., BARROW, C.J., ESHRAGHI, J., COOPER, R., REIS, D.J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, **263**: 966-969, 1994.
- LISMAN, J., SCHULMAN, H., CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**: 175-190, 2002.
- LIU, Y.F. e ALBERT, P.R. Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A. *J. Biol. Chem.*, **266**: 23689-23697, 1991.
- LI, Y.F., GONG, Z.H., CAO, J.B., WANG, H.L., LUO, Z. P., LI, J. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, **469**: 81-88, 2003.
- LUO, J.H. e WEINSTEIN, I.B. Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity. *J. Biol. Chem.*, **268**: 23580-23584, 1993.
- MAFFUCCI, T., COOKE, F.T., FOSTER, F.M., TRAER, C.J., FRY, M.J., FALASCA, M. Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J. Cell Biol.*, **169**: 789-799, 2005.
- MALBERG, J.E. e BLENDY, J.A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**: 631-638, 2005.

- MANIER, D.H., SHELTON, R.C., ELLIS, T.C., PETERSON, C.S., EIRING, A., SULSER, F. Human fibroblasts as a relevant model to study signal transduction in affective disorders. *J. Affect. Disord.*, **61**: 51-58, 2000.
- MANJI, H.K. e CHEN, G.K.C. MAP kinases and the bcl-2 family of proteins as long-term targets for mood stabilizers. *Mol. Psychiatry*, **1**: S46-S56, 2002.
- MANJI, H.K., DREVETS, W.P., CHARMEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. *Nature Med.*, **7**: 541-547, 2001a.
- MANJI, H.K., MOORE, G.J., CHEN, G. Bipolar disorder: Leads from the molecular and cellular mechanisms of action of mood stabilizers. *Br. J. Psychiatry*, **178**: S107-S119, 2001b.
- MANJI, H.K., MOORE, G.J., RAJKOWSKA, G., CHEN, G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol. Psychiatry*, **5**: 578-593, 2000.
- MANJI, H.K., QUIROZ, J.A., SPORN, J., PAYNE, J.L., DENICOFF, K., GRAY, N.A., ZARATE, J.R., CHARNEY, D.S. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol. Psychiatry*, **53**: 707-714, 2003.
- MANN, C.D., VU, T.B., HRDINA, P.D. Protein kinase C in rat brain cortex and hippocampus: effect of repeated administration of fluoxetine and desipramine. *B. J. Pharmacol.*, **115**: 595-600, 1995.
- MANN, J.J. e KAPUR, S. A dopaminergic hypothesis of major depression. *Clin. Neuropharmacology*, **18**: 557-567, 1995.
- MARABESE, I., DE NOVELLIS, V., PALAZZO, E., MARIANI, L., SINISCALCO, D., RODELLA, L., ROSSI, F., MAIONE, S. Differential roles of mGlu8 receptors in the regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid release at periaqueductal grey level. *Neuropharmacology*, **49**: 157-66, 2005.
- MATHEW, S.J., KEEGAN, K., SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, **27**: 243-248, 2005.
- MATTSON, M.P., BARGER, S.W., BEGLEY, J.G., MARK, R.J. Calcium free radicals and excitotoxic neuronal death in primary cell cultures. *Methods Cell Biol.*, **46**: 187-216, 1995.
- MATTSON, M.P., RYCHLIK, B., CHU, C., CHRISTAKOS, S. Evidence for calcium reducing and excitoprotective roles for the calcium binding protein calbindin-D_{28k} in hippocampal neurons. *Neuron*, **6**: 41-51, 1991.
- McCONKEY, D.J. e ORRENIUS, S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, **59**: 775-783, 1996.

- MENDEZ, J., KADIA, T.M., SOMAYAZULA, R.K., EL-BADAWI, K.I., COWEN, D.S. Differential coupling of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors to activation of ERK2 and inhibition of adenylyl cyclase in transfected CHO cells. *J. Neurochem.*, **73**: 162-168, 1999.
- MERCIER, G., LENNON A.M., RENOUF, B., DESSOUROUX, A., RAMAUGÉ, M., COURTIN, F., PIERRE, M. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured astrocytes. *J. Mol. Neurosci.*, **24**: 207-216, 2004.
- MERRY, D.E. e KORSMEYER, S.J. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20**: 245-267, 1997.
- MEUNIER, F.A., OSBORNE, S.L., HAMMOND, G.R., COOKE, F.T., PARKER, P.J., DOMIN, J., SCHIAVO, G. Phosphatidylinositol 3-kinase C₂α is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell.*, **16**: 4841-4851, 2005.
- MIGUES, P.V., LEAL, R.B., MANTOVANI, M., NICOLAU, M., GABILAN, N.H. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Neuroreport*, **10**: 67-70, 1999.
- MILLÁN, C., TORRES, M., SÁNCHEZ-PRIETO, J. Co-activation of PKA and PKC in cerebrocortical nerve terminals synergistically facilitates glutamate release. *J. Neurochem.*, **87**: 1101-1111, 2003.
- MILOSEVIC, I., SORENSEN, J.B., LANG, T., KRAUSS, M., NAGY, G., HAUCKE, V., JAHN, R., NEHER, E. Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J. Neurosci.*, **25**: 2557-2565, 2005.
- MOGHADDAM, B. e ADAMS, B.W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science*, **281**: 1349-1352, 1998.
- MOGHADDAM, B., ADAMS, B., VERMA, A., DALY, D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, **17**: 2921-2927, 1997.
- MOGHADDAM, B. e JACKSON, M.E. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1003**: 131-137, 2003.
- MONTMINY, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**: 807-822, 1997.
- NESTLER, E.J., GOULD, E., BUNCAN, M., DUMAN, R.S., GRESHENFELD, H.K., HEN, R. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol. Psychiatry*, **52**: 503-528, 2002.

NESTLER, E.J., TERWILLIGER, R.Z., DUMAN, R.S. Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex. *J. Neurochem.*, **53**:1644-1647, 1989.

NIBUYA, M., MORINOBU, S., DUMAN, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.*, **15**: 7539-7547, 1995.

NICHOLLS, D.G. Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem. Res.*, **28**: 1433-1441, 2003.

NGUYEN, P.V. e WOO, N.H. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog. Neurobiol.*, **71**: 401-437, 2003.

OJCIUS, D.M., ZYCHLINSKY, A., ZHENG, L.M., YOUNG, J.D.E. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp. Cell Res.*, **197**: 43-49, 1991.

OKKENHAUG, K. e VANHAESEBROECK, B. New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci. STKE.*, **65**: PE1, 2001.

OLMOS, G., DeGREGORIO-ROCASOLANO, N., REGALADO, M.P., GASULL, T., BORONAT, M.A., TRULLAS, R., VILLARROEL, A., LERMA, J., 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.

OTAKE, K., RUGGIERO, D.A., REGUNATHAN, S., WANG, H., MILNER, T.A., REIS, D.J. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.*, **787**: 1-14, 1998.

PAGE, G., PEETERS, M., NAJIMI, M., MALOTEAUX, J.N., HERMANS, E. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. *J. Neurochem.*, **76**: 1282-1290, 2001.

PALUCHA, A. e PILC, A. The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression. *Drug News Perspect.*, **18**: 262-268, 2005.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., KUMARI, R., JANICAK, P.G. Protein kinase C in platelets of depressed patients. *Biol. Psychiatry*, **44**: 909-911, 1998.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., PANDEY, S.C., CONLEY, R.R., ROBERTS, R.C., TAMMINGA, C.A. Protein kinase C in the postmortem brain of teenage suicide victims. *Neurosci. Lett.*, **228**: 111-114, 1997.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., SRIDHARARAO, J., REN, X., JANICAK, P.G., SHARMA, R. Protein kinase C and phospholipase C activity and expression of their specific isozymes is decreased and expression of MARCKS is increased in platelets of bipolar but not in unipolar patients. *Neuropsychopharmacology*, **26**: 216-228, 2002.

PANDEY, G.N., REN, X., PANDEY, S.C., DWIVEDI, Y., SHARMA, R., JANICAK, P.G. Hyperactive phosphoinositide signaling pathway in platelets of depressed patients: effect of desipramine treatment. *Psychiatry Res.*, **105**: 23-32, 2001.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., REN, X., RIZAVI, H.S., ROBERTS, R.C., CONLEY, R.R., TAMMINGA, C. Altered expression and phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in postmortem brain of suicide victims with or without depression. *J. Psychiatry Res.*, **37**: 421-32, 2003.

PANDEY, G.N., DWIVEDI, Y., RIZAVI, H.S., REN, X., CONLEY, R.R. Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry*, **61**: 685-93, 2004.

PARKER, P.J. e MURRAY-RUST, J. PKC at a glance. *J. Cell Sci.*, **117**: 131-132, 2004.

PARK, Y.S., JUN, D.J., HUR, E.M., LEE, S.K., SUH, B.S., KIM, K.T. Activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle (LDCV) release modulated by MAPK/ERK signaling. *Endocrinology*, **23**, 2005.

PATAPOUTIAN, A. e REICHARDT, L.F. Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**: 272-280, 2001.

PEREIRA, D.B., CARVALHO, A.P., DUARTE, C.B. Non-specific effects of the MEK inhibitors PD98059 and U0126 on glutamate release from hippocampal synaptosomes. *Neuropharmacology*, **42**: 9-19, 2002.

PETRIE, R.X., REID, I.C., STEWART, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol. Ther.*, **87**: 11-25, 2000.

POO, M.M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**: 24-32, 2001.

POPOLI, M., BRUNELLO, N., PEREZ, J., RAEAGNI, G. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. *J. Neurochem.*, **74**: 21-33, 2000.

POPOLI, M., GENNARELLI, M., RACAGNI, G. Modulation of synaptic plasticity by stress and antidepressants. *Bipolar Disord.*, **4**: 166-82, 2002.

- POPOLI, M., MORI, S., BRUNELLO, N., PEREZ, J., GENNARELLI, M., RACAGNI, G. Serine/threonine kinases as molecular targets of antidepressants: implications for pharmacological treatment and pathophysiology of affective disorders. *Pharmacol. Ther.*, **89**: 149-170, 2001.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **229**: 327-336, 1977.
- RAASCH, W., REGUNATHAN, S., LI, G., 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., DOMINIAK, P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br. J. Pharmacol.*, **133**: 755-780, 2001.
- RAASCH, W., SCHAFFER, U., QADRI, F., DOMINIAK, P. Agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites, does not antagonize the clonidine-mediated blood pressure reaction. *Br. J. Pharmacol.*, **135**: 663-72, 2002.
- RAITERI, L., GIOVEDI, S., BENFENATI, F., RAITERI, M., BONANNO, G. Cellular mechanisms of the acute increase of glutamate release induced by nerve growth factor in rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*, **44**: 390-402, 2003.
- RAMI, A., RABIE, A., THOMASSET, M., KRIEGLSTEIN, J. Calbindin-D28k and ischemic damage of pyramidal cells in rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.*, **31**: 89-95, 1992.
- RAUSCH, J.L., GILLESPIE, C.F., FEI, Y., HOBBY, H.M., STOMING, T., GANAPATHY, V., LEIBACH, F.H. Antidepressant effects on kinase gene expression patterns in rat brain. *Neurosci. Lett.*, **334**: 91-94, 2002.
- REIS, D.J. e REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**: 187-193, 2000.
- REIS, D.J., YANG X.C., MILNER, T.A. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. *Neurosci. Lett.*, **250**: 185-188, 1998.
- RICCIO, A., AHN, S., DAVENPORT, C.M., BLENDY, J.A., GINTY, D.D. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF dependent survival of sympathetic neurons. *Science*, **286**: 2358-2361, 1999.
- RINTOUL, G.L., RAYMOND, L.A., BAIMBRIDGE, K.G. Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28k in HEK293 cells. *Cell Calcium*, **29**: 277-287, 2001.

- RISSE, F., GRILLI, M., PARODI, M., BADO, M., RAITERI, M., MARCHI, M. Nicotine exerts a permissive role on NMDA receptor function in hippocampal noradrenergic terminals. *Neuropharmacology*, **47**: 65-71, 2004.
- RIZZOLI, S.O. e BETZ, W.J. Effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one on synaptic vesicle cycling at the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci.*, **22**: 10680-10689, 2002.
- RODRIGUES, A.L., ROCHA, J.B., MELLO, C.F., SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.*, **79**: 150-156, 1996.
- RUSSO-NEUSTADT, A.A., BEARD, R.C., HUANG, Y.M., COTMAN, C.W. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience*, **101**: 305-312, 2000.
- RYVES, W.J., DEKKER, L.V., BRAMMER, M.J., CAMPBELL, I.C. PKC in rat cortical synaptosomes: effects of depolarization. *Neuroreport*, **8**: 323-327, 1996.
- SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., SURGET, A., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C., HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, **301**: 805-809, 2003.
- SANTOS, A.R.S., GADOTTI, V.M., OLIVEIRA, G.L., TIBOLA, D., PASZCUK, A.F., NETO, A., SPINDOLA, H.M., SOUZA, M.M., RODRIGUES, A.L., CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology*, **48**: 1021-1034, 2005.
- SASTRE, M., REGUNATHAN, S., GALEA, E., REIS, D.J. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. *J. Neurochem.*, **67**: 1761-1765, 1996.
- SATO, T., TANAKA, K., OHNISHI, Y., TERAMOTO, T., IRIFUNE, M., NISHIKAWA, T. Inhibitory effects of group II mGluR-related drugs on memory performance in mice. *Physiol. Behav.*, **80**: 747-758, 2004.
- SCHAEFFER, H.J. e WEBER, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.*, **19**: 2435-2444, 1999.
- SHAMIR, A., ELHADAD, N., BELMAKER, R.H., AGAM, G. Interaction of calbindin D28k and inositol monophosphatase in human postmortem cortex: possible implications for bipolar disorder. *Bipolar Disord.*, **7**: 42-48, 2005.
- SHAYWITZ, A. e GREENBERG, M. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**: 821-861, 1999.
- SHEARMAN, M.S., SHINOMURA, T., ODA, T., NISHIZUKA, Y. Protein kinase C subspecies in adult rat hippocampal synaptosomes. Activation by diacylglycerol and arachidonic acid. *FEBS Lett.*, **279**: 261-264, 1991.

SHELTON, R.C., MANIER, D.H., PETERSON, C.S., ELLIS, T.C., SULSER, F. Cyclic AMP-dependent protein kinase in subtypes of major depression and normal volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol*, **2**: 187-192, 1999.

SHELTON, R.C., MANIER, D.H., SULSER, F. cAMP-dependent protein kinase activity in major depression. *Am. J. Psychiatry*, **153**: 1037-1042, 1996.

SHEPHERD, R.M., HASHMI, M.N., KANE, C., SQUIRES, P.E., DUNNE, M.J. Elevation of cytosolic calcium by imidazolines in mouse islets of Langerhans: implications for stimulus-response coupling of insulin release. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 911-916, 1996.

SHIMIZU, E., HASHIMOTO, K., OKAMURA, N., KOIKE, K., KOMATSU, N., NAKAZATO, M., WATANABE, H., SHINODA, N., OKADA, S., IYO, M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol. Psychiatry*, **54**: 70-75, 2003.

SHIRAYAMA, Y., CHEN, A.C., NAKAGAWA, S., RUSSELL D.S., DUMAN, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.*, **22**: 3251-3261, 2002.

SIHRA, T.S. e PEARSON, H.A. Ca/Calmodulin-dependent kinase II inhibitor KN62 attenuates glutamate release by inhibiting voltage-dependent Ca⁺²-channels. *Neuropharmacology*, **34**: 731-741, 1995.

SIUCIAK, J.A., LEWIS, D.R., WIEGAND, S.J., LINDSAY, R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **56**: 131-137, 1997.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *Eur. J. Pharmacol.*, **375**: 31-40, 1999.

SODERLING, T.R. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**: 375-380, 2000.

SODERLING, T.R., CHANG B., BRICKEY, D. Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **276**: 3719-3722, 2001.

SODERLING, T.R. e STULL, J.T. Structure and regulation of calcium / calmodulin-dependent protein kinases. *Chem. Rev.*, **101**: 2341-2352, 2001.

STERU, L., CHERMAT, T.R., THIERY, B., SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, **85**: 367-370, 1985.

SWEATT, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.*, **76**: 1-10, 2001.

- TABOR, C.W. e TABOR, H. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.*, **53**: 749-790, 1984.
- TAYLOR, C., FRICKER, A.D., DEVI, L.A., GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal.*, **17**: 549-557, 2005.
- THOMAS, G.M. e HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**:173-183, 2004.
- THOME, J., SAKAI, N., SHIN, K., STEFFEN, C., ZHANG, Y.J., IMPEY, S., STORM, D., DUMAN, R.S. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. *J. Neurosci.*, **20**: 4030-4036, 2000.
- TIRABOSCHI, E., TARDITO, D., KASAHARA, J., MORASCHI, S., PRUNERI, P., GENNARELLI, M., RACAGNI, G., POPOLI, M. Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology*, **29**: 1823-1830, 2004a.
- TIRABOSCHI, E., GIAMBELLI, R., D'URSO, G., GALIETTA, A., BARBON, A., DE BARTOLOMEIS, A., GENNARELLI, M., BARLATI, S., RACAGNI, G., POPOLI, M. Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. *Neuroreport*, **15**: 2393-2396, 2004b.
- TOKER, A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol. Pharmacol.*, **57**: 652-658, 2000.
- TOKOMITSU, H., CHIJIWA, T., HAGIWARA, M., MIZITANI, A., TERASAWA, M., HIDAKA, H. KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **265**: 4315-4320, 1990.
- TORREGROSSA, M.M., FOLK, J.E., RICE, K.C., WATSON, S.J., WOODS, J.H. Chronic administration of the delta opioid receptor agonist (+)BW373U86 and antidepressants on behavior in the forced swim test and BDNF mRNA expression in rats. *Psychopharmacology*, **183**: 31-40, 2005.
- TURNER, K.M., BURGOYNE, R.D., MORGAN, A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci.*, **22**: 459-464, 1999.
- TUZ, K., PEÑA-SEGURA, C., FRANCO, R., PASANTES-MORALES, H. Depolarization, exocytosis and amino acid release evoked by hyposmolarity from cortical synaptosomes. *Eur. J. Neurosci.*, **19**: 916-924, 2004.
- VAN DER ZEE, E.A. e DOUMA, B.R. Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **21**: 379-406, 1997.

- VIANNA, M.R.M., ALONSO, M., VIOLA, H., QUEVEDO, J., PARIS, F., FURMAN, M., STEIN, M.L., MEDINA J.H., IZQUIERDO, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.*, **7**: 333-340, 2000.
- WANG, G., GORBATYUK, G.O., DAYANITHI, G., OUYANG, W., WANG, J., MILNER, T.A., REGUNATHAN, S., REIS, D.J. Evidence for endogenous agmatine in hypothalamo-neurohypophysial tract and its modulation on vasopressin release and Ca²⁺ channels. *Brain Res.*, **932**: 25-36, 2002.
- WANG, S.J. An investigation into the effect of the type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram in the modulation of glutamate release from rat prefrontocortical nerve terminals. *Synapse*, **59**: 41-50, 2006a.
- WATKINS, J. e COLLINGRIDGE, G. Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**: 333-342, 1994.
- WENG, X.C., GAI, X.D., ZHENG, J.Q., LI, J. Agmatine blocked voltage-gated calcium channel in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**: 746-750, 2003.
- 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. Neurosci.*, **2**: 343-351, 2001.
- XIA, H.J. e YANG, G. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. *Cell Res.*, **15**: 83-91, 2005.
- XIA, Z., LUNDGREN, B., BERGSTRAND, A., DEPIERRE, J.W., NÄSSBERGER, L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X_L. *Biochem. Pharmacol.*, **57**: 1199-1208, 1999.
- XU, H., STEVEN RICHARDSON, J., LI, X.M. Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, **28**: 53-62, 2003.
- YAMADA, J. e SUGIMOTO, Y. Differential effects of the 5-HT₂ receptor antagonist on the anti-immobility effects of noradrenaline and serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test. *Brain Res.*, **958**:161-165, 2002.
- YAMAMOTO, H., MATSUMOTO, K., ARAKI, E., MIYAMOTO, E. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of synapsin I in insulin exocytosis. *J. Pharmacol. Sci.*, **93**: 30-34, 2003.

YANG, F., HE, X., FENG, L., MIZUNO, K., LIU, X.W., RUSSELL, J., XIONG, W.C., LU, B. PI-3 kinase and IP₃ are both necessary and sufficient to mediate NT3-induced synaptic potentiation. *Nat. Neurosci.*, **4**: 19-28, 2001.

YOUNG, L.T. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. *J. Psychiatry Neurosci.*, **27**: 8-9, 2002.

ZARATE, C.A JR., DU, J., QUIROZ, J., GRAY, N.A., DENICOFF, K.D., SINGH, J., CHARNEY, D.S., MANJI, H.K. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1003**: 273-291, 2003.

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

ZEIDAN, M. P. Estudo sobre o efeito antidepressivo da administração aguda e crônica da agmatina. Dissertação de Mestrado em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. pág. 60, 2004.

ZHENG, J.Q, WENG, X.C., GAI, X.D., LI, J., XIAO, W.B. Mechanism underlying blockade of voltage-gated calcium channels by agmatine in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacol. Sin.*, **25**: 281-285, 2004.

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

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

ZOMKOWSKI, A.D., SANTOS, A.R., RODRIGUES, A.L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci. Lett.*, **381**:279-83, 2005.

ZUO, D.Y., ZHANG, Y.H., CAO, Y., WU, C.F., TANAKA, M., WU, Y.L. Effect of acute and chronic MK-801 administration on extracellular glutamate and ascorbic acid release in the prefrontal cortex of freely moving mice on line with open-field behavior. *Life Sci.*, 2005. (*in press*)