

Vivian Binder Neis

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA EM
MODELOS ANIMAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título
de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia
Severo Rodrigues

FLORIANÓPOLIS

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Neis, Vivian Binder

Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo antidepressivo da agmatina em modelos animais / Vivian Binder Neis ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues - Florianópolis, SC, 2017.
254 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

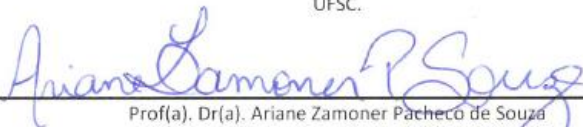
1. Bioquímica. 2. Bioquímica. 3. Depressão. 4. Agmatina. 5. Cetamina. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Investigação dos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina em modelos animais”

Por

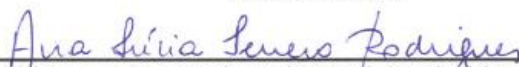
Vivian Binder Neis

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Ana Lucia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr(a) Debora Kurrle Rieger Venske (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Mandella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Alexandre Paim Diaz (Universidade do Sul de Santa Catarina)



Dr(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus queridos pais, Márcia e Dauro, pelo amor, suporte e incentivo em todos os momentos. Essa conquista não é apenas minha, é nossa! Agradeço todo o esforço de vocês para minha formação pessoal e profissional. Amo-os infinitamente.

Ao meu amor, Eduardo, que me aturou e ajudou muito nesse período. Pelos momentos de distração e cumplicidade. Por ser o meu porto seguro, o amor da minha vida.

Ao meu irmão Fábio e a minha querida cunhada Jaque, por todos os momentos de descontração, amizade, companheirismo e por sempre torcerem por mim.

À minha querida orientadora Ana Lúcia, pelos ensinamentos, dedicação e paciência ao longo desses anos. Por ser uma das responsáveis pela minha formação profissional, pelos conselhos e pela confiança depositada. Por ser um exemplo de competência e simplicidade sempre.

Ao laboratório de neurobiologia da depressão e todos os alunos que dele fazem parte, estando presentes ou não nos meus experimentos: Aline, Andi, Ana Ramos, Dai, Day bebe, Fe e Ana (agregadas) Francis, Gisa, Julia, Mauren, Nicolle, Suellen. Pelos dias compartilhados e companheirismo durante todos os anos em que fiz parte do LANED.

Aos amigos do laboratório que vou levar para minha vida: Prizinha, Louis, Morgs e Camys. Por me ajudarem sempre, pelos ótimos momentos de descontração e pelo apoio, incentivo e amizade. Todos têm um lugar guardado no meu coração.

Aos alunos de outros laboratórios que contribuíram de alguma forma para a realização dessa tese e que me acompanharam nessa jornada: Isa, Mark, Helo, Cinis. Agradeço também ao Filipe, que entrou no doutorado junto comigo, e me ajudou sempre que precisei, nos experimentos ou fora deles, se tornando fundamental para a realização desse trabalho.

Aos amigos de fora da pesquisa pelas palavras de carinho, momentos maravilhosos e incentivo sempre. Amo vocês.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, por todo o conhecimento repassado e contribuição no meu processo de aprendizado.

Aos amigos e familiares que torceram por mim e me apoiaram nesse período.

Aos animais experimentais utilizados nesse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Diversos compostos com potencial antidepressivo vêm sendo investigados atualmente para o tratamento da depressão. Dentre eles, destaca-se a agmatina, uma amina endógena considerada um neuromodulador no sistema nervoso central (SNC), dotada de propriedades neuroprotetoras. Estudos pré-clínicos demonstraram que essa amina possui efeito tipo-antidepressivo, mas ainda existe a necessidade de se investigar os mecanismos envolvidos nesse efeito. Nesse sentido, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a capacidade da agmatina em aumentar a potência de antidepressivos convencionais monoaminérgicos e MK-801, um antagonista de receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Foi observado que a agmatina em sua dose sub-efetiva (0,0001 mg/kg, p.o.) foi capaz de potencializar o efeito dos antidepressivos convencionais (duas vezes o efeito da fluoxetina e 10 vezes o efeito da imipramina e bupropiona) e MK-801 (100 vezes), diminuindo o tempo de imobilidade de camundongos no teste de suspensão pela cauda (TSC), o que sugere que ela pode ter uma maior afinidade por receptores NMDA do que por alvos monoaminérgicos. Considerando que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina ocorreu em maior escala mediante antagonismo de receptores NMDA, e a existência e importância de um antidepressivo dessa classe que possui ação rápida (cetamina), um segundo objetivo desse estudo foi avaliar vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito da agmatina com base nas vias relacionadas com o efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina. Os resultados mostraram que a agmatina exerce seu efeito tipo-antidepressivo no TSC através da modulação de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropilônico (AMPA) e tropomiosina cinase B (TrkB), da sinalização mediada pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β), proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), além de ocasionar um rápido aumento do imunocontéudo de BDNF e das proteínas sinápticas de densidade pós-sináptica de 95KDa (PSD-95) e GluA1 no córtex pré-frontal dos camundongos, de forma semelhante ao que ocorre com a cetamina. Este trabalho também realizou uma análise comparativa dos efeitos da agmatina com os de um antidepressivo convencional monoaminérgico (fluoxetina) e um de ação rápida (cetamina) em modelos

de estresse crônico. Camundongos expostos ao estresse crônico imprevisível (ECI) por 14 dias receberam uma dose única por via oral de agmatina (0,1 mg/kg), cetamina (1 mg/kg) ou fluoxetina (10 mg/kg) 24 h antes de serem submetidos ao TSC. Apenas a agmatina e a cetamina foram capazes de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI no TSC, mas não houve alteração no comportamento anedônico dos animais em nenhum dos grupos. Além disso, nenhuma alteração foi encontrada no imunoconteúdo de PSD-95, sinapsina 1 e GluA1 nos diferentes grupos experimentais (animais estressados ou não, tratados ou não). Posteriormente, a comparação entre os efeitos da agmatina, cetamina e fluoxetina se deu em um modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona (20 mg/kg, p.o., 21 dias). Tanto a agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), quanto a cetamina (1 mg/kg, i.p.) reverteram o comportamento tipo-depressivo induzido pelo modelo no TSC. No entanto, de forma similar ao modelo do ECI, o efeito anedônico não foi observado neste protocolo e em nenhum dos grupos experimentais (tanto no teste de borrifagem de sacarose quanto no de consumo de sacarose). Os animais submetidos ao protocolo da corticosterona apresentaram uma redução no peso das glândulas adrenais, mas esse efeito não foi revertido por nenhum dos tratamentos utilizados. Quanto às análises bioquímicas, foi observado que nos animais controle, os tratamentos com agmatina, cetamina ou fluoxetina aumentaram o imunoconteúdo de GluA1 no hipocampo, sem alterar a fosforilação desta proteína (Ser831 e Ser845). Também não foram observadas alterações no imunoconteúdo de PSD-95 e na fosforilação da cinase ribossomal S6 de 70 kDa (p70S6K) nessa mesma estrutura. Além disso, os animais submetidos ao protocolo da corticosterona apresentaram uma diminuição no imunoconteúdo de sinapsina, efeito que foi revertido apenas pelo tratamento com fluoxetina. Em conjunto, os resultados fornecem evidências de que a agmatina possui um mecanismo de ação similar ao da cetamina quanto às vias de sinalização intracelular, bem como a capacidade de reverter, com uma única administração, o comportamento tipo-depressivo induzido por modelos de estresse crônico. Esses resultados sugerem que essa amina endógena pode ser um agente promissor para o tratamento da depressão.

Palavras-chaves: depressão; agmatina; NMDA; estresse; teste de suspensão pela cauda; cetamina; proteínas sinápticas.

ABSTRACT

Several compounds with antidepressant potential have been investigated for the treatment of depression. One of them is agmatine, an endogenous amine considered as a neuromodulator in the central nervous system (CNS) that exhibits several neuroprotective properties. Previous studies from our group demonstrated that this amine elicits antidepressant-like effects in predictive animal models of depression. However, the mechanisms underlying its antidepressant effects need to be further investigated. Therefore, one purpose of this study was to evaluate the extent of the antidepressant synergism induced by a fixed sub-effective dose of agmatine (0.0001 mg/kg, p.o.) to shift the antidepressant potency of monoaminergic conventional antidepressants and MK-801, an N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist. The present study found that a sub-effective dose of agmatine increased the potency by which fluoxetine, imipramine, bupropion and MK-801 decreased immobility time in the tail suspension test (TST): 2-fold (fluoxetine), 10-fold (imipramine and bupropion) and 100-fold (MK-801), suggesting that agmatine substantially augmented the antidepressant-like effect of MK-801. This result reinforces the notion that this compound modulates NMDA receptor activation with a higher affinity when compared to monoamines. Taking into account the involvement of antagonism of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of agmatine, and the existence of fast-acting antidepressants (like ketamine, an NMDA receptor antagonist), a second purpose of this work was to evaluate the possibility that agmatine elicits antidepressant effects through the modulation of intracellular signaling pathways implicated in fast antidepressant responses, as occurs with the fast-acting antidepressant ketamine. Our results demonstrated that the antidepressant-like effect of agmatine in the TST depends on the modulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors and tropomyosin receptor kinase B (TrkB), and signaling pathways mediated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), mechanistic target of rapamycin (mTOR), besides increasing the immuncontent of BDNF and the synaptic proteins postsynaptic density protein 95 (PSD-95) and GluA1 in the prefrontal cortex of mice. Of note, these alterations were observed just 1 h after agmatine administration. Finally, this study also performed a comparative analysis of the

antidepressant-like effect of agmatine with a conventional antidepressant (fluoxetine) and a fast-acting drug (ketamine), using models of chronic stress. Mice exposed to chronic unpredictable stress (CUS) received a single oral dose of agmatine (0.1 mg/kg), ketamine (1 mg/kg), or fluoxetine (10 mg/kg) 24 h before being submitted to the TST. Only agmatine and ketamine were able to reverse the depressive-like behavior induced by CUS in the TST. No anhedonic behavior was observed in any experimental group. Moreover, no alteration was found in the immunocontent of PSD-95, synapsin and GluA1 in the CUS protocol and/or treatments in the prefrontal cortex of mice. After that, the comparative analysis of the antidepressant-like effect of agmatine, ketamine or fluoxetine was performed in another chronic stress model: the administration of corticosterone. A single administration of agmatine (0.1 mg/kg, p.o.) or ketamine (1 mg/kg, i.p.), but not fluoxetine 10 mg/kg, p.o.), was able to reverse the depressive-like behavior induced by corticosterone in the TST. No anhedonic behavior was found in any experimental group in splash test or sucrose consumption test. Additionally, reduced size and weight of adrenal glands were observed in mice submitted to corticosterone exposure, but none of the treatments were able to reverse these effects. Regarding biochemical analysis, treatment of control animals with agmatine, ketamine or fluoxetine increased the immunocontent of GluA1 in hippocampus, but caused no alteration in the phosphorylation of this protein (Ser831 and Ser845). In addition, none of the treatments were able to alter hippocampal immunocontent of PSD-95 and phosphorylation of p70S6 kinase (p70S6K). However, corticosterone administration was able to decrease the immunocontent of synapsin, and this effect was reversed only by fluoxetine. Altogether, the results of the present study provide evidence for the ability of agmatine to prevent depressive-like behavior in models of chronic stress with a single administration, similar to ketamine (fast-acting antidepressant response) suggesting that this amine could be a promising compound to the treatment of depression

Keywords: depression; agmatine; NMDA; stress; tail suspension test; ketamine; synaptic proteins.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.	Hipótese monoaminérgica da depressão.....	33
Figura 2.	Hipótese neurotrófica da depressão.....	38
Figura 3.	Liberação de glutamato na fenda sináptica.....	42
Figura 4.	Cetamina aumenta a atividade da mTOR e sinaptogênese.....	51
Figura 5.	Regulação do eixo HPA pelo estresse.....	55
Figura 6.	Síntese e degradação da agmatina.....	61
Figura 7.	Esquema de uma sinapse contendo agmatina.....	63
Figura 8.	Linha do tempo do efeito antidepressivo da agmatina.....	71

CAPÍTULO I – AGMATINA AUMENTA A POTÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS CONVENCIONAIS E MK-801

Figura 1A.	Protocolo de administração dos fármacos para obtenção da mínima dose efetiva (MED).....	81
Figura 1B.	Protocolo de administração para avaliar o efeito sinérgico dos compostos.....	82
Figura 2A.	Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	83
Figura 2B.	Teste do campo aberto (TCA).....	83
Figura 3.	Tempo de imobilidade dos animais em função da dose de antidepressivo administrada.....	88
Figura 4.	Correlação entre o tempo de imobilidade dos animais no TSC e doses de antidepressivos convencionais utilizados isoladamente ou em combinação com uma dose sub-efetiva de agmatina.....	92
Figura 5.	Resumo dos resultados encontrados no Capítulo I.....	99

CAPÍTULO II - AGMATINA PRODUZ EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO MEDIANTE A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES AMPA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA mTOR

Figura 1A.	Investigação do envolvimento de receptores AMPA no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	104
Figura 1B.	Protocolo para investigar o envolvimento de BDNF e seus receptores TRkB no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	105
Figura 1C.	Investigação do envolvimento de PI3K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	106
Figura 1D.	Protocolo para investigar o envolvimento de GSK-3 β no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	107
Figura 1E.	Protocolo para reforçar o envolvimento de GSK-3 β no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	107
Figura 1F.	Investigação do envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	108
Figura 1G.	Protocolo para investigar o envolvimento das proteínas GluA1, PSD-95, sinapsina e p70S6K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	109
Figura 2.	Influência de receptores AMPA no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC.....	113
Figura 3.	Envolvimento do BDNF e de seus receptores TRkB no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC.....	114
Figura 4.	Envolvimento da PI3K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	115
Figura 5.	Envolvimento da GSK-3 β no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC.....	117
Figura 6.	Envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.....	118
Figura 7.	Influência de uma única administração de agmatina na fosforilação de GluA1 no córtex pré-frontal de camundongos.....	119
Figura 8.	Influência de uma única administração de agmatina no imunoc conteúdo de PSD-95, BDNF, sinapsina 1 e GluA1 no córtex pré-frontal de camundongos.....	120

Figura 9.	Resumo dos resultados encontrados no Capítulo II.....	126
-----------	---	-----

CAPÍTULO III – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELO ECI

Figura 1A.	Representação esquemática do tratamento, testes comportamentais e análises bioquímicas realizadas.....	129
Figura 1B.	Representação esquemática do teste de borrifagem de sacarose (TBS).....	132
Figura 2.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TSC.....	135
Figura 3.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TBS.....	136
Figura 4.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no imunoconteúdo de GluA1, sinapsina e PSD-95 no córtex pré-frontal dos camundongos.....	137
Figura 5.	Resumo dos resultados encontrados no capítulo III.....	143

CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PAL ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

Figura 1A.	Representação esquemática do tratamento, testes comportamentais e análises bioquímicas realizadas.....	147
Figura 1B.	Teste de consumo de sacarose (TCS).....	149
Figura 2.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TSC.....	153
Figura 3.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TBS.....	154
Figura 4.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TCS.....	154

Figura 5.	Comparação do peso das adrenais nos animais tratados com agmatina, cetamina e fluoxetina submetidos ou não à administração de corticosterona.....	155
Figura 6.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no imunoconteúdo de GluA1 e fosforilação dos sítios GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 no hipocampo dos animais.....	157
Figura 7.	Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina na fosforilação de p70S6K no hipocampo dos animais.....	159
Figura 8.	Resumo dos resultados encontrados no capítulo IV.....	168

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1.	Representação esquemática dos resultados obtidos nos Capítulos I, II, III e IV.....	172
-----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1. Sumário dos sintomas para o diagnóstico clínico da depressão.....	29
---	----

CAPÍTULO I – AGMATINA AUMENTA A POTÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS CONVENCIONAIS E MK-801

Tabela 1. Valores de MDE da agmatina, antidepressivos convencionais e MK-801 no TSC.....	86
Tabela 2. Avaliação da potência de antidepressivos convencionais e MK-801 associados a uma dose sub-efetiva de agmatina no TSC.....	87
Tabela 3. Correlação entre doses sub-efetivas de antidepressivos convencionais ou MK-801 no tempo de imobilidade dos animais no TSC.....	90
Tabela 4. Correlação entre doses sub-efetivas de antidepressivos ou MK-801 em combinação com uma dose sub-efetiva de agmatina no tempo de imobilidade dos animais no TSC.....	91

CAPÍTULO III – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELO ECI

Tabela 1. Estressores utilizados no protocolo de ECI.....	130
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
Akt – proteína cinase B
AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
AMPC – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA – análise de variância
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
CA3 – *cornu ammonis 3*
CREB – elemento de resposta ao AMPc
CRH – hormônio liberador de corticotrofina
DMSO – dimetil sulfóxido
DNQX – 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona
DO – densidade óptica
DSM-5 – Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais 5
EAAT – transportador de aminoácidos excitatórios
EPM – erro padrão da média
ERK – proteína cinase regulada por sinal extracelular
EROs – espécies reativas de oxigênio
GABA – ácido gama aminobutírico
GSK-3 β – glicogênio sintase cinase 3 β
HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal
i.c.v. - intracerebroventricular
ISRS – inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LPS – lipopolissacarídeo
MAO – monoamina oxidase
mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NF κ B – fator nuclear kappa B
NMDA – *N*-metil-D-aspartato
Nrf2 – fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
NO - Óxido nítrico
PI3K – fosfatidilinositol 3 cinase
PKA – proteína cinase A
p.o. - *per os*
PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa
p70S6K – proteína ribossomal S6 cinase
SNC – sistema nervoso central
TBS – teste de borrifagem de sacarose
TCA – teste do campo aberto

TCS – teste de consumo de sacarose

TNF – teste do nado forçado

TRkB – receptor tropomiosina cinase B

TSC – teste de suspensão pela cauda

LISTA DE PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DA TESE

Publicações relacionadas à tese:

NEIS, V. B.; MORETTI, M.; MANOSSO, L.M.; LOPES, M. W.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v.130, p. 9–14, 2015.

NEIS, V. B.; MORETTI, M.; BETTIO, L. E. B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; GONÇALVES, F. M., LOPES, M. W.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **European Neuropsychopharmacology**. v.26, p.959-71, 2016.

NEIS, V.B.; BETTIO, L.E.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; RIBEIRO, C.M.; FREITAS, A.E.; GONÇALVES, F.M.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 150-151, p.108–114, 2016.

NEIS, V.B.; BETTIO, L.E.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; OLESCOWICZ, G.; FRAGA, D., GONÇALVES, F.M.; FREITAS, A.E.; HEINRICH, I.A.; LOPES, M.W.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L. A single administration of agmatine reverses depressive-like behavior induced by chronic administration of corticosterone. *Artigo em fase de preparação.*

NEIS, V.B.; ROSA, P.B.; OLESCOWICZ, G.; RODRIGUES, A.L. Therapeutic potential of agmatine for CNS disorders. Review Article. *Artigo em fase de preparação.*

Publicações como co-autor durante o período:

BETTIO, L.E.; FREITAS, A.E.; **NEIS, V.B.**; SANTOS, D.B.; RIBEIRO, C.M.; ROSA, P.B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.S. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 7-14, 2014.

BETTIO L.E.B.; **NEIS, V.B.**; PAZINI, F.L.; BROCARD, P. S.; PATTEN, A.R.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R.; RODRIGUES, A.L.S. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation, **European Journal of Neuroscience**, v.43, p. 1006–1015, 2016.

FREITAS, A.E.; BETTIO, L.E.B.; **NEIS, V.B.**; SANTOS, D.B.; RIBEIRO, C.M.; ROSA, P.B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.S. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 143–150, 2014.

FREITAS, A.E.; BETTIO, L.E.B.; **NEIS, V. B.**; MORETTI, M.; RIBEIRO, C.M.; LOPES, M.W.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L.S. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 58, p. 137-146, 2014.

MACHADO, D.G.; CUNHA, M.P.; **NEIS, V.B.**; BALEN, G.O.; COLLA, A.R.; BETTIO, L.E.B.; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F. L.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E.L.; PIZZOLATTI, M.G.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 136, p. 999-1005, 2013.

ROSA, P.B.; **NEIS, V.B.**; RIBEIRO, C.; MORETTI, M; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine involve

modulation of GABAA and GABAB receptors. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 996-1001, 2016.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; FREITAS, A.E.; **NEIS, V.B.**; RIBEIRO, C.; BALEN, G.O.; RIEGER, D.K.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L.S. TNF- α -induced depressive-like phenotype and p38MAPK activation are abolished by ascorbic acid treatment. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, p. 902-912, 2015.

MORETTI, M.; **NEIS, V.B.**; MATHEUS, F.C.; CUNHA, M.P.; ROSA, P.B.; RIBEIRO, C.M.; RODRIGUES, A.L.S.; PREDIGER, R.D. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). **Neurotoxicity Research**, v. 28, p. 222-231, 2015.

MORETTI, M.; MATHEUS, F.C.; OLIVEIRA, P.A.; **NEIS, V.B.**; BEN, J.; WALZ, R.; RODRIGUES, A.L.S.; PREDIGER, R.D. Role of agmatine in neurodegenerative diseases and epilepsy. **Frontiers in Bioscience**, v. E6, p. 341-359, 2014.

FREITAS, A.E.; MACHADO, D.G.; BUDNI, J.; **NEIS, V.B.**; BALEN, G.O.; LOPES, M.W.; SOUZA, L.F.; VERONEZI, P.O.; HELLER, M.; MICKE, A.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DAFRE, A. L.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 737-745, 2013.

FREITAS, A.E.; **NEIS, V.B.**; RODRIGUES, A.L.S. Agmatine, a potential novel therapeutic strategy for depression. **European Neuropsychopharmacology**, v.26, p.1885-1899, 2016.

GONÇALVES, F.M.; NEIS, V.B.; RIEGER, D.K.; LOPES, M.W.; HEINRICH, I.A.; COSTA, A.P.; RODRIGUES, A.L.S.; KASTER, M.P.; LEAL, R.B. Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice. **Purinergic Signaling**, 2016.

OLESKOWICZ, G.; NEIS, V.B.; FRAGA, D.B.; ROSA P.B.; AZEVEDO, D.P.; BROCARDI, P.S.; GI-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant and Pro-neurogenic Effects of Agmatine in a Mouse Model of Stress Induced by Chronic Exposure to Corticosterone. Artigo submetido para a **Molecular Neurobiology**.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. DEPRESSÃO	27
1.1.1. Considerações gerais	27
1.1.2. Hipótese monoaminérgica.....	33
1.1.3. Hipótese neurotrófica.....	37
1.1.4. Sistema glutamatérgico e depressão	40
1.1.5. Cetamina e vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão	46
1.1.6. Estresse e depressão.....	52
1.2. MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO.....	57
1.3. AGMATINA	59
1.3.1. Poliaminas.....	59
1.3.2. Agmatina: absorção e metabolismo	60
1.3.3. Efeitos biológicos da agmatina	63
1.3.4. Efeitos da agmatina em neuropatologias	65
1.3.5. Agmatina e depressão	69
2. JUSTIFICATIVA	73
3. OBJETIVOS.....	75
3.1. OBJETIVO GERAL.....	75
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	75
4. RESULTADOS	77
CAPÍTULO I – AGMATINA AUMENTA A POTÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS CONVENCIONAIS E MK-801	79
1. MATERIAIS E MÉTODOS	80
1.1. ANIMAIS	80
1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS ...	80
1.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	80
1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	82

1.4.1.	<i>Teste de suspensão pela cauda (TSC)</i>	82
1.4.2.	<i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	83
1.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
2.	RESULTADOS	85
3.	DISCUSSÃO	94
4.	CONCLUSÃO	99

CAPÍTULO II - AGMATINA PRODUZ EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO MEDIANTE A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES AMPA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA mTOR.....101

1.	MATERIAIS E MÉTODOS	102
1.1.	ANIMAIS.....	102
1.2.	AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS...102	
1.3.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	103
1.4.	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	109
1.4.1.	<i>Teste de suspensão pela cauda (TSC)</i>	109
1.4.2.	<i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	110
1.5.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	110
1.5.1.	<i>Preparação do tecido</i>	110
1.5.2.	<i>Western Blotting</i>	111
1.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	111
2.	RESULTADOS	112
3.	DISCUSSÃO	120
4.	CONCLUSÃO	125

CAPÍTULO III – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELO ECI127

1. MATERIAIS E MÉTODOS	128
1.1. ANIMAIS	128
1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS ..	128
1.3. PROTOCOLO DE ECI	129
1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	131
1.4.1. <i>Teste de suspensão pela cauda (TSC)</i>	131
1.4.2. <i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	131
1.4.3. <i>Teste de borrifagem de sacarose (TBS)</i>	131
1.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	132
1.5.1. <i>Preparação do tecido</i>	132
1.5.2. <i>Western Blotting</i>	133
1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	134
2. RESULTADOS	134
3. DISCUSSÃO.....	137
4. CONCLUSÃO.....	142

CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

1. MATERIAIS E MÉTODOS	146
1.1. ANIMAIS	146
1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS ..	146
1.3. MODELO DE ESTRESSE INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA	147
1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS	148
1.4.1. <i>Teste de suspensão pela cauda (TSC)</i>	148
1.4.2. <i>Teste do campo aberto (TCA)</i>	148
1.4.3. <i>Teste de borrifagem de sacarose (TBS)</i>	148
1.4.4. <i>Teste de consumo de sacarose (TCS)</i>	149
1.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	150

1.5.1.	<i>Pesagem das adrenais</i>	150
1.5.2.	<i>Preparação do tecido</i>	150
1.5.3.	<i>Western Blotting</i>	151
1.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	151
2.	RESULTADOS	152
3.	DISCUSSÃO	159
4.	CONCLUSÃO	166
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	169
6.	CONCLUSÕES	173
7.	PERSPECTIVAS	175
	REFERÊNCIAS	177

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEPRESSÃO

1.1.1. Considerações gerais

Os transtornos de humor correspondem a aproximadamente 13% da carga global de doenças no mundo (PRINCE *et al.*, 2007). Dentre eles, destaca-se o transtorno depressivo maior (depressão), que é uma condição psiquiátrica crônica e recorrente (cerca de 80% dos pacientes em remissão apresentam pelo menos uma recorrência durante a vida) (VOS *et al.*, 2004), com uma prevalência ao longo da vida de aproximadamente 20% na população mundial (KESSLER *et al.*, 2003; KESSLER *et al.*, 2012; HILLHOUSE e PORTER, 2015), sendo as mulheres duas a três vezes mais acometidas do que os homens (SOARES e ZITEK, 2008; KESSLER *et al.*, 2012). Segundo uma estimativa realizada entre 1990 e 2013, que avaliou as causas de incapacitação por doenças agudas e crônicas em 188 países, a depressão ocupa o segundo lugar no ranking (GBD, 2013). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2030 poderá ser considerada a principal causa de incapacitação (MURRAY e LOPEZ, 1997; CUIJPERS e SMIT, 2002; LEPINE e BRILEY, 2011). Além disso, a OMS estima que 151 milhões de pessoas tenham sua saúde comprometida em consequência da depressão (PRINCE *et al.*, 2007). Esses prejuízos à saúde do indivíduo geram altos custos de tratamento (tanto diretos como o próprio atendimento do paciente, internação e medicações quanto indiretos incluindo aposentadoria e licença do trabalho), maior utilização dos serviços de saúde e improdutividade no trabalho reduzindo, dessa forma, a qualidade de vida dos pacientes (NEMEROFF e OWENS, 2002; GUSTAVSSON *et al.*, 2011; KESSLER e BROMET, 2013; VIGO, THORNICROFT e ATUN, 2016). Em função disso, esse transtorno vem sendo considerado um problema de saúde pública (NESTLER e CARLEZON, 2006).

Um estudo recente avaliando a população brasileira acima de 18 anos mostrou que a prevalência de depressão no Brasil é de 4,1%, correspondendo a 5,5 milhões de pessoas afetadas (MUNHOZ *et al.*, 2016). Além disso, estima-se que no país exista aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas terão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (NARDI, 2000). É estimado que mais de

50% dos 800.000 suicídios que ocorrem anualmente no mundo estão associados a episódios depressivos (WHO, 2016) e pacientes acometidos por esse transtorno apresentam risco aumentado de mortalidade por suicídio em pelo menos 20 vezes (CHESNEY, GOODWIN e FAZEL, 2014). Além do elevado índice de mortalidade associado ao suicídio, pacientes deprimidos são mais propensos a desenvolverem doenças arteriais coronarianas, *diabetes mellitus* tipo 2 (VAN DER KOOY K, 2007; VAN DER FELTZ-CORNELIS *et al.*, 2010), hipertensão (ALMAS *et al.*, 2014), além de outras doenças mentais como ansiedade, transtornos psicóticos e abuso de drogas (KESSLER *et al.*, 2003; BROWN, VARGHESE e MCEWEN, 2004; KATON, LIN e KROENKE, 2007; THAIPISUTTIKUL *et al.*, 2014). Nesse sentido, um trabalho recente demonstrou que as patologias que são mais prevalentes em indivíduos com depressão incluem asma, artrite, gota, doenças coronarianas, acidente vascular encefálico, diabetes mellitus e problemas tireoidianos (KIM, SHIN e SONG, 2015).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-5, 2013), o diagnóstico da depressão se baseia na observação clínica do paciente e requer a ocorrência de humor deprimido ou anedonia (diminuição de interesse/prazer por todas ou quase todas as atividades diárias) por um período mínimo de duas semanas. Além disso, para que o transtorno seja caracterizado é necessário também que a presença de um destes sintomas esteja associada a pelo menos 4 outros sintomas de uma lista de critérios, conforme ilustrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Sumário dos sintomas para o diagnóstico clínico da depressão

The infographic is titled "Sintomas clínicos para o diagnóstico da depressão" and lists nine symptoms in a vertical list. Each symptom is numbered and contained within a rounded rectangular box. The numbers 1 through 9 are in small purple circles on the left side of each box. The symptoms are: 1. Humor deprimido; 2. Anedonia; 3. Perda de peso e apetite / Ganho de peso ou apetite; 4. Insônia / Hipersônia; 5. Agitação psicomotora / Letargia; 6. Fadiga ou falta de energia; 7. Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia; 8. Dificuldade de concentração ou indecisão; 9. Pensamentos recorrentes de morte e suicídio.

Sintomas clínicos para o diagnóstico da depressão	
1	Humor deprimido
2	Anedonia
3	Perda de peso e apetite / Ganho de peso ou apetite
4	Insônia / Hipersônia
5	Agitação psicomotora / Letargia
6	Fadiga ou falta de energia
7	Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia
8	Dificuldade de concentração ou indecisão
9	Pensamentos recorrentes de morte e suicídio

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (DSM-5, 2013).

A depressão é considerada uma doença multifatorial uma vez que diferentes fatores podem ser responsáveis pelo desencadeamento e estabelecimento de um quadro depressivo. Dentre eles destacam-se os fatores genéticos (hereditários) e os ambientais, como estresse emocional decorrente de abuso na infância, problemas financeiros, exposição à violência, e ainda, doença física (KESSLER, 1997; BERTON e NESTLER, 2006; LI, D'ARCY e MENG, 2016). Considerando essa diversidade de fatores envolvidos na etiologia da depressão, e o fato de levarem a alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (FILE, 1996; BERTON e NESTLER, 2006) existe uma complexidade

(relacionada à própria complexidade do cérebro e o fato dele ser inacessível) dificultando sua definição, diagnóstico e tratamento (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

A natureza heterogênea da depressão está relacionada com o fato de que quadros clínicos muitas vezes opostos recebem o mesmo diagnóstico para o transtorno. Os sintomas dos pacientes variam bastante em função das diferenças nas características biológicas de cada um, e do subtipo de depressão que o indivíduo apresenta (atípica ou melancólica, por exemplo). Cada subtipo responderia de forma particular a diferentes tratamentos, por estar associado a marcadores diagnósticos particulares. A combinação de mecanismos moleculares e celulares em sua fisiopatologia contribuem para alterações morfológicas em múltiplas regiões cerebrais nesse transtorno, como o córtex pré-frontal, córtex cingulado, núcleo accumbens, gânglios da base, amígdala, hipocampo, estriado e tálamo (DREVETS, PRICE e FUREY, 2008; KRISHNAN e NESTLER, 2008; SAVITZ e DREVETS, 2009; RUSSO e NESTLER, 2013). Dentre essas regiões destacam-se o hipocampo e córtex pré-frontal. O hipocampo é uma estrutura envolvida com aprendizado e memória que possui um importante papel na fisiopatologia da depressão, uma vez que está envolvido na regulação do humor e emoções (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; FUCHS *et al.*, 2004; SHELINE, 2011). De fato, um estudo de meta análise mostrou redução de diversas estruturais cerebrais em pacientes com depressão, incluindo o hipocampo (SCHMAAL *et al.*, 2016). Além disso, uma meta análise com 193 estudos compreendendo 15.892 indivíduos também sugere que o hipocampo pode ser afetado de maneira seletiva na depressão quando comparado com outros transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, bipolaridade, transtorno obsessivo compulsivo e ansiedade (GOODKIND *et al.*, 2015). Outro estudo sugeriu que a redução do volume hipocampal poderia ser um marcador para depressão ou de vulnerabilidade para episódios futuros, enquanto um aumento no volume hipocampal poderia ser um marcador de resiliência à depressão (CHAN *et al.*, 2016).

Além do hipocampo, estudos também mostram o envolvimento do córtex pré-frontal na fisiopatologia da depressão (DREVETS, 2001; KRISHNAN e NESTLER, 2008). O córtex pré-frontal, parte anterior do lobo frontal do cérebro, exerce um papel importante na tomada de decisões, expressão da personalidade, controle do sistema de recompensa e controle cognitivo (MILLER e COHEN, 2001; YANG e RAINE, 2009). Estudos sugerem que pacientes com depressão possuem uma diminuição e disfunção do córtex pré-frontal (RAJKOWSKA *et al.*, 1999; HASLER *et al.*, 2004), além de redução do fluxo sanguíneo na região (DREVETS,

PRICE e FUREY, 2008). Ainda, a exposição ao estresse, altamente associado com a depressão, gera alterações na integridade sináptica e em neurônios excitatórios no córtex pré-frontal (GHOSAL, HARE e DUMAN, 2017).

Apesar de ser considerado um transtorno incapacitante, com alterações em diversas regiões cerebrais, o tratamento com antidepressivos constitui atualmente maior segmento do mercado de fármacos que agem no sistema nervoso central (SNC) (aproximadamente 24%) (SCHMIDT, BANASR e DUMAN, 2008). No entanto, apesar da grande disponibilidade de antidepressivos no mercado atualmente, aproximadamente metade dos pacientes não responde à terapia de primeira escolha e 30% não conseguem remissão do transtorno após diversas tentativas de tratamento, sendo considerados resistentes (RUSH *et al.*, 2006a; THASE *et al.*, 2007). Isso ocorre provavelmente porque existem outras doenças associadas. A medicação pode ser efetiva para determinado subtipo de depressão, mas quando administrada para os pacientes de um modo geral diagnosticados com depressão, alguns subtipos podem não responder. Caso a resposta ao tratamento seja insuficiente com a utilização de pelo menos dois antidepressivos de classes diferentes, a depressão é considerada resistente ao tratamento, estando geralmente associada a um maior risco de suicídio (RUSH *et al.*, 2006b; SCHOSSER *et al.*, 2012). Adicionalmente, mais de 65% dos pacientes não alcançam a remissão completa dos sintomas com a utilização desses fármacos (FAVA, 2003; HAMON e BLIER, 2013), além dos efeitos colaterais que eles podem gerar como dor de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual, hipotensão e arritmia (KELLER *et al.*, 2002; SERRETTI e MANDELLI, 2010; LANG e BORGWARDT, 2013), o que contribui para diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento (BRUNELLO *et al.*, 2002). Vale ressaltar que a resposta terapêutica desses fármacos ocorre cerca de três semanas após o início do tratamento, o que pode trazer complicações quando se trata de pacientes com ideação suicida assim como afetar a adesão desses ao tratamento (SKOLNICK, POPIK e TRULLAS, 2009).

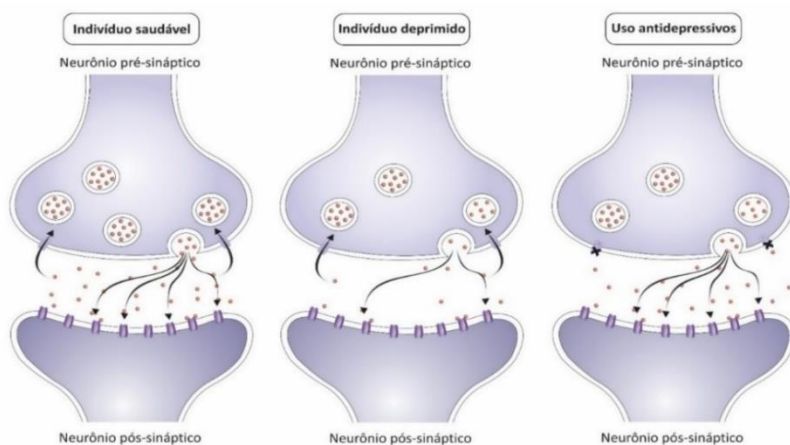
Uma alternativa para pacientes que desistem do tratamento devido aos efeitos adversos dos antidepressivos clássicos, ou ainda, que não obtém o alívio dos sintomas com a monoterapia, é a chamada terapia combinada, ou seja, a utilização de um ou mais fármacos concomitantemente ao uso dos antidepressivos convencionais. Essa terapia combinada vem crescendo consideravelmente e tem proporcionado uma melhora significativa dos sintomas depressivos nos pacientes (DEBATTISTA, 2006; BERMAN *et al.*, 2007; MARCUS *et*

al., 2008; BERMAN *et al.*, 2009). Essa combinação pode se dar tanto através do tratamento dos pacientes com psicoterapia em conjunto com a farmacoterapia (CUIJPERS *et al.*, 2009a; CUIJPERS *et al.*, 2009b), quanto da própria farmacoterapia, se utilizando a combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação para tratar o transtorno, produzindo resultados melhores do que com a utilização de apenas um fármaco. Alguns exemplos disso estão descritos na literatura tanto em estudos com modelos animais como em estudos clínicos. Já foi demonstrado que a coadministração de memantina (antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)) e sertralina (inibidor da recaptação de serotonina) induziu um efeito tipo-antidepressivo mais pronunciado no teste do nado forçado (TNF), um teste preditivo para avaliar o efeito tipo-antidepressivo de compostos. Além disso, essa associação de fármacos foi capaz de aumentar os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e córtex pré-frontal ao comparar com o tratamento desses fármacos isoladamente (AMIDFAR *et al.*, 2016b). Adicionalmente, a eletroconvulsoterapia combinada com antidepressivos tricíclicos pode ser uma boa estratégia para pacientes que não possuem remissão total dos sintomas ou ainda que possuem recidivas (BIRKENHAGER e PLUIJMS, 2016), além de aumentar a resposta da clozapina (antipsicótico) em pacientes resistentes ao tratamento com esquizofrenia (KITTSTEINER MANUBENS, LOBOS URBINA e ACEITUNO, 2016). Esses achados são importantes principalmente para os pacientes que são resistentes a monoterapia, pois além de terem um efeito mais pronunciado, reduzem de modo significativo os efeitos colaterais.

1.1.2. Hipótese monoaminérgica

A terapia farmacológica da depressão teve seu primeiro avanço significativo nos anos 50 com a descoberta de que moduladores dos sistemas monoaminérgicos melhoravam significativamente o humor dos pacientes. Com isso, teve início a hipótese monoaminérgica da depressão (SCHILDKRAUT, 1965), a qual postula que esse transtorno pode ser consequência de uma redução dos níveis de monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina) na fenda sináptica e o tratamento com antidepressivos reverte esses efeitos, envolvendo o aumento da atividade monoaminérgica no encéfalo (SCHILDKRAUT, 1965; ELHWUEGI, 2004) (**Figura 1**).

Figura 1. Hipótese monoaminérgica da depressão



Legenda: No encéfalo, os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados e ativam receptores pós-sinápticos. A neurotransmissão é terminada pela recaptação do neurotransmissor no neurônio pré-sináptico. Segundo a hipótese monoaminérgica da depressão, nos indivíduos deprimidos, a concentração de monoaminas na fenda sináptica está diminuída, acarretando o transtorno de humor. Após o tratamento com antidepressivos monoaminérgicos há o aumento da disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos (por exemplo, por meio do bloqueio dos sítios de recaptação), os quais ativam seus receptores pós-sinápticos, sendo o humor reestabelecido. Fonte: adaptado de CASTREN (2005).

Sabe-se que as monoaminas exercem grande influência sobre os circuitos cerebrais envolvidos na regulação do humor, reatividade ao estresse psicológico, autocontrole, motivação e desempenho cognitivo (HAMON e BLIER, 2013). A hipótese monoaminérgica foi postulada em 1965 com o propósito de explicar as bases neuroquímicas envolvidas na etiologia e tratamento da depressão (SCHILDKRAUT, 1965), e se baseou no mecanismo de ação dos dois primeiros fármacos antidepressivos: a iproniazida (inibidor da MAO, que degrada monoaminas), utilizada no tratamento da tuberculose (CRANE, 1957) e a imipramina (antidepressivo tricíclico, inibidor da recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina), descoberta durante a pesquisa de novos compostos anti-histamínicos (DELAY, LAINE e BUISSON, 1952; KUHN, 1958). Estes dois antidepressivos produziam melhora do humor e euforia e tinham em comum a capacidade de aumentar os níveis de monoaminas na fenda sináptica (NESTLER *et al.*, 2002). Outra evidência que corrobora a hipótese monoaminérgica envolve o aparecimento de sintomas depressivos em cerca de 25% dos pacientes que utilizam a reserpina, fármaco capaz de depletar as monoaminas por impedir o transporte vesicular desses neurotransmissores, utilizado como anti-hipertensivo (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Nesse sentido, a primeira linha de escolha para o tratamento de pacientes com depressão continua sendo fármacos que influenciam na neurotransmissão monoaminérgica (HILLHOUSE e PORTER, 2015). Dentre esses fármacos destacam-se os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (ex: fluoxetina), inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (ex: venlafaxina, também classificada como antidepressivo atípico), inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina (ex: bupropiona – também classificada como antidepressivo atípico), antidepressivos tricíclicos, que atuam inibindo a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (ex: imipramina), além de inibidores da enzima MAO (ex: iproniazida) (NEMEROFF E OWENS, 2002).

Mais especificamente em relação ao envolvimento do sistema serotoninérgico na depressão, sabe-se que baixos níveis plasmáticos de serotonina são observados em pacientes com depressão (COPPEN e DOOGAN, 1988) e níveis reduzidos de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, é encontrado no líquor de pacientes com depressão (RICCI e WELLMAN, 1990). A serotonina (5 hidroxitriptamina ou 5-HT) é uma monoamina amplamente distribuída no organismo, que exerce um papel importante em diversas funções fisiológicas como regulação da temperatura, memória e aprendizado, humor, apetite, libido, sono e comportamento social. Grande parte dos

fármacos utilizados no tratamento da depressão age sob o sistema serotoninérgico (RISCH e NEMEROFF, 1992; WONG, PERRY e BYMASTER, 2005), o que reforça seu envolvimento na fisiopatologia desse transtorno. Nesse contexto, os antidepressivos tricíclicos (os quais agem inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina na fenda sináptica), foram considerados a terapia farmacológica convencional para a depressão durante aproximadamente 30 anos, apesar de apresentarem inúmeros efeitos colaterais (THASE, 2003). Ainda que tenham surgido outras classes de antidepressivos, o tratamento desse transtorno só avançou de modo significativo em termo de efeitos colaterais no final dos anos 80 com o surgimento dos ISRS, reforçando a hipótese serotoninérgica da depressão. O primeiro ISRS sintetizado foi a fluoxetina, comercialmente conhecida como Prozac®, que se tornou então o antidepressivo mais prescrito mundialmente, além de ser utilizado também para o tratamento de transtornos de ansiedade e bulimia (BURT, MCCAIG e RECHTSTEINER, 2007; LOPEZ-MUNOZ e ALAMO, 2009). Esse antidepressivo possui uma biodisponibilidade relativamente alta, com um pico de concentração plasmática que varia de 6 a 8 h. É metabolizada no fígado por isoenzimas do sistema citocromo P450, e somente um metabólito é ativo, a norfluoxetina. A taxa de eliminação da fluoxetina e do seu metabólito é relativamente baixa, o que a diferencia de outros antidepressivos (MAGNI *et al.*, 2013). Pode induzir alguns efeitos colaterais incluindo náuseas, dores de cabeça, insônia, nervosismo, ansiedade, anorexia e diarreia (BRAMBILLA *et al.*, 2005). De um modo geral, apesar de bem tolerados em comparação aos antidepressivos previamente utilizados na clínica, possuem um baixo índice de remissão dos sintomas, assim como a presença de sintomas residuais.

O papel do sistema noradrenérgico na depressão também tem sido relatado na literatura (WONG e LICINIO, 2001). Evidências demonstram a participação de α -adrenoceptores e β -adrenoceptores na fisiopatologia da depressão, uma vez que os níveis desses receptores parecem estar diminuídos em indivíduos com depressão e são reestabelecidos após o tratamento crônico com antidepressivos (MILLAN, 2004; TAYLOR *et al.*, 2005; HAMON e BLIER, 2013). Além disso, os níveis de noradrenalina na fenda sináptica encontram-se reduzidos nesse transtorno (WONG e LICINIO, 2001; TAYLOR *et al.*, 2005; HAMON e BLIER, 2013). Segundo um estudo pré-clínico, camundongos *knockout* para o transportador de noradrenalina possuem um aumento dos níveis extracelulares dessa monoamina e um comportamento tipo-antidepressivo em testes comportamentais

(DZIEDZICKA-WASYLEWSKA *et al.*, 2006). De fato, apesar de agentes seletivos para o sistema noradrenérgico não serem utilizados como tratamento de primeira escolha para a depressão, principalmente em função dos efeitos colaterais, é importante ressaltar que, muitos dos pacientes que não respondem à terapia com agentes serotoninérgicos de primeira escolha, podem utilizar como alternativa esses agentes que atuam no sistema noradrenérgico, até mesmo como candidatos para terapia combinada (DELL'OSSO *et al.*, 2011).

Apesar das pesquisas se concentrarem principalmente nos fármacos que agem nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico (antidepressivos tricíclicos e ISRS e eventualmente da noradrenalina também), o atraso na resposta aos antidepressivos convencionais sugere que outros mecanismos possam estar envolvidos na fisiopatologia da depressão, e uma série de evidências experimentais favorece o papel da dopamina nesse transtorno (D'AQUILA *et al.*, 2000; DAILLY *et al.*, 2004; WILLNER, HALE e ARGYROPOULOS, 2005). Foi demonstrada uma possível associação de polimorfismos nos genes que codificam os receptores dopaminérgicos D3 e D4 na depressão (DIKEOS *et al.*, 1999; LOPEZ LEON *et al.*, 2005). Além disso, a concentração de ácido homovanílico, um metabólito da dopamina, está presente em menor quantidade no líquido de pacientes depressivos, quando comparado com indivíduos saudáveis (KORF, VAN PRAAG e SEBENS, 1971). De fato, sabe-se que a severidade do episódio depressivo parece estar relacionada aos níveis de metabólitos de dopamina no SNC (PAPAKOSTAS, 2006), uma vez que se encontram diminuídos em pacientes suicidas (ENGSTROM *et al.*, 1999). Adicionalmente, o tratamento com antidepressivos aumenta a transmissão dopaminérgica preferencialmente no sistema mesolímbico, induzindo uma melhora nos sintomas da depressão, incluindo a anedonia, que parece estar relacionada com a redução da sinalização dopaminérgica (D'AQUILA *et al.*, 2000; DAILLY *et al.*, 2004; PAPAKOSTAS, 2006).

Apesar de estar bem estabelecido o envolvimento desses sistemas monoaminérgicos (serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico) na fisiopatologia da depressão, além de serem a base da farmacoterapia antidepressiva, a hipótese monoaminérgica possui algumas limitações. Inicialmente, falha ao não explicar o fato de que a melhora dos sintomas decorrente do tratamento com antidepressivos ocorre tardiamente em relação aos eventos bioquímicos rápidos que aumentam as monoaminas na fenda sináptica (ELHWUEGI, 2004). Vale destacar que a depleção de monoaminas em indivíduos saudáveis não desencadeia sintomas depressivos (SALOMON *et al.*, 1997) e que substâncias como a cocaína

e a anfetamina, que aumentam a neurotransmissão monoaminérgica, não são efetivas para o tratamento da depressão (HINDMARCH, 2001). Adicionalmente, esses agentes farmacológicos baseados no sistema monoaminérgico apresentam um efeito tardio, demorando semanas de tratamento para começarem a apresentar um alívio sintomático, o que dificulta sua utilização no caso de pacientes com ideação suicida (JACOBS, VAN PRAAG e GAGE, 2000). Levando em consideração essas limitações da hipótese monoaminérgica e dos fármacos que atuam nesse sistema, bem como o fato de que o aumento monoaminas na fenda sináptica desencadeia uma série de alterações em vias de sinalização intracelulares e na atividade de outros sistemas de neurotransmissão, estudos buscam investigar novos alvos envolvendo outros neurotransmissores. Além disso, buscam a manipulação de vias de sinalização intracelular e de fatores de crescimento como o BDNF para se desenvolver uma nova geração de fármacos antidepressivos (LOPEZ-MUNOZ e ALAMO, 2009).

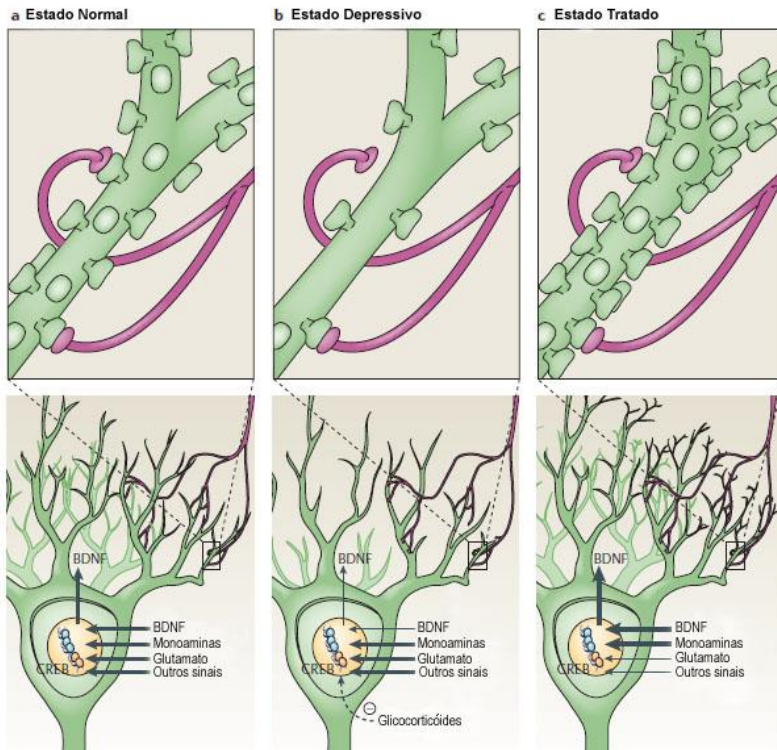
1.1.3. Hipótese neurotrófica

A hipótese neurotrófica da depressão postula que esse transtorno resulta de uma diminuição dos fatores neurotróficos, em especial o BDNF, levando à atrofia neuronal, perda de células gliais e/ou diminuição da neurogênese hipocampal (KEMPERMANN e KRONENBERG, 2003). Reforçando a hipótese, o tratamento crônico com antidepressivos bloqueia ou reverte esse déficit nos fatores neurotróficos, bem como a atrofia e perda de células neuronais (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN e LI, 2012; LINDHOLM e CASTREN, 2014).

O BDNF é uma proteína membro da família das neurotrofinas que possui um papel essencial na plasticidade sináptica, sendo crucial para processos de aprendizagem e memória, além de ser importante para a sobrevivência e diferenciação de neurônios bem como estabilização de contatos sinápticos (COHEN-CORY, 2002; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Esse papel pode ser prejudicado na presença de estressores, pois o excesso de glicocorticoides pode interferir com mecanismos transcricionais que levam à expressão de BDNF, como a redução da fosforilação do elemento de resposta ao AMPc (CREB). Além disso, os efeitos prejudiciais do estresse sobre as ramificações dendríticas, particularmente em neurônios hipocampais, podem ser suprimidos pelo tratamento com antidepressivos, que aumenta a neurogênese hipocampal, contribuindo para o restabelecimento

sináptico nessa estrutura (WOOLLEY, GOULD e MCEWEN, 1990; SANTARELLI *et al.*, 2003; CASTREN, VOIKAR e RANTAMAKI, 2007; DUMAN, 2009) (**Figura 2**).

Figura 2. Hipótese neurotrófica da depressão



Legenda: O painel A demonstra um neurônio piramidal hipocampal de um indivíduo em estado normal, sofrendo regulação por suas inervações glutamatérgicas, monoaminérgicas e de outros tipos neuronais, bem como pela presença de BDNF. O painel B ilustra um neurônio piramidal hipocampal exposto a estresse intenso ou crônico com redução nos níveis de BDNF e atrofia dendrítica. Essa redução na expressão de BDNF é, pelo menos em parte, mediada pelo excesso de glicocorticóides interferindo com mecanismos transcricionais mediados pelo CREB. No painel C observa-se a reversão desse quadro pelo tratamento com antidepressivos, levando a uma redução na excitotoxicidade glutamatérgica, assim como um aumento na atividade monoaminérgica, expressão de BDNF e arborização dendrítica dos neurônios hipocampais. Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; CREB, elemento de resposta ao AMPc. Fonte: Adaptado de BERTON e NESTLER (2006).

Evidências mostram uma diminuição dos níveis de BDNF e de seu receptor tropomiosina cinase B (TrkB) no hipocampo, soro ou plasma de pacientes com depressão (KAREGE *et al.*, 2005a; LEE *et al.*, 2007; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Além disso, estudos *post-mortem* mostram que pacientes com depressão ou que cometeram suicídio apresentam uma redução na expressão de BDNF e do seu receptor TrkB, tanto no hipocampo (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005b; THOMPSON RAY *et al.*, 2011) quanto no córtex pré-frontal (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005b; PANDEY *et al.*, 2008; RAY, SHANNON WEICKERT e WEBSTER, 2014). Sabe-se que esse transtorno envolve uma diminuição hipocampal (de aproximadamente 10-15%) (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004), que pode estar relacionada com uma redução na neurogênese, processo diretamente influenciado pelo BDNF (CZECH e LUCASSEN, 2007; HAASE e BROWN, 2015). Além disso, o polimorfismo no gene do BDNF (Val66Met), que está relacionado com uma menor secreção dessa neurotrofina, pode aumentar o risco do desenvolvimento de depressão, principalmente em indivíduos submetidos a eventos estressantes durante a vida (HOSANG *et al.*, 2014).

Em estudos pré-clínicos, modelos animais de depressão induzida por estresse são capazes de diminuir os níveis de BDNF em regiões cerebrais, principalmente no hipocampo (MURAKAMI *et al.*, 2005; GRONLI *et al.*, 2006). Em contrapartida, o tratamento com antidepressivos é capaz de aumentar os níveis dessa neurotrofina no soro, córtex pré-frontal e hipocampo, tanto em humanos quanto em animais (CHEN *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2003; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; AUTRY e MONTEGGIA, 2012; DUMAN e LI, 2012). De fato, a administração periférica (SCHMIDT e DUMAN, 2010) ou central de BDNF (SHIRAYAMA *et al.*, 2002; HOSHAW, MALBERG e LUCKI, 2005) resulta em efeitos tipo-antidepressivos. Além disso, o prejuízo na sinalização do BDNF por deleção do seu receptor TrkB prejudica a ação de antidepressivos em camundongos (LI *et al.*, 2008), enquanto um aumento nessa sinalização resulta em efeitos antidepressivos (KOPONEN *et al.*, 2005; TALIAZ *et al.*, 2011).

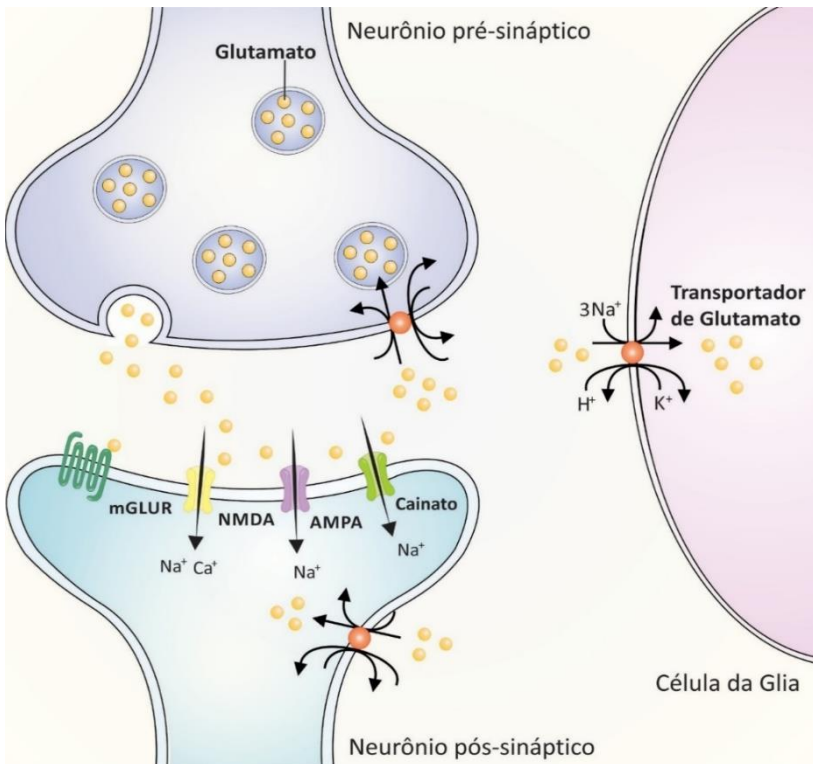
1.1.4. Sistema glutamatérgico e depressão

O glutamato é um aminoácido presente em todos os tipos celulares do organismo humano sendo que, no SNC, é estocado em vesículas e liberado dos neurônios mediante despolarização, agindo como seu principal neurotransmissor excitatório (TAKAMORI, 2006). Em condições fisiológicas, esse neurotransmissor possui um papel fundamental na regulação da plasticidade sináptica, aprendizado e memória assim como na migração, diferenciação, sobrevivência neuronal e sinaptogênese (MATTSON, 1996; TZSCHENTKE, 2002). Depois de ser sintetizado no neurônio pré-sináptico, o glutamato é armazenado em vesículas pré-sinápticas (TAKAMORI, 2006) e após a despolarização, ele é liberado na fenda sináptica, onde exerce suas ações através da estimulação de receptores específicos. Em seguida, o glutamato pode ser eliminado da fenda sináptica após captação por transportadores presentes no neurônio pré ou pós-sinápticos ou principalmente nos astrócitos. Esses transportadores são comumente chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT), presentes tanto em células da glia (EAATs 1 e 2) como em neurônios (EAATs 3-5) (DANBOLT, 2001; JIANG e AMARA, 2011). Esses transportadores atuam prevenindo a estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos por meio da captação de glutamato da fenda sináptica, mantendo dessa forma o controle de sua concentração no espaço extracelular, mantendo-o abaixo de níveis tóxicos (SORIANO e HARDINGHAM, 2007). Essa função é essencial considerando que não existe um sistema enzimático capaz de metabolizar rapidamente esse neurotransmissor na fenda sináptica (DANBOLT, 2001). No interior das células gliais, o glutamato pode ser convertido em glutamina (pela ação da enzima glutamina sintetase), que pode ser transportada para o neurônio pré-sináptico, onde é precursora para uma nova síntese de glutamato (SCHOUSBOE, BAK e WAAGEPETERSEN, 2013; HILLHOUSE e PORTER, 2015).

Quanto aos receptores glutamatérgicos, são amplamente distribuídos no SNC e podem ser classificados com base em características estruturais e farmacológicas em metabotrópicos (acoplados à proteína G) ou ionotrópicos (canais iônicos). Os receptores metabotrópicos, compreendem 8 subtipos de receptores (mGlu1 à mGlu8) (COUTINHO e KNOPFEL, 2002), podendo estar localizados tanto pré quanto pós-sinápticamente (DUMAN, 2009; NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012). Por outro lado, os receptores ionotrópicos incluem os do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-

4-isoxazol propionato (AMPA) e cainato (**Figura 3**), presentes principalmente pós-sinápticamente, embora existam também no neurônio pré-sináptico, sugerindo que eles também podem responder à liberação de glutamato sináptico (GILL *et al.*, 2015). Os receptores ionotrópicos, quando ativados, permitem a entrada de íons catiônicos (principalmente íons cálcio e sódio) para o interior do neurônio pós-sináptico. Particularmente os receptores ionotrópicos AMPA são os responsáveis pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico e podem ter 4 tipos de subunidades: GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4 (STONE e ADDAE, 2002; LI, CHEN e SMIT, 2013), podendo ser permeáveis ao sódio (principalmente) ou cálcio dependendo por quais subunidades são constituídos (KEW e KEMP, 2005). Os receptores cainato diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (HUETTNER, 2003), sendo permeáveis principalmente ao sódio e, em menor escala ao cálcio (KEW e KEMP, 2005). Podem ser formados a partir da associação de cinco tipos de subunidades: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 e GluK5 (REINER, ARANT e ISACOFF, 2012). No que diz respeito aos receptores NMDA, possuem maior afinidade pelo glutamato (NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012) e são permeáveis ao sódio e principalmente ao cálcio (KEW e KEMP, 2005). Esse tipo de receptor pode ser constituído pelas subunidades GluN1, GluN2 (GluN2A – GluN2D) e GluN3 (GluN3A e GluN3B) (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013) e, de acordo com a composição de suas subunidades, os receptores NMDA podem ter distribuição, propriedades e regulações distintas no encéfalo (GONDA, 2012).

Figura 3. Liberação de glutamato na fenda sináptica



Legenda: O glutamato liberado na fenda sináptica pode se ligar em receptores metabotrópicos (mGLUR) ou ionotrópicos (NMDA, AMPA ou cainato) no neurônio pós-sináptico. As ações desse neurotransmissor na fenda sináptica terminam quando sua concentração na fenda é reduzida por difusão e por captação de glutamato pelos transportadores presentes nas células gliais e nos neurônios pré e pós-sinápticos. Abreviaturas: NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; mGLUR, receptores glutamatérgicos metabotrópicos. Fonte: adaptado de ATTWELL e GIBB (2005).

Embora a neurotransmissão glutamatérgica tenha um papel importante em nível de SNC, sua hiperativação pode resultar no excesso de glutamato, que leva a uma excitotoxicidade devido ao aumento nos níveis de cálcio e sódio intracelulares, desencadeando uma série de eventos como liberação de NO e aumento de espécies reativas de oxigênio

(EROs) que culminam em morte celular (LIPTON e ROSENBERG, 1994). Essa excitotoxicidade está frequentemente associada a diversas doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, depressão, epilepsia e esquizofrenia (KORNHUBER e WELLER, 1997; HYND, SCOTT e DODD, 2004; SANACORA *et al.*, 2008; ZARATE *et al.*, 2010; CALABRESE *et al.*, 2012; HILLHOUSE e PORTER, 2015). A hiperfunção glutamatérgica em transtornos do humor pode ocorrer devido ao aumento nos níveis de glutamato por excitação excessiva ou ainda por anormalidades em células gliais devido à diminuição na recaptação de glutamato extracelular (KUGAYA e SANACORA, 2005).

O papel do glutamato na depressão e no efeito de antidepressivos tem sido evidenciado desde estudos farmacológicos realizados no final de 1980. De fato, um estudo realizado em 1988 mostrou que antidepressivos tricíclicos possuem a capacidade de bloquear receptores NMDA (REYNOLDS e MILLER, 1988). Uma série de estudos mostra que esses antagonistas apresentam propriedades antidepressivas e que o tratamento com antidepressivos pode ter um efeito sobre a função destes receptores (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; SKOLNICK, 1999; MATHEW, KEEGAN e SMITH, 2005; GARCIA *et al.*, 2008; CHUNG, 2012; SANACORA, TRECCANI e POPOLI, 2012).

Também foi demonstrado um papel importante dos receptores NMDA na modulação das funções serotoninérgicas. Antagonistas dos receptores NMDA podem liberar serotonina e estimular sua renovação em várias regiões do encéfalo através da modulação de α -2 adrenoceptores pré-sinápticos, o que pode contribuir para suas propriedades antidepressivas (LOSCHER, ANNIES e HONACK, 1991; FINK *et al.*, 1995). Ressalta-se ainda, que esses antagonistas têm efeitos protetores em modelos animais que estudam condições agudas de dano cerebral (MUIR, 2006) e propriedades antidepressivas em modelos animais de depressão, como o estresse inescapável (TRULLAS e SKOLNICK, 1990), estresse crônico moderado (PAPP e MORYL, 1994), desamparo aprendido, modelo de bulbectomia olfatória e testes de desespero comportamental, como o TNF e o teste da suspensão pela cauda (TSC) (SKOLNICK, 1999; MORETTI *et al.*, 2011). A administração dos antagonistas de receptores NMDA também é capaz de mimetizar o efeito de antidepressivos, revertendo a anedonia induzida pelo estresse crônico moderado (PAPP e MORYL, 1994; SKOLNICK, POPIK e TRULLAS, 2009), além de potencializar o efeito tipo-antidepressivo da fluoxetina, venlafaxina e imipramina no TNF (ROGOZ *et al.*, 2002; PRUUS *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, um acúmulo de evidências relaciona à disfunção no sistema glutamatérgico com a depressão (BONANNO *et al.*, 2005; SANACORA *et al.*, 2008; SANACORA, TRECCANI e POPOLI, 2012). Estudos demonstram uma atrofia de regiões do SNC diretamente envolvidas com este transtorno e níveis elevados de glutamato nas mesmas (SANACORA *et al.*, 2004), assim como uma diminuição na densidade neuronal e glial (DREVETS *et al.*, 1992; SHELINE *et al.*, 1996). Adicionalmente, pacientes com depressão, quando comparados com indivíduos saudáveis, possuem um aumento dos níveis de glutamato no plasma (MAURI *et al.*, 1998; KUCUKIBRAHIMOGLU *et al.*, 2009) e no córtex pré-frontal (LEVINE *et al.*, 2000; HASHIMOTO, SAWA e IYO, 2007) bem como um aumento de glutamina no líquido cerebrospinal (LEVINE *et al.*, 2000). Tanto o aumento de glutamato no plasma (MAES *et al.*, 1998; KUCUKIBRAHIMOGLU *et al.*, 2009) quanto o de glutamina no líquido cerebrospinal (GARAKANI *et al.*, 2013) foram revertidos após o tratamento com antidepressivos, sugerindo um possível papel do sistema glutamatérgico na ação dos antidepressivos convencionais monoaminérgicos. Estudos *post-mortem* mostram que pacientes com depressão apresentam alterações nas subunidades de receptores NMDA (variáveis dependendo de quais subunidades ou regiões encefálicas) em regiões como córtex pré-frontal, hipocampo e *locus coeruleus* (FEYISSA *et al.*, 2009; SOWA-KUCMA *et al.*, 2013; HILLHOUSE e PORTER, 2015) e que o tratamento de pacientes com antidepressivos pode diminuir a expressão dessas subunidades (SKOLNICK, 1999; PITTENGER *et al.*, 2008), reforçando o envolvimento deles como um alvo para novas estratégias no tratamento da depressão.

Nesse sentido, uma série de medicamentos capaz de influenciar a neurotransmissão glutamatérgica têm sido testados em pacientes com depressão, como por exemplo, a memantina (antagonista não competitivo de receptores NMDA) (LENZE *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2013), lanicemina (bloqueador do canal do receptor NMDA) (ZARATE *et al.*, 2013; SANACORA *et al.*, 2014) e traxoprodil (antagonista seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA) (PRESKORN *et al.*, 2008). Entretanto, a presença de efeitos colaterais, como por exemplo, tontura, sedação, sonolência, perda de apetite, náuseas e vômitos, é um dos fatores que prejudica o amplo uso clínico desses fármacos (CVRCEK, 2008).

Estudos clínicos utilizando antagonistas de receptores NMDA para o tratamento da depressão têm focado principalmente na cetamina, uma vez que este composto em doses sub- anestésicas é capaz de reverter de forma rápida os sintomas depressivos de pacientes refratários ao

tratamento com antidepressivos convencionais. Desde o ano de 2000 a cetamina vem sendo estudada em doses sub-anestésicas para avaliar seu potencial antidepressivo em pacientes. Em um estudo realizado no ano em questão, pacientes deprimidos refratários a tratamentos convencionais que foram tratados com uma única dose sub-anestésica de cetamina (0,5 mg/kg, intravenosa) apresentaram uma redução significativa no escore da escala Hamilton de depressão (um maior escore indica maior severidade do transtorno depressivo) em relação aos pacientes deprimidos que receberam placebo apenas após 4 h de administração, efeito que durou por 4 dias (BERMAN *et al.*, 2000). Outro estudo clínico realizado no ano de 2006 mostrou que a cetamina, a partir de uma única infusão endovenosa (dose sub-anestésica de 0,5 mg/kg), induziu um efeito antidepressivo em menos de 2 h, revertendo os sintomas depressivos de pacientes resistentes ao tratamento convencional, e esse efeito perdurava por até duas semanas (ZARATE *et al.*, 2006). A partir destes estudos, o interesse acerca do potencial antidepressivo da cetamina aumentou consideravelmente, e novas evidências reforçaram sua capacidade em reverter os sintomas depressivos de forma aguda, como também em manter esse efeito antidepressivo por períodos prolongados (até 15 dias) (ZARATE *et al.*, 2006; AAN HET ROT *et al.*, 2010; DIAZGRANADOS *et al.*, 2010; IRWIN e IGLEWICZ, 2010; MCNULTY e HAHN, 2012; IRWIN *et al.*, 2013; LARA, BISOL e MUNARI, 2013; MURROUGH *et al.*, 2013a; MURROUGH *et al.*, 2013b; CHILUKURI *et al.*, 2014; GHASEMI *et al.*, 2014; LAPIDUS *et al.*, 2014).

Estudos pré-clínicos têm buscado compreender os mecanismos pelos quais a cetamina exerce esses efeitos, e de um modo geral, eles mostram que ela aumenta de maneira rápida (em 24 hs) a sinaptogênese (aumento da função e densidade das espinhas dendríticas) no córtex pré-frontal de roedores (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). Além disso, ela é capaz de reverter o déficit sináptico induzido por estresse crônico moderado (LI *et al.*, 2011), efeitos esses que são acompanhados pelo aumento na liberação de BDNF, da ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e do aumento de proteínas sinápticas como a proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa (PSD-95) e sinapsina 1 (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012). Essas descobertas acerca do efeito antidepressivo da cetamina reforçam o envolvimento dos receptores NMDA na fisiopatologia da depressão e sugerem que antagonistas desses receptores sejam estratégias promissoras para a pesquisa de fármacos com atividade antidepressiva rápida. As vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da cetamina estão melhor descritas a seguir.

1.1.5. *Cetamina e vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão*

A cetamina, derivada da fenciclidina, é sintetizada pela indústria química para uso farmacêutico a partir do brometo de ciclopentilo, o-clorobenzonitrilo e metilamina, e comercialmente utilizada como uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos (enantiômeros), o S(+) e o R(-) (KOHRS e DURIEUX, 1998; LUFT e MENDES, 2005). Estudos em animais demonstraram que a S(+) cetamina tem aproximadamente quatro vezes mais afinidade para o sítio de ligação da fenciclidina no receptor NMDA comparado à R(-) cetamina, o que a torna clinicamente interessante (PFENNINGER, DURIEUX e HIMMELSEHER, 2002). A cetamina foi introduzida na prática clínica há cerca de 45 anos, com o objetivo de atuar como droga monoanestésica para produzir analgesia, amnésia, inconsciência e imobilidade (KOHRS e DURIEUX, 1998) e é utilizada principalmente por médicos e veterinários em procedimentos cirúrgicos variados (GREEN e LI, 2000). A cetamina produz um tipo específico de anestesia, denominada dissociativa. Os efeitos dissociativos são dependentes da dose e os pacientes parecem estar em estado cataléptico, permanecendo com os olhos abertos e mantendo muitos reflexos, além de apresentarem pupilas dilatadas moderadamente e nistagmo, lacrimejamento e salivação (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Devido a sua ação dissociativa, ela produz efeitos psicológicos indesejáveis, principalmente no período pós-operatório sendo que os mais comuns são pesadelos, experiências extracorpóreas (sensação de flutuar fora do corpo) e ilusões. A ocorrência de alucinações varia de 5% a mais de 30% após doses usadas para indução anestésica. Por esse motivo, o uso da cetamina não tem sido restrito à prática clínica, sendo frequentemente utilizada como droga de abuso (GABLE, 2004).

A cetamina é solúvel em água e lipídeos, o que permite que seja administrada comumente por via intravenosa, mas também pelas vias subcutânea, intramuscular, transdérmica, intranasal, intrarectal e oral (MION e VILLEVIEILLE, 2013). É rapidamente captada pelo cérebro e redistribuída, com um tempo de meia vida de distribuição de 10 a 15 minutos (WIEBER *et al.*, 1975; DOMINO *et al.*, 1984). Uma vez no organismo, a cetamina é metabolizada pelo fígado em diversos metabólitos (CLEMENTS e NIMMO, 1981) como a norcetamina, que mantém a atividade anestésica da cetamina em cerca de 1/3 de sua potência (COHEN e TREVOR, 1974; DOMINO *et al.*, 1984). A cetamina inativa é conjugada e os metabólitos são excretados na urina (WIEBER

et al., 1975), sendo que seu tempo de meia vida de eliminação é de 2 a 3 h (DOMINO *et al.*, 1984).

Além de antagonizar receptores NMDA, a cetamina age em inúmeros outros alvos, exercendo uma série de efeitos biológicos. Por exemplo, seu efeito relaxante muscular pode ser atribuído a inibição de canais de cálcio voltagem dependentes (YAMAKAGE *et al.*, 1995), sendo que a inibição desses canais pode contribuir para seus efeitos de disforia, psicose, alteração da percepção e na fala (BAUM E TECSON, 1991). O bloqueio no transporte de monoaminas também pode contribuir para os efeitos psicomiméticos da cetamina (NISHIMURA *et al.*, 1998), bem como a hiperpolarização de canais de nucleotídeos cíclicos podem contribuir para seu efeito hipnótico (CHEN *et al.*, 2009; Zhou C. *et al.*, 2013). Esses canais podem estar mediando os efeitos hipnóticos de outros anestésicos voláteis também (ZHOU *et al.*, 2015). Adicionalmente, a cetamina exerce efeito antinociceptivo por meio de receptores opióides (FINCK E NGAI, 1982; SMITH *et al.*, 1987; PACHECO *et al.*, 2014) e efeito analgésico por meio da inibição da recaptação de serotonina (MARTIN *et al.*, 1982).

Na última década, uma série de estudos clínicos e pré-clínicos mostrou o potencial antidepressivo da cetamina (BERMAN *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010), e sua capacidade em reduzir os sintomas depressivos rapidamente após administração aguda. Esses estudos mostram que a administração de cetamina (via oral e intravenosa) foi capaz de resolver rapidamente tanto a ideação suicida em situações emergenciais, como também demonstrou eficácia em pacientes resistentes, que não responderam à terapia convencional (DIAZGRANADOS *et al.*, 2010; IRWIN e IGLEWICZ, 2010; MURROUGH *et al.*, 2013a). Embora a farmacodinâmica clássica da cetamina envolva o antagonismo não competitivo dos receptores NMDA, sua resposta antidepressiva rápida envolve um mecanismo mais abrangente. Estudos evidenciam que seu efeito rápido ocorre através do antagonismo de receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, que estão tonicamente ativos. Em situações fisiológicas, estes interneurônios emitem projeções para os neurônios glutamatérgicos, regulando negativamente a transmissão glutamatérgica por meio da liberação de ácido gama aminobutírico (GABA). A cetamina inibe a atividade desses interneurônios GABAérgicos, que por sua vez perdem sua capacidade de inibir os neurônios glutamatérgicos, aumentando consequentemente a excitose de vesículas neurotransmissores (como o glutamato) na fenda sináptica. Dessa forma, o efeito inicial da cetamina é um aumento da atividade glutamatérgica, com aumento dos níveis de

glutamato na fenda sináptica (MACHADO-VIEIRA, MANJI e ZARATE, 2009; LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; DUMAN *et al.*, 2012; DUMAN e VOLETI, 2012). A cetamina ainda exerce efeitos nos neurônios pós-sinápticos, também por meio do antagonismo dos receptores NMDA. Esse antagonismo impede a ação do glutamato previamente liberado na fenda sináptica sobre esses receptores, levando a ativação preferencial dos receptores AMPA. No SNC de mamíferos, os receptores AMPA atuam mediando a neurotransmissão excitatória rápida e estão intimamente relacionados com a plasticidade sináptica (LEE e KIRKWOOD, 2011). Dados pré-clínicos mostram que compostos que estimulam esses receptores demonstram efeito tipo-antidepressivo rápido em modelos animais (BAI, BERGERON e NELSON, 2003; SANACORA *et al.*, 2008), bem como a deleção da subunidade GluA1 desse receptor induz um comportamento tipo-depressivo nos animais (CHOURBAJI *et al.*, 2008). Além disso, a forma pela qual a modulação desses receptores se relaciona com o efeito tipo-antidepressivo da cetamina tem sido foco de diversos estudos (FLEMING e ENGLAND, 2010; ZARATE *et al.*, 2010; HASHIMOTO, 2011), uma vez que a ativação dos receptores AMPA pelo glutamato é importante para o efeito antidepressivo da cetamina, conferindo papel especial para esse receptor (MAENG *et al.*, 2008; KOIKE, IJIMA e CHAKI, 2011).

Com a ativação dos receptores AMPA, o neurônio pós-sináptico sofre um influxo de íons sódio, acarretando em uma onda de despolarização transitória na membrana que leva a ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCVD). O influxo de cálcio resultante desse processo acarreta na exocitose de vesículas contendo fatores neurotróficos, com destaque para o BDNF (MACHADO-VIEIRA, MANJI e ZARATE, 2009). O BDNF desempenha um papel crítico como modulador de diversas funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal (THOENEN, 1995). O aumento nos níveis de BDNF aumenta a sobrevivência neuronal, sinaptogênese e neurogênese adulta hipocampal e reverte a atrofia observada no córtex e hipocampo de pacientes com transtorno depressivo (CASTREN, 2004). Os efeitos dessa neurotrofina são mediados predominantemente pela ligação com seu receptor TrkB, sendo que, a diminuição dos níveis tanto do BDNF quanto desse receptor é observada no hipocampo ou soro de pacientes com depressão (KAREGE *et al.*, 2005a; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Além disso, modelos animais de depressão induzida por estresse são capazes de diminuir os níveis de BDNF em algumas regiões cerebrais, principalmente no hipocampo (MURAKAMI *et al.*, 2005; GRONLI *et*

al., 2006). Foi observado também que tanto em modelos animais quanto em humanos, a presença de uma mutação específica no gene que codifica o BDNF impede a ocorrência da resposta antidepressiva rápida induzida pela cetamina (LAJE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012). Essas evidências experimentais sugerem então que a liberação de BDNF, ocasionando a estimulação de seus receptores TrkB e consequente ativação das vias da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) /proteína cinase B (Akt), parece ser um componente crucial para a ocorrência de uma resposta antidepressiva rápida e eficaz (AUTRY *et al.*, 2011; DUMAN e VOLETI, 2012).

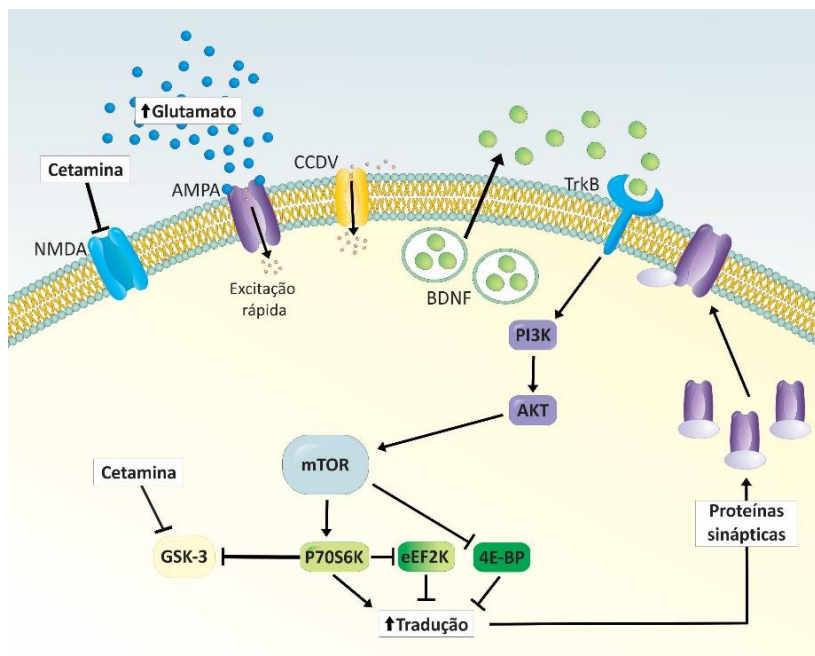
O aumento da liberação de BDNF em função dos efeitos desencadeados pela cetamina (GARCIA *et al.*, 2008) leva a ativação da via de sinalização PI3K/Akt, considerada importante para o efeito antidepressivo rápido desse composto, e associada com controle da sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, plasticidade sináptica, aprendizado e memória (KELLY e LYNCH, 2000; DWIVEDI *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008; MENDOZA, ER e BLENIS, 2011). Essas vias têm sido implicadas na fisiopatologia da depressão, uma vez que seu funcionamento se apresenta prejudicado durante a presença dos sintomas depressivos, podendo ser normalizado após o tratamento com antidepressivos (DWIVEDI *et al.*, 2001; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; QI *et al.*, 2009). Nesse contexto, dados pré-clínicos mostram que o aumento de fatores neurotróficos após administração crônica de antidepressivos também envolve a ativação dessas vias de sinalização (MERCIER *et al.*, 2004; KODAMA, RUSSELL e DUMAN, 2005). Quando ativada, a via da PI3K/Akt é responsável por regular negativamente a atividade da enzima glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) via fosforilação do resíduo de serina 9 N-terminal (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). A GSK-3 é uma serina/treonina cinase multifuncional, que existe em duas isoformas: GSK-3 α e GSK-3 β . A forma constitutivamente ativa é a GSK-3 β , que é ativada quando ocorre fosforilação no resíduo de tirosina 216 e inativada quando a fosforilação ocorre no resíduo de serina 9 (JOPE e JOHNSON, 2004; CORTES-VIEYRA *et al.*, 2012). É considerada um importante regulador da síntese de glicogênio, transcrição de genes e vias de sinalização intracelular relacionadas à neuroplasticidade (JOPE, 2003), sendo que diversos estudos correlacionam transtornos depressivos com a ativação dessa enzima. Estudos mostram que a expressão de GSK-3 β está aumentada tanto no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado quanto em pacientes com depressão (SILVA *et al.*, 2008; OH, PARK e KIM, 2010) e que inibidores desta enzima têm apresentado efeito tipo-antidepressivo (GOULD *et al.*, 2004; SHAPIRA *et al.*, 2007; SILVA

et al., 2008). Além disso, a superexpressão de GSK-3 β no hipocampo de camundongos submetidos ao estresse crônico moderado está associada a um comportamento depressivo dos animais (ZHANG *et al.*, 2013). Nesse sentido, uma série de estudos indica o uso de inibidores da GSK-3 β para o tratamento da depressão (GOULD *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008; BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009; MAES *et al.*, 2012).

Como mencionado anteriormente, a GSK-3 β pode sofrer regulação da sua atividade pela proteína Akt e por fosfatases, sendo que a fosforilação da Akt suprime a atividade da GSK-3 β por fosforilação no resíduo de Ser9, levando à ativação da mTOR. Nesse contexto, o efeito antidepressivo rápido produzido por antagonistas de receptores NMDA (cetamina e Ro 25-6981) é mediado por uma rápida ativação da via da mTOR no córtex pré-frontal (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012). Uma única dose desses antagonistas rapidamente reverte déficits comportamentais, morfológicos e bioquímicos induzidos por um protocolo de estresse crônico através da ativação da via da mTOR (LI *et al.*, 2011). Estudos pós-morte indicam que os níveis de mTOR e proteínas sinápticas sintetizadas por sua ativação encontram-se significativamente reduzidas no córtex pré-frontal de indivíduos depressivos em comparação ao grupo controle (JERNIGAN *et al.*, 2011).

O complexo mTORC 1 é constituído por diversas proteínas como a mTOR, a proteína regulatória associada a mTOR (Raptor) e o substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa (Pras 40), entre outras proteínas que, quando devidamente acopladas, permitem a regulação da síntese proteica em diversos níveis. A mTOR é a principal proteína do complexo com domínios serina-treonina cinase que podem sofrer ativação ou inibição por meio de fosforilação por outras cinases, e regula a tradução proteica, sendo que nos processos dendríticos regula a síntese de novas proteínas necessárias para a sinaptogênese. Como mencionado anteriormente, um ativador do complexo é a Akt, e essa ativação desencadeia a fosforilação da cinase ribossomal S6 de 70 kDa (p70S6K) (um membro da família de cinases ribossomais S6 de 70 kDa) que fosforila e conseqüentemente inibe a cinase de fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2K), levando ao aumento de tradução de proteínas. Adicionalmente, a mTOR ativada também pode fosforilar a proteína ligante 4E (4E-BP), inativando-a e permitindo a liberação da proteína 4E que estimula o aumento da tradução de proteínas sinápticas, com destaque para subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (GluA1) e proteínas de ancoragem desses receptores, como a PSD-95 e a proteína pré-sináptica sinapsina 1. Sendo assim, a ativação da mTOR culmina na tradução de proteínas diretamente envolvidas com a sinaptogênese (**Figura 4**) (DUMAN *et al.*, 2012).

Figura 4. Cetamina aumenta a atividade da mTOR e sinaptogênese



Legenda: A cetamina aumenta a atividade glutamatérgica nos receptores AMPA pós-sinápticos, por meio do antagonismo dos receptores NMDA nos interneurônios GABAérgicos e nos neurônios pós-sinápticos. A onda de despolarização resultante do influxo de sódio nos receptores AMPA abre os canais de cálcio voltagem dependente (CCVD) permitindo a liberação de vesículas contendo BDNF. O BDNF ativa seus receptores TrkB, levando à ativação da via PI3K/Akt que fosforila subunidades do complexo mTOR, ativando-o, o qual fosforila a cinase ribossomal S6 de 70 kDa (p70S6K) e inibe proteínas que possuem papel inibitório sobre a transcrição, tais quais a cinase do fator de elongação 2 (eEF2K) e a proteína de ligação ao fator de iniciação 4E em eucariotos (4E-BP). Esses eventos levam a um aumento da tradução de proteínas inerentes à sinaptogênese, como subunidades de receptores AMPA (GluA1), proteínas de ancoragem (PSD-95) e a proteína pré-sináptica sinapsina 1, bem como a inserção dos mesmos na fenda sináptica. Abreviaturas: NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; TrkB, receptor tropomiosina cinase B; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; Akt, proteína cinase B; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; GSK3, glicogênio sintase cinase 3; PSD-95, proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa. Fonte: adaptado de DUMAN *et al.* (2012).

Diversos estudos sugerem que os sintomas da depressão estão relacionados com uma redução na plasticidade sináptica cerebral (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN *et al.*, 2012), e essa diminuição em indivíduos deprimidos está associada a modificações morfológicas no córtex límbico, como uma diminuição da arborização dendrítica e do número de contatos sinápticos, evidenciado por uma menor expressão de proteínas sinápticas (MAGARINOS e MCEWEN, 1995; MAGARINOS, VERDUGO e MCEWEN, 1997). Estudos pré-clínicos mostram que o tratamento com cetamina aumenta rapidamente os níveis de proteínas sinápticas (GluA1, PSD-95) e o número e função das sinapses glutamatérgicas excitatórias no córtex pré-frontal, além de reverter os déficits sinápticos caracterizados pela diminuição dos níveis de proteínas sinápticas induzidas pelo estresse (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011). A importância dessas vias para a resposta antidepressiva está diretamente relacionada com a ativação de alvos que estimulam a síntese de proteínas sinápticas, um fenômeno que desempenha um papel importante na reversão da atrofia neuronal e redução da densidade sináptica observados no córtex pré-frontal e hipocampo de pacientes depressivos (PITTENGER e DUMAN, 2008; KRISHNAN e NESTLER, 2010).

1.1.6. *Estresse e depressão*

Dentre os diversos fatores ambientais que predisõem um indivíduo a depressão, episódios de estresse parecem ser um dos principais envolvidos (MCGONAGLE e KESSLER, 1990; KESSLER, 1997; HAMMEN *et al.*, 2009), uma vez que aproximadamente 60% dos episódios depressivos são precedidos por um evento estressante (POST, 1992; HAMMEN, 2005; SIEGRIST *et al.*, 2012). O estresse crônico é um fator ambiental que pode levar ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides (corticosterona em roedores e cortisol em humanos), desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e consequentemente morte de neurônios hipocampais (NESTLER *et al.*, 2002), além de redução da neurogênese (NESTLER *et al.*, 2002; PITTENGER e DUMAN, 2008). Nesse contexto, situações de estresse estão associadas com diminuição do volume de regiões cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) (RAJKOWSKA *et al.*, 1999; BREMNER *et al.*, 2000; IZQUIERDO, WELLMAN e HOLMES, 2006; BANASR *et al.*, 2007; GOOSENS e SAPOLSKY, 2007; SHANSKY *et al.*, 2009; MCEWEN e GIANAROS, 2011) principalmente do hipocampo que,

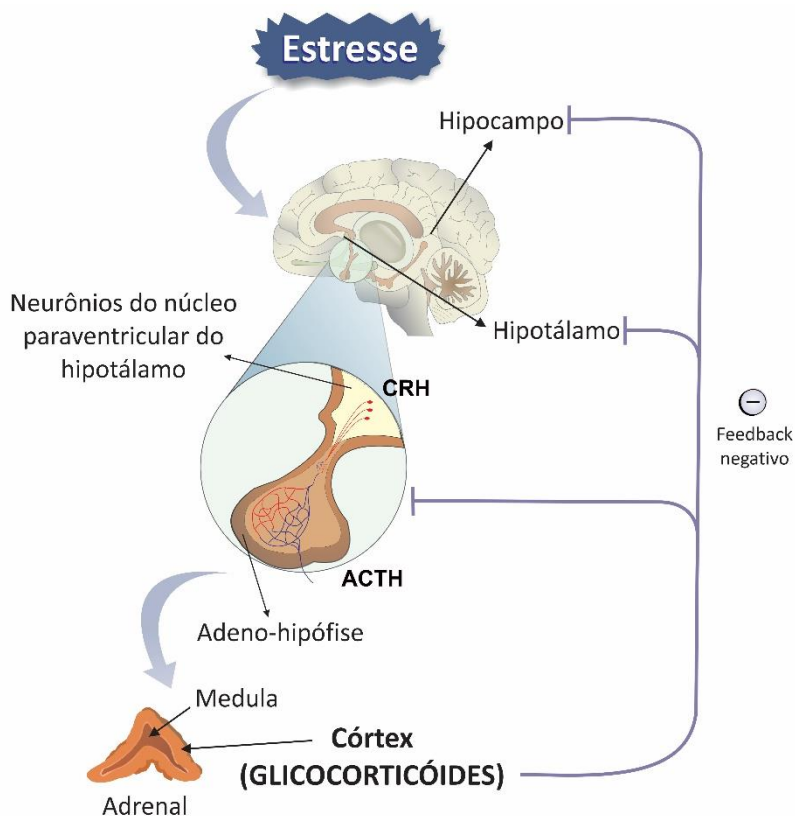
além de estar associado com a depressão e neurogênese, é particularmente vulnerável ao estresse uma vez que possui uma elevada concentração de receptores para os glicocorticoides (MACQUEEN e FRODL, 2011; DUMAN, 2014a).

A liberação de glicocorticoides pelas adrenais é controlada pelo eixo HPA, que corresponde a um sistema regulatório primário de resposta ao estresse, sendo que sua estimulação excessiva está relacionada à depressão (BERTON e NESTLER, 2006). Quando há um estímulo estressor, ocorre a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina pelas células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (PVN). O CRH, na hipófise anterior, estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que cai na corrente sanguínea e atua no córtex da glândula adrenal, promovendo a síntese e liberação de glicocorticoides (NEMEROFF, 1996; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005; XIONG e ZHANG, 2013). Os glicocorticoides, os quais são hormônios esteróides, interagem com seus receptores em diversos tecidos-alvos, mediante a ativação de mecanismos de resposta rápida (não-genômicos) ou de resposta lenta (através de alterações na transcrição gênica) (TASKER, DI e MALCHER-LOPES, 2006; LUPIEN *et al.*, 2009; GROENEWEG *et al.*, 2011). A atividade dos glicocorticoides pode ser mediada por dois tipos de receptores, os mineralocorticóides e os receptores de glicocorticoides, sendo que, quando os níveis de glicocorticoides estão mais altos no encéfalo (em situações de estresse), há o predomínio de receptores glicocorticoides e sua consequente ativação (REUL e DE KLOET, 1985; JOELS e DE KLOET, 1994). Essa ativação excessiva está relacionada com a atrofia e morte neuronal induzidas, por exemplo, pela inibição da neurogênese hipocampal (SAALTINK e VREUGDENHIL, 2014). Sabe-se também que níveis elevados de estresse e glicocorticoides (presentes em pacientes depressivos) estão relacionados a um aumento nos níveis de glutamato extracelular (LOWY, WITTENBERG e YAMAMOTO, 1995). De fato, a atrofia e morte neuronal decorrentes da ativação excessiva de receptores de glicocorticoides estão relacionadas com a excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que os glicocorticoides estão associados a uma rápida liberação de glutamato em diversas regiões límbicas e corticais, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala (LOWY, WITTENBERG e YAMAMOTO, 1995; VENERO e BORRELL, 1999; POPOLI *et al.*, 2011). Adicionalmente, o estresse está associado com a redução na expressão de transportadores de glutamato no hipocampo, aumentando a probabilidade de que esse neurotransmissor cause prejuízo neuronal (YANG, HUANG e HSU, 2005; ZINK *et al.*, 2010).

Corroborando esses achados, agonistas de receptores NMDA são capazes de aumentar a secreção de ACTH, efeito que pode ser prevenido pelo tratamento com antagonistas desses receptores (FARAH *et al.*, 1991; JEZOVA, OLIVER e JURCOVICOVA, 1991).

Quando o eixo HPA está funcionando de forma adequada, a resposta neuroendócrina ao estresse é contra regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticoides sobre os componentes do SNC, diminuindo a liberação encefálica de CRH e ACTH, causando diminuição dos glicocorticoides (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005; KYROU e TSIGOS, 2009). Além disso, o hipocampo também auxilia no controle da ativação do eixo HPA, através da inibição dos neurônios hipotalâmicos secretores de CRH (NESTLER *et al.*, 2002; HERMAN *et al.*, 2005; FRODL e O'KEANE, 2013) (**Figura 5**).

Figura 5. Regulação do eixo HPA pelo estresse



Legenda: Com o estímulo estressor, ocorre a secreção do CRH pelas células do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O CRH, na hipófise anterior, estimula a liberação de ACTH, que atua no córtex da glândula supra-renal, promovendo a síntese e liberação de glicocorticóides. Os efeitos celulares dos glicocorticóides são mediados via receptores de glicocorticóides e de mineralocorticóides. O controle regulatório sobre o eixo HPA é mediado por feedback negativo a nível da hipófise, bem como de outras regiões do cérebro, incluindo o hipocampo. Abreviaturas: CRH, hormônio liberador de corticotrofina, ACTH, hormônio adrenocorticotrófico. Fonte: adaptado de GILLESPIE e NEMEROFF (2005).

A hiperatividade do eixo HPA acarreta em níveis basais elevados de CRH no SNC (SAPOLSKY, ROMERO e MUNCK, 2000;

GILLESPIE e NEMEROFF, 2005), além de níveis elevados de cortisol no sangue, urina e líquido cefalorraquidiano (GOLD *et al.*, 1996; NEMEROFF, 1996; DEUSCHLE *et al.*, 1997; OTTE *et al.*, 2004; BHAGWAGAR, HAFIZI e COWEN, 2005; PARIANTE e LIGHTMAN, 2008; DETTENBORN *et al.*, 2012) que acometem grande parte dos pacientes com depressão. Adicionalmente, esses pacientes geralmente apresentam aumento da hipófise, das glândulas adrenais e ausência de resposta ao teste de supressão com o corticóide sintético dexametasona (GOLD *et al.*, 1996; HOLSBOER e BARDEN, 1996) o que indica ausência do mecanismo de controle do eixo HPA. Além disso, quando o tratamento com antidepressivos é bem-sucedido, ocorre uma diminuição nos níveis séricos de cortisol (PIWOWARSKA *et al.*, 2012). No entanto, é importante ressaltar que nem todos os pacientes com depressão possuem aumento nos níveis de cortisol (YOUNG, CARLSON e BROWN, 2001; VYTHILINGAM *et al.*, 2004). Um exemplo disso, é a depressão atípica, na qual não ocorre uma hiperativação do eixo HPA como evidenciado frequentemente em pacientes com depressão melancólica, mas sim uma alteração diferente no eixo, levando a redução dos níveis séricos de cortisol (LAMERS *et al.*, 2013). De fato, esses subgrupos de depressão apresentam outras características clínicas diferentes. Na depressão atípica o paciente apresenta hipersonia, hiperfagia e reatividade de humor, enquanto na melancólica apresenta redução de apetite, insônia e menor responsividade

Quanto à relação entre estresse e depressão em estudos pré-clínicos, alguns modelos animais de depressão sustentam essa associação, demonstrando que situações de estresse, ou que alteram diretamente o eixo HPA, podem causar um comportamento tipo-depressivo nos animais. Dentre esses modelos, destaca-se a administração crônica de corticosterona (ZHAO *et al.*, 2008; LUSSIER *et al.*, 2013), o modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível (ECI) (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; MORETTI *et al.*, 2012; FILHO *et al.*, 2015) e o modelo de estresse de contenção (POLESZAK *et al.*, 2006; BUDNI *et al.*, 2013). O excesso de glicocorticoides induzido em alguns modelos animais, tanto pela exposição a eventos estressores quanto pela administração exógena de corticosteroides, é capaz de ocasionar alterações estruturais no hipocampo e sintomas semelhantes aos observados na depressão humana (ANDRADE e RAO, 2010). O estresse também é capaz de prejudicar a neurotransmissão monoaminérgica, causando redução no número e na função de receptores serotoninérgicos no hipocampo (FLUGGE, 1995; VAN RIEL *et al.*, 2003; KIERAN, OU e IYO, 2010).

A redução da densidade e tamanho das espinhas dendríticas pode contribuir para a atrofia dessas estruturas além dos déficits cognitivos observados em pacientes depressivos e em animais submetidos a modelos de estresse. Essas alterações podem ser decorrentes principalmente da redução da expressão de proteínas sinápticas tanto em humanos quanto em roedores (SHELLINE, GADO e KRAEMER, 2003; LI *et al.*, 2011), sendo prevenidas pelo tratamento com antidepressivos (GOULD e TANAPAT, 1999; DUMAN, 2004; DRANOVSKY e HEN, 2006). Estudos sugerem que a exposição ao estresse crônico causa alterações neuronais que levam a uma maior susceptibilidade à transtornos de humor pela diminuição do número e função das espinhas sinápticas (PITTENGER e DUMAN, 2008; SHANSKY *et al.*, 2009). Nesse contexto, em estudos pré-clínicos, ratos expostos a protocolos de estresse ou administração de glicocorticoides apresentam redução do tamanho e quantidade de espinhas dendríticas bem como proteínas sinápticas no córtex pré-frontal e hipocampo (WOOLLEY, GOULD e MCEWEN, 1990; RADLEY *et al.*, 2006). Por outro lado, o tratamento com antidepressivos podem reverter essas alterações moleculares (aumento da liberação de glicocorticoides, aumento da excitotoxicidade glutamatérgica, diminuição de fatores neurotróficos e da função sináptica e alteração em vias de sinalização intracelular), celulares (diminuição da neurogênese e gliogênese, aumento da atrofia e remodelamento neuronal, diminuição da plasticidade sináptica e sinaptogênese e aumento da desestabilização do citoesqueleto) e morfológicas (por exemplo proliferação de neurônios hipocampais), melhorando os sintomas depressivos (DURIC e DUMAN, 2013).

1.2. MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

Considerando que os sintomas característicos da depressão (como humor deprimido e sentimento de culpa) são de difícil mensuração em animais de laboratório, além da ausência de marcadores em nível molecular que possuam boa reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade para este transtorno psiquiátrico, modelos animais de depressão são ferramentas necessárias para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da depressão, além de permitirem a identificação de novos compostos com possível ação antidepressiva (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002; MCARTHUR e BORSINI, 2006). Portanto, busca-se avaliar aspectos isolados do transtorno como anedonia (um dos principais sintomas, que pode ser

inferido a partir de alterações comportamentais em roedores), desespero comportamental, alterações bioquímicas e/ou morfológicas em determinadas regiões encefálicas dos animais (HASLER *et al.*, 2004). Atualmente, os modelos animais de depressão são avaliados com base em 3 critérios: 1) validade preditiva ou farmacológica (ocorre a reversão dos sintomas depressivos após o tratamento com antidepressivos convencionais) (NESTLER e HYMAN, 2010); 2) validade de face (indica que o modelo reproduz características do tratamento e aspectos dos sintomas do paciente); 3) validade de constructo (envolve similaridades na fisiopatologia da doença como: bioquímicas, anatômicas e comportamentais) (BELZUNG e LEMOINE, 2011). Modelos com validade preditiva, como o TNF e o TSC são amplamente utilizados para o estudo da depressão (NESTLER *et al.*, 2002; MCARTHUR e BORSINI, 2006). O TNF foi descrito primeiramente em 1977 (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente em camundongos, enquanto o TSC foi descrito em camundongos em 1985 (STERU *et al.*, 1985). Estes modelos baseiam-se na observação do animal em estado de desespero comportamental, que se movimenta para fugir de uma situação inescapável, desenvolvendo após os primeiros minutos uma postura de imobilidade que pode ser revertida pela administração de antidepressivos. Ambos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (BOURIN *et al.*, 2005) e apesar de possuírem apenas validade preditiva, ambos os testes são amplamente utilizados devido ao fácil uso e boa reprodutibilidade observada (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002). É importante ressaltar que embora possuam similaridades quanto a validade, o TSC possui alguns benefícios em relação ao TNF, entre eles: evita qualquer possibilidade de indução de hipotermia, não depende de coordenação motora para nadar, o tempo inicial para o animal desenvolver uma postura de imobilidade é mais curto, acredita-se ser uma situação menos aversiva do que o TNF e ainda, que o TSC apresente uma maior sensibilidade farmacológica quando comparado ao TNF (THIERRY *et al.*, 1986; CRYAN, MOMBEBEAU e VASSOUT, 2005).

Além de validade preditiva, são utilizados modelos animais de depressão com validade de face e de constructo. Entre esses, destacam-se os modelos baseados na indução de estresse e os modelos farmacológicos para indução de depressão (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Os modelos de indução ao estresse baseiam-se em estudos que relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental de risco para o desenvolvimento da depressão e nas alterações neuroquímicas e morfológicas provocadas pelo estresse que contribuem

para o risco da depressão (NESTLER *et al.*, 2002). Nesses modelos, a exposição dos animais a agentes estressores induz a uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e comportamentais que mimetizam o estado depressivo. Os animais são expostos a situações de estresse e, como resultado apresentam comportamento tipo-depressivo (MCARTHUR e BORSINI, 2006), tais como: aumento do tempo de imobilidade em modelos preditivos de atividade antidepressiva como o TNF e TSC (GUTIERREZ-GARCIA e CONTRERAS, 2009), aumento da secreção de corticosterona (LIU *et al.*, 2014), aumento da transmissão glutamatérgica no giro denteado, apoptose e diminuição da neurogênese hipocampal (JOELS *et al.*, 2004), entre outras alterações. Dentre esses modelos de indução de estresse, destacam-se o estresse crônico moderado (WILLNER, 1997) e o ECI (HENN e VOLLMAYR, 2005). O modelo do ECI foi proposto como uma estratégia capaz de impedir que os animais se adaptem aos estímulos estressores, desencadeando alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroendócrinas que só podem ser revertidas mediante tratamento repetido com antidepressivos convencionais (KATZ, ROTH e SCHMALTZ, 1981; WILLNER *et al.*, 1987; WILLNER, 1997). Com relação aos modelos farmacológicos, eles induzem um comportamento tipo-depressivo através de alterações neuroquímicas semelhantes àsquelas encontradas na depressão (MCARTHUR e BORSINI, 2006), sendo que um dos mais estudados envolve a administração do glicocorticoide corticosterona (GOURLEY *et al.*, 2008b; AGO *et al.*, 2013). Essa exposição crônica ao glicocorticoide leva a um aumento no tempo de imobilidade dos animais em testes preditivos de atividade antidepressiva como TNF e TSC, além de causar alterações neuroquímicas e morfológicas, levando a um prejuízo dos mecanismos de neuroplasticidade, que pode estar correlacionado ao comportamento tipo-depressivo, equivalente aos sintomas clínicos encontrados na depressão (GOURLEY e TAYLOR, 2009; ROSA *et al.*, 2014; PAZINI *et al.*, 2016b).

1.3. AGMATINA

1.3.1. Poliaminas

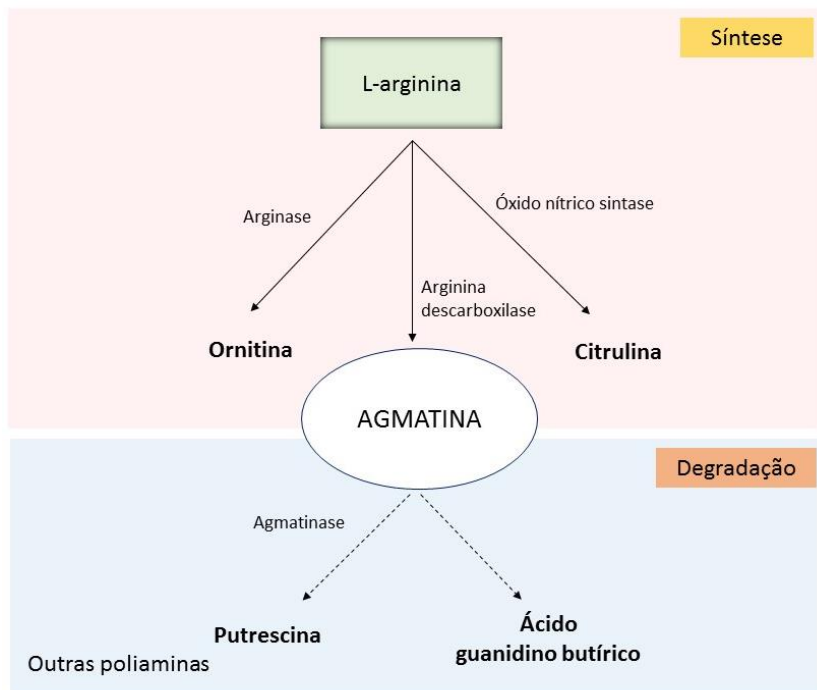
Poliaminas são compostos orgânicos com dois ou mais grupamentos amino, que estão envolvidos em diversas funções fisiológicas como crescimento e proliferação celular, síntese de proteínas e ácidos nucléicos, diferenciação de células imunes, regulação de reação

inflamatória e manutenção da função intestinal (MOINARD, CYNOBER e DE BANDT, 2005). Também estão envolvidas no reparo de matriz extracelular, adesão celular e alguns processos de sinalização. Devido ao seu caráter policatiônico, eles interagem com fosfolipídeos de membrana e exercem um papel importante na regulação de enzimas associadas às membranas plasmáticas. O termo “poliamina” é usado para designar os seguintes compostos: putrescina, espermidina, espermina e mais recentemente, agmatina, que possui papel neuronal, vascular, metabólico, além de diversas funções terapêuticas (MOINARD, CYNOBER e DE BANDT, 2005).

1.3.2. *Agmatina: absorção e metabolismo*

A agmatina, chamada quimicamente de 4-aminobutil guanidina, é uma amina endógena, conhecida como um produto intermediário no metabolismo de poliaminas, encontrada em plantas, bactérias e invertebrados, descoberta em 1910 e em 1994, em mamíferos (KOSSEL, 1910). Sabe-se que é sintetizada pela descarboxilação de L-arginina em uma reação catalisada pela enzima arginina descarboxilase no encéfalo e em outros tecidos como estômago, intestino e adrenais (RAASCH *et al.*, 1995) (**Figura 6**). A agmatina pode ser metabolizada em produtos como espermina durante a biossíntese de poliaminas, por ação da enzima agmatinase ou metabolizada a ácido guanido butanóico, por ação da enzima diamina oxidase (REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH *et al.*, 2001; MOINARD, CYNOBER e DE BANDT, 2005).

Figura 6. Síntese e degradação da agmatina



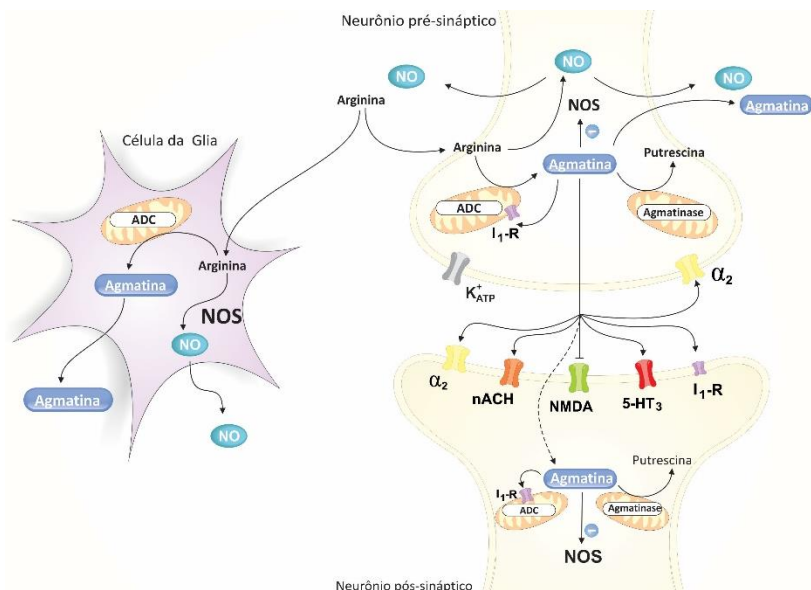
Legenda: A agmatina é sintetizada a partir da descarboxilação de L-arginina pela enzima arginina descarboxilase. É metabolizada a putrescina por ação da enzima agmatinase ou metabolizada a ácido guanidino butírico pela enzima diamina oxidase. Fonte: adaptado de REIS e REGUNATHAN (2000).

A administração exógena de agmatina é uma das estratégias mais utilizadas para se alcançar seus efeitos terapêuticos. Dentre as várias vias de administração que podem ser empregadas, a mais conveniente é a via oral. Estudos mostram que quando administrada por essa via, a agmatina é absorvida pelo trato gastro-intestinal e rapidamente distribuída pelo organismo (HAENISCH *et al.*, 2008), sendo que pode atingir o encéfalo por atravessar a barreira hemato-encefálica (PILETZ *et al.*, 2003). Sua eliminação ocorre através da urina, possuindo um tempo de meia-vida de aproximadamente 2 h (HUISMAN *et al.*, 2010). Sabe-se que a microbiota é uma das maiores fontes de agmatina no organismo, e que apenas a dieta contendo agmatina (presente em bebidas alcoólicas como vinho, cerveja

e principalmente saquê, peixes, alguns vegetais, carnes, entre outros) não permite que ela module seus alvos moleculares (GALGANO *et al.*, 2012). Portanto, o sulfato de agmatina (500 mg – 1g) tem sido utilizado como suplemento nutricional por fisiculturistas no intuito de auxiliar o ganho de massa muscular e a perda de gordura. Além disso, uma das vantagens do uso da agmatina por via oral é sua baixa toxicidade e efeitos adversos observada em estudos pré-clínicos e clínicos (GILAD *et al.*, 1996; SATRIANO *et al.*, 1998; KEYNAN *et al.*, 2010).

A agmatina está distribuída nos tecidos, sendo abundante no estômago, intestino e aorta e em menores níveis no fígado, adrenal, músculo esquelético e encéfalo (RAASCH *et al.*, 1995). No encéfalo (representa aproximadamente 10% da concentração presente no estômago, órgão que apresenta altas concentrações desta amina) a agmatina está presente em neurônios situados em regiões relacionadas ao processamento das emoções, percepção da dor e cognição, incluindo a amígdala, septo, hipotálamo, locus ceruleus, núcleo dorsal da rafe e substância cinza periaquedutal (LI *et al.*, 1994). Mais especificamente, em nível de SNC ela está presente no córtex cerebral (principalmente lâmina VI e V), hipocampo, complexo amigdalóide, hipotálamo e tronco cerebral (regiões do encéfalo responsáveis pelo controle endócrino e visceral, processamento das emoções, dor, percepção e cognição). Em nível sub-celular, está presente no corpo celular, dendritos, axônios e terminais axônicos neuronais (REIS e REGUNATHAN, 2000). A agmatina foi proposta como um neuromodulador (REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH *et al.*, 2001), é sintetizada no encéfalo, estocada em vesículas sinápticas, acumulada por captação, liberada de maneira dependente de cálcio por despolarização, metabolizada e degradada a putrescina pela enzima agmatinase e captada por sinaptossomos (REIS e REGUNATHAN, 2000; HALARIS e PLIETZ, 2007). Essa amina endógena se liga com afinidade moderada a receptores nicotínicos de acetilcolina, α_2 -adrenérgicos e receptores imidazólicos tipo 1 (I₁) e 2 (I₂). Além disso, a agmatina é capaz de inibir receptores NMDA e todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no encéfalo (REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH *et al.*, 2001; MOINARD, CYNOBER e DE BANDT, 2005), liga-se com baixa afinidade a receptores α_1 e β -adrenérgicos, 5-HT₃-serotonérgicos, D₂-dopaminérgicos e κ -opioides (RAASCH *et al.*, 2001) (**Figura 7**).

Figura 7. Esquema de uma sinapse contendo agmatina



Legenda: A arginina (Arg) entra no terminal neuronal ou na glia via um transportador ou um canal, servindo como substrato da arginina descarboxilase (ADC) mitocondrial para sintetizar agmatina, ou substrato da NOS citoplasmática para formar o NO solúvel. A agmatina sintetizada em neurônio ou glia e liberada para o espaço sináptico ou estocada em vesículas é degradada pela enzima agmatinase a putrescina. A agmatina pode inibir a NOS, interagir com sítios de receptores imidazólicos da subclasse I₂ (I₂-R) localizados na mitocôndria, inibir canais de K_{ATP} ou quando liberada do neurônio, interagir com vários canais iônicos ativados por ligantes (incluindo receptores nicotínicos ou 5-HT₃), ou ligar-se a receptores imidazólicos da subclasse I₁ (I₁-R) ou α_2 -adrenoceptores. A agmatina pode também entrar em neurônios pós-sinápticos via receptores nicotínicos, ligar-se em receptores I₂, pode antagonizar receptores NMDA e inibir a NOS, ou ser metabolizada produzindo putrescina. Abreviaturas: NOS, óxido nítrico sintase; ADC, arginina descarboxilase; NO, óxido nítrico; NMDA, N-metil-D-aspartato. Fonte: adaptado de REIS e REGUNATHAN (2000).

1.3.3. Efeitos biológicos da agmatina

A agmatina possui diversas ações biológicas. Estimula a liberação de catecolaminas pelas células da adrenal de maneira dose

dependente (LI *et al.*, 1994), de insulina pelas células das ilhotas pancreáticas (SENER *et al.*, 1989), bem como a do hormônio luteinizante (LH) do hipotálamo (KALRA *et al.*, 1995). Possui também efeito neuroprotetor, aumentando a proliferação de células progenitoras hipocampais *in vitro* e revertendo a diminuição de células do giro denteado induzidas pelo estresse *in vivo*, efeito que parece ser mediado pelo antagonismo de receptores NMDA (LI *et al.*, 2006). Essa amina é capaz de induzir a neurogênese em ratos submetidos a injúria cerebral traumática, facilitando a incorporação de novos neurônios no hipocampo e zonas subventriculares (ZSV) (KUO *et al.*, 2011). A literatura evidencia também os efeitos neuroprotetores da agmatina contra dano celular causado por glicocorticoides e glutamato em culturas neuronais uma vez que sua administração atenua os níveis de corticosterona e influxo de glutamato associados com a modulação de resposta ao estresse no hipocampo e córtex pré-frontal (ZHU *et al.*, 2008).

Essa amina endógena possui também a habilidade de proteger contra a inflamação, por meio da inibição de vias pró-inflamatórias e/ou ativação de circuitos anti-inflamatórios no cérebro (TAKSANDE *et al.*, 2015). Atua inibindo a produção de ON (agente pró inflamatório) pela diminuição da atividade de NOS-2 nos macrófagos e células gliais, fornecendo evidências das suas propriedades anti-inflamatórias no cérebro e tecidos periféricos (GALEA *et al.*, 1996; SCHWARTZ *et al.*, 1997; ABE, ABE e SAITO, 2000; SATRIANO *et al.*, 2001; REGUNATHAN e PILETZ, 2003). Ainda em relação às suas propriedades anti-inflamatórias, a agmatina protege contra injúria pulmonar aguda induzida por zymosan (polissacarídeo que induz intensa resposta inflamatória), um efeito que é acompanhado pela redução dos níveis de TNF- α , IL-1 β , e IL-6 no pulmão e lavado broncoalveolar, além da inibição do fator nuclear kappa B (NF κ B) no pulmão (LI *et al.*, 2014). Corroborando esses achados, a agmatina é capaz de reduzir a fosforilação de NF κ B em culturas de células neuronais da retina (HONG *et al.*, 2007), além de atenuar o dano microglial induzido por lipopolissacarídeo (LPS) (ABE, ABE e SAITO, 2000), reduzir a expressão de iNOS, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-1 β (ABE, ABE e SAITO, 2000; AHN *et al.*, 2012) e modular a ativação de macrófagos sob condições inflamatórias (SASTRE *et al.*, 1998). Pode promover também a diferenciação de progenitores neurais tratados com LPS em células tronco neurais pela modulação da expressão de IL-1 β , sugerindo que essa amina endógena pode ser uma nova estratégia terapêutica para doenças neuroinflamatórias (SONG *et al.*, 2013). Mais recentemente, um estudo mostrou que a administração de agmatina reverte o efeito da indução da

ativação do inflamossoma Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos (SAHIN *et al.*, 2016).

Além de suas propriedades anti-inflamatórias, seus efeitos neuroprotetores possivelmente estão associados com a redução da apoptose. Por exemplo, a co-incubação de agmatina com dexametasona reduz células TUNEL positivas e previne a ativação de caspase-3 (ZHU, WANG e BISSETTE, 2006). Além disso, a administração de agmatina previne o déficit de memória induzido por estreptozotocina, que está associado a apoptose no hipocampo (aumento de proteínas caspase 3, e relação Bax/Bcl2) (MOOSAVI *et al.*, 2014). Os efeitos protetores da agmatina contra apoptose celular podem estar relacionados com sua habilidade em agir como um *scavenger* de radicais livres (CONDELLO *et al.*, 2011). Evidências sugerem que essa amina protege contra o estresse oxidativo, por exemplo, atenuando esse processo em células tronco corticais de camundongos (BOKARA *et al.*, 2011), reduzindo o peróxido de hidrogênio em células mesangiais sob altas condições de glicose e suprimindo a ativação de NFκB (LEE *et al.*, 2003). Essa substância endógena também pode prevenir a apoptose induzida pelo TNF-α em células ganglionares da retina *in vitro* (HONG *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2009), apoptose induzida pelo LPS e ativação de caspase 3 (ZARIFKAR *et al.*, 2010) além de promover resistência a apoptose por atuar como *scavenger* de EROs, prevenindo o estresse oxidativo e colapso de membrana e bloqueando a via apoptótica intrínseca (ARNDT *et al.*, 2009; BATTAGLIA *et al.*, 2010).

A habilidade da agmatina em reduzir estresse oxidativo, inflamação e apoptose pode contribuir para os efeitos benéficos desse composto em injúrias e doenças inflamatórias, incluindo lesão induzida por isquemia e lesão na medula espinhal (GILAD *et al.*, 1996; FAIRBANKS *et al.*, 2000; GILAD e GILAD, 2000; YU *et al.*, 2000; GREENBERG *et al.*, 2001; FENG, PILETZ e LEBLANC, 2002; KIM *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; KOTIL *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2007) e danos induzidos por glicocorticóides ou NMDA (WANG *et al.*, 2006; ZHU, WANG e BISSETTE, 2006; FREITAS *et al.*, 2015b).

1.3.4. Efeitos da agmatina em neuropatologias

A agmatina exerce um efeito protetor contra diversas patologias em nível de SNC, e essa capacidade depende da modulação de uma série de alvos e sistemas de neurotransmissores. De um modo geral, uma série

de estudos pré-clínicos evidencia que essa amina endógena protege contra hipóxia/isquemia, dor neuropática, epilepsia, doenças neurodegenerativas e doenças psiquiátricas que serão descritas com mais detalhes na sequência.

Evidências da literatura mostram que a agmatina possui efeito neuroprotetor contra isquemia em roedores, reduzindo o tamanho das áreas infartadas ou a perda de neurônios decorrentes de excitotoxicidade (GILAD *et al.*, 1996; OLMOS *et al.*, 1999; FAIRBANKS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004; AHN *et al.*, 2012). Protege também culturas de células hipocâmpais frente à excitotoxicidade glutamatérgica (OLMOS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006) e morte induzida por privação de glicose e oxigênio (KIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009; AHN *et al.*, 2011), além de ser capaz de melhorar a isquemia cerebral em ratos através da redução de apoptose, astrogliose, neurotoxicidade e formação de edema cerebral (MUN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010). Estudos indicam também que a agmatina possui propriedade antinociceptiva dose-dependente em modelos animais de dor induzida por ácido acético, glutamato, capsaicina ou formalina (ONAL *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005), além de potencializar o efeito analgésico da morfina e oxicodona (KOLESNIKOV, JAIN e PASTERNAK, 1996; YESILYURT e UZBAY, 2001). Também exerce efeito antinociceptivo em modelos crônicos de dor inflamatória e dor neuropática (FAIRBANKS *et al.*, 2000; QIN XH, 2005; WANG XL, 2005). De fato, a agmatina reverte a alodinia e hiperalgesia em diferentes modelos experimentais de dor neuropática (KARADAG *et al.*, 2003; ONAL *et al.*, 2003; PASZCUK *et al.*, 2007), além de aliviar a dor e melhorar a qualidade de vida de pacientes que sofrem dessa condição sem produzir efeitos adversos significativos (KEYNAN *et al.*, 2010).

Evidências mostram o efeito anticonvulsivante da agmatina em um modelo de convulsão induzida por eletrochoque (BENCE *et al.*, 2003; SU *et al.*, 2004), que parece ser mediado pelo antagonismo de receptores NMDA (SU *et al.*, 2004). Adicionalmente, a agmatina em altas doses foi capaz de causar proteção nesse mesmo modelo, reduzindo a hiperplasia astrocitária e dano neuronal no hipocampo de ratos, um efeito que ocorreu paralelamente a redução da expressão da subunidade NR1 dos receptores NMDA (XU *et al.*, 2014). Reforçando o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito anticonvulsivante da agmatina, outros estudos mostram que essa amina, quando administrada pela via intraperitoneal protege frente à convulsão induzida por pentileno-tetrazol (DEMEHRI *et al.*, 2003; FENG, LEBLANC e REGUNATHAN, 2005), um efeito provavelmente mediado por diminuição da liberação de glutamato

(FENG, LEBLANC e REGUNATHAN, 2005). Também é capaz de potencializar o efeito anticonvulsivante da morfina ou do lítio através da modulação de $\alpha 2$ -adrenoceptores (RIAZI *et al.*, 2005; BAHREMAND *et al.*, 2010), bem como aumentar o efeito do fenobarbital e valproato em camundongos em um modelo de eletrochoque (LUSZCZKI *et al.*, 2008).

Além desse efeito anticonvulsivante, como previamente mencionado, a agmatina possui propriedades neuroprotetoras, protegendo contra o estresse oxidativo e morte excessiva de neurônios que ocorrem nas doenças de Parkinson e Alzheimer (MCGEER, YASOJIMA e MCGEER, 2001; CHEN e ZHONG, 2014; BEN HAIM *et al.*, 2015), por exemplo. Foi demonstrado em camundongos que o tratamento com agmatina atenua a neurotoxicidade dopaminérgica induzida por 1-metil-4-fenil-1,3,6-tetraidropiridina (MPTP), 8 h após a administração dessa toxina (GILAD *et al.*, 2005). Corroborando com esses achados, a agmatina é capaz de prevenir danos motores e de memória e a perda de neurônios dopaminérgicos em um modelo experimental de doença de Parkinson em camundongos envelhecidos, além da redução da captação de glutamato causada pelo modelo (MATHEUS *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo mostrou que a agmatina protegeu uma linhagem de células SH-SY5Y (linhagem de células de neuroblastoma) contra a rotenona, que induz um modelo de injúria celular (modelo *in vitro* da doença de Parkinson), um efeito que parece ser associado com a redução da translocação de NF κ B, diminuição dos níveis de ERO e da cascata apoptótica (CONDELLO *et al.*, 2011; CONDELLO *et al.*, 2012). Adicionalmente, a agmatina também induz efeitos benéficos na memória. Ela é capaz de melhorar a memória em modelo de esQUIVA inibitória em ratos (ARTENI *et al.*, 2002), além de prevenir a deterioração da memória e neuroinflamação induzidas por LPS (ZARIFKAR *et al.*, 2010) e o prejuízo da memória induzido por estreptozotocina associado ao aumento do estresse oxidativo (BHUTADA *et al.*, 2012). A agmatina inibe os efeitos deletérios que a morfina induz à memória no modelo da esQUIVA inibitória (LU *et al.*, 2010) e previne o prejuízo comportamental induzido pela escopolamina observado no teste do labirinto aquático e inativação hipocampal da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e Akt, o que reforça seu papel importante contra a amnésia (MOOSAVI *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram níveis elevados de agmatina em sinapses no hipocampo de ratos associadas à memória espacial (LEITCH *et al.*, 2011; SEO, LIU e LEITCH, 2011). Esse composto endógeno pode reduzir o acúmulo do peptídeo A β , melhorando o déficit cognitivo e protegendo contra o dano pela redução da apoptose neuronal através da diminuição da expressão de caspase-3 e Bax, bem como aumento da

expressão de Bcl2, PI3K, fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e glutamyl cisteina sintetase (SONG *et al.*, 2014). Protege também contra a toxicidade neuronal e déficits de memória induzida por A β 25-35 em diversos testes comportamentais como labirinto em cruz elevado, campo aberto, memória aversiva no teste do labirinto aquático e reconhecimento de objeto (BERGIN e LIU, 2010).

Além de proteger contra as doenças neurodegenerativas previamente mencionadas, a agmatina possui potencial efeito neuroprotetor para ansiedade, esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão. Em relação à ansiedade, sua administração mostrou propriedades ansiolíticas em diversos modelos animais de ansiedade como teste de transição claro-escuro, teste do conflito de beber de Vogel, teste de interação social e labirinto em cruz elevado (ARICIOGLU e ALTUNBAS, 2003; LAVINSKY, ARTENI e NETTO, 2003; GONG *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008). Esse efeito parece ser mediado pela inibição da NOS, bloqueio de receptores NMDA ou ativação de α -2-adrenoceptores (LAVINSKY, ARTENI e NETTO, 2003). Além disso, a ativação de receptores de neuropeptídios tipo 1 (NPY Y1) pode mediar os efeitos ansiolíticos da agmatina (TAKSANDE *et al.*, 2014). A administração repetida de agmatina foi capaz de abolir o comportamento tipo-depressivo e ansioso induzido pela retirada de nicotina em camundongos (KOTAGALE *et al.*, 2015). Além disso, ela é capaz de atenuar o consumo de etanol através da modulação de receptores imidazólicos, sugerindo um potencial terapêutico na dependência induzida por essa substância (SAMEER, CHAKRABORTY e UGALE, 2013). De fato, estudos pré-clínicos mostram o envolvimento de receptores imidazólicos e NO no efeito anti-compulsivo induzido pela agmatina, sugerindo que essa amina pode ser um novo alvo a ser investigado para o tratamento da ansiedade e transtornos compulsivos (DIXIT *et al.*, 2014; DIXIT *et al.*, 2014; GAWALI *et al.*, 2016b). De fato, a agmatina está presente em altas concentrações em regiões cerebrais associadas com o processamento do vício como a área tegmentar ventral, núcleo acumbens e amígdala (REIS e REGUNATHAN, 2000).

De um modo geral, a agmatina possui uma relevância terapêutica em neuropatologias, o que contribui para que esse composto seja considerado promissor, e continue sendo investigado como um adjuvante no tratamento dessas condições neurológicas. No entanto, como o foco do presente trabalho envolve o efeito da agmatina na depressão, isso será mencionado com mais detalhes no tópico a seguir.

1.3.5. Agmatina e depressão

Em 2002, nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração aguda de agmatina por via sistêmica (intraperitoneal) e central (intracerebroventricular) em camundongos produziu efeito tipo-antidepressivo no TNF e no TSC (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002). Posteriormente, um estudo mostrou o efeito da agmatina (administrada pelas vias oral e subcutânea) no TNF em camundongos e em ratos (LI *et al.*, 2003). Diversos agentes farmacológicos foram utilizados para investigar os mecanismos responsáveis pela ação antidepressiva da agmatina no TNF. Foi demonstrado que seu efeito é dependente da inibição dos receptores NMDA e da síntese de NO e de uma interação com os sistemas noradrenérgico (receptores α_2 -adrenérgicos), serotoninérgico (receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT₂), opióide (receptores δ - e μ -opioides) (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004; ZOMKOWSKI, SANTOS e RODRIGUES, 2005), receptores imidazólicos I₁ e I₂ (ZEIDAN *et al.*, 2007), receptor do neuropeptídeo Y tipo Y1 (NPY-Y1) (KOTAGALE *et al.*, 2013) e canais de potássio (BUDNI *et al.*, 2007).

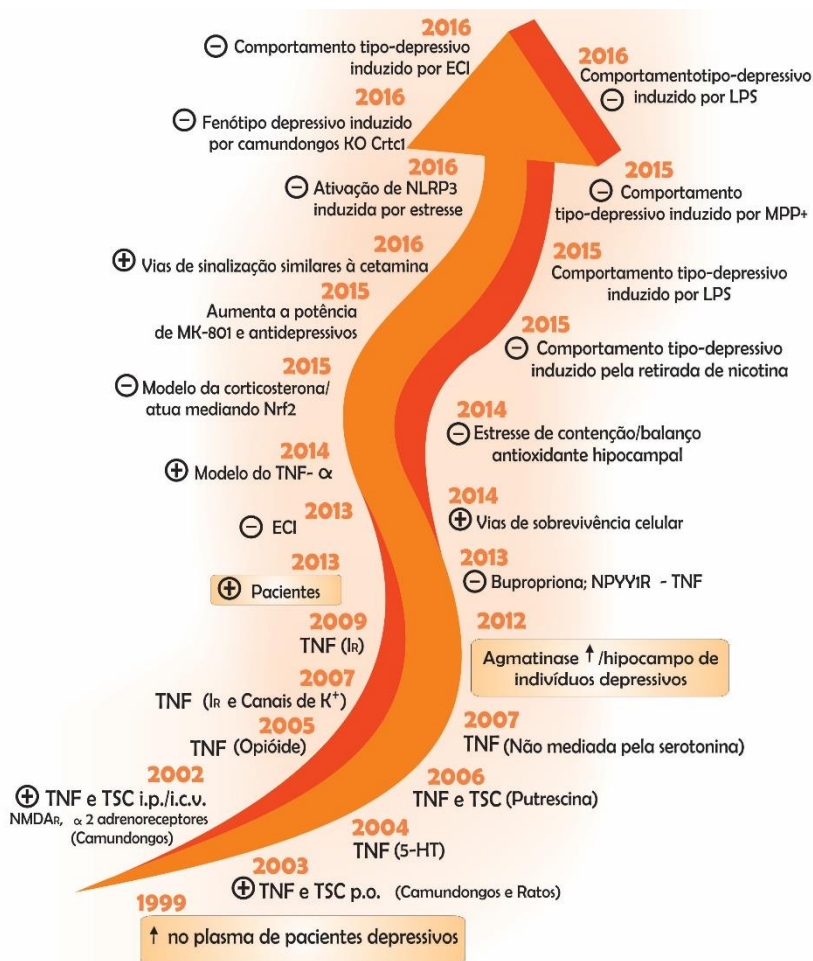
Em relação às vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da agmatina após tratamento crônico, um estudo do nosso grupo mostrou que ela aumenta a fosforilação de CREB, o imunoconteúdo de BDNF maduro e sinaptogenina I, além de reduzir o imunoconteúdo de pró-BDNF (forma imatura do BDNF) no hipocampo de camundongos controle (FREITAS *et al.*, 2014a). Sabe-se também que a putrescina, produto de degradação da agmatina a partir da enzima agmatinase, quando administrada por via oral (p.o.) ou central (i.c.v.) produz um efeito tipo-antidepressivo no TNF e TSC por um mecanismo que parece envolver a modulação do sítio de poliaminas dos receptores NMDA (ZOMKOWSKI, SANTOS e RODRIGUES, 2006).

Com relação aos modelos que mimetizam comportamento tipo-depressivo nos animais, uma série de estudos do nosso grupo mostrou que o tratamento de camundongos com agmatina é capaz de reverter ou prevenir esse comportamento induzido por ECI, estresse agudo de contenção e pela administração crônica de corticosterona (TAKSANDE *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2014b; FREITAS *et al.*, 2015a; FREITAS *et al.*, 2015b). Especificamente no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona, observou-se que a agmatina aumenta a fosforilação da proteína cinase A (PKA), Akt, GSK-3 β (Ser9), ERK1/2 e CREB, além do imunoconteúdo de BDNF (FREITAS *et al.*, 2015a). Além

disso, nosso grupo demonstrou que o tratamento sistêmico (via oral) de camundongos com agmatina é capaz de abolir o comportamento tipo-depressivo induzido pela citicina pró-inflamatória TNF- α , e que tal efeito parece estar associado com a ativação do sistema monoaminérgico, antagonismo de receptores NMDA e inibição da síntese de óxido nítrico (ON) (NEIS *et al.*, 2014). Mais recentemente, foi demonstrado que a agmatina é capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo e anedônico induzidos pela administração da neurotoxina MPP+ (MORETTI *et al.*, 2015c), além de atenuar a neuroinflamação induzida por LPS, diminuindo níveis de IL-1 β e TNF- α (GAWALI *et al.*, 2016a).

Quanto aos estudos clínicos acerca do possível envolvimento da agmatina na modulação do humor, Halaris et al. (1999) mostraram que pacientes com depressão apresentaram aumentos significativos das concentrações plasmáticas de agmatina quando comparado com pacientes controle saudáveis, indicando uma correlação positiva entre depressão e agmatina, provavelmente como um efeito compensatório (HALARIS *et al.*, 1999). Outros estudos realizados em humanos mostraram que indivíduos deprimidos apresentam aumento da expressão da enzima agmatinase (responsável pela degradação da agmatina neuronal hipocampal), o que sugere que esta enzima e/ou níveis neuronais hipocampais alterados de agmatina podem estar implicadas na fisiopatologia da depressão (BERNSTEIN *et al.*, 2012). Além disso, um estudo clínico realizado por Shopsin (2013) mostrou que a administração exógena de agmatina com duração de 3-4 semanas foi capaz de produzir efeitos antidepressivos em três indivíduos diagnosticados com depressão. Ao contrário de achados prévios, nesse mesmo estudo os pacientes foram co-tratados com PCPA (p-clorofenilalanina; inibidor da síntese de serotonina), que não foi capaz de reverter o efeito causado pela agmatina, sugerindo que não há envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo dessa amina endógena. Apesar desse estudo ser considerado inovador ao mostrar, pela primeira vez, que a agmatina é capaz de produzir efeitos antidepressivos na clínica, novos estudos clínicos e pré-clínicos são necessários para que se possa elucidar os mecanismos pelos quais a agmatina produz seus efeitos antidepressivos. O estudos clínicos e pré-clínicos acerca desses efeitos estão representados na **Figura 8**. No presente trabalho, o efeito tipo-antidepressivo da agmatina será avaliado principalmente em relação ao seu envolvimento com o sistema glutamatérgico, bem como possíveis similaridades entre seu efeito tipo-antidepressivo e aquele apresentado pela cetamina, tanto em relação às vias de sinalização intracelular quanto à capacidade de resposta em modelos de depressão associados ao estresse.

Figura 8. Linha do tempo do efeito antidepressivo da agmatina



Legenda: Representação esquemática dos estudos clínicos e pré-clínicos realizados no decorrer do tempo acerca do efeito antidepressivo da agmatina. Abreviaturas: TNF, teste do nado forçado; TSC, teste de suspensão pela cauda; LPS, lipopolissacarídeo; ECI, estresse crônico imprevisível; KO, Knockout; Fonte: Imagem cedida por Priscila Batista da Rosa.

2. JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno de alta prevalência, sendo considerado um grave problema de saúde pública, uma vez que está associada a diversas comorbidades, elevados índices de suicídio e altos custos para a sociedade (NESTLER *et al.*, 2002; NEMEROFF, 2007; LEPINE e BRILEY, 2011). Um dos motivos que levam ao agravamento do impacto social desse transtorno são as limitações da terapia convencional disponível como altas taxas de respostas parciais ou ausência de resposta ao tratamento (RUHE *et al.*, 2012), demora na remissão dos sintomas, além dos diversos efeitos colaterais (SERRETTI e MANDELLI, 2010), que prejudicam a adesão do paciente ao tratamento (NEMEROFF e OWENS, 2002; COVINGTON, VIALOU e NESTLER, 2010). Levando em consideração essas limitações dos antidepressivos convencionais, o uso de estratégias moleculares capazes de interferir de forma mais direta na sinalização superaria muitas das desvantagens dessa terapia clássica (NIBUYA, NESTLER e DUMAN, 1996; CONTI *et al.*, 2002), incluindo a eficácia do tratamento, diminuição de efeitos colaterais e o tempo de resposta dos pacientes ao tratamento. Uma alternativa é a modulação de sistemas de neurotransmissão capazes de ativar mecanismos de sinalização intracelular distintos, cujo efeito sobre a transcrição de BDNF seja significativamente mais rápido. Nesse sentido, a modulação do sistema glutamatérgico é apontada como uma estratégia farmacológica para melhorar a eficácia desse tratamento, e estudos mostram que o antagonista de receptores NMDA cetamina promove efeitos antidepressivos rápidos e persistentes. No entanto, considerando que a grande limitação do uso da cetamina diz respeito aos seus efeitos colaterais, se torna importante a busca por agentes que atuem de forma semelhante a este fármaco, mas possivelmente sem causar esses efeitos adversos. A agmatina é considerada um neuromodulador que age por mecanismos intimamente relacionados com a depressão, através do aumento de fatores tróficos (em especial o BDNF) (FREITAS *et al.*, 2014a; MEYLAN *et al.*, 2016), efeito neuroprotetor pela redução do estresse oxidativo, inflamação e apoptose (CONDELLO *et al.*, 2011; TAKSANDE *et al.*, 2015), além de proteger contra danos induzidos pelo glutamato, principalmente através do antagonismo de receptores NMDA (OLMOS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006). Considerando a similaridade entre esses efeitos exercidos pela agmatina e os mecanismos implicados na depressão, principalmente em relação à modulação glutamatérgica, torna-se relevante ampliar os estudos acerca do seu potencial efeito tipo-

antidepressivo incluindo mecanismos intracelulares envolvidos em sua possível ação terapêutica. Levando em conta também que essa amina endógena apresenta efeito tipo-antidepressivo em modelos preditivos de ação antidepressiva em baixas doses por um mecanismo de ação que parece envolver a modulação glutamatérgica de receptores NMDA (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; NEIS *et al.*, 2014), o presente trabalho buscou verificar se ela é capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo com um perfil farmacológico e mecanismo de ação similar à cetamina frente ao prejuízo ocasionado por diferentes modelos de depressão induzidos pelo estresse. Esta abordagem poderá facilitar a compreensão dos mecanismos de regulação endógena desse transtorno de humor, contribuindo, desta forma, para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controle e/ou remissão dos sintomas associados à depressão. Além disso, pode contribuir para a futura utilização da agmatina isoladamente ou em associação com antidepressivos a fim de reduzir os efeitos colaterais destes fármacos, possibilitando melhor adesão ao tratamento e qualidade de vida dos pacientes ao longo da terapia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o possível efeito tipo-antidepressivo rápido da agmatina em modelos animais de depressão e avaliar o envolvimento do sistema glutamatérgico e de vias de sinalização relacionadas com a resposta antidepressiva rápida no efeito desse composto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o possível efeito antidepressivo sinérgico obtido pela administração combinada de agmatina com antidepressivos convencionais fluoxetina (inibidor seletivo da receptação de serotonina), imipramina (inibidor da receptação de serotonina, noradrenalina e dopamina, antidepressivo tricíclico), bupropiona (inibidor da recaptção de dopamina, antidepressivo atípico) e com o antagonista de receptores NMDA, MK-801.

2. Investigar o envolvimento dos receptores AMPA e das vias de sinalização intracelular mediadas por BDNF/PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina.

3. Verificar se a administração aguda de agmatina é capaz de alterar o imunoconteúdo das proteínas BDNF, PSD-95 sinapsina 1 e GluA1 bem como a fosforilação dos sítios GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 no córtex pré-frontal de camundongos.

4. Comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina com a cetamina e fluoxetina no modelo de depressão induzida pelo ECI.

5. Comparar se a administração de agmatina, fluoxetina ou cetamina é capaz de alterar o imunoconteúdo de PSD-95, sinapsina 1 e GluA1 no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI.

6. Comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina com a cetamina e fluoxetina no modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona.

7. Verificar se a administração de agmatina, cetamina ou fluoxetina causa alterações no comportamento motivacional/anedônico de animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona.

8. Investigar se a administração de agmatina, fluoxetina e cetamina é capaz de alterar o imunoconteúdo de PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 bem como a fosforilação dos sítios GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 e p70S6K no hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona

4. RESULTADOS

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de uma introdução geral, contendo o embasamento teórico relacionado aos experimentos realizados, seguida por quatro capítulos. Cada um deles é composto de uma rápida introdução sobre o tema abordado no capítulo, seguido das metodologias utilizadas, resultados, discussão e conclusões parciais dos resultados obtidos em cada capítulo. As referências de todos os capítulos encontram-se no final da tese, onde estão contidas todas as publicações que foram usadas como fonte e citadas no decorrer do presente trabalho. Os capítulos são referentes a quatro artigos publicados ou submetidos à publicação em revistas internacionais:

Capítulo I – Agmatina aumenta a potência de antidepressivos convencionais e MK-801

“Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. Vivian B. Neis, Morgana Moretti, Luana M. Manosso, Mark W. Lopes, Rodrigo B. Leal, Ana Lúcia S. Rodrigues”.

Manuscrito completo referente ao primeiro objetivo específico da tese, publicado no periódico *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.130, p.9-14, 2015.

Capítulo II – Agmatina produz efeito tipo-antidepressivo mediante a ativação de receptores AMPA e sinalização da mTOR

“Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling

Vivian Binder Neis, Morgana Moretti, Luis Eduardo Beltrão Bettio, Camille Ribeiro, Priscila Batista Rosa, Filipe Marques Gonçalves, Mark William Lopes, Rodrigo B. Leal, Ana Lúcia S. Rodrigues”.

Manuscrito completo referente ao segundo e terceiro objetivos específicos da tese, publicado no periódico *European Neuropsychopharmacology*, v. 26, p. 959-971, 2016.

Capítulo III – Efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no modelo de depressão induzida por estresse crônico imprevisível (ECI)

“Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. Vivian Binder Neis, Luis Eduardo Beltrão Bettio, Morgana Moretti, Priscila Batista Rosa, Camille Ribeiro, Filipe Marques Gonçalves, Rodrigo Bainy Leal, Ana Lúcia S. Rodrigues”.

Manuscrito completo referente ao quarto e quinto objetivos específicos da tese, publicado no periódico *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.150, p. 108-114, 2016.

Capítulo IV – Efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona

“Agmatine reverses depressive-like behaviour induced by administration of corticosterone with a single administration”. Vivian Binder Neis, Luis Eduardo Beltrão Bettio, Morgana Moretti, Priscila Batista Rosa, Gislaine Olescowicz, Daiane Fraga, Filipe Marques Gonçalves, Andiará Espíndola de Freitas, Isabela Aparecida Heinrinch, Mark W. Lopes, Rodrigo Bainy Leal, Ana Lúcia S. Rodrigues”.

Manuscrito referente ao sexto, sétimo e oitavo objetivos específicos da tese, em fase de preparação.

CAPÍTULO I – AGMATINA AUMENTA A POTÊNCIA DE ANTIDEPRESSIVOS CONVENCIONAIS E MK-801

Apesar da grande disponibilidade de antidepressivos no mercado, muitos pacientes não respondem à terapia de primeira escolha e não alcançam a remissão completa dos sintomas com a utilização desses fármacos (HAMON e BLIER, 2013). Além disso, eles podem causar uma série de efeitos colaterais, que contribuem para diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento (BRUNELLO *et al.*, 2002; KELLER *et al.*, 2002; LANG e BORGWARDT, 2013). Vale ressaltar que a resposta terapêutica desses fármacos só ocorre no mínimo três semanas após o início do tratamento, o que pode trazer complicações quando se trata de pacientes com ideação suicida, assim como afetar a adesão desses ao tratamento (SKOLNICK, POPIK e TRULLAS, 2009).

Para os pacientes que desistem do tratamento devido aos efeitos adversos dos antidepressivos clássicos, ou que não obtém o alívio dos sintomas com a utilização de apenas um fármaco, existe a terapia combinada, na qual se utiliza um ou mais fármacos juntamente com os antidepressivos clássicos. Esse tipo de tratamento vem sendo utilizado com mais frequência e tem proporcionado uma melhora significativa dos sintomas depressivos nos pacientes (DEBATTISTA, 2006; BERMAN *et al.*, 2007; MARCUS *et al.*, 2008; BERMAN *et al.*, 2009). Em estudos pré-clínicos que avaliam o efeito tipo-antidepressivo de compostos, essa combinação pode vir na forma de um efeito sinérgico, ou seja, a administração de dois compostos que em baixas doses (chamadas sub-efetivas) não possuem efeito, mas que quando associados nessas mesmas doses são capazes de exercer um efeito significativo.

Apesar de já existir uma série de estudos que avaliam o sinergismo entre determinados compostos e antidepressivos convencionais (BINFARE *et al.*, 2009; KASTER *et al.*, 2012b; ROSA *et al.*, 2016), raramente é investigada a extensão desse sinergismo, em que é possível verificar qual dose sub-efetiva um determinado composto é capaz de aumentar a potência de fármacos convencionais (no caso, antidepressivos).

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (pesando entre 35-45 g; aproximadamente 60 dias de idade), mantidos a 20-22 °C com livre acesso a água e comida e submetidos a um ciclo claro/escuro 12:12 h (luzes acesas às 7:00 h) (N =7-10). Os animais foram acomodados em grupos de 15 por caixa (41x34x16 cm) e todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h, sendo que os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 h antes dos testes. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo n° 00795).

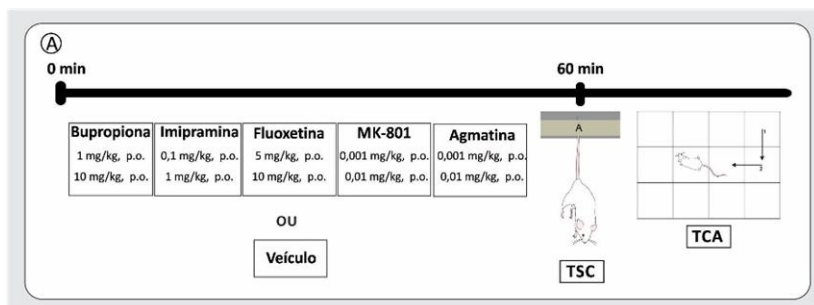
1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS

Agmatina, fluoxetina, imipramina, bupropiona e MK-801 (obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA, exceto a bupropiona, obtida da Libbs Farmaceutica Ltda.) foram dissolvidos em água destilada e administrados por via oral em diferentes doses, 1 h antes dos testes comportamentais. As soluções foram preparadas e em seguida administradas em um volume de 10 ml/kg.

1.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Inicialmente os camundongos foram tratados com agmatina (0,001, e 0,01 mg/kg, p.o.), bupropiona (1 e 10 mg/kg, p.o.; inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina), imipramina (0,1 e 1 mg/kg, p.o.; antidepressivo tricíclico), fluoxetina (5 e 10 mg/kg, p.o.; inibidor seletivo da recaptação de serotonina), ou MK-801 (0,001, e 0,01 mg/kg, p.o.; antagonista não competitivo de receptores NMDA), a fim de estabelecer o valor da mínima dose efetiva (MED), ou seja, a menor dose com que o fármaco produz um efeito tipo-antidepressivo significativamente estatístico quando comparado com o grupo controle (**Figura 1A**). Após 60 min desses tratamentos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, TSC e TCA.

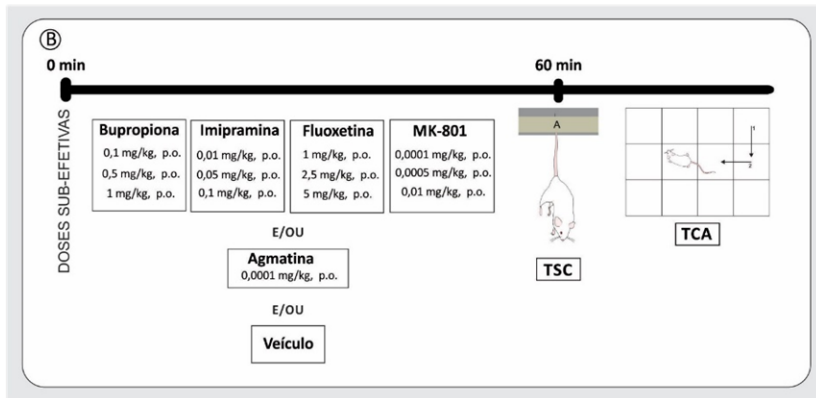
Figura 1A. Protocolo de administração dos fármacos para obtenção da mínima dose efetiva (MED)



Legenda: Bupropiona (1 e 10 mg/kg, p.o.), imipramina (0,1 e 1 mg/kg, p.o.), fluoxetina (5 e 10 mg/kg, p.o.) MK-801 (0,001 e 0,01 mg/kg, p.o.) e agmatina (0,001 e 0,01 mg/kg) ou veículo foram administrados 60 min antes dos animais serem submetidos aos testes comportamentais, TSC e TCA. Fonte: autor.

Após estabelecida o valor da MED, os camundongos foram tratados com veículo ou doses sub-efetivas de bupropiona (0,1, 0,5 e 1 mg/kg, p.o.), imipramina (0,01, 0,05 e 0,1 mg/kg, p.o.), fluoxetina (1, 2,5 e 5 mg/kg, p.o.), ou MK-801 (0,0001, 0,0005 e 0,001 mg/kg, p.o.) isoladamente ou em combinação com uma dose sub-efetiva de agmatina (0,0001 mg/kg p.o.). Após 60 min desses tratamentos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, TSC e TCA (**Figura 1B**).

Figura 1B. Protocolo de administração para avaliar o efeito sinérgico dos compostos



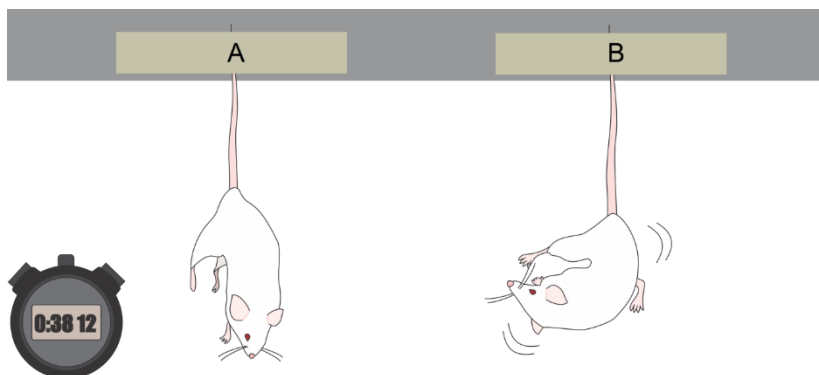
Legenda: Veículo, bupropiona (0,1, 0,5 e 1 mg/kg, p.o.), imipramina (0,01, 0,05, e 0,1 mg/kg, p.o.), fluoxetina (1, 2,5, e 5 mg/kg, p.o.), MK-801 (0,0001, 0,0005 e 0,01 mg/kg) e/ou agmatina (0,0001 mg/kg) foram administrados em diversas doses sub-efetivas 60 min antes dos testes comportamentais, TSC e TCA. Fonte: autor.

1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

1.4.1. *Teste de suspensão pela cauda (TSC)*

O TSC baseia-se no fato de que animais submetidos ao estresse inescapável ao serem suspensos pela cauda desenvolvem uma postura de imobilidade, a qual é reduzida por intervenções com potencial antidepressivo. A duração total da imobilidade é mensurada de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985). Os camundongos foram isolados e suspensos por uma fita adesiva (50 cm de altura) localizada aproximadamente 1 cm a partir do ponta da cauda do animal. A duração total da imobilidade (ausência de movimento ou movimentação passiva) foi registrada durante um período de 6 minutos por um observador experiente. A **Figura 2A** é uma representação esquemática do teste.

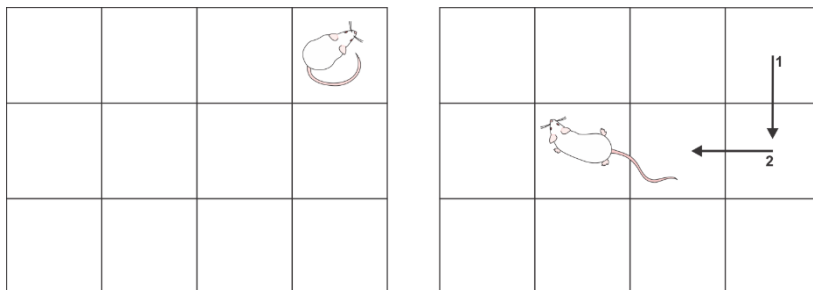
Figura 2A. Teste de suspensão pela cauda (TSC)



Legenda: O camundongo é suspenso acima do chão, preso pela cauda com auxílio de uma fita adesiva. Durante 6 minutos é contabilizado o tempo de imobilidade do animal, sendo que essa postura é adquirida frente a essa situação inescapável. Uma redução no tempo de imobilidade dos animais nesse teste é considerada como um efeito tipo-antidepressivo. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.4.2. *Teste do campo aberto (TCA)*

Para excluir a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma alteração motora, os animais foram submetidos ao TCA durante 6 minutos (RODRIGUES *et al.*, 2002). Este teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a base dividida em 12 quadrantes iguais (**Figura 2B**). O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa de madeira foi limpa com álcool (10%) entre os testes, os quais foram realizados em uma sala com temperatura controlada.

Figura 2B. Teste do campo aberto (TCA)

Legenda: Com o intuito de descartar a possibilidade de que interferências na atividade locomotora possam levar a resultados falso-positivos, o camundongo é colocado em uma caixa e durante o período de 6 minutos é contabilizado o número de quadrantes cruzados com as quatro patas como parâmetro de locomoção. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas dose resposta foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de *post hoc* de Dunnett's para comparação do efeito entre animais tratados com veículo e cada fármaco utilizado. A MDE foi determinada a partir dessa análise. Alterações nas curvas dose resposta foram avaliadas com base na potência relativa (coeficiente B) usando regressão linear simples. Um valor positivo do coeficiente B indicaria uma correlação positiva, no entanto, nesse estudo foi encontrado um valor negativo, mostrando que o aumento nas doses dos fármacos está associado à diminuição no tempo de imobilidade dos animais. Essa análise foi realizada com base em um estudo prévio que descreve o sinergismo entre glutamato e aminas biogênicas (LI *et al.*, 2003). As correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A magnitude da diminuição do tempo de imobilidade para cada 1 mg por quilograma de aumento de dose (agmatina + antidepressivos) é indicada pelo coeficiente B. Alterações nas curvas dose-resposta foram consideradas significativas quando os limites de confiança de 95% para o coeficiente B não incluíram 1,0.

2. RESULTADOS

Inicialmente, foi avaliada a influência do tratamento com diferentes doses de agmatina, antidepressivos convencionais e MK-801 para estabelecer o valor de MDE, por mensuração do tempo de imobilidade dos camundongos no TSC. Com o objetivo de excluir a possibilidade de que as alterações no tempo de imobilidade no TSC fossem devido a alguma interferência na atividade locomotora dos animais, o número de cruzamentos foi avaliado no TCA. No entanto, esses dados não foram mostrados pois não houve alteração significativa em nenhum dos grupos nesse teste. A **Tabela 1** resume os efeitos da agmatina, antidepressivos convencionais e MK-801 sobre o tempo de imobilidade dos animais no TSC. Com base na realização de uma curva dose resposta, foi observado que os compostos reduziram o tempo de imobilidade dos animais de maneira dose dependente, e de acordo com o seguinte ranking, do mais potente para o menos potente: agmatina > MK-801 > fluoxetina = bupropiona > imipramina. O valor da MDE, para diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TSC foi realizado para cada composto, e os resultados estão indicados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores de MDE da agmatina, antidepressivos convencionais e MK-801 no TSC

Fármacos	Doses (mg/kg)	MDE (mg/kg)
Agmatina	0,0001-1	0,001*
Bupropiona	0,1-10	10*
Imipramina	0,01-1	1*
Fluoxetina	1-10	10*
MK-801	0,00005-0,01	0,01*

Legenda: A MDE é a mínima dose efetiva para diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TSC, determinada por ANOVA de uma via seguida por *post hoc* de Dunnett's test (* $p < 0,05$, comparado ao grupo tratado com veículo apropriado). Todos os compostos foram administrados por via oral 60 min antes dos testes comportamentais (N =7-8 animais por grupo).

Uma vez que o valor de MDE foi estabelecido para todos os compostos, a agmatina foi administrada em uma dose sub-efetiva (não reduz o tempo de imobilidade dos animais no TSC e é 10 vezes menor do que a MDE) juntamente com várias doses de antidepressivos convencionais ou MK-801 (Tabela 2). Nesses experimentos, a combinação dessas diferentes doses de antidepressivos e MK-801 com a agmatina propiciou uma redução que variou de duas vezes na MDE dos antidepressivos (no caso da fluoxetina) até 100 vezes (no caso do MK-801). Esses dados estão expressos na **Tabela 2**.

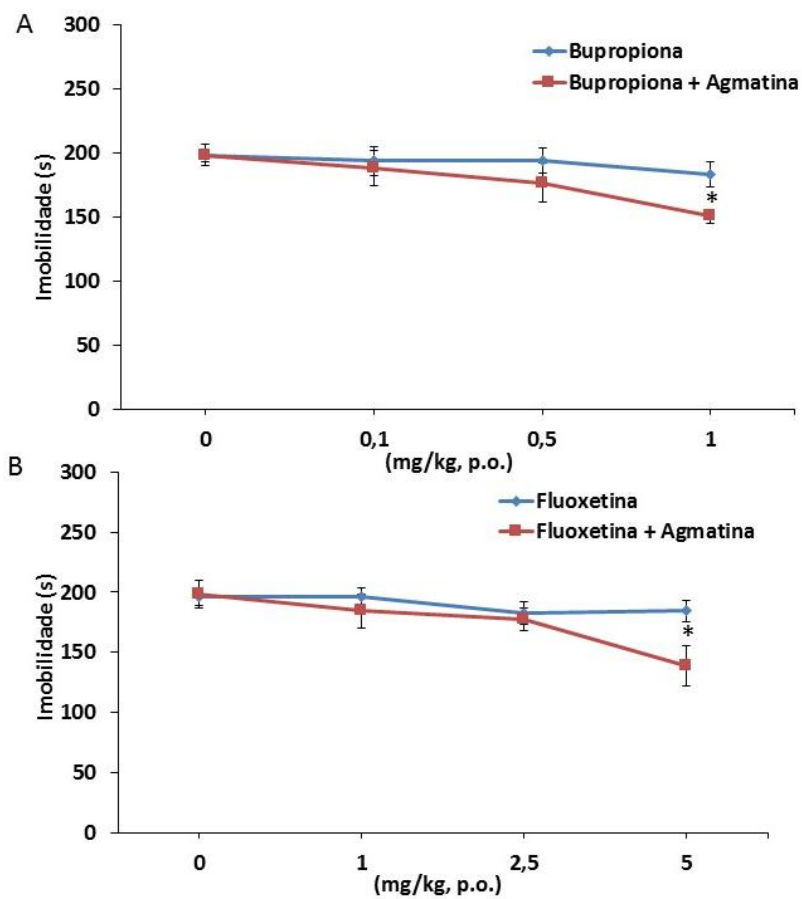
Tabela 2. Avaliação da potência de antidepressivos convencionais e MK-801 associados a uma dose sub-efetiva de agmatina no TSC

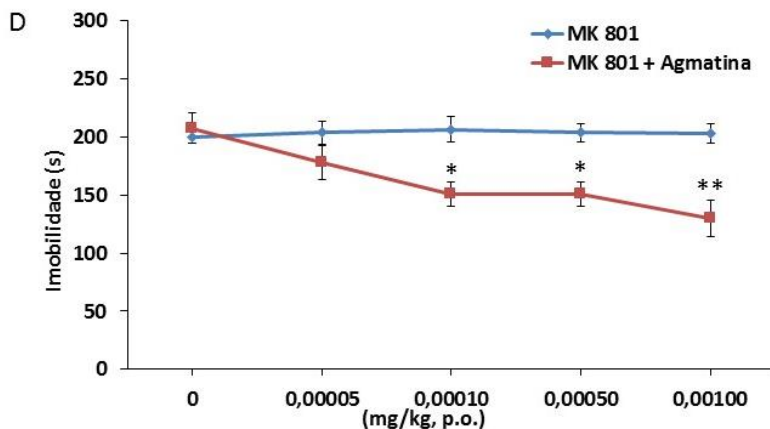
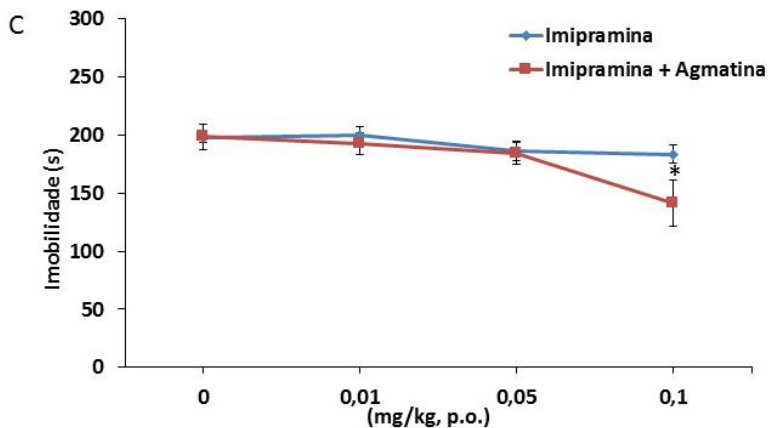
Fármacos	Doses (mg/kg)	MDE dos antidepressivos com agmatina (mg/kg)	Quantidade de vezes em que ↓MDE
Bupropiona	0,1-1	1	10
Imipramina	0,01-0,1	0.1	10
Fluoxetina	1-5	5	2
MK-801	0,00005-0,001	0,0001	100

Legenda: Uma dose de agmatina 10 vezes menor do que a MDE (0,001 mg/kg) foi administrada em conjunto com diversas doses sub-efetivas de antidepressivos convencionais e MK-801 e o valor da MDE desses fármacos na presença de agmatina foi calculada por ANOVA de uma via seguida por *post hoc* de Dunnett's. Nessa tabela, observa-se o número de vezes em que o valor da MDE é reduzido quando se compara a combinação dos antidepressivos ou MK-801 com a agmatina, e a administração dos antidepressivos sem a presença dessa amina (Tabela 1). Todos os compostos foram administrados por via oral 60 min antes dos testes comportamentais (N = 7-8).

É importante ressaltar que conforme mencionado nos Materiais e métodos (**Figura 1B**), os animais foram tratados tanto com a associação de diferentes doses sub-efetivas de antidepressivos juntamente com a agmatina em dose sub-efetiva (**Tabela 2**), quanto com esses fármacos em dose sub-efetivas isoladamente, para possibilitar comparação. Portanto, a **Figura 3** mostra as comparações entre o tempo de imobilidade dos camundongos tratados com diversas doses de antidepressivos ou MK-801 sozinhos ou em combinação com agmatina em sua dose sub-efetiva. Os gráficos ilustram que houve um aumento na potência dos antidepressivos: fluoxetina, imipramina, bupropiona e MK-801 induzida pela agmatina no TSC.

Figura 3. Tempo de imobilidade dos animais em função da dose de antidepressivo administrada





Legenda: A agmatina em uma dose sub-efetiva fixa (0,0001 mg/kg, p.o.) aumenta a potência de antidepressivos: bupropiona (painel A), fluoxetina (painel B), imipramina (painel C) e MK-801 (painel D) no TSC. A agmatina em sua dose sub-efetiva foi capaz de reduzir o valor da MDE. Foi utilizada uma dose sub-efetiva de agmatina 10 vezes menor do que o MDE. As linhas azuis representam os animais tratados somente com doses sub-efetivas de bupropiona (0,1, 0,5 e 1 mg/kg), fluoxetina (1, 2,5 e 5 mg/kg), imipramina (0,01, 0,05 and 0,1 mg/kg) e MK-801 (0,0001, 0,0005, e 0,001 mg/kg) e as linhas vermelhas representam um grupo tratado com doses sub-efetivas de agmatina (0,0001 mg/kg) em combinação com diferentes doses sub-efetivas de antidepressivos ou MK-801. Os fármacos ou veículo foram administrados 60 minutos antes dos testes comportamentais e os valores representam a média +/- erro padrão da média (EPM) (N = 7–8). $p < 0,05$ comparado com animais tratados com veículo (teste de Dunnett).

Com o intuito de avaliar a medida da relação entre as duas variáveis: dose e tempo de imobilidade dos animais, na **Tabela 3** consta a correlação entre a redução no tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com antidepressivos e a dose utilizada. Os resultados expressos na tabela mostram que não houve correlação significativa entre a administração de doses sub-efetivas de antidepressivos ou MK-801 e a redução no tempo de imobilidade dos animais.

Tabela 3. Correlação entre doses sub-efetivas de antidepressivos convencionais ou MK-801 no tempo de imobilidade dos animais no TSC

Fármacos	R	R ²	Coef. B	IC 95%	F	P
Bupropiona	0,213	0,045	-12,662	-35,573/10,250	1,286	0,267
Imipramina	0,361	0,130	-169,997	-347,268/7,275	3,886	0,059
Fluoxetina	0,241	0,058	-2,729	-7,064/1,606	1,668	0,207
MK-801	0,008	0,0001	496,620	-19259,460/20252,460	0,003	0,960

Legenda: A correlação entre doses sub-efetivas de antidepressivos convencionais ou MK-801 no tempo de imobilidade dos animais no TSC foi realizada com diversas doses sub-efetivas de antidepressivos e avaliada por análise univariada por regressão linear. Todos os compostos foram administrados por via oral 60 min antes dos testes comportamentais, sendo que foram utilizados 7 a 8 animais por grupo para cada dose analisada.

Para avaliar também a medida da relação entre as variáveis dose e tempo de imobilidade dos animais, a **Tabela 4** resume a correlação entre o tempo de imobilidade dos animais e diferentes doses sub-efetivas de antidepressivos usados em combinação com a agmatina também em dose sub-efetiva. Os resultados mostram que a cada 1 mg/kg de aumento nas doses da bupropiona e da fluoxetina, há uma redução de 44 s e 11 s, respectivamente, no tempo de imobilidade dos animais. Além disso, quando a dose de imipramina aumenta em 0,1 mg/kg, existe uma redução de 61 s no tempo de imobilidade dos animais e, cada aumento de 0,001 mg/kg na dose de MK-801 reduz o tempo de imobilidade dos animais em 54 s.

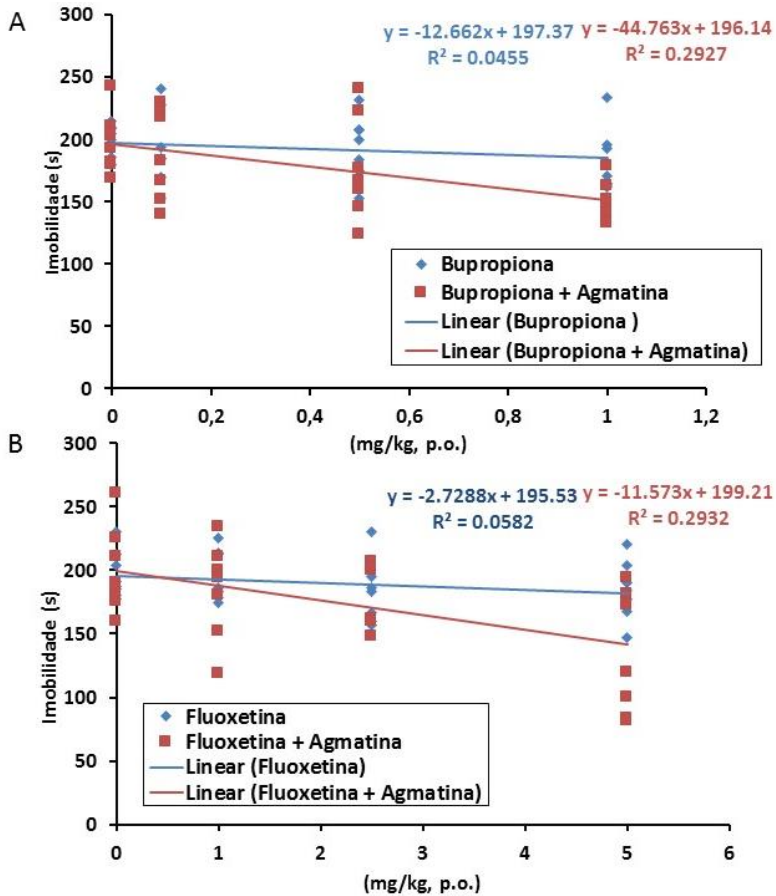
Tabela 4. Correlação entre doses sub-efetivas de antidepressivos ou MK-801 em combinação com uma dose sub-efetiva de agmatina no tempo de imobilidade dos animais no TSC

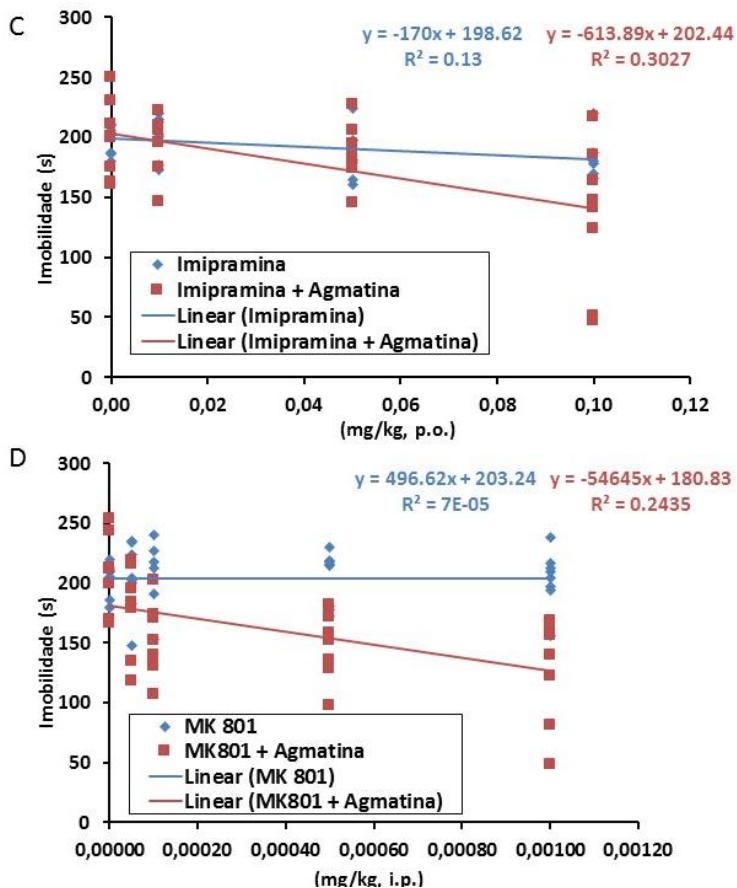
Fármacos	R	R ²	Coef B	IC 95%	F	P
Bupropiona	0,541	0,293	-44,763	-71,697/- 17,829	11,589	0,002
Imipramina	0,550	0,303	-613,892	-967,736/- 260,048	12,591	0,001
Fluoxetina	0,541	0,293	-11,573	-18,529/- 4,616	11,613	0,002
MK-801	0,493	0,243	-	-	11,584	0,002
			54645,191	87206,493/- 22083,889		

Legenda: Uma dose de agmatina 10 vezes menor do que a MDE (0,001 mg/kg) foi administrada juntamente com diversas doses sub-efetivas de antidepressivos convencionais ou MK-801 e os dados foram avaliados por análise univariada por regressão linear. Todos os compostos foram administrados por via oral 60 min antes dos testes comportamentais, sendo que foram utilizados 7 a 8 animais por grupo para cada dose analisada.

A fim de melhor representar os dados expostos na **Tabela 4**, os gráficos da **Figura 4** ilustram a correlação entre o tempo de imobilidade dos animais com diferentes doses sub-efetivas de antidepressivos ou MK-801 (sozinhos ou em combinação com a agmatina administrada em sua dose sub-efetiva).

Figura 4. Regressão linear entre o tempo de imobilidade dos animais no TSC e doses de antidepressivos convencionais utilizados isoladamente ou em combinação com uma dose sub-efetiva de agmatina





Legenda: Esses gráficos ilustram a correlação entre o tempo de imobilidade dos animais com diferentes doses sub-efetivas de bupropiona (painel A), fluoxetina (painel B), imipramina (painel C) e MK-801 (painel D) administrados sozinhos ou em combinação com uma dose sub-efetiva fixa de agmatina (0,0001 mg/kg). As linhas azuis representam os animais tratados somente com bupropiona (0,1, 0,5 e 1 mg/kg), fluoxetina (1, 2,5 e 5 mg/kg), imipramina (0,01, 0,05 e 0,1 mg/kg) ou MK-801 (0,0001, 0,0005 e 0,001 mg/kg) e as linhas vermelhas representam os grupos tratados com agmatina em sua dose sub-efetiva (0,0001 mg/kg) em combinação com as diferentes doses sub-efetivas dos antidepressivos. Os valores estão representados pela média \pm EPM (N = 7–8 por grupo).

3. DISCUSSÃO

Na última década a terapia combinada tem se tornado uma estratégia no tratamento de pacientes que não respondem adequadamente a apenas um antidepressivo (KESSLER *et al.*, 2003; HORI e KUNUGI, 2012; CHANG, SATO e HAN, 2013; PATKAR e PAE, 2013). Esse tipo de associação se torna importante devido a elevada incidência de comorbidades associadas à depressão e também ao fato de que os pacientes normalmente utilizam mais de um fármaco psicoativo. Nesse sentido, estudos pré-clínicos investigam a combinação de agentes que possam fornecer bases neurofarmacológicas para fundamentar a utilização dessas combinações na clínica. Por exemplo, já foi demonstrado que a associação do fármaco memantina (opção terapêutica no tratamento sintomático da doença de Alzheimer moderada a grave) com sertralina (ISRS) possui maior eficácia (resposta mais rápida e pronunciada) em pacientes com depressão quando comparado com o tratamento apenas com a sertralina (AMIDFAR *et al.*, 2016a). Além disso, a combinação de duloxetina (ISRSN) com outros antidepressivos (mirtazapina, paroxetina, escitalopram, venlafaxina, bupropiona, sertralina e fluoxetina) aumenta a eficácia e tolerabilidade quando comparada com a monoterapia (CHEON *et al.*, 2016) bem como a terapia combinada com antidepressivos tricíclicos e inibidores da MAO pode ser efetiva em pacientes que não respondem à monoterapia com esses fármacos (SCHIPPER, VANMOLKOT e PEETERS, 2016).

Reforçando esses achados e a importância da terapia combinada para o tratamento da depressão, um recente estudo mostrou que a associação de brexpiprazol (antipsicótico) e fluoxetina promove um rápido efeito tipo-antidepressivo em um modelo de depressão associada a inflamação (induzida por LPS), além de alterar a sinalização mediada por BDNF-TrkB e a densidade de espinhas dendríticas no córtex pré-frontal, núcleo accumbens e regiões CA3 e do giro denteado do hipocampo (MA *et al.*, 2016). De fato, uma série de estudos mostra que a associação de antipsicóticos com antidepressivos induzem um efeito mais pronunciado em pacientes com depressão ou transtorno bipolar (SHELTON e PAPAKOSTAS, 2008; KATO e CHANG, 2013; ROGOZ, 2013; SILVA *et al.*, 2013). Com base nesses dados, esse estudo objetivou estabelecer a magnitude do sinergismo de antidepressivos convencionais (fluoxetina, imipramina e bupropiona) ou MK-801 administrados juntamente com uma dose sub-efetiva de agmatina, avaliando dessa forma

a potência desses fármacos na presença ou ausência dessa amina endógena.

Nesse capítulo, inicialmente, observou-se que os antidepressivos convencionais, o MK-801 e a agmatina quando administrados separadamente reduziram o tempo de imobilidade dos animais no TSC de maneira dose-dependente. Com isso, foi estabelecido o valor da MDE desses compostos, ou seja, a mínima dose com que eles exercem seu efeito tipo-antidepressivo. Farmacologicamente, uma dose considerada efetiva é a dose ou quantidade de fármaco que produz uma resposta terapêutica ou efeito desejado nos pacientes que a estão consumindo. Já a MDE é a menor dose de determinado fármaco que produz o efeito desejado, ou seja, um efeito clinicamente significativo, estatisticamente superior aquele fornecido pelo placebo, sendo um valor acima dessa dose dispensável (JEN-PEI, 2010). A MDE compõe a janela terapêutica dos fármacos, que é definida pelo intervalo entre a MDE e a máxima dose tolerada, estando essa última, no limite para a toxicidade. Portanto, a MDE se torna importante para a diminuição de efeitos colaterais exercidas por determinados fármacos, como é o caso do lítio, que possui essa janela terapêutica estreita

Os valores de MDE nesse trabalho estão de acordo com aqueles encontrados em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (CUNHA *et al.*, 2008; NEIS *et al.*, 2014). É importante destacar que a MDE do MK-801 foi consideravelmente menor do que a MDE dos outros antidepressivos testados. De fato, tanto a dose ativa quanto sub-efetiva do MK-801 utilizada em estudos prévios do nosso grupo é consideravelmente menor do que os antidepressivos convencionais (MANTOVANI *et al.*, 2003; MORETTI *et al.*, 2011). Posteriormente, a agmatina foi administrada em sua dose sub-efetiva em combinação com doses também sub-efetivas dos antidepressivos bupropiona, imipramina e fluoxetina. Todas essas combinações proporcionaram um efeito tipo-antidepressivo sinérgico. Outros estudos já demonstraram a capacidade da agmatina em exercer efeito sinérgico com diferentes compostos exercendo outras propriedades biológicas. Um exemplo disso, é a associação de doses sub-efetivas da agmatina, a qual é capaz de aumentar o efeito anticonvulsivante da melatonina (MOEZI *et al.*, 2011), morfina, lítio (RIAZI *et al.*, 2005; BAHREMAND *et al.*, 2010) fenobarbital e valproato (LUSZCZKI *et al.*, 2008). No entanto, em relação aos resultados encontrados nesse capítulo, a magnitude desse efeito sinérgico não foi uniforme uma vez que houve uma redução na MDE dos antidepressivos convencionais quando combinados com agmatina, que variou de duas vezes (fluoxetina) até 10 vezes (imipramina e bupropiona).

Esses achados corroboram estudos prévios que mostram um efeito tipo-antidepressivo sinérgico quando a agmatina é administrada com esses antidepressivos convencionais (ZOMKOWSKI *et al.*, 2004; TAKSANDE *et al.*, 2009; KOTAGALE *et al.*, 2013; NEIS *et al.*, 2014). No entanto, esses estudos não avaliaram a magnitude desse efeito sinérgico. Adicionalmente, sabe-se que o efeito tipo-antidepressivo dessa amina endógena ocorre mediante ativação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (HALARIS *et al.*, 1999; ONAL *et al.*, 2003; ZOMKOWSKI *et al.*, 2004). De fato, estudos pré-clínicos mostraram que o efeito tipo-antidepressivo dos ISRS no TNF é potencializado pela administração exógena de agmatina (ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; TAKSANDE *et al.*, 2009), que essa amina endógena é capaz de aumentar os níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina no hipocampo de camundongos e que esse aumento pode estar relacionado a potencialização do efeito tipo-antidepressivo de ISRS (TAKSANDE *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2015b). Além disso, já foi demonstrada a participação da agmatina e de receptores imidazólicos no efeito antidepressivo da bupropiona (KOTAGALE *et al.*, 2013) e que a modulação desses receptores pela agmatina está implicada no efeito tipo-antidepressivo de ISRS (TAKSANDE *et al.*, 2009). No entanto, é importante ressaltar que foi relatado que a agmatina possui efeito antidepressivo em 3 pacientes com depressão, aparentemente de modo independente do sistema serotoninérgico, uma vez que seus efeitos não foram revertidos por paraclorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina (SHOPSIN, 2013). Ainda de acordo com os resultados encontrados nesse capítulo, estudos prévios mostram que compostos com potencial antidepressivo podem produzir efeito sinérgico quando administrados juntamente com antidepressivos convencionais (CUNHA *et al.*, 2008; REUS *et al.*, 2011; MANOSSO *et al.*, 2013). Com base nesses achados, existe a necessidade de investigar se a administração combinada de agmatina com antidepressivos convencionais causa um efeito sinérgico em pacientes com depressão. Esse tipo de tratamento permite que doses menores de antidepressivos sejam utilizadas, diminuindo dessa forma os efeitos adversos decorrentes da terapia, o que resulta em maior qualidade de vida para os pacientes.

Além de ter sido observado um efeito sinérgico da agmatina com antidepressivos convencionais, uma dose sub-efetiva dessa amina quando administrada em conjunto com doses sub-efetivas de MK-801 foi capaz de reduzir a MDE desse antagonista de receptores NMDA em 100 vezes. Embora estudos prévios do nosso grupo tenham demonstrado que a agmatina aumenta o efeito tipo-antidepressivo do MK-801, resultando em

sinergismo tanto no TSC quanto no TNF (ZEIDAN *et al.*, 2007; NEIS *et al.*, 2014), nenhum deles avaliou a potência desse efeito sinérgico. Reforçando o fato de que a inibição de receptores NMDA está envolvida no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, evidências demonstraram que essa amina protege contra o dano induzido por NMDA e glutamato em culturas de neurônios hipocâmpais e corticais (OLMOS *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2006; ZHU, WANG e BISSETTE, 2006). Além disso, a agmatina reverte o aumento de cálcio intracelular induzido pela ativação de receptores NMDA e a diminuição de monoaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) em células PC12 (LI, Y. F. *et al.*, 2003a). Corroborando esses achados, outros efeitos benéficos dessa amina endógena ocorrem mediante o bloqueio dos receptores NMDA, incluindo proteção contra discinesia orofacial induzida por reserpina e contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol (ambos *in vivo*), além de um modelo de retinopatia diabética *in vitro* (FENG, LEBLANC e REGUNATHAN, 2005; HAN *et al.*, 2015; CUNHA, A. S. *et al.*, 2016). Shopsin (2013) sugere ainda que o efeito antidepressivo da agmatina pode ser mediado pela inibição da excitotoxicidade glutamatérgica, mais especificamente, pela habilidade dela em antagonizar receptores NMDA (SHOPSIN, 2013). Antagonistas de receptores NMDA têm mostrado efeito tipo-antidepressivo em testes preditivos de depressão como o TSC e TNF além de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido por modelos como estresse inescapável e estresse crônico imprevisível (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; SKOLNICK, 1999; MANTOVANI *et al.*, 2003; SANACORA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011). É importante destacar que esses antagonistas de receptores NMDA foram efetivos em aumentar o efeito de antidepressivos convencionais (imipramina, venlafaxina e fluoxetina) e de outros compostos com potencial antidepressivo no TNF e TSC (ROGOZ *et al.*, 2002; GHASEMI, RAZA e DEHPOUR, 2010; MORETTI *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2015). Adicionalmente, o efeito sinérgico de antagonistas de receptores NMDA juntamente com compostos com potencial antidepressivo foi observado também em modelos que induzem comportamento tipo-depressivo nos animais, como é o caso da administração da citocina pró-inflamatória TNF- α (MORETTI *et al.*, 2015a).

Quanto às interações farmacocinéticas entre os antidepressivos ou MK-801 e a agmatina, não existem dados na literatura sobre o assunto. O perfil farmacocinético da agmatina em nível de SNC ainda é minimamente definido. No entanto, a agmatina poderia estar aumentando as concentrações desses compostos no SNC e levando ao aumento da potência antidepressiva observada nesse estudo. Nesse sentido, existe a

necessidade de se investigar se as interações farmacocinéticas podem estar relacionadas com as respostas comportamentais no TSC nos animais tratados com essa combinação terapêutica (agmatina + antidepressivos ou agmatina + MK-801).

É importante ressaltar que a agmatina em uma dose sub-efetiva foi capaz de diminuir a MDE do MK-801 em maior magnitude (100 vezes) do que aquela observada com os antidepressivos convencionais. Essa diferença poderia ser explicada devido a uma maior afinidade da agmatina por receptores NMDA do que pelas monoaminas. De fato, as consequências da inibição de receptores NMDA podem estar afetando diversas vias de sinalização intracelular implicadas em respostas antidepressivas. Ainda de acordo com esses achados, em estudo prévio a agmatina foi capaz de bloquear os receptores NMDA em neurônios hipocâmpais de ratos através da interação com o sítio localizado dentro do poro do canal NMDA, e o grupo guanidino da agmatina mostrou ser responsável por grande parte do bloqueio desses receptores (YANG e REIS, 1999; ROBERTS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006). O MK-801 se liga preferencialmente ao complexo NMDA ativado, interagindo com um sítio localizado dentro do poro do receptor NMDA (JAVITT e ZUKIN, 1989).

De modo interessante, as doses de agmatina necessárias para produzir um efeito tipo-antidepressivo no presente estudo foram extremamente baixas quando comparadas com outros estudos, e muitos deles utilizaram essa amina endógena administrada por via intraperitoneal (variando de 5–80 mg/kg) ao invés de oral (LI, Y. F. *et al.*, 2003b; TAKSANDE *et al.*, 2009). Além disso, doses maiores de agmatina são necessárias para observar seus outros efeitos farmacológicos como, por exemplo, suas propriedades ansiolíticas, anticonvulsivantes e antinociceptivas (DEMEHRI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; GONG *et al.*, 2006). Essas diferenças entre os estudos podem ser atribuídas às vias de administração utilizadas, bem como podem estar relacionadas com as linhagens e o sexo dos camundongos utilizados. Apesar das diferenças mencionadas, as doses de agmatina utilizadas no estudo em questão estão de acordo com estudos prévios do nosso grupo, mostrando que o efeito tipo-antidepressivo desse composto ocorre em doses muito baixas quando administrado por via oral em camundongos Swiss fêmeas (FREITAS *et al.*, 2014a; NEIS *et al.*, 2014).

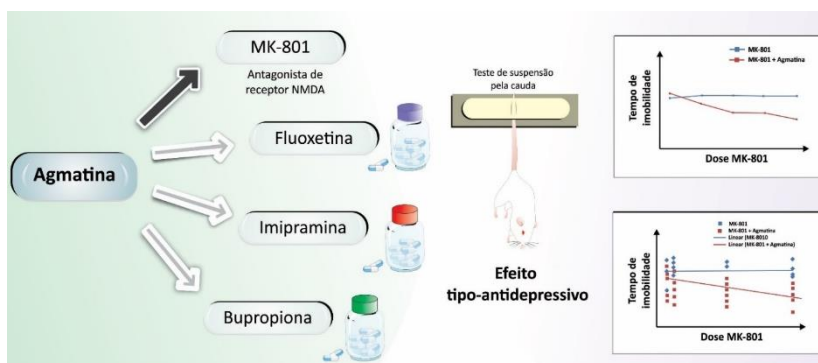
Com base nesses achados, considerando que a agmatina não vem apresentando efeitos adversos em estudos clínicos (KEYNAN *et al.*, 2010; SHOPSIN, 2013) e que a terapia combinada com esse composto pode ser considerada mais segura em relação à redução dos efeitos

colaterais, pretende-se continuar investigando o efeito tipo-antidepressivo dessa amina. Considerando também que o papel do sistema glutamatérgico vem crescendo consideravelmente na depressão no decorrer dos anos (MAENG *et al.*, 2008; SANACORA *et al.*, 2008), os resultados apresentados nesse estudo fornecem informações importantes para se continuar investigando o efeito tipo-antidepressivo da agmatina e seu envolvimento com esse sistema de neurotransmissão, mais especificamente explorando a modulação de receptores NMDA.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo em questão indicaram que a agmatina aumenta os efeitos de antidepressivos convencionais, e, com maior destaque, do MK-801, sugerindo que essa amina pode aumentar a atividade e efeitos terapêuticos desses compostos (**Figura 5**). Levando em consideração a relevância da modulação do sistema glutamatérgico no tratamento da depressão, esses achados são considerados de alta relevância terapêutica e sugerem que uma maior investigação desse sistema de neurotransmissor no efeito tipo-antidepressivo da agmatina se faz necessário.

Figura 5. Resumo dos resultados encontrados no Capítulo I



Legenda: Os resultados desse capítulo indicam que a administração de agmatina em sua dose sub-efetiva é capaz aumentar a potência do efeito tipo-antidepressivo de antidepressivos monoaminérgicos convencionais, principalmente do antagonista NMDA, MK-801 no TSC, um efeito considerado dose-dependente. Fonte: Priscila Batista da Rosa

CAPÍTULO II - AGMATINA PRODUZ EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO MEDIANTE A ATIVAÇÃO DE RECEPTORES AMPA E DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA PELA mTOR

Estudos recentes têm mostrado evidências de que o sistema glutamatérgico é um alvo relevante no que diz respeito a antidepressivos de ação rápida (DUMAN, 2014b). O glutamato exerce um papel importante na modulação da neuroplasticidade e comportamento através de seus receptores, em especial os subtipos AMPA e NMDA (KESSELS e MALINOW, 2009). Sabe-se que antagonistas de receptores NMDA podem exercer efeitos antidepressivos rápidos, como é o caso da cetamina (SKOLNICK, 1999; SANACORA *et al.*, 2008; DUMAN, 2014b). Esse composto tem sido amplamente estudado em relação ao seu potencial efeito antidepressivo, uma vez que sua administração aguda é capaz de produzir efeito antidepressivo rápido em pacientes refratários a antidepressivos convencionais (BERMAN *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2006; DUMAN e KEHNE, 2007). Nesse contexto, tem se investigado amplamente os mecanismos e vias de sinalização envolvidas no efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que a administração de cetamina leva rapidamente a uma cascata de eventos que incluem a inibição de receptores NMDA extrassinápticos associados a uma desinibição glutamatérgica pré-sináptica (LI *et al.*, 2010; AUTRY *et al.*, 2011). Essa modulação está relacionada ao aumento do funcionamento de receptores AMPA, que são rapidamente modulados por fosforilação em dois sítios da subunidade GluA1 (GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845), ambos implicados na plasticidade sináptica e memória (LEE *et al.*, 2003). Sabe-se que a cetamina é capaz de aumentar rapidamente a expressão pós-sináptica de AMPA (LI *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2013), que está envolvido no aumento da expressão de BDNF (LAUTERBORN *et al.*, 2000). O aumento da liberação de BDNF permite a ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, sendo que a mTOR pode ser modulada negativamente pela GSK3- β (DUMAN e LI, 2012). Com a ativação da mTOR, ocorre o favorecimento da tradução de proteínas sinápticas, com destaque para subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (GluA1) e proteínas de ancoragem desses receptores, como as proteínas PSD-95 e sinapsina 1.

Levando em consideração que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina ocorre mediante antagonismo de receptores NMDA

(ZOMKOWSKI *et al.*, 2002; NEIS *et al.*, 2014; NEIS *et al.*, 2015) e a relação existente entre esses e os receptores AMPA, que contribuem para o aumento da função sináptica e respostas antidepressivas (MAENG e ZARATE, 2007; MAENG *et al.*, 2008), o objetivo desse capítulo é avaliar se a agmatina exerce seu efeito tipo-antidepressivo no TSC através da modulação de receptores AMPA (imunoconteúdo de GluA1 e fosforilação de GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845), e das vias de sinalização intracelular mediadas por BDNF/PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR, além de alterar o imunoconteúdo das proteínas BDNF, PSD-95 e sinapsina 1 no córtex pré-frontal dos animais, da mesma forma que ocorre com a cetamina.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. ANIMAIS

Camundongos Swiss fêmeas (45-55 dias, pesando entre 30-45 g), foram mantidos a 20-22 °C com livre acesso a água e comida, submetidos a um ciclo claro/escuro 12:12 h (luzes acesas às 7:00 h) (N = 7-8). Os animais foram acomodados em grupos de 15 por caixa (41x34x16 cm). Os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h sendo que, os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 h antes dos testes comportamentais. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) (protocolo n° 00795) e esforços foram realizados para minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS

Foram utilizados os seguintes compostos: agmatina (0,1 mg/kg ou em sua dose sub-efetiva 0,0001 mg/kg), LY2940029 (10 nmol/sítio, inibidor da PI3K), AR-A014418 (0,001 μ g/sítio, inibidor seletivo da GSK-3 β), LiCl (10 mg/kg, p.o, inibidor não seletivo da GSK-3 β), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona (DNQX) (2,5 μ g/sítio, antagonista de receptores AMPA), K-252a (1 μ g/sítio, antagonista de receptores TrkB), rapamicina (0,2 nmol/sítio, inibidor seletivo da mTOR). Esses agentes farmacológicos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. Foram utilizados também cloreto de lítio (LiCl) (10 mg/kg, inibidor não seletivo da GSK-3 β) (obtido da MERCK, Darmstadt, Alemanha), e o anticorpo anti-BDNF (1 μ g/sítio, anticorpo policlonal anti-IgG de coelho,

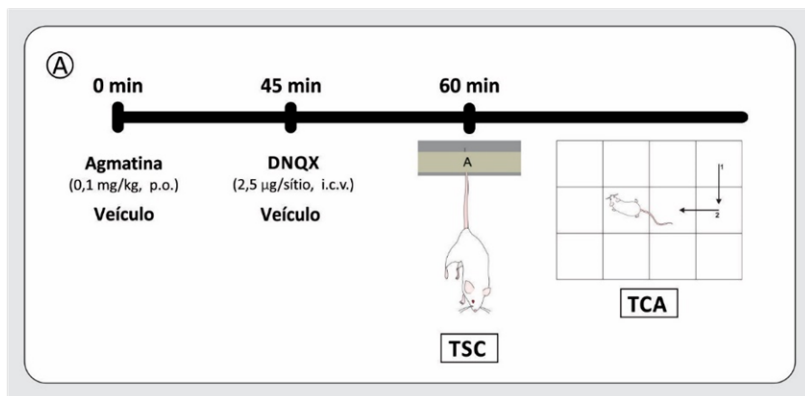
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). O LiCl e a agmatina foram dissolvidos em água destilada e administrados por via oral (p.o.) por gavagem em um volume de 10 ml/kg. O LY294002, AR-A014418, DNQX, K-252 e rapamicina foram dissolvidos em salina (0,9% NaCl) em uma concentração final de 1% de dimetil sulfoxido (DMSO), todos administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.) em um volume de 3 µl por camundongo. Os animais controles receberam veículo apropriado.

As administrações i.c.v. foram realizadas de acordo com um protocolo previamente descrito por nosso grupo (KASTER *et al.*, 2012a). Para a realização dessas injeções, os camundongos foram brevemente anestesiados com isofluorano (2.5%; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, Brasil). Após a anestesia, uma agulha hipodérmica de 0,4 mm de diâmetro acoplada a uma seringa de Hamilton de 25 µl por uma cânula de polietileno foi inserida perpendicularmente ao crânio do animal, no ventrículo lateral esquerdo. A injeção foi administrada durante 30 s, e manteve-se a agulha no local durante mais 30 s, a fim de evitar o retorno das substâncias injetadas. O local de injeção foi de 1 mm para a esquerda a partir do ponto médio de uma linha que passa pela base anterior das orelhas. Para garantir que os fármacos foram administrados no lugar exato dentro do ventrículo lateral, o cérebro foi dissecado e examinado macroscopicamente após o teste. Os resultados referentes aos cérebros que apresentaram o menor sinal de hemorragia foram excluídos das análises estatísticas (menos de 5% do total de animais utilizados).

1.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para investigar o envolvimento dos receptores AMPA no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, os camundongos foram pré-tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o., dose ativa no TSC) ou veículo 45 min antes da administração de DNQX (antagonista de receptores AMPA, 2,5 µg/sítio, i.c.v.) ou veículo. O TSC foi realizado 15 min após a administração de DNQX, e 10 minutos após a realização desse teste, os animais foram submetidos ao TCA (**Figura 1A**).

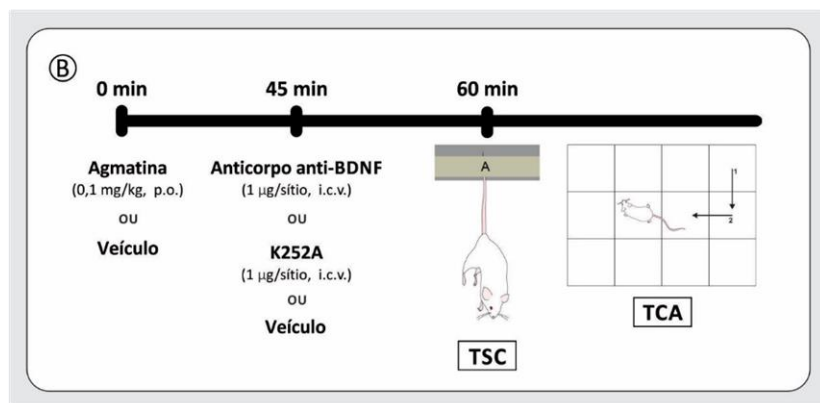
Figura 1A. Investigação do envolvimento de receptores AMPA no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois foram tratados com DNQX (2,5 µg/sítio, i.c.v., antagonista de receptores AMPA). Após 15 min os animais foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

Com o intuito de verificar a importância do BDNF no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, os camundongos foram pré-tratados com essa amina endógena (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo 45 min antes da administração i.c.v. do anticorpo anti-BDNF (1 µg/sítio) ou veículo. O TSC foi realizado após 15 min da administração do anticorpo. Posteriormente, para verificar se o efeito tipo-antidepressivo da agmatina é dependente da ativação de receptores TrkB, os animais foram pré-tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o) ou veículo 45 min antes da injeção i.c.v. de K-252a (antagonista de receptores TrkB, 1 µg/sítio) ou veículo (RIEGER *et al.*, 2014). Os animais foram testados no TSC 15 min após essas administrações i.c.v., e após 10 min foram submetidos ao TCA.

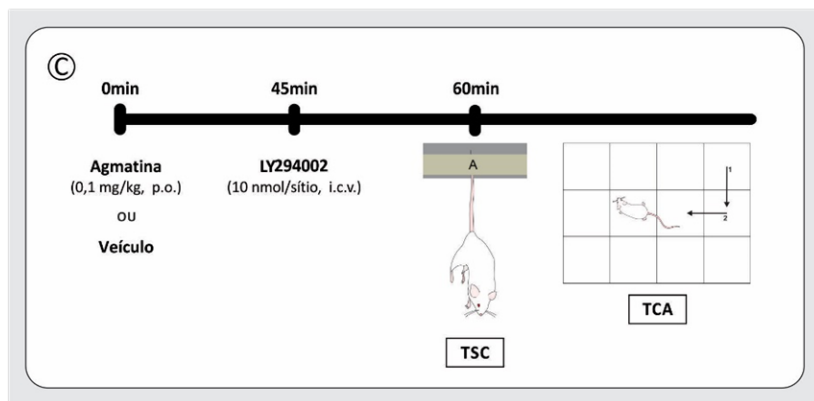
Figura 1B. Protocolo para investigar o envolvimento de BDNF e seus receptores TrkB no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois receberam anticorpo anti-BDNF (1 µg/sítio, i.c.v., anticorpo policlonal anti-IgG de coelho) ou anti-K252A (1 µg/sítio, i.c.v., antagonista de receptores TrkB). Após 15 min os camundongos foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

A fim de investigar o envolvimento da PI3K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, os camundongos foram pré-tratados com essa amina (0,1 mg/ kg, p.o.) ou veículo 45 min antes da administração i.c.v. de LY294002 (inibidor da PI3K, 10 nmol/sítio) ou veículo. O TSC foi realizado 15 min após essa administração i.c.v., seguido do TCA (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015) (Figura 1C).

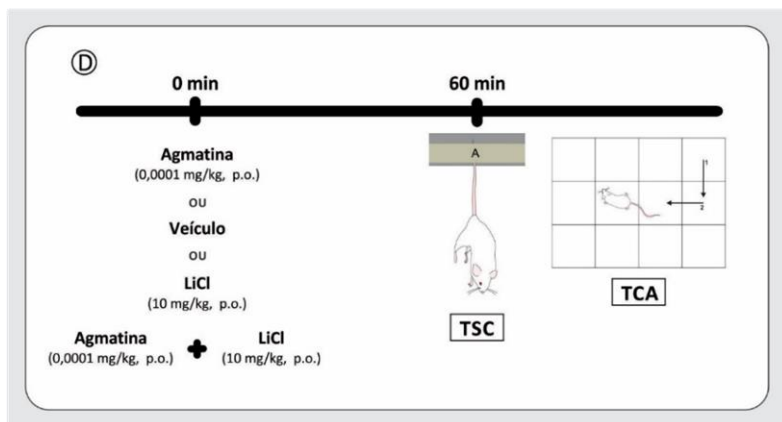
Figura 1C. Investigação do envolvimento da PI3K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois receberam LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v., inibidor da PI3K). Após 15 min dessa administração, os animais foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

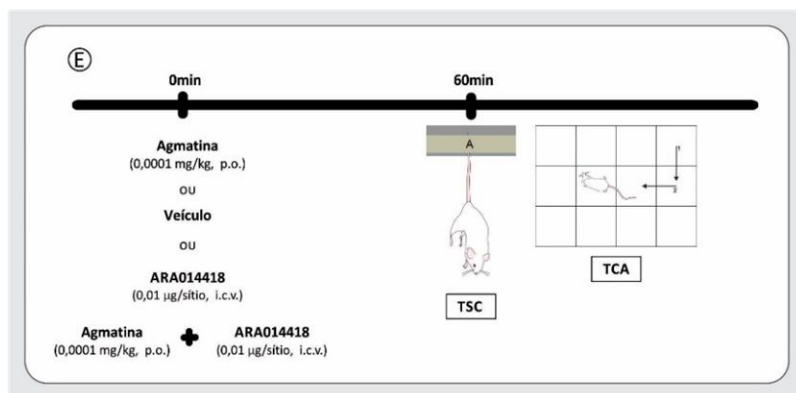
Para investigar a possibilidade de que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina seja mediado pela inibição de GSK-3 β , os animais foram tratados com uma dose sub-efetiva de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) ou veículo, e imediatamente após, receberam uma dose sub-efetiva de LiCl (inibidor não seletivo da GSK-3 β , 10 mg/kg, p.o.) ou veículo. O TSC foi realizado 60 min após essas administrações, seguido do TCA (**Figura 1D**). Em outro conjunto de experimentos, os camundongos foram tratados com uma dose sub-efetiva de agmatina ou água destilada juntamente com uma dose sub-efetiva de AR-A014418 (inibidor seletivo de GSK-3 β 0,01 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo. Após 60 min dessas administrações, os animais foram submetidos ao TSC e posteriormente ao TCA (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015) (**Figura 1E**).

Figura 1D. Protocolo para investigar o envolvimento da GSK-3 β no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.), LiCl (10 mg/kg, p.o., inibidor não seletivo da GSK-3 β) ou veículo ou ainda, uma associação de agmatina em sua dose sub-efetiva (0,0001 mg/kg) juntamente com uma dose sub-efetiva de LiCl. Após 60 min, os camundongos foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

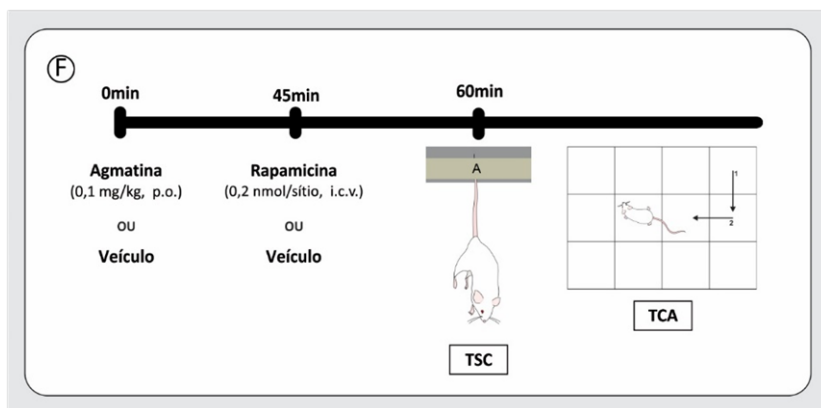
Figura 1E. Protocolo para reforçar o envolvimento de GSK-3 β no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) e após 45 min, receberam AR-A014418 (0,01 μ g/sítio, i.c.v., inibidor seletivo da GSK-3 β). Decorridos 15 min dessa última administração os animais foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

Com o intuito de avaliar a participação da mTOR no efeito anti-impulsividade da agmatina no TSC, os animais foram tratados com essa amina, e após 45 min receberam rapamicina (inibidor seletivo da mTOR, 0,2 nmol/sítio). O TSC foi realizado 15 min após a administração de rapamicina, e após 10 min desse teste os animais foram submetidos ao TCA (MORETTI *et al.*, 2014) (**Figura 1F**).

Figura 1F. Investigação do envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



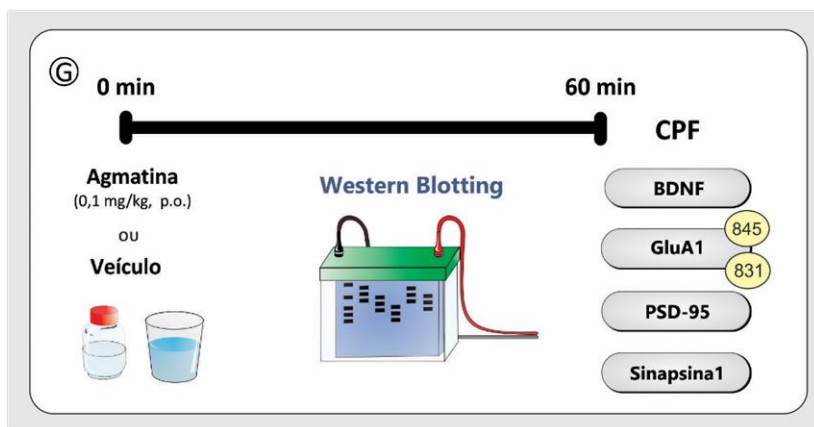
Legenda: Os animais receberam uma administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois receberam rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.). Após 15 min, os camundongos foram submetidos ao TSC e TCA. Fonte: autor.

As doses utilizadas no presente estudo foram escolhidas com base em estudos prévios do nosso grupo: agmatina (FREITAS *et al.*, 2014a; NEIS *et al.*, 2014), DNQX (CUNHA, M. P. *et al.*, 2016), LY2940029 (BETTIO *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2015), AR-A014418 (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015), LiCl (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015), anticorpo anti-BDNF (LEPACK *et al.*, 2015) e rapamicina (BETTIO *et al.*, 2012; MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015).

Após os testes comportamentais, um grupo independente de camundongos foi utilizado para as análises bioquímicas. Os animais foram tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo (água destilada) e após 60 min foram decapitados para retirada do córtex pré-frontal e análise do imunocontéudo das proteínas BDNF, sinapsina 1, GluA1 e

PSD-95 além da fosforilação dos resíduos de Serina 831 e 845 da subunidade GluA1 dos receptores AMPA (**Figura 1G**).

Figura 1G. Protocolo para investigar o imunocntéudo das proteínas GluA1, PSD-95 e sinapsina no córtex pré-frontal dos camundongos tratados com agmatina



Legenda: Para as análises bioquímicas, os animais receberam uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 60 min depois foram decapitados para retirada do córtex pré-frontal. Nessa estrutura, foi avaliado o imunocntéudo das proteínas BDNF, sinapsina 1 e PSD-95, além da fosforilação dos sítios da subunidade GluA1 do receptor AMPA (GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845). Abreviaturas: CPF, córtex pré-frontal; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; PSD-95, proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa. Fonte: autor.

1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

1.4.1. *Teste de suspensão pela cauda (TSC)*

O tempo de imobilidade dos animais foi avaliado no TSC durante um período de 6 minutos, conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.2. *Teste do campo aberto (TCA)*

Os camundongos foram avaliados no TCA a fim de descartar alterações na atividade locomotora como uma possível interferência na interpretação dos resultados obtidos no TSC (MORETTI *et al.*, 2012; NEIS *et al.*, 2014). O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

1.5.1. *Preparação do tecido*

Para as análises bioquímicas, um grupo independente de animais foi utilizado para investigar o imunoconteúdo de BDNF, PSD-95, sinapsina 1 e subunidade GluA1 dos receptores AMPA bem como a fosforilação nos sítios Serina831 (GluA1–Ser831) e Serina845 (GluA1–Ser845). Para isso, os animais foram tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), e após 1 h foram decapitados. Após a decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e os córtices pré-frontais foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases Amresco número M222). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante foi diluído 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8% e aquecido a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. O restante da amostra foi diluído (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8) em uma proporção de 1:4 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final de 8%) foi adicionado na amostra. O conteúdo das proteínas foi estimado a partir de uma curva padrão, utilizando albumina de soro bovino (PETERSON, 1977).

1.5.2. Western Blotting

A mesma quantidade de proteínas (60 µg de proteína total/poço) em cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5%.

Após esse processo, as membranas resultantes foram bloqueadas durante 1 h com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforiladas (sítios Serina831 e Serina845) e total de GluA1 (Cell Signaling, 1:1000) e o imunoconteúdo de BDNF, PSD-95, sinapsina 1 e GluA1 (Santa Cruz, 1:1000) foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5). As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Millipore 1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T.

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O nível de fosforilação de Serina831 (GluA1– Ser831) e Serina845 (GluA1–Ser845) foi determinado pela razão entre a DO da proteína fosforilada / DO da proteína total. O imunoconteúdo das proteínas BDNF, PSD-95, sinapsina 1, GluA1 e β-actina foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da β-actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). A DO das bandas foi quantificada usando Scion Image TM (Frederick, MD, USA).

1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através de ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Duncan quando apropriado (para as análises comportamentais) ou do teste t de

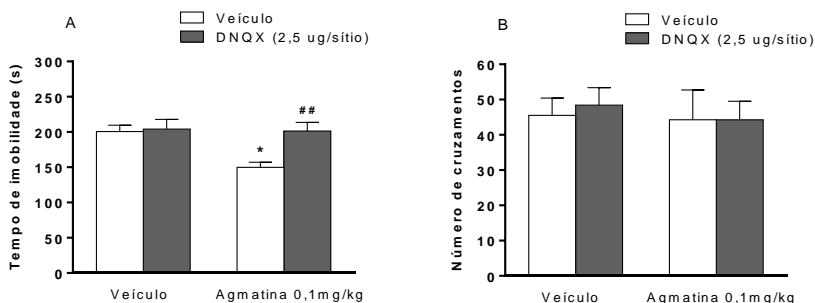
Student (para as análises de *Western blotting*). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.).

2. RESULTADOS

Para avaliar o envolvimento de diferentes receptores e alvos intracelulares no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, foi mensurado o tempo de imobilidade dos animais no TSC (**Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**) e com o intuito de excluir a possibilidade de que as alterações nesse tempo de imobilidade fossem devido a alguma interferência na atividade locomotora, foi mensurado o número de cruzamentos no TCA (**Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8**).

A **Figura 2A** mostra a influência do tratamento com DNQX (antagonista de receptores AMPA, 2,5 µg/sítio, i.c.v.) no efeito anti-imobilidade da agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,25)=6,07$; $p < 0,05$], DNQX [$F(1,25)=6,50$; $p < 0,05$] e interação entre agmatina x DNQX [$F(1,25)=4,95$; $p < 0,05$]. O *post hoc* indica que o tratamento com DNQX foi capaz de prevenir a diminuição da imobilidade induzida pela agmatina no TSC. A **Figura 2B** mostra que o tratamento não causou alterações na atividade locomotora dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,26)=0,19$; $p=0,67$], DNQX [$F(1,26)=0,06$; $p=0,81$], e interação agmatina x DNQX [$F(1,26)=0,05$; $p=0,82$].

Figura 2. Influência de receptores AMPA no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC

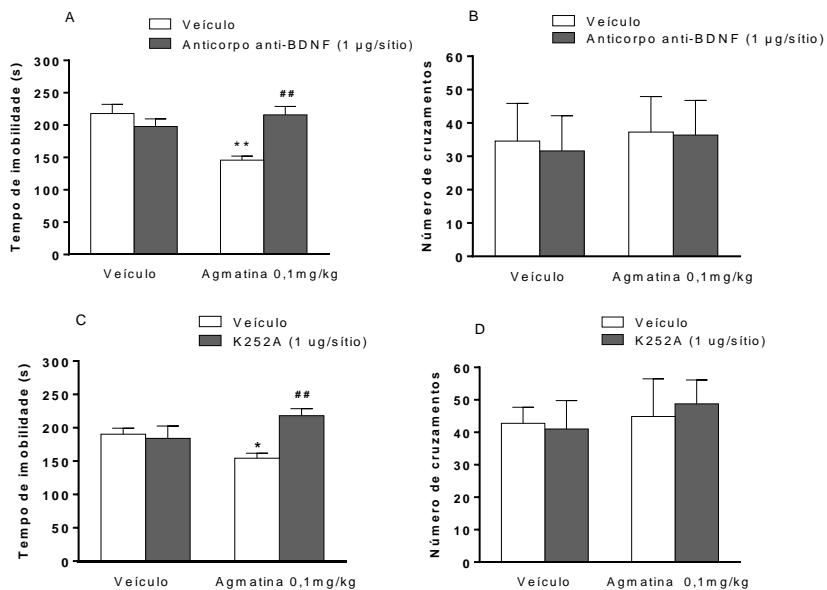


Legenda: Efeito do tratamento com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e/ou DNQX (2,5 µg/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). * $p < 0,05$ comparado com controle (H₂O + Veículo). ## $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com Agmatina+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan).

Para confirmar a hipótese de que a sinalização BDNF/TrkB está envolvida no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC, a **Figura 3A** mostra que o tratamento dos animais com o anticorpo anti-BDNF (1 µg/sítio, i.c.v.) foi capaz de prevenir o efeito anti-imobilidade induzido pela agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,26)=5,21$; $p < 0,05$], anti-BDNF [$F(1,26)=4,48$; $p < 0,05$] e interação agmatina x anti-BDNF [$F(1,26)=14,48$; $p < 0,01$]. Nenhum dos tratamentos causou alteração na atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 3B**). A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas entre o tratamento com agmatina [$F(1,26) = 0,12$; $p = 0,73$], anti-BDNF [$F(1,26) = 0,03$; $p = 0,86$], e interação entre agmatina x anti-BDNF [$F(1,26)=0,01$; $p = 0,92$]. Além disso, a **Figura 3C** mostra a influência do tratamento com K-252a (antagonista de receptores TrkB, 1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito anti-imobilidade da agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento K-252a [$F(1,27)=6,07$; $p < 0,05$] e interação entre agmatina x K-252a [$F(1,27)=8,91$; $p < 0,01$] mas não com agmatina [$F(1,27)=0,01$; $p = 0,93$]. A análise do *post hoc* mostrou que a administração de K-252a aboliu a resposta comportamental da agmatina no TSC. O número de cruzamentos no TCA não foi alterado por nenhum dos tratamentos (**Figura 3D**). A

ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças no tratamento com agmatina [$F(1,27)=0,02$; $p=0,90$], K-252a [$F(1,27)=0,35$; $p=0,56$], e interação entre agmatina x K-252a [$F(1,27)=0,11$; $p=0,74$].

Figura 3. Envolvimento do BDNF e de seus receptores TrkB no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC

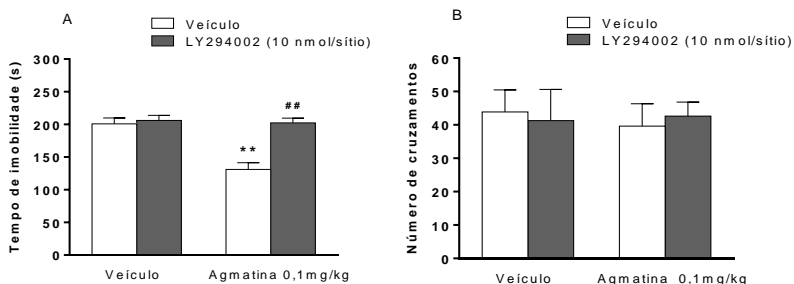


Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e/ou anticorpo anti-BDNF (1 µg/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). Painéis C e D: Efeito do tratamento com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e/ou K252A (1 µg/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel C) e no número de cruzamentos no TCA (painel D). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). * $p<0,05$ comparado com controle ($H_2O + Veículo$). ## $p<0,01$ comparado com o grupo tratado com Agmatina+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan).

A **Figura 4A** mostra o efeito da inibição de PI3K por LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.) no efeito tipo-antidepressivo da agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,28)=17,98$; $p<0,01$],

LY294002 [F(1,28)=19,48; $p<0,01$] e interação entre agmatina x LY294002 [F(1,28)=14,39; $p<0,01$]. A análise do *post hoc* mostrou que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina foi completamente prevenido pelo tratamento com LY294002. Os tratamentos não causaram alterações na atividade locomotora dos animais no TCA, conforme ilustrado na **Figura 4B**. A ANOVA de duas vias mostrou que não existem diferenças significativas para o tratamento com agmatina [F(1,28)=0,04; $p=0,84$], LY294002 [F(1,28)=0,001; $p=0,98$], e interação entre agmatina x LY294002 [F(1,28)=0,16; $p=0,69$].

Figura 4. Envolvimento da PI3K no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC

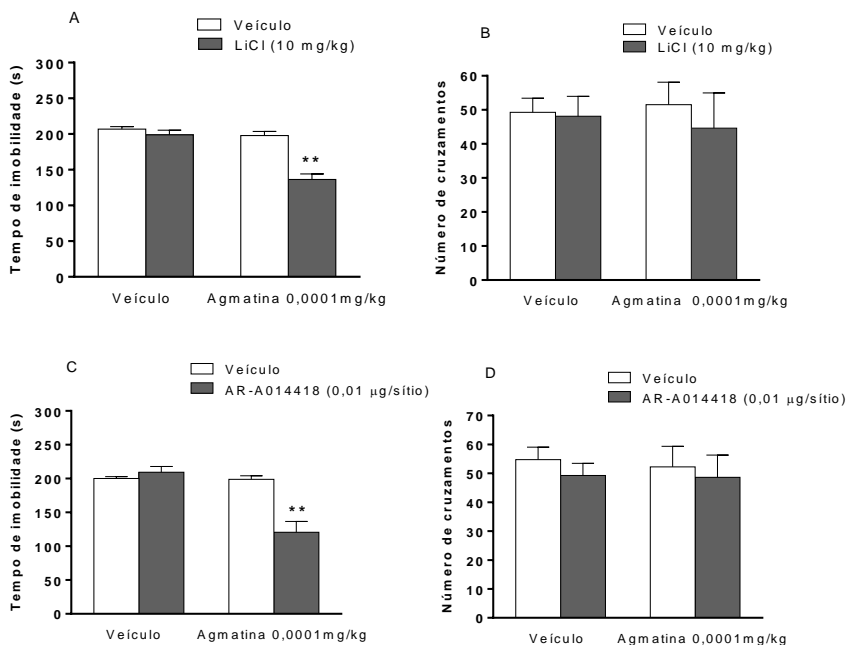


Legenda: Efeito do tratamento com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e/ou LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). ** $p<0,01$ comparado com controle (H₂O + Veículo). ## $p<0,01$ comparado com o grupo tratado com Agmatina+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan).

Para testar a hipótese de que a GSK-3 β está envolvida no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC, os animais foram tratados com doses sub-efetivas de agmatina (0,0001 mg/kg,p.o.) juntamente com doses sub-efetivas de LiCl (inibidor não seletivo da GSK-3 β , 10 mg/kg,p.o.) no TSC, como ilustrado na **Figura 5A**. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [F(1,28)=34,05; $p<0,01$], LiCl [F(1,28)=32,40; $p<0,01$] e interação entre agmatina x LiCl [F(1,28)=19,06; $p<0,01$]. A análise de *post hoc* indicou que o tratamento com doses sub-efetivas de agmatina produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico quando administrada em conjunto com doses sub-efetivas de LiCl no TSC. A administração de LiCl sozinho ou

em combinação com a agmatina não foi capaz de afetar a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 5B**). A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas no tratamento com agmatina [$F(1,28)=0,01$; $p=0,93$], LiCl [$F(1,28)=0,32$; $p=0,58$], e interação entre agmatina x LiCl [$F(1,28)=0,16$; $p=0,69$]. A **Figura 5C** ilustra o efeito da administração combinada de doses sub-efetivas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) com doses sub-efetivas de AR-A014418 (inibidor seletivo de GSK-3 β , 0,01 mg/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,28)=22,30$; $p<0,01$], AR-A014418 [$F(1,28)=13,01$; $p<0,01$] e interação entre agmatina x AR-A014418 [$F(1,28)=21,08$; $p<0,01$]. Como mostrado na Figura 5, o teste *post-hoc* indica que a administração combinada de doses sub-efetivas de agmatina com doses sub-efetivas AR-A014418 produz um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC. A administração de AR-A014418 sozinho ou em combinação com agmatina não afetou a atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 5D**). A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa para o tratamento com agmatina [$F(1,28)=0,07$; $p=0,80$], AR-A014418 [$F(1,28)=0,57$; $p=0,46$], ou a interação entre agmatina x AR-A014418 [$F(1,28)=0,02$; $p=0,88$].

Figura 5. Envolvimento da GSK-3 β no efeito anti-imobilidade da agmatina no TSC

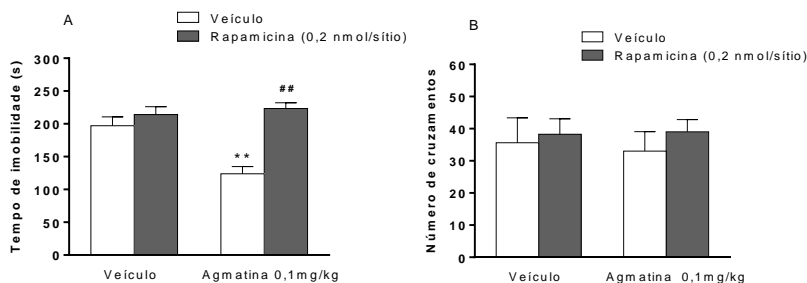


Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) e/ou LiCl (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). Painéis C e D: Efeito do tratamento com agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) em conjunto com AR-A014418 (0,01 µg/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel C) e no número de cruzamentos no TCA (painel D). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). ** $p < 0,01$ comparado com controle (H₂O + Veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan).

A fim de investigar o papel da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC, os animais foram tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e rapamicina (inibidor da mTOR, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com agmatina [$F(1,28)=7,64$; $p < 0,01$], rapamicina [$F(1,28)=25,47$; $p < 0,01$] e interação entre agmatina x rapamicina [$F(1,28)=12,71$; $p < 0,01$]. Como demonstrado na **Figura 6A**, a análise do *post hoc* mostrou que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina foi completamente abolido pelo tratamento dos animais com

rapamicina. Os tratamentos não causaram alterações na atividade locomotora dos animais no TCA (**Figura 6B**). A ANOVA de duas vias mostrou que não houve alteração significativa no tratamento com agmatina [$F(1,28)=0,03$; $p=0,87$], rapamicina [$F(1,28)=0,55$; $p=0,46$], e interação entre agmatina x rapamicina [$F(1,28)=0,08$; $p=0,77$].

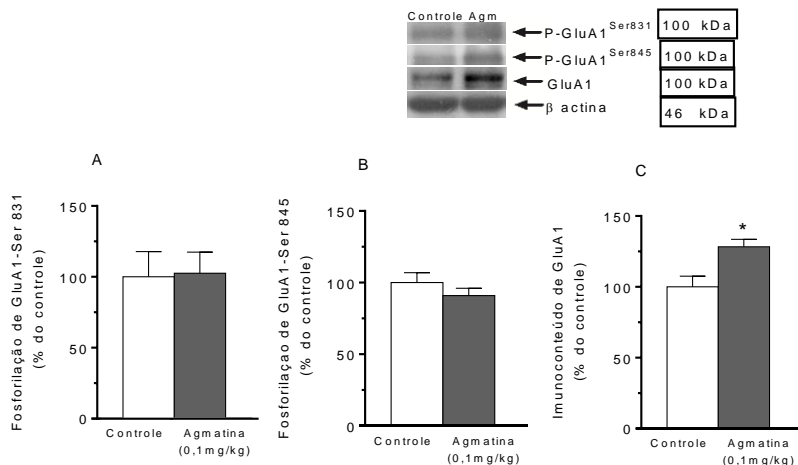
Figura 6. Envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC



Legenda: Efeito do tratamento com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) e/ou rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). ** $p<0,01$ comparado com controle (H_2O + Veículo). ## $p<0,01$ comparado com o grupo tratado com Agmatina+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan).

O imunocontéudo e fosforilação de GluA1 (tanto no sítio de fosforilação GluA1–Ser831 como no GluA1–Ser845) foi investigado no córtex pré-frontal 1 h após a administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o., dose que produz efeito tipo-antidepressivo no TSC) por *Western blotting*. A **Figura 7** mostra um *Western blotting* representativo da fosforilação de GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 no córtex pré-frontal (painéis A e B, respectivamente) e do imunocontéudo de GluA1 no córtex pré-frontal (painel C) de camundongos tratados com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.). A análise densitométrica revelou que a agmatina foi capaz de aumentar o imunocontéudo de GluA1 ($[t(12)=-3,0626$; $p<0,05$]), mas não houve alteração significativa na fosforilação de GluA1–Ser831 ($[t(12)=-0,1476$; $p>0,05$) e de GluA1–Ser845 ($[t(12)=1,1089$; $p>0,05$) no córtex pré-frontal dos camundongos (**Figura 7**) (teste t de Student).

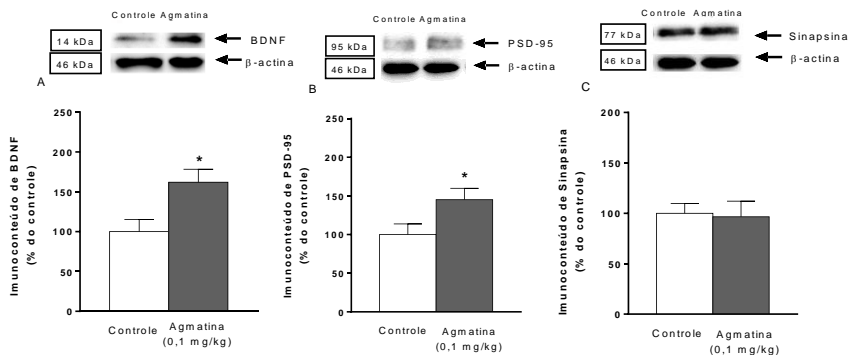
Figura 7. Influência de uma única administração de agmatina na fosforilação e imunoc conteúdo de GluA1 no córtex pré-frontal de camundongos



Legenda: Efeito do tratamento agudo com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no imunoc conteúdo de GluA1 e fosforilação das subunidades Serina831 e Serina845 no córtex pré-frontal de camundongos. Os painéis A–C mostram a quantificação da fosfo-GluA1–Ser831 (painel A), fosfo-GluA1–Ser845 (painel B) e imunoc conteúdo total de GluA1 e β-actina (painel C) (usado como controle). As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). * $p < 0,05$ comparado com controle (H₂O + Veículo) (teste t de Student).

Posteriormente, foi avaliado o imunoc conteúdo de BDNF, PSD-95 e sinapsina 1 no córtex pré-frontal dos animais após 1 h da administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.). A **Figura 8** mostra um *Western blotting* representativo do imunoc conteúdo de BDNF, PSD-95 e sinapsina 1 no córtex pré-frontal dos animais (painéis A, B e C, respectivamente). A análise densitométrica revelou que a agmatina foi capaz de aumentar o imunoc conteúdo de BDNF ([$t(12) = -2,77$; $p < 0,05$]) e PSD-95 ([$t(12) = -2,25$; $p < 0,05$]), como demonstrado nas **Figuras 8A e 8B**, respectivamente. No entanto, não houve alteração no imunoc conteúdo de sinapsina 1 ([$t(12) = 0,18$; $p = 0,86$]) em nenhum dos grupos experimentais, como observa-se na **Figura 8C**.

Figura 8. Influência de uma única administração de agmatina no imunoconteúdo de PSD-95, BDNF e sinapsina 1



Legenda: Efeito do tratamento agudo com agmatina (0,1 mg/kg, p.o.) no imunoccontento de BDNF (painel A), PSD-95 (painel B) e sinapsina I (painel C) no córtex pré-frontal de camundongos. As barras representam a média + E.P.M. (N = 7-8). * $P < 0.05$ comparado com controle (H_2O + Veículo) (teste t de Student).

3. DISCUSSÃO

Evidências mostram que alguns alvos que atuam na transmissão glutamatérgica, principalmente antagonizando receptores NMDA podem ser efetivos para o tratamento da depressão. Nesse sentido, um composto que tem recebido atenção especial quanto ao seu potencial efeito tipo-antidepressivo é a agmatina. Considerada um neuromodulador em nível de SNC, ela possui uma série de funções biológicas, já descritas no presente trabalho. Apesar de se saber que os efeitos biológicos da agmatina dependem da ativação ou inibição de diversos receptores, incluindo o antagonismo de NMDA, as vias de sinalização envolvidas nesse efeito precisam ser melhor investigadas, inclusive pelo fato de que a resposta aos antidepressivos tem sido atribuída à ativação ou inibição de vias de sinalização intracelular (NICIU *et al.*, 2013a). Um composto que vem sendo bastante estudado quanto ao seu envolvimento na transmissão glutamatérgica é a cetamina, um antagonista de receptores NMDA que tem mostrado possuir efeito antidepressivo rápido e persistente. No entanto, esse composto apresenta uma série de efeitos colaterais, tanto psicomiméticos quanto dissociativos, além de potencial de abuso, neurotoxicidade após tratamento crônico e dificuldade em sua utilização diária uma vez que as principais vias de administração

utilizadas são intravenosas e subcutâneas. Por esses motivos, alternativas consideradas mais seguras, mas que possuam similaridades quanto ao mecanismo de ação da cetamina vem sendo amplamente investigadas. Portanto, considerando o potencial antidepressivo da agmatina, sua toxicidade praticamente nula, e o fato de antagonizar receptores NMDA, este capítulo buscou investigar se vias de sinalização intracelular relacionadas com neuroplasticidade e sobrevivência celular e envolvidas nesse efeito antidepressivo rápido da cetamina (vias mediadas por BDNF/PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR e aumento do imunoconteúdo das proteínas BDNF, PSD-95 e sinapsina 1) poderiam estar também envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.

Uma série de evidências sugere que os receptores AMPA exercem um papel importante na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de antidepressivos (ZHANG *et al.*, 2010). Estudos mostram que moduladores positivos de receptores AMPA (potencializadores) são capazes de produzir um efeito tipo-antidepressivo no TNF e TSC (LI *et al.*, 2001; ALT, WITKIN e BLEAKMAN, 2005; ANDREASEN *et al.*, 2015), além de potencializar o efeito de antidepressivos monoaminérgicos (LI *et al.*, 2003; ANDREASEN *et al.*, 2013). Reforçando esses achados, camundongos com deleção da principal subunidade dos receptores AMPA (GluA1) exibiram um comportamento tipo-depressivo em testes comportamentais (CHOURBAJI *et al.*, 2008). Estudos mostram também que a ativação desses receptores está envolvida no efeito tipo-antidepressivo rápido de compostos com potencial antidepressivo (BJORKHOLM *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2015), no efeito antidepressivo após o tratamento crônico convencional (MARTINEZ-TURRILLAS, FRECHILLA e DEL RIO, 2002; BARBON *et al.*, 2011) e principalmente no efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012; TIZABI *et al.*, 2012). De fato, a redução da expressão de subunidades de receptores AMPA está envolvida com o prejuízo na plasticidade sináptica observada em pacientes com depressão (PLAYER *et al.*, 2013). Os resultados desse estudo estão de acordo com esses dados da literatura, uma vez que o tratamento com DNQX (antagonista de receptores AMPA) reverte a diminuição do tempo de imobilidade produzido pela agmatina no TSC, indicando que o efeito tipo-antidepressivo dessa amina endógena é dependente da ativação de receptores AMPA.

Sabe-se que a ativação de receptores AMPA leva ao aumento da expressão de BDNF, um dos maiores alvos envolvidos na resposta antidepressiva (ZAFRA *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 2001; SKOLNICK *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2008). A atividade desses receptores regula o

desenvolvimento de espinhos dendríticos (VOSS *et al.*, 2007; MATTISON *et al.*, 2014), bem como a neurogênese hipocampal adulta (SU *et al.*, 2009). Infusões dessa neurotrofina no mesencéfalo, hipocampo ou ventrículos laterais reduziram o tempo de imobilidade dos animais no TNF, de modo similar aos efeitos observados após a administração de antidepressivos convencionais (SIUCIAK *et al.*, 1997; HOSHAW, MALBERG e LUCKI, 2005). De acordo com esses achados, o efeito tipo-antidepressivo da administração hipocampal de BDNF é bloqueado pela administração de K252a, um inibidor dessa sinalização mediada por BDNF (SHIRAYAMA *et al.*, 2002). Quanto à modulação da sinalização via BDNF/TrkB pela agmatina, estudos prévios do nosso grupo já mostraram que a administração crônica dessa amina endógena foi capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo de camundongos (FREITAS *et al.*, 2014a; FREITAS *et al.*, 2015a). No estudo em questão, nós ampliamos essa relação entre BDNF e agmatina, mostrando que a administração aguda dessa amina no TSC depende da ativação de BDNF/TrkB. Além desses efeitos comportamentais, uma única dose de agmatina foi capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos apenas 1 h após sua administração. Reforçando esses achados, um estudo realizado posteriormente mostrou que a agmatina aumentou agudamente os níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos fêmeas (MEYLAN *et al.*, 2016). Além disso, os achados desse capítulo estão de acordo com estudos prévios que mostraram que uma única administração de LY451646, um potencializador de receptores AMPA, foi capaz de induzir o aumento agudo da expressão de BDNF no hipocampo de ratos (MACKOWIAK *et al.*, 2002). Sabe-se que um aumento rápido nos níveis de BDNF também está associado com o rápido efeito tipo-antidepressivo de antagonistas de receptores NMDA (AUTRY *et al.*, 2011), e parece exercer um papel importante nos efeitos sinaptogênicos da cetamina (LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2012). Nesse sentido, um estudo mostrou que a resposta antidepressiva da cetamina é abolida em camundongos *knockout* para BDNF e seu receptor TrkB (AUTRY *et al.*, 2011) e, de um modo geral, estudos sugerem que tanto antidepressivos convencionais quanto a cetamina aumentam a expressão de BDNF em diversas regiões cerebrais (AUTRY *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012) tornando-o uma ferramenta essencial para a eficácia antidepressiva. De modo interessante, nossos resultados indicam que a agmatina pode ser um modulador rápido da sinalização mediada por BDNF, indicando que esse composto deve ser investigado de modo mais aprofundado quanto às suas possíveis ações antidepressivas rápidas.

A sinalização BDNF/TrkB induz a ativação das vias de sinalização PI3K/Akt, que leva a fosforilação do resíduo de serina 9 de GSK-3 β , inibindo sua atividade (MAI, JOPE e LI, 2002). Existem diversas evidências que mostram o envolvimento da via PI3K/Akt/GSK-3 β na fisiopatologia dos transtornos de humor (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Essas vias de sinalização estão comprometidas no cérebro de pacientes suicidas em comparação com cérebros de indivíduos que não possuem o transtorno (KAREGE *et al.*, 2007; DWIVEDI *et al.*, 2008). De acordo com esses achados, inibidores de GSK-3 β possuem propriedades antidepressivas (GOULD *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2008), e potencializam os efeitos sinaptogênicos e tipo-antidepressivos da cetamina (LIU *et al.*, 2013), contribuindo para o efeito rápido desse composto (BEUREL, SONG e JOPE, 2011). Embora mais estudos sejam necessários para determinar os mecanismos envolvidos na indução da fosforilação de GSK-3 β (que levam a sua inibição) pela cetamina, especula-se que isso poderia estar ocorrendo via Akt, a principal reguladora de GSK-3 β que foi demonstrada ser ativada pela cetamina (LI *et al.*, 2010). A cetamina estimula rapidamente as cascatas de sinalização de PI3K/Akt (LI *et al.*, 2010) e também aumenta a fosforilação de GSK-3 β no hipocampo e córtex cerebral de camundongos (BEUREL, SONG e JOPE, 2011). Os resultados desse Capítulo indicam que a agmatina, de modo similar a cetamina, induz um comportamento tipo-antidepressivo que envolve a ativação de PI3K/Akt e inibição de GSK-3 β . De acordo com esses achados, estudos prévios do nosso grupo mostraram que a agmatina aumenta a fosforilação de Akt em neurônios hipocámpais (FREITAS *et al.*, 2015b) e que o tratamento sub crônico com agmatina produz um efeito tipo- antidepressivo no TSC, acompanhado pela modulação das vias de sinalização PKA/Akt/GSK-3 β /ERK/JNK/CREB/BDNF no hipocampo (FREITAS *et al.*, 2014a).

A mTOR faz parte da via de sinalização PI3K/Akt/GSK-3 β e tem sido implicada na fisiopatologia da depressão e no mecanismo envolvido no efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina (LI *et al.*, 2010). Estudos pós-morte mostraram déficits da sinalização mTOR no córtex pré-frontal de pacientes diagnosticados com depressão (JERNIGAN *et al.*, 2011; CHANDRAN *et al.*, 2013). Estudos clínicos mostram também que a mTOR é ativada no sangue de pacientes depressivos após administração aguda com cetamina (DENK *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2013). Além disso, os déficits nas proteínas sinápticas induzidos por ECI foram revertidos pela administração de cetamina, que através da ativação da mTOR, promove um aumento da síntese de proteínas sinápticas e consequente aumento no número e função de novas espinhas sinápticas

(LI *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que o déficit na fosforilação de mTOR e da síntese de proteínas dependentes de mTOR podem contribuir para alterações moleculares associadas com a fisiopatologia da depressão. Os nossos resultados sugerem que a ativação de mTOR, provavelmente decorrente da ativação de PI3K, tem um papel importante no efeito tipo-antidepressivo da agmatina no TSC.

A rápida ativação da mTOR resulta na rápida elevação de proteínas sinápticas e a modulação da sinaptogênese induzida pela cetamina também é mediada por reguladores importantes da estrutura sináptica e plasticidade como a subunidade GluA1 dos receptores AMPA, PSD-95 e sinapsina 1 (LI *et al.*, 2010). A importância dessas proteínas na fisiopatologia da depressão se confirma em estudos pós-morte que mostram que seus níveis estão reduzidos no córtex pré-frontal de indivíduos com depressão (FEYISSA *et al.*, 2009), alteração essa que está acompanhada por uma redução no número de sinapses desses indivíduos (KANG *et al.*, 2012). A PSD-95, uma das proteínas citoplasmáticas mais abundantes na densidade pós-sináptica, está envolvida na regulação da função sináptica e atua controlando a inserção de receptores AMPA nas sinapses (EHRlich e MALINOW, 2004; EHRlich *et al.*, 2007). De modo interessante, nesse estudo foi encontrado que a agmatina induz um aumento no imunoconteúdo de PSD-95 no córtex pré-frontal de camundongos apenas 1 h após sua administração, reforçando o fato de que a regulação dos níveis de proteínas sinápticas pode ter um papel importante em sua atividade antidepressiva. Esse resultado corrobora estudos prévios do nosso grupo, que mostraram que a administração de ácido ascórbico, que também possui potencial antidepressivo, aumenta o imunoconteúdo dessa proteína no hipocampo dos animais, 1 h após sua administração (MORETTI *et al.*, 2014).

A inserção de receptores AMPA na membrana pós-sináptica e ativação daqueles já inseridos na membrana dependem da fosforilação dos sítios Serina831 (GluA1–Ser831) ou Serina845 (GluA1–Ser845). De modo específico, a fosforilação de Ser845 na subunidade GluA1 causa a inserção dos receptores AMPA na membrana plasmática na região extra sináptica. Em seguida ocorre a fosforilação de GluA1–Ser831, que conduz o receptor até a região sináptica (ESTEBAN *et al.*, 2003; SANDERSON e DELL'ACQUA, 2011).

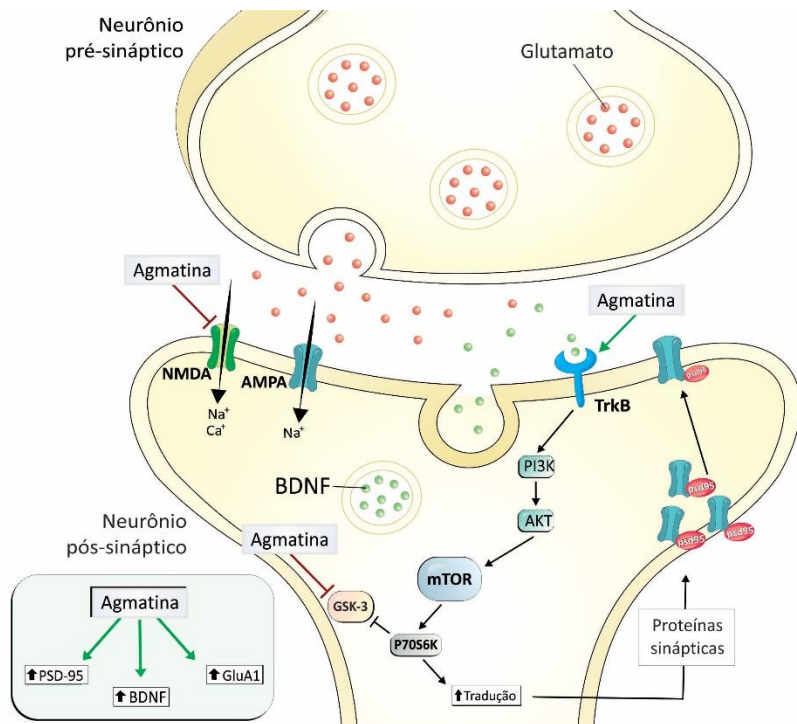
No nosso estudo, o tratamento com agmatina não alterou significativamente a taxa de fosforilação dos sítios Serina831 (GluA1–Ser831) ou Serina845 (GluA1–Ser845). No entanto, houve um aumento significativo na quantidade total de GluA1, sugerindo que a fosforilação desses resíduos na subunidade GluA1 estavam acompanhadas pelo

aumento dos níveis de proteínas sinápticas. Esses resultados indicam que o tratamento com agmatina estava associado com um aumento no número de moléculas GluA1 que estavam fosforiladas nos resíduos de Serina831 e Serina845, sugerindo um aumento da função do receptor AMPA. Sabe-se que o tratamento crônico com fluoxetina (28 dias), é capaz de aumentar os níveis da subunidade GluA1 no córtex de ratos bem como uma única administração de cetamina é capaz de exercer esse efeito (AMPUERO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Embora a administração da agmatina não tenha alterado significativamente o imunoconteúdo de sinapsina 1, não se descarta a possibilidade de que as alterações nos níveis dessas proteínas podem ocorrer em outras estruturas que não o córtex pré-frontal e/ou em períodos de tempo diferentes. Além disso, a cetamina e o zinco (antagonista de receptor NMDA dotado de propriedade antidepressiva) são capazes de induzir alterações nessa proteína sináptica com um pico de 2 a 6 h após sua administração, permanecendo elevados por 72 h e 24 h, respectivamente (LI *et al.*, 2010; SZEWCZYK *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÃO

Os resultados desse capítulo sugerem que a agmatina exerce um efeito tipo-antidepressivo através da ativação de receptores AMPA e TrkB. A ativação das vias PI3K/Akt/mTOR e inibição de GSK-3 β , resultando em um aumento dos níveis de proteínas sinápticas GluA1 e PSD-95 também são implicados no efeito tipo-antidepressivo da agmatina (**Figura 9**). Esses dados apontam para similaridades nos mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina e da cetamina. Considerando que a agmatina é uma amina endógena que não tem mostrado efeitos colaterais significativos em estudos clínicos, sendo utilizada na clínica como um suplemento nutricional, seu potencial terapêutico precisa continuar sendo investigado.

Figura 9. Resumo dos resultados encontrados no Capítulo II



Legenda: Os resultados desse capítulo mostram as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, 1 h após sua administração. Esses resultados indicam que os receptores AMPA e TrkB estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina. Além disso, a administração dessa amina endógena induz o aumento de BDNF, a ativação das vias PI3K/Akt/mTOR e inibição de GSK-3 β , resultando em um aumento dos níveis de proteínas sinápticas GluA1 e PSD-95. Abreviaturas: NMDA, N-metil-D-aspartato; AMPA, ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; TrkB, receptor tropomiosina cinase B; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; Akt, proteína cinase B; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; p70S6K, cinase ribossomal S6; GSK-3, glicogênio sintase cinase 3; PSD-95, proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa; GluA1, subunidade GluA1 do receptor AMPA. Fonte: Priscila Batista da Rosa.

CAPÍTULO III – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELO ECI

A exposição crônica ao estresse está implicada no surgimento de alterações moleculares, celulares e morfológicas, podendo levar a transtornos de humor (DURIC e DUMAN, 2013; KUMAR *et al.*, 2013) como a depressão. Sabe-se que o estresse pode causar anormalidades no eixo HPA, culminando na produção de glicocorticoides pelas adrenais, que ativam seus receptores (LI *et al.*, 2012). A superativação desses receptores induz neurotoxicidade e neurodegeneração, que estão intimamente relacionados com a depressão (CHARNEY e MANJI, 2004). Um modelo de depressão que mimetiza essas alterações é o ECI, que vem sendo utilizado há mais de 20 anos e consiste na exposição dos animais a diversos estressores por um determinado período de tempo (varia de 10 dias até 8 semanas) (HILL *et al.*, 2012). O modelo possui validade de face, constructo, preditiva e etiológica, podendo causar, além de alterações comportamentais e cognitivas, redução na expressão de proteínas sinápticas como PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 no córtex pré-frontal de roedores (XU *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2016).

Estudos mostram que a cetamina é capaz de reverter os efeitos prejudiciais induzidos pelo estresse através da modulação de vias de sinalização críticas para a sinaptogênese. O estudo das propriedades antidepressivas desse agente farmacológico indica sua capacidade de desencadear uma liberação rápida de fatores tróficos (particularmente o BDNF), estimulação da mTOR e consequente síntese de proteínas sinápticas como a PSD-95, a sinapsina 1 e a subunidade GluA1 de receptores AMPA no córtex pré-frontal dos animais (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). Levando em consideração os efeitos da agmatina na modulação de fatores tróficos e a observação de que existem diversas similaridades entre as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da agmatina e no efeito antidepressivo rápido da cetamina (dados mostrados no Capítulo II), este capítulo realizou uma análise comparativa da ação tipo-antidepressiva da agmatina com a de um antidepressivo convencional de resposta lenta (fluoxetina) e um de ação rápida (cetamina) em animais submetidos ao modelo de ECI. Esse estudo pretende verificar as possíveis similaridades e/ou diferenças nas respostas comportamentais a estes compostos e sobre o imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica (PSD-95, GluA1 e

sinapsina 1) em camundongos submetidos ao ECI e tratados com uma dose única de agmatina, cetamina ou fluoxetina.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. ANIMAIS















Considerando que a prevalência da depressão é aproximadamente duas vezes maior em mulheres do que em homens (WONG e LICINIO, 2001), e que as fêmeas são mais suscetíveis ao estresse do que os machos (YOSHIMURA *et al.*, 2003), esse estudo foi realizado com camundongos Swiss fêmeas (30–40 g). Os animais foram mantidos a uma temperatura de 20–22 °C com água e comida a vontade, sob um ciclo claro escuro de 12 h. Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h, sendo que os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 h antes dos testes comportamentais. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) (protocolo n° 00795) e esforços foram realizados para minimizar o sofrimento bem como reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS

Foram utilizados os seguintes compostos: agmatina (0,1 mg/kg), cetamina (1 mg/kg, antagonista de receptores NMDA) e fluoxetina (10 mg/kg, ISRS), todos obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, dissolvidos em água destilada e administrados por via oral (p.o.). Os compostos foram preparados logo antes do tratamento e administrados em um volume de 10 ml/kg, e administrados em uma única dose aproximadamente 5 h após o último agente estressor (14° dia do protocolo). Os tratamentos e testes realizados estão esquematizados na **Figura 1A**.

suas caixas nas condições padrão previamente descritas (seção 1.1). No último dia do protocolo, os animais receberam uma única administração de veículo, agmatina, fluoxetina ou cetamina e, após 24 h foram realizados os testes comportamentais e coletadas as amostras de hipocampo.

Tabela 1. Estressores utilizados no protocolo de ECI

Tabela de estressores do protocolo de estresse crônico imprevisível (14 dias)							
Dia	Estressor	Duração	Hora do dia	Dia	Estressor	Duração	Hora do dia
1	Contenção 	1.5 h	14:00h	8	Choque inescapável (0.7 mA, 0.5 s/min) 	3 min	08:30h
2	Banho frio (15° C) 	10 min	09:30h	9	Banho frio (15° C) 	10 min	16:30h
3	Maravalha molhada/ Caixa inclinada (45°) 	24 h	10:30h	10	Maravalha molhada/ Caixa inclinada (45°) 	24 h	13:00h
4	Contenção no frio (8° C) 	7 min	05:30h	11	Choque inescapável (0.7 mA, 0.5 s/min) 	3 min	08:30h
5	Prendedor na cauda 	10 min	13:00h	12	Contenção no frio (8° C) 	7 min	10:00h
6	Nado forçado (25° C) 	6 min	14:00h	13	Prendedor na cauda 	10 min	14:30h
7	Contenção 	1.5 h	09:30h	14	Choque inescapável (0.7 mA, 0.5 s/min) 	3 min	08:30h

Legenda: Tabela contendo os estressores utilizados nos 14 dias de protocolo do ECI. Fonte: Imagem adaptada de Priscila Batista da Rosa.

Para a realização dos protocolos de confinamento, os animais foram colocados em dispositivos (semelhantes a tubos) plásticos individuais e fenestrados. Para a realização dos estressores nado forçado e banho frio, os animais foram colocados em um recipiente cilíndrico (diâmetro 10 cm, altura 25 cm) contendo 19 cm de água. O estressor relativo à maravalha molhada foi conduzido mediante exposição dos camundongos a um ambiente com substrato úmido (400 ml de água) mantido em uma inclinação de 45°. O choque nas patas foi aplicado dentro de um aparato que consiste em uma caixa plástica (50 x 25 x 25 cm) com uma parede de vidro. O piso do aparato consiste de barras paralelas de 10 mm onde os camundongos foram colocados, sendo os choques aplicados de forma aleatória (0,7 mA; 0,5 s/min) durante 3

minutos. A compressão da cauda foi realizada com um prendedor de roupas a 1 cm da base da cauda dos animais.

1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

1.4.1. *Teste de suspensão pela cauda (TSC)*

O tempo de imobilidade dos animais foi avaliado no TSC durante um período de 6 minutos, conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.2. *Teste do campo aberto (TCA)*

Os camundongos foram avaliados no TCA a fim de descartar alterações na atividade locomotora como uma possível interferência na interpretação dos resultados obtidos no TSC (MORETTI *et al.*, 2012; NEIS *et al.*, 2014). O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.3. *Teste de borrifagem de sacarose (TBS)*

O TBS consiste na borrifagem de uma solução de água contendo 10% de sacarose no dorso do camundongo (**Figura 1B**), seguida da alocação do mesmo em um funil de vidro, permitindo assim a observação do animal ($9 \times 7 \times 11$ cm). Devido à viscosidade da solução de sacarose, o animal tende a iniciar um comportamento de autolimpeza. Esse comportamento é considerado um indicador de autocuidado e comportamento motivacional, sintomas comparáveis à anedonia, que é um dos sintomas necessários para o diagnóstico da depressão em seres humanos (WILLNER, 2005; ISINGRINI *et al.*, 2010). Após a aplicação da solução de sacarose, a latência para o início da autolimpeza e o tempo total de autolimpeza foram contabilizados por um período de 5 minutos. O aparato utilizado foi limpo com uma solução de álcool 10% entre cada animal testado.

Figura 1B. Representação esquemática do Teste de borrifagem de sacarose (TBS)



Legenda: No TBS, uma solução de água contendo 10% de sacarose é borrifada no dorso do camundongo (A), e em seguida o animal é alocado em um funil de vidro que permite a observação do comportamento de autolimpeza (B). Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

1.5.1. Preparação do tecido

Após os testes comportamentais, os animais foram decapitados e foi retirado o córtex pré-frontal para investigar o imunoconteúdo de GluA1, PSD-95 e sinapsina 1 nessa estrutura. Após a decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e os córtices pré-frontais foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases Amresco número M222). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante foi diluído 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8% e aquecido a 100°C por 5 min. Após homogeneização, uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. O restante da amostra foi diluído (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8) em uma proporção de 1:4 (v/v) e β-

mercaptoetanol (concentração final de 8%) foi adicionado na amostra. O conteúdo das proteínas foi estimado a partir de uma curva padrão, utilizando albumina de soro bovino (PETERSON, 1977).

1.5.2. Western Blotting

A mesma quantidade de proteínas (60 µg de proteína total/poço) em cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5%.

Após esse processo, as membranas resultantes foram bloqueadas durante 1 h com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforiladas (sítios Ser831 e Ser845) e total de GluA1 (Cell Signaling, 1:1000) e o imunoc conteúdo de GluA1, PSD-95 e sinapsina 1 (Santa Cruz, 1:1000) foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5). As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Millipore 1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T.

A DO das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O imunoc conteúdo das proteínas GluA1, PSD-95, sinapsina 1 e β-actina foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da β-actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). A DO das bandas foi quantificada usando Scion Image TM (Frederick, MD, USA).

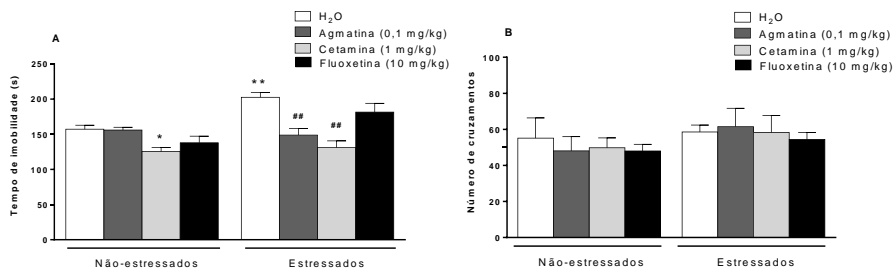
1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. Os dados foram apresentados nas figuras como média + EPM. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

2. RESULTADOS

A fim de comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina com um antidepressivo clássico e um antidepressivo de ação rápida, os animais foram submetidos ao protocolo de ECI e tratados com veículo, agmatina, cetamina ou fluoxetina 24 h antes de serem avaliados no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o protocolo de ECI [F(1,58)=15,00; $p < 0,01$], tratamentos [F(3,58)=14,68; $p < 0,01$], e interação entre ECI x tratamentos [F(3,58)=5,61; $p < 0,01$]. Como demonstrado na **Figura 2A**, a exposição ao ECI aumentou significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$). Esse aumento foi revertido pelos tratamentos com agmatina e cetamina (ambos $p < 0,01$), mas não com fluoxetina. Vale destacar que apenas o tratamento com cetamina foi capaz de induzir uma resposta tipo-antidepressiva em animais não submetidos ao ECI ($p < 0,05$). A avaliação da atividade locomotora dos animais (**Figura 2B**) não revelou diferenças estatisticamente significativas para o ECI [F(1,58)=2,22; $p = 0,14$], tratamentos [F(3,58)=0,18; $p = 0,91$] e interação ECI x tratamentos [F(3,58)=0,16; $p = 0,92$].

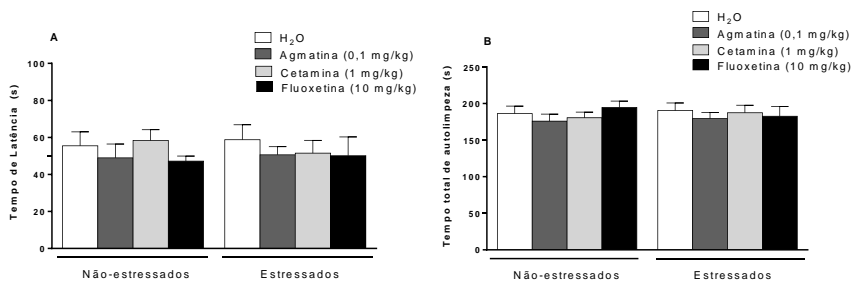
Figura 2. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TSC e TCA



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e atividade locomotora (painel B) de camundongos submetidos ou não ao ECI. Cada coluna representa a média + EPM (N = 7-9 animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

No que diz respeito à avaliação do comportamento anedônico dos animais, foi observada a latência e tempo de autolimpeza dos mesmos no TBS (Figura 3). A **Figura 3A** mostra a latência para o início do comportamento de autolimpeza no TBS, e a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas para o protocolo de ECI [$F(1,58)=0,002$; $p=0,96$], tratamento [$F(3,58)=0,70$; $p=0,55$] e interação ECI x tratamentos [$F(3,58)=0,24$; $p=0,87$]. Com relação ao tempo total de autolimpeza, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve alterações significativas para o protocolo de ECI [$F(1,59)=0,01$; $p=0,92$], tratamentos [$F(3,59)=0,54$; $p=0,65$] e interação ECI x tratamentos [$F(3,59)=0,37$; $p=0,77$], como ilustrado na **Figura 3B**.

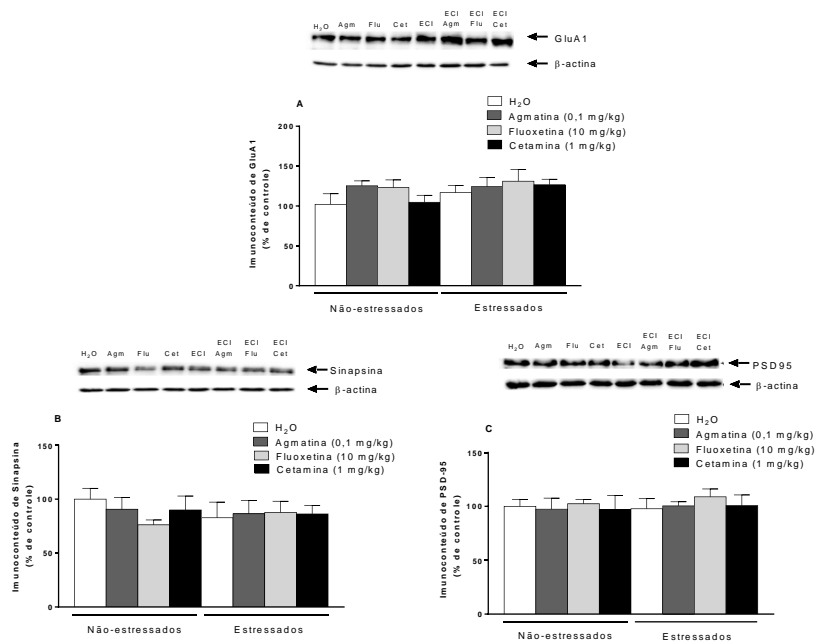
Figura 3. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TBS



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de latência (painel A) e tempo total de autolimpeza (painel B) de camundongos submetidos ou não ao ECI. Cada coluna representa a média + EPM (N = 7-9 animais por grupo).

Os efeitos do ECI e/ou tratamentos com uma única administração de agmatina, cetamina ou fluoxetina foram avaliados com relação ao imunocnteúdo de proteínas sinápticas (GluA1, PSD-95 e sinapsina 1) no córtex pré-frontal dos animais por *Western blotting*. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve alteração significativa no imunocnteúdo de GluA1 (protocolo de ECI $F(1,52)=2,09$; $p=0,15$, tratamento $F(3,52)=1,17$; $p=0,33$ e interação entre protocolo de ECI x tratamento $F(3,52)=0,43$; $p=0,73$; **Figura 4A**). De modo similar, não foram encontradas alterações significativas no imunocnteúdo de PSD-95 (protocolo de ECI $F(1,31)=0,22$; $p=0,64$; tratamento $F(3,31)=0,34$; $p=0,80$ e interação entre o protocolo de ECI x tratamento $F(3,31)=0,09$; $p=0,96$; **Figura 4B**) e sinapsina 1 (protocolo de ECI $F(1,47)=0,20$; $p=0,66$; tratamento $F(3,47)=0,28$; $p=0,84$ e interação entre protocolo ECI x tratamento $F(3,47)=0,60$; $p=0,62$; **Figura 4C**).

Figura 4. Comparação do efeito da agmatina, cetamina e fluoxetina sobre o imunoconteúdo de GluA1, sinapsina e PSD-95 no córtex pré-frontal dos camundongos



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, p.o.), ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) sobre o imunoccontento de GluA1 (painel A), sinapsina 1 (painel B), e PSD-95 (painel C) no córtex pré-frontal de camundongos. Os resultados são expressos como percentual do controle (média + E.P.M. de 4–8 camundongos; ANOVA de duas vias).

3. DISCUSSÃO

Esse capítulo teve como objetivo ampliar dados prévios do nosso grupo (Capítulos I e II) quanto ao efeito tipo-antidepressivo da agmatina e suas similaridades com o rápido efeito exercido pela cetamina, em um modelo de depressão que é classicamente responsivo apenas à administração crônica de antidepressivos convencionais (WILLNER, 2005; MORETTI *et al.*, 2012). Apesar de já ter sido demonstrado pelo nosso grupo que uma única administração desse composto é capaz de reverter alterações comportamentais e bioquímicas induzidas por um

estresse agudo (estresse de contenção) (FREITAS *et al.*, 2014b), nesse capítulo foi investigado se a agmatina, também com uma única administração, é capaz de reverter as alterações induzidas por um modelo de ECI.

O modelo do ECI foi desenvolvido numa tentativa de reproduzir um dos principais fatores ambientais relacionados com o desenvolvimento da depressão em seres humanos (WILLNER, 1997). Ele é amplamente utilizado e reconhecido na literatura, e resulta em diversas alterações comportamentais, incluindo o aumento do tempo de imobilidade dos animais no TSC (LU *et al.*, 2006; NIRMAL *et al.*, 2008; KUMAR, KUHAD e CHOPRA, 2011; MORETTI *et al.*, 2012; MANOSSO *et al.*, 2016). O TSC é um dos modelos mais frequentemente utilizados para avaliar propriedades antidepressivas de compostos (STERU *et al.*, 1985) bem como o efeito tipo-depressivo induzido pela administração de TNF- α (NEIS *et al.*, 2014) corticosterona (ROSA *et al.*, 2014; PAZINI *et al.*, 2015) LPS (GAWALI *et al.*, 2016a; ZHU *et al.*, 2016) MPP+ (MORETTI *et al.*, 2015b), bem como a exposição ao ECI (MORETTI *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2016) e estresse de contenção (SULAKHIYA *et al.*, 2016; BUDNI *et al.*, 2013). De fato, nesse capítulo observa-se que a exposição ao ECI foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos animais no TSC.

Com relação aos tratamentos, em relação ao grupo controle (não submetido ao ECI), os resultados obtidos demonstraram que apenas a cetamina apresentou comportamento tipo-antidepressivo 24 h após uma única administração. Esse achado corrobora estudos que mostram que esse composto é capaz de induzir um comportamento tipo-antidepressivo em roedores avaliados em testes preditivos de atividade antidepressiva como o TNF e o TSC (AUTRY *et al.*, 2011; LUDKA *et al.*, 2013). Com relação aos animais tratados com fluoxetina, de fato, não existem dados na literatura que mostrem ação prolongada (24h) desse antidepressivo após uma única administração. A ausência de efeito da agmatina administrada em camundongos corrobora estudos que mostram que a agmatina quando administrada em camundongos controle, não apresenta efeito tipo-antidepressivo 24 h após sua administração na mesma dose utilizada nesse estudo (MORETTI *et al.*, 2015b). Isso sugere que apesar de existirem similaridades entre o efeito tipo-antidepressivo da agmatina e cetamina, podem ser observadas também diferenças nos mecanismos de ação desses fármacos. Possivelmente uma das diferenças diz respeito ao fato de que a cetamina é metabolizada a norcetamina, que apresenta cerca de um terço da potência anestésica da própria cetamina, o que poderia de

certa forma explicar seu efeito duradouro (COHEN e TREVOR, 1974; DOMINO *et al.*, 1984).

Com relação aos animais submetidos ao ECI, uma única administração de agmatina foi capaz de reverter os efeitos comportamentais induzidos por esse modelo, de modo similar a cetamina. Levando em consideração que a fluoxetina não apresentou essa resposta antidepressiva, é razoável especular que esse efeito induzido pela agmatina esteja relacionado com o fato de que essa amina endógena apresenta mais similaridades com os antidepressivos de ação rápida (cetamina) do que com os antidepressivos convencionais monoaminérgicos (fluoxetina) no modelo utilizado neste estudo. Essa hipótese está de acordo com os resultados descritos no Capítulo II, que mostram que a sinalização da mTOR e receptores AMPA são ativados pela administração aguda de agmatina e que ela é capaz de aumentar agudamente a expressão de BDNF em camundongos fêmeas (MEYLAN *et al.*, 2016). Além disso, o fato da agmatina ter apresentado efeito tipo-antidepressivo apenas no grupo submetido ao ECI, corrobora estudos que mostram efeito tipo-antidepressivo de compostos administrados a animais que são previamente expostos a algum tipo de estresse, quando comparados com os não estressados (POLESZAK *et al.*, 2006; CAPRA *et al.*, 2010; NEIS *et al.*, 2014). No que diz respeito à cetamina, os dados apresentados corroboram estudos que mostram que a cetamina apresenta um efeito rápido e duradouro em protocolos não responsivos ao tratamento agudo com antidepressivos convencionais (LI *et al.*, 2011). De modo diferente da agmatina e da cetamina, a administração de fluoxetina não apresentou efeito tipo-antidepressivo no modelo. Esses resultados estão de acordo com estudos que mostram que a fluoxetina, quando utilizada em modelos animais de depressão, apresenta sua ação antidepressiva somente mediante administração crônica (7 a 21 dias) (GOURLEY *et al.*, 2008a; GOURLEY e TAYLOR, 2009; ROSA *et al.*, 2014). Considerando que a fluoxetina não apresentou efeito no modelo, os dados sugerem que essa abordagem pode ser uma ferramenta interessante para a investigação da eficácia de novos agentes moduladores do sistema glutamatérgico e a busca de novos antidepressivos que apresentem efeito rápido. É importante mencionar que nenhum dos tratamentos afetou a locomoção espontânea dos animais, excluindo a hipótese de que efeitos psicoestimulantes possam ser os responsáveis pelos efeitos comportamentais no TSC.

Além dessas alterações observadas no TSC, uma série de evidências mostra que o ECI diminui o consumo de sacarose e comportamento motivacional e de autocuidado, parâmetros esses

interpretados como um comportamento anedônico (GARCIA *et al.*, 2009; ISINGRINI *et al.*, 2010), um sintoma chave apresentado por pacientes com depressão (GOLD, 2015). Embora o comportamento anedônico seja observado em diversos modelos animais de depressão, em nosso estudo, essa alteração não foi observada. De fato, existem discrepâncias nos estudos que investigam modelos de estresse crônico principalmente entre laboratórios diferentes, o que pode estar relacionado a diferenças nas condições experimentais, incluindo a duração e intensidade de estressores, idade, sexo e linhagem dos animais, tempo de análise e outras variáveis nos protocolos, incluindo o próprio manejo dos animais (JACOBSON e CRYAN, 2007; GUPTA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016). Mais especificamente, a ausência desse comportamento anedônico nesses modelos pode estar relacionado a uma influência de sexo. De um modo geral, sabe-se que as diferenças entre os sexos podem ser encontradas em comportamentos de agressividade, aprendizado, exploração, consumo ou preferência de alimentos, novidade, comportamento emocional e muitos outros (GRAY, 1971; ARCHER, 1975). Um estudo prévio demonstrou que o aumento da preferência por sacarose induzida pela cetamina em ratos machos não foi reproduzível em ratos fêmeas (CARRIER e KABBAJ, 2013). Além disso, 7 semanas de estresse de isolamento na idade adulta demonstrou induzir um comportamento anedônico nos camundongos machos, mas esse comportamento não foi observado em fêmeas (SARKAR e KABBAJ, 2016). Outra explicação para os resultados encontrados é o fato de que foi utilizado um protocolo de estresse moderado (14 dias), enquanto a maioria dos estudos utiliza protocolos de maior duração (no mínimo 21 dias) (ABDUL SHUKKOOR *et al.*, 2016; HAZRA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017). Além disso, as linhagens de animais por si só podem mostrar variação comportamental fenotípica, influenciando nas respostas individuais (JACOBSON e CRYAN, 2007). Embora as razões para essas diferenças ainda não estejam totalmente compreendidas, podem estar relacionadas com a endogamia da colônia de camundongos utilizada, gerando uma resistência parcial aos efeitos deletérios da exposição ao estresse. Do ponto de vista genético, pequenas variações podem contribuir para alterações individuais, que, ao se tornarem dominantes podem modificar visivelmente o comportamento (JACOBSON e CRYAN, 2007).

Quanto às análises bioquímicas, sabe-se que em modelos de estresse como o ECI, espera-se encontrar uma diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais (LIU *et al.*, 2014; FILHO *et al.*, 2015), bem como redução de proteínas sinápticas (WANG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2016). No entanto,

essas alterações não foram observadas no estudo em questão, o que sugere que existe a necessidade de utilizar um modelo mais prolongado de estresse. Apesar de ter sido demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina envolve a ativação de AMPA e inibição de receptores NMDA, aumento rápido dos níveis de BDNF e estímulo da síntese de mTOR e de proteínas sinápticas (PSD-95 e GluA1) no córtex pré-frontal de camundongos, efeitos esses observados 60 minutos após a administração de agmatina (NEIS *et al.*, 2014; NEIS *et al.*, 2015; NEIS *et al.*, 2016b) (dados mostrados no Capítulo II), o tratamento dos animais com essa amina endógena não foi capaz de alterar o imunocontéudo das proteínas sinápticas avaliadas após 24 h no córtex pré-frontal dos camundongos após o protocolo de ECI. Esses achados reforçam a hipótese de que os efeitos tipo-antidepressivos observados no TSC podem estar relacionados com estimulação sináptica aguda, e esse efeito pode não ser mantido por muito tempo. Além disso, os achados divergem de outros estudos que mostram que a cetamina é capaz de aumentar os níveis de proteínas sinápticas em ratos no mesmo tempo investigado nesse estudo (24 h após sua administração) (HERMES *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011). Uma possível explicação para esses resultados envolve o fato de que os efeitos tipo-antidepressivos induzidos pela cetamina e agmatina no presente estudo foram consequência de alterações que ocorrem em tempos diferentes, que precederam a análise por *Western blotting*. Outra explicação envolve o fato de que nesse estudo foram utilizadas diferentes espécies (camundongos Swiss ao invés de ratos), diferentes doses (1 mg/kg ao invés de 10 mg/kg) e vias de administração (via oral ao invés de intraperitoneal). De fato, quando administrada por via oral, a biodisponibilidade da cetamina reduz consideravelmente, o que pode contribuir para a ausência de efeito (MION e VILLEVIEILLE, 2013). No entanto, não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de alterações sinápticas em outras estruturas cerebrais que não o córtex pré-frontal. Estudos prévios mostram que a cetamina aumenta rapidamente a subunidade GluA1 de receptores AMPA no hipocampo de roedores (NOSYREVA *et al.*, 2013). Com relação à fluoxetina, o fato dela não ter mostrado alteração no imunocontéudo de proteínas sinápticas está de acordo com dados da literatura que mostram que esse antidepressivo induz o aumento da subunidade GluA1 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos após, no mínimo, 7 dias de tratamento (BARBON *et al.*, 2011) e reverte a redução de PSD-95 e sinapsina 1 induzida por estresse crônico após utilizada por um período de 4 semanas (LIU *et al.*, 2015).

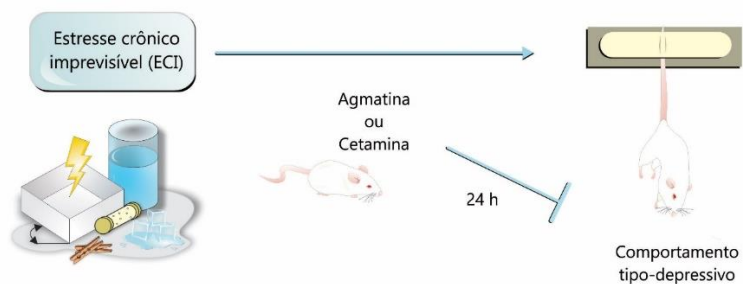
Apesar dessas limitações quanto à ausência de comportamento anedônico e alteração no imunocontéudo de proteínas sinápticas em

camundongos expostos ao ECI, os resultados mostraram claramente similaridades comportamentais entre os efeitos benéficos da agmatina e da cetamina no protocolo de ECI. Portanto, novos estudos são necessários para determinar se a cetamina e a agmatina são capazes de aumentar os níveis de proteínas sinápticas utilizando um protocolo de estresse, mas analisando outros períodos de tempo após o protocolo e tratamentos e/ou camundongos machos. Finalmente, não se descarta a possibilidade de que essas alterações possam estar ocorrendo em outras regiões cerebrais afetadas pelo ECI, como por exemplo, o hipocampo.

4. CONCLUSÃO

A identificação de antidepressivos que possuam ação rápida, porém sem apresentar os efeitos adversos da cetamina (efeitos psicomiméticos, tolerância e toxicidade) pode ser considerada um avanço significativo para o tratamento da depressão. Uma abordagem importante envolve a investigação de propriedades antidepressivas de compostos que apresentam similaridade com os mecanismos da cetamina. Nesse contexto, estudos recentes têm sugerido que a agmatina age como um modulador da plasticidade sináptica, de modo similar a cetamina. No estudo em questão, essa hipótese ganha força, uma vez que uma única administração de agmatina, de modo similar a cetamina, foi capaz de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pelo protocolo de ECI, enquanto a fluoxetina não foi responsiva (**Figura 5**). Embora não tenham sido encontradas alterações nos níveis de proteínas sinápticas avaliadas por *Western blotting* (GluA1, PSD-95 e sinapsina 1; 24 h após o tratamento) no estudo em questão, estudos futuros são necessários para elucidar se os efeitos comportamentais observados são uma consequência de alterações nas proteínas sinápticas em tempos diferentes daquele avaliado nesse estudo, bem como em outras estruturas cerebrais, em particular no hipocampo.

Figura 5. Resumo dos resultados encontrados no capítulo III



Legenda: O modelo do ECI induziu um aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC, caracterizando um comportamento tipo-depressivo. Tanto a agmatina quanto a cetamina, administradas agudamente 24 h antes dos testes comportamentais, foram capazes de reverter esse efeito. Fonte: Neis et al. (2016).

CAPÍTULO IV – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA, CETAMINA E FLUOXETINA NO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

Como mencionado anteriormente, episódios de estresse podem levar ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides, que pode resultar em uma desregulação do eixo HPA com consequente morte de neurônios hipocâmpais (NESTLER *et al.*, 2002). Esses glicocorticoides se ligam a receptores, os quais possuem alta densidade no hipocampo, tornando essa estrutura mais vulnerável a alterações na plasticidade sináptica e redução da neurogênese (MAGARINOS, VERDUGO e MCEWEN, 1997; SCHOENFELD e GOULD, 2012). De fato, um grande número de observações clínicas têm mostrado que a hipercortisolemia está presente em pacientes depressivos (MITANI *et al.*, 2006a; OBERLANDER *et al.*, 2008) e suicidas (KAMALI *et al.*, 2012). Com base nesta teoria envolvendo a hiperativação do eixo HPA, bem como alterações neuroendócrinas que estão relacionadas com a etiologia da depressão, a administração de doses repetidas de corticosterona vem sendo utilizada farmacologicamente como modelo pré-clínico de indução de comportamento tipo-depressivo. É importante ressaltar que esse modelo é responsivo apenas ao tratamento crônico (e não agudo) com antidepressivos clássicos (DWIVEDI, RIZAVI e PANDEY, 2006; GOURLEY e TAYLOR, 2009), o que permite avaliar abordagens farmacológicas mais rápidas do que as convencionais (LI *et al.*, 2011).

Uma série de estudos demonstrou que o estresse ou a exposição crônica a glicocorticoides diminui o número e o comprimento das espinhas dendríticas das células piramidais de CA3 (MAGARINOS *et al.*, 1996; DWYER e DUMAN, 2013), bem como de neurônios apicais do córtex pré-frontal de roedores submetidos a modelos de depressão (COOK e WELLMAN, 2004; RADLEY *et al.*, 2004). Esta atrofia nas espinhas dendríticas é acompanhada pela perda de proteínas chave para a transmissão sináptica, como a PSD-95, a subunidade GluA1 de receptores AMPA e a proteína sinapsina 1 (DUMAN, 2014). Dessa maneira, fármacos que modulem a expressão e síntese destas proteínas, aumentando a sinaptogênese, poderiam apresentar um efeito positivo no tratamento da depressão.

Considerando essa fundamentação teórica e os resultados obtidos no Capítulo III, o objetivo do presente Capítulo foi comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina com o da fluoxetina e da cetamina, dessa vez

em animais submetidos a um modelo farmacológico de depressão (que é realizado em um período maior de tempo quando comparado ao ECI) induzida pela administração de corticosterona. Esse estudo pretende verificar as possíveis similaridades ou diferenças no comportamento e imunocontéudo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica, incluindo PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 bem como fosforilação de p70S6K e dos sítios da subunidade GluA1 dos receptores AMPA (GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845) no hipocampo de camundongos tratados com uma dose única de agmatina, cetamina ou fluoxetina e submetidos ao modelo de depressão induzida corticosterona.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

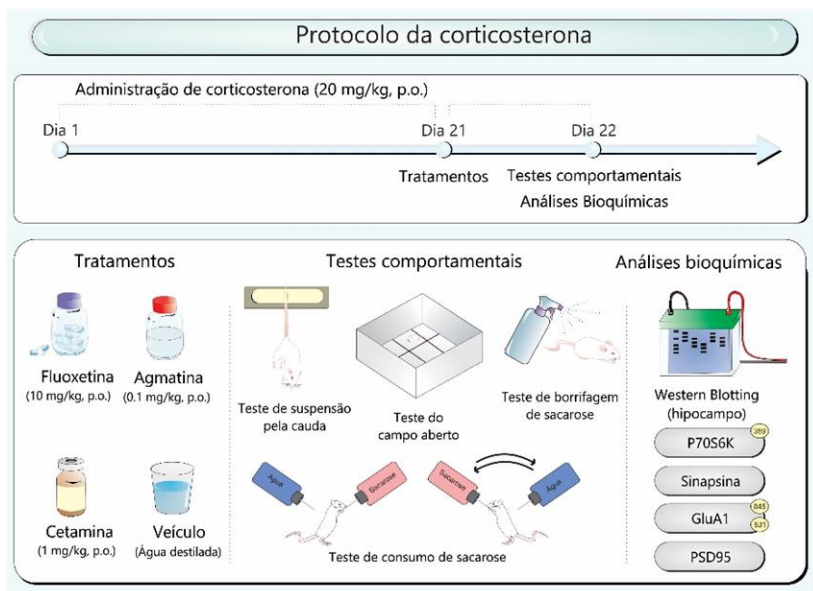
1.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (30–40 g), mantidos a uma temperatura de 20–22 °C com água e comida a vontade, sob um ciclo claro escuro de 12 h. Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h sendo que, os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 h antes dos testes comportamentais. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) (protocolo n° 00795) e todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento, bem como reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTOS

Agmatina (0,1 mg/kg), cetamina (1 mg/kg, antagonista de receptores NMDA), fluoxetina (10 mg/kg, ISRS) e corticosterona (20 mg/kg, p.o.) foram utilizados para a realização desse protocolo, sendo todos esses compostos obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. A agmatina e fluoxetina foram dissolvidas em água destilada e administradas por via oral (p.o.) enquanto a cetamina foi dissolvida em salina (0,9% NaCl) e administrada por via intraperitoneal. Os compostos foram preparados logo antes do tratamento e administrados em um volume de 10 ml/kg, e administrados em uma única dose no 21° dia do protocolo. A **Figura 1A** mostra uma representação esquemática do tratamento, testes comportamentais e análises bioquímicas realizadas.

Figura 1A. Representação esquemática do tratamento, testes comportamentais e análises bioquímicas realizadas



Legenda: O protocolo experimental foi realizado com o intuito de comparar os efeitos da administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no modelo de indução de estresse induzido pela administração crônica de corticosterona (21 dias). Os agentes farmacológicos a serem investigados foram administrados no último dia de cada protocolo e, após 24 h, os animais foram avaliados no TSC, TCA, no teste de borrifagem de sacarose (TBS) e no teste de consumo de sacarose (TCS). Após a realização dos testes comportamentais, foram coletadas amostras de hipocampo dos camundongos para avaliar o imunoconteúdo de proteínas sinápticas nessa estrutura. Fonte: Adaptado de NEIS *et al.* (2016a).

1.3. MODELO DE ESTRESSE INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERONA

Nesse modelo, os animais foram administrados com corticosterona por 21 dias, período de tempo superior àquele utilizado no ECI (14 dias). Por ser um insulto estressor mais pronunciado, a administração crônica do glicocorticoide corticosterona permite, além do estudo dos efeitos de níveis elevados desse hormônio sobre o

comportamento (GREGUS *et al.*, 2005), a investigação de alterações na expressão de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica que não seriam modificados em outros modelos baseados na indução do estresse (NACHER *et al.*, 2004). Portanto, com o intuito de expandir o estudo dos efeitos da administração de uma única dose de agmatina, fluoxetina ou cetamina no comportamento e imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica em um modelo de depressão, os animais foram submetidos ao protocolo de administração crônica de corticosterona, o qual consistiu na administração de uma dose diária desse glicocorticoide (20 mg/kg, p.o.) durante 21 dias, conforme previamente descrito (ROSA *et al.*, 2014). Os animais do grupo controle foram mantidos em câmaras separadas dos animais tratados com corticosterona, em condições padrão de biotério previamente descritas (seção 1.1). No último dia do protocolo, os animais receberam uma única administração de veículo, agmatina, cetamina ou fluoxetina e, após 24 h foram realizados os testes comportamentais e coletadas as amostras de hipocampo.

1.4. TESTES COMPORTAMENTAIS

1.4.1. *Teste de suspensão pela cauda (TSC)*

O tempo de imobilidade dos animais foi avaliado no TSC durante um período de 6 minutos, conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.2. *Teste do campo aberto (TCA)*

Os camundongos foram avaliados no TCA a fim de descartar alterações na atividade locomotora como uma possível interferência na interpretação dos resultados obtidos no TSC (MORETTI *et al.*, 2012; NEIS *et al.*, 2014). O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.3. *Teste de borrifagem de sacarose (TBS)*

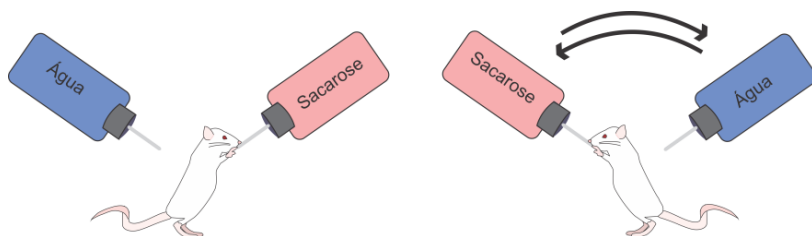
Os camundongos foram avaliados nesse teste durante 5 minutos para verificar o comportamento motivacional relacionado à anedonia dos

animais. O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 2 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.4.4. Teste de consumo de sacarose (TCS)

A diminuição no consumo de sacarose (uma solução altamente palatável) no TCS é considerada um forte indicador de anedonia (WEISS, 1997). Em vista disso, um grupo adicional de camundongos expostos ao mesmo protocolo de tratamento foi utilizado para avaliar o efeito da agmatina, cetamina e fluoxetina sobre o comportamento anedônico induzido pela administração de corticosterona. Para tanto, os camundongos foram acondicionados pelo período de 24 h em caixas individuais contendo duas garrafas, uma com água e outra com solução contendo 2% de sacarose (TAKATSU-COLEMAN *et al.*, 2013). Para prevenir um possível efeito de preferência por algum dos lados da caixa, as garrafas foram invertidas após um período de 12 h. O consumo de sacarose foi calculado como a porcentagem de consumo da solução de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose). A diminuição do consumo de sacarose, uma solução altamente palatável para os animais, é considerada como um indicador de comportamento anedônico (WEISS, 1997).

Figura 1B. Teste de consumo de sacarose (TCS)



Legenda: No teste de consumo de sacarose os animais são alocados individualmente em caixas contendo uma garrafa com água e outra com solução de sacarose (2%). O consumo de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose) foi avaliado após 24 h. As garrafas foram invertidas de posição para evitar a preferência por um dos lados da caixa. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

1.5.1. *Pesagem das adrenais*

Além da retirada do encéfalo e posteriormente do hipocampo dos animais, após a decapitação foram retiradas e pesadas as adrenais, a fim de verificar se havia alteração no peso dessas estruturas após a administração de corticosterona por 21 dias ou tratamentos com agmatina, cetamina ou fluoxetina. A análise do peso da estrutura permite avaliar se existe uma atrofia nas adrenais decorrente de alterações no eixo HPA dos animais. O peso das adrenais foi expresso em relação ao peso corporal do animal.

1.5.2. *Preparação do tecido*

Após os testes comportamentais, os animais foram decapitados e foi retirado o hipocampo para investigar o imunoconteúdo de PSD-95, GluA1 e sinapsina 1, bem como fosforilação de p70S6K (sítio Thr389) e dos sítios da subunidade GluA1 (GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845) nessa estrutura. Depois da decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e os hipocampus foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases Amresco número M222). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante foi diluído 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8% e aquecido a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. O restante da amostra foi diluído (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8) em uma proporção de 1:4 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final de 8%) foi adicionado na amostra. O conteúdo das proteínas foi estimado a partir de uma curva padrão, utilizando albumina de soro bovino (PETERSON, 1977).

1.5.3. Western Blotting

A mesma quantidade de proteínas (60 µg de proteína total/poço) em cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5%.

Após esse processo, as membranas resultantes foram bloqueadas durante 1 h com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforiladas (sítios Serina831 e Serina845) e total de GluA1 (Cell Signaling, 1:1000), de p70S6K (Cell Signaling, 1:1000), bem como o imunoconteúdo de PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 (Santa Cruz, 1:1000) foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5). As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Millipore 1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T.

A DO das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O imunoconteúdo das proteínas PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da β-actina. Além disso, a fosforilação de p70S6K e dos sítios da subunidade GluA1 (GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845) foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas fosforiladas / DO total. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). A DO das bandas foi quantificada usando Scion Image TM (Frederick, MD, USA).

1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

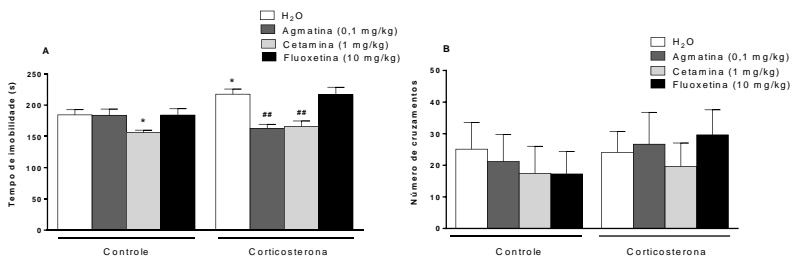
Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. Os dados foram

apresentados nas figuras como média + EPM. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

2. RESULTADOS

Com o intuito de comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina com um antidepressivo clássico e um antidepressivo de ação rápida, os animais foram submetidos ao protocolo de administração de corticosterona, e tratados com veículo, agmatina, fluoxetina ou cetamina, 24 h antes de serem avaliados no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o protocolo da corticosterona [$F(1,62)=4,08$; $p < 0,05$], tratamentos [$F(3,62)=9,84$; $p < 0,01$] e interação entre corticosterona x tratamento [$F(3,62)=4,51$; $p < 0,01$]. Como demonstrado na Figura 2A, os animais que receberam corticosterona tiveram um aumento no tempo de imobilidade no TSC em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Esse aumento foi revertido pelos tratamentos com agmatina e cetamina (ambos $p < 0,01$), mas não com fluoxetina. É importante ressaltar que apenas o tratamento com cetamina foi capaz de induzir uma resposta tipo-antidepressiva em animais não submetidos à administração de corticosterona ($p < 0,05$). A avaliação da atividade locomotora dos animais (Figura 2B) não revelou diferenças estatisticamente significativas para a administração de corticosterona [$F(1,62)=0,67$; $p=0,41$], tratamento [$F(3,62)=0,23$; $p=0,87$] e interação corticosterona x tratamento [$F(3,62)=0,23$; $p=0,87$].

Figura 2. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TSC e TCA após a administração de corticosterona

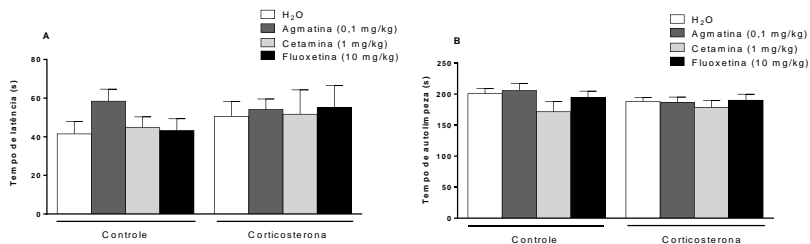


Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e atividade locomotora (painel B) de camundongos submetidos ou não à administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (8-9 animais por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo tratado com corticosterona + veículo.

Como ilustrado na **Figura 3A**, em relação à latência para o início do comportamento de autolimpeza no TBS, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas para o protocolo da corticosterona [$F(1,61) = 1,01$; $p = 0,32$], tratamentos [$F(3,61) = 0,56$; $p = 0,64$] bem como interação corticosterona x tratamentos [$F(3,61) = 0,36$; $p = 0,78$].

Com relação ao tempo total de autolimpeza, a ANOVA de duas vias também mostrou que não houve alterações significativas para o protocolo da corticosterona [$F(1,61) = 0,99$; $p = 0,32$], tratamentos [$F(3,61) = 1,66$; $p = 0,18$] e interação corticosterona x tratamentos [$F(3,61) = 0,58$; $p = 0,63$], como ilustrado na **Figura 3B**.

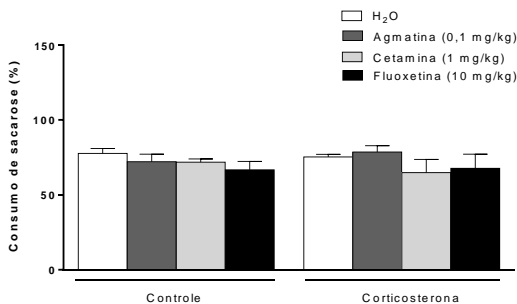
Figura 3. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TBS após a administração de corticosterona



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de latência (painel A) e tempo total de autolimpeza (painel B) de camundongos submetidos ou não ao protocolo de administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (8-9 animais por grupo).

Conforme pode ser observado na **Figura 4**, que representa o consumo de sacarose pelos animais, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas para o protocolo da corticosterona [$F(1,39)=0,01$; $p=0,91$], tratamentos [$F(3,39)=1,55$; $p=0,22$] e interação corticosterona x tratamentos [$F(3,39)=0,49$; $p=0,69$].

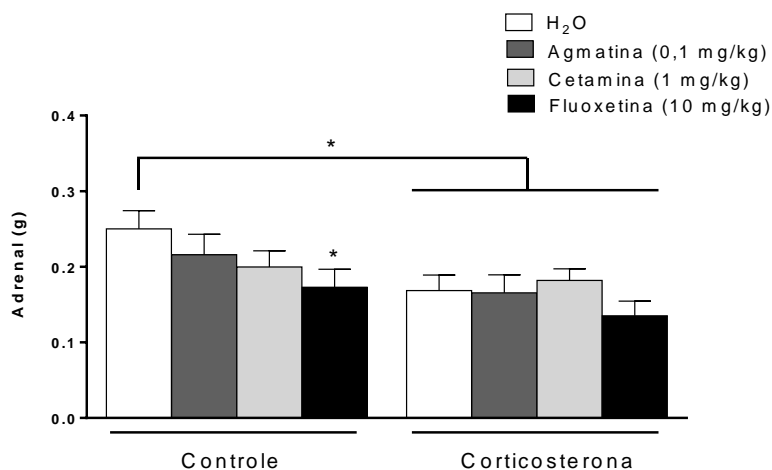
Figura 4. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no TCS



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no consumo de sacarose (%) de camundongos submetidos ou não ao protocolo de administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (N = 5-7 animais por grupo).

Como ilustrado na **Figura 5**, no que diz respeito à pesagem das adrenais dos camundongos, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o protocolo da corticosterona [$F(1,43)=8,67$; $p<0,01$], mas não para os tratamentos [$F(3,43)=2,16$; $p=0,11$] e interação corticosterona x tratamentos [$F(3,43)=0,76$; $p=0,53$]. Como demonstrado na **Figura 5**, os animais que receberam corticosterona tiveram uma diminuição no peso das adrenais em comparação ao grupo controle ($p<0,05$). No entanto, esse aumento não foi revertido por nenhum dos tratamentos. Além disso, o tratamento com fluoxetina nos animais controle levou a uma redução no peso das adrenais, em comparação ao grupo controle ($p<0,05$).

Figura 5. Comparação do peso das adrenais nos animais tratados com agmatina, cetamina e fluoxetina submetidos ou não à administração de corticosterona

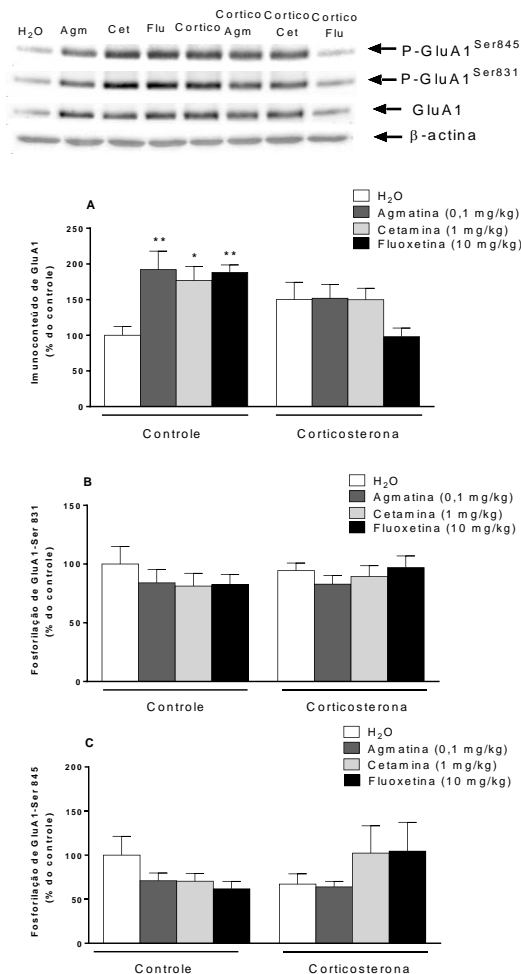


Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) sobre o peso da adrenal de camundongos submetidos ou não ao protocolo de administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (6-8 animais por grupo). * $p<0,05$, em comparação ao grupo controle.

Os efeitos da administração de corticosterona e/ou tratamentos com uma única administração de agmatina, cetamina ou fluoxetina foram avaliados com relação ao imunoc conteúdo das proteínas sinápticas GluA1,

e dos sítios da subunidade GluA1 (GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845) no hipocampo dos animais por *Western blotting*. A ANOVA de duas vias mostrou que houve alteração significativa no imunoconteúdo de GluA1 para o protocolo de corticosterona [$F(1,32)=4,29$; $p<0,05$] e para a interação corticosterona x tratamentos [$F(3,32)=4,99$; $p<0,01$], mas não para os tratamentos [$F(3,32)=2,64$; $p=0,66$]. No que diz respeito à fosforilação de GluA1, a análise densitométrica revelou que não houve alteração significativa na fosforilação de GluA1–Ser831 para o protocolo de corticosterona [$F(1,48)=0,30$; $p=0,59$], tratamentos [$F(3,48)=0,72$; $p=0,54$] ou interação corticosterona x tratamentos [$F(3,48)=0,39$; $p=0,76$], nem na fosforilação de GluA1–Ser845 para a administração de corticosterona [$F(1,40)=0,42$; $p=0,52$], tratamentos [$F(3,40)=0,40$; $p=0,75$] ou interação corticosterona x tratamentos [$F(3,40)=1,69$; $p=0,18$] no hipocampo dos camundongos. Como demonstrado na **Figura 6**, os animais tratados com agmatina, cetamina ($p<0,05$) ou fluoxetina tiveram um aumento do imunoconteúdo de GluA1 em comparação ao grupo controle ($p<0,01$).

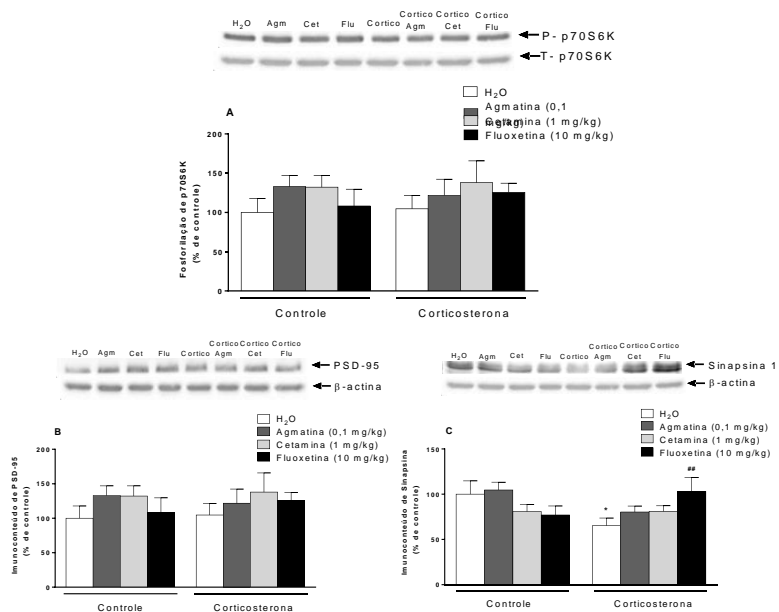
Figura 6. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina no imunoconteúdo de GluA1 e fosforilação dos sítios GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 no hipocampo dos animais



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no imunoccontido de GluA1 e fosforilação dos sítios GluA1–Ser831 e GluA1–Ser845 no hipocampo de camundongos submetidos ou não ao protocolo de administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (N = 5-7 animais por grupo). * $p < 0,05$, em comparação ao grupo controle.

Também foram avaliados os efeitos da administração de corticosterona e/ou tratamentos no que diz respeito a fosforilação de p70S6K, bem como do imunoconteúdo de PSD-95 e sinapsina 1 no hipocampo dos animais. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve alteração significativa na fosforilação de p70S6K para o protocolo de corticosterona [$F(1,48)=2,77$; $p=0,10$], tratamentos [$F(3,48)=0,19$; $p=0,90$], ou interação corticosterona x tratamentos [$F(3,48)=2,08$; $p=0,11$], **Figura 7A**). De modo similar, não foram encontradas alterações significativas no imunoconteúdo de PSD-95 para o protocolo da corticosterona [$F(1,40)=0,10$; $p=0,75$], tratamentos [$F(1,48)=0,15$; $p=0,34$] e interação entre o protocolo da corticosterona x tratamentos [$F(1,48)=0,20$; $p=0,90$; **Figura 7B**) e sinapsina 1 para o protocolo da corticosterona [$F(1,32)=1,30$; $p=0,26$] e tratamentos [$F(3,32)=0,60$; $p=0,62$], mas houve efeito significativo para a interação entre corticosterona x tratamentos [$F(3,32)=3,49$; $p<0,05$], **Figura 7C**). Como demonstrado na **Figura 7C**, os animais que receberam corticosterona tiveram uma diminuição no imunoconteúdo de sinapsina 1 em comparação ao grupo controle ($p<0,05$) e esse efeito foi revertido apenas pelo tratamento com fluoxetina ($p<0,05$).

Figura 7. Comparação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina na fosforilação de p70S6K, PSD-95 e sinapsina 1 no hipocampo dos animais



Legenda: Efeito de uma única administração de agmatina (0,1 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) na fosforilação de P7S6K e no imunocnteuúdo de PSD-95 e sinapsina 1 no hipocampo de camundongos submetidos ou não ao protocolo de administração de corticosterona. Cada coluna representa a média + EPM (N = 5-7 animais por grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle e ##p<0,01 em comparação ao grupo tratado com corticosterona + veículo.

3. DISCUSSÃO

A administração crônica de corticosterona vem sendo utilizada farmacologicamente como modelo pré-clínico de indução de comportamento tipo-depressivo. O modelo é capaz de induzir alterações em parâmetros comportamentais como aumento do tempo de imobilidade no TNF (GOURLEY *et al.*, 2008b; ZHAO *et al.*, 2009) e no TSC (ZHAO *et al.*, 2008), comportamento anedônico no TCS (HUANG *et al.*, 2011), aumento da latência para se alimentar no teste da hipofagia induzida pela

novidade (GOURLEY *et al.*, 2008a), além de alterações neuroquímicas e morfológicas (WOOLLEY, GOULD e MCEWEN, 1990; KARISHMA e HERBERT, 2002; MORALES-MEDINA *et al.*, 2009), que estão associadas com os sintomas encontrados em pacientes com depressão. De fato, esse modelo possui validade de face (por induzir sintomas da doença), de constructo (pois reproduz características fisiopatológicas semelhantes à condição humana) e validade preditiva (o tratamento crônico com antidepressivos pode reverter as alterações do modelo) (AGO *et al.*, 2008; MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID *et al.*, 2009; GOURLEY e TAYLOR, 2009; STERNER e KALYNCHUK, 2010; OLAUSSON *et al.*, 2013). Essas características o tornam uma ferramenta bastante utilizada para o desencadeamento de comportamento tipo-depressivo e sugerem que ele é considerado válido para avaliar a eficácia e os mecanismos de ação de candidatos antidepressivos (ZHAO *et al.*, 2008; IJIMA *et al.*, 2010). Esse trabalho demonstrou que o protocolo envolvendo a administração crônica de corticosterona foi capaz de produzir um comportamento tipo-depressivo nos camundongos, verificado pelo aumento no tempo de imobilidade no TSC, confirmando dados anteriores do nosso grupo (ROSA *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2015a; PAZINI *et al.*, 2015), além de dados prévios da literatura (ZHAO *et al.*, 2008).

A fim de observar se a agmatina, cetamina e fluoxetina compartilham um efeito tipo-antidepressivo agudo e rápido em um modelo animal de depressão classicamente responsivo apenas à administração crônica de antidepressivos, os animais receberam uma única administração desses tratamentos 24 h antes dos testes comportamentais, após serem submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração crônica de corticosterona. Tal protocolo foi adotado com o objetivo de excluir a interferência do efeito agudo das administrações. Para os animais não administrados com corticosterona, os resultados obtidos demonstraram apenas a cetamina induziu um comportamento tipo-antidepressivo 24 h após administração, corroborando os resultados encontrados no Capítulo III. Além disso, a ausência de efeito tipo-antidepressivo no grupo controle administrado com agmatina sugere que, pelo menos no tempo experimental avaliado nos capítulos III e IV, a ação antidepressiva dessa amina endógena parece ser dependente da ocorrência de um estressor. É importante ressaltar que, uma vez que apenas a cetamina levou a uma redução no tempo de imobilidade dos animais controle, é plausível que existam algumas diferenças na modulação das cascatas de sinalização estimuladas pela cetamina e agmatina. Umadas diferenças pode estar relacionada à

metabolização desses fármacos, uma vez que a cetamina é metabolizada a norcetamina, um metabólito que possui cerca de um terço de sua potência (COHEN e TREVOR, 1974; DOMINO *et al.*, 1984).

Diversas evidências mostram que a administração crônica, mas não aguda de antidepressivos convencionais como a fluoxetina (DAVID *et al.*, 2009; GOURLEY e TAYLOR, 2009; ROSA *et al.*, 2014) conseguem reverter o comportamento tipo-depressivo de roedores expostos à corticosterona. O aumento no tempo de imobilidade dos animais observado em protocolos de estresse crônico está relacionado com os efeitos deletérios que esses modelos causam em neurônios hipocâmpais (SNYDER *et al.*, 2011). Portanto, antidepressivos convencionais só são capazes de reverter esse déficit comportamental quando administrados de forma repetida, uma vez que esses compostos levam a alterações tróficas mediando vias de resposta lenta (ALFONSO, FRASCH e FLUGGE, 2005). Entretanto, antidepressivos que agem modulando o sistema glutamatérgico (particularmente aqueles capazes de potencializar a atividade de receptores AMPA e/ou antagonistas de subunidades de receptores NMDA) têm se mostrado mais eficazes em reverter esse prejuízo causado pelo estresse. Isso se deve à capacidade desses agentes farmacológicos em desencadear uma resposta rápida, liberando BDNF e estimulando a síntese de proteínas relacionadas com o restabelecimento das sinapses prejudicadas pela exposição ao estresse, como é o caso da cetamina (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; AKINFIRESOYE e TIZABI, 2013). A investigação dos mecanismos envolvidos na resposta antidepressiva desencadeada pela cetamina se tornou a base para a compreensão dos mecanismos moleculares que levam a sinaptogênese e remissão dos sintomas depressivos em um curto período de tempo. Nesse contexto, foram encontrados resultados promissores, uma vez que uma única administração de agmatina ou cetamina, mas não de fluoxetina, conseguiu reverter o efeito tipo-depressivo induzido pela corticosterona no TSC. O fato de a agmatina e cetamina promoverem resultados semelhantes, sugere que esses compostos compartilham alguns mecanismos de ação, corroborando com os achados apresentados nos Capítulos anteriores e reforçando a necessidade de investigar vias de sinalização celular que possam estar implicadas nesse efeito. Para descartar a possibilidade que os resultados encontrados no TSC pudessem ter relação com uma possível alteração na atividade locomotora dos animais, os mesmos foram submetidos ao TCA. Nenhum tratamento ou protocolo causou alterações na locomoção espontânea dos animais, descartando a influência locomotora nos resultados.

A literatura mostra ainda que a exposição à corticosterona é capaz de induzir um comportamento tipo-anedônico nos animais, como a redução no consumo de sacarose, diminuição na frequência de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose e aumento da latência para se alimentar no teste da hipofagia induzida pela novidade (GOURLEY *et al.*, 2008a; DAVID *et al.*, 2009). No entanto, não foram observadas alterações no comportamento anedônico dos animais em nenhum dos grupos estudados no presente trabalho, corroborando com os resultados mostrados no Capítulo III. Essas divergências com relação aos dados encontrados na literatura podem estar relacionadas a diferenças na natureza e no período de tempo do protocolo, bem como na espécie e linhagem utilizada no trabalho. Mais especificamente, podem ser explicadas em função da diferença existente entre as respostas comportamentais das fêmeas em relação aos machos. Apesar de existir bastante variação entre os estudos quanto às diferenças comportamentais entre os sexos, muitos deles mostram que as fêmeas são mais susceptíveis ao estresse (YOSHIMURA *et al.*, 2003; GOEL e BALE, 2009; BOURKE e NEIGH, 2011). No entanto, a literatura mostra que os machos apresentam uma maior susceptibilidade ao comportamento anedônico quando comparados com as fêmeas. Por exemplo, no teste de preferência pela sacarose foi observado que ratos da linhagem WKY apresentaram um comportamento anedônico, enquanto esse comportamento não foi observado nas fêmeas da mesma linhagem (BURKE *et al.*, 2016). Outro estudo mostrou que fêmeas submetidas a um protocolo de estresse de 6 semanas de duração apresentaram diminuição no consumo de sacarose, mas em uma menor extensão quando comparado com os machos (DALLA *et al.*, 2008). Outros achados mostram que após a administração de LPS houve uma diminuição no consumo de alimentos apenas nos ratos machos (PITYCHOUTIS *et al.*, 2009) e ainda, que as fêmeas apresentaram um menor número de lambidas a soluções de sacarose quando comparado com ratos machos, sugerindo que elas são menos sensíveis a propriedades de recompensa (CURTIS *et al.*, 2004). Outra explicação para essas divergências nas respostas comportamentais diz respeito às linhagens utilizadas. Um estudo que comparou diferentes linhagens de camundongos submetidas a um modelo de estresse (ECI) demonstrou que apenas a linhagem de animais BALB/C apresentou comportamento anedônico no teste de borrifagem de sacarose, resposta não observada na linhagem Swiss, indicando que esses últimos apresentam uma menor sensibilidade ao estresse (YALCIN, BELZUNG e SURGET, 2008). Portanto, esses fatores somados aos repetidos cruzamentos entre os animais na colônia (que podem levar a alterações

genéticas tornando os animais mais resilientes ao estresse), poderiam explicar, ao menos em parte, essa resistência ao estresse induzido pela corticosterona e consequente atenuação dos déficits comportamentais observados no modelo. Esse contínuo cruzamento dos animais poderia explicar o fato de que o presente estudo não replicou os resultados de um estudo prévio do nosso grupo que, utilizando o mesmo protocolo da corticosterona, linhagem e sexo de animais do presente Capítulo, mostrou que eles apresentaram um comportamento anedônico no TCS (PAZINI *et al.*, 2016a).

Estudos prévios do nosso grupo utilizando o mesmo protocolo descrito nesse trabalho mostraram que a exposição crônica a esse glicocorticoide é capaz de diminuir os níveis de corticosterona circulante no soro (ROSA *et al.*, 2014; PAZINI *et al.*, 2016b), possivelmente em virtude de sua ação farmacológica sobre receptores glicocorticoides e mineralocorticóides no hipotálamo, influenciando no controle por *feedback* negativo do eixo HPA. A desregulação desse *feedback* prejudica o controle da liberação hipotalâmica de CRH, o qual estimula a hipófise a secretar o hormônio ACTH, levando a produção de glicocorticoides pelas adrenais. De fato, diversos relatos da literatura mostram que a administração crônica de glicocorticoides tem como consequência a supressão da produção endógena dos mesmos (HOWELL *et al.*, 2011; CASTELA *et al.*, 2012). Com base nisso, e uma vez que no protocolo padronizado pelo nosso grupo de pesquisa os animais são sacrificados cerca de 24 h depois da última administração de corticosterona, sugere-se que o eixo HPA é incapaz de manter os níveis normais de glicocorticoide no soro. É interessante ressaltar que a depressão atípica é característica por apresentar uma diminuição nos níveis de cortisol em humanos (O'KEANE *et al.*, 2012), sugerindo que o modelo de corticosterona utilizado poderia ser adequado para mimetizar algumas alterações fisiológicas que ocorrem neste transtorno de humor, além de estar envolvida com à depressão associada ao transtorno de estresse pós-traumático, podendo estar relacionado a um estado de fadiga adrenal (GOLD *et al.*, 1995; GOLD e CHROUSOS, 2002).

Apesar de não terem sido analisados os níveis de corticosterona dos animais, foram retiradas as adrenais para pesagem. Observou-se que houve uma redução no peso e tamanho das adrenais nos animais submetidos ao protocolo de corticosterona, o que sugere uma alteração no eixo HPA. Ressalta-se que nenhum dos tratamentos foi capaz de reverter esse efeito. Embora a literatura demonstre que a administração repetida de corticosterona pode causar um aumento no peso das adrenais, esse aumento está associado com o aumento da secreção de corticosterona

(GOMEZ *et al.*, 1996; ULRICH-LAI *et al.*, 2006). Portanto, considerando que estudos prévios do nosso grupo mostraram que esse mesmo protocolo induz a uma diminuição nos níveis de corticosterona, era de se esperar que houvesse uma redução das adrenais simultaneamente. Estas diferenças nos níveis de corticosterona e tamanho das adrenais que são observadas nesse estudo quando comparado com a literatura, podem ocorrer possivelmente devido à dose de corticosterona utilizada no protocolo, via de administração (subcutânea, i.p., implantação de pellet, bomba osmótica de infusão, administração passiva através da água ou comida, administração oral por gavagem), espécie (ratos ou camundongos) e linhagem utilizada, assim como tempo de exposição/administração (dias, semanas ou meses) e horário de retirada das estruturas (STERNER e KALYNCHUK, 2010). É importante ressaltar que as adrenais possuem outras funções além da liberação de hormônios em resposta ao estresse. Elas são fonte de diversas substâncias incluindo hormônios esteroides, citocinas, catecolaminas, neurotransmissores e neuropeptídeos. Essas substâncias interagem com muitos tipos celulares dentro da própria adrenal, influenciando sua função durante condições de estresse. Portanto, com a atrofia da estrutura, essas funções também podem ser prejudicadas (BORNSTEIN *et al.*, 1994; KANCZKOWSKI *et al.*, 2015).

Além da desregulação do eixo HPA, estudos sugerem que os sintomas da depressão estão relacionados com uma redução na plasticidade sináptica cerebral (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN *et al.*, 2012), envolvendo uma diminuição da arborização dendrítica e do número de contatos sinápticos, evidenciado por uma menor expressão de proteínas sinápticas (MAGARINOS e MCEWEN, 1995; MAGARINOS, VERDUGO e MCEWEN, 1997). Em concordância com esses achados, protocolos de estresse induzindo comportamento tipo-depressivo em roedores têm sido relacionados com um déficit das espinhas dendríticas bem como diminuição dos níveis de sinapsina 1, GluA1 e PSD-95 (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; NING *et al.*, 2017). Adicionalmente, postula-se que a capacidade que a cetamina tem de reverter os déficits sinápticos induzidos pelo estresse crônico está relacionada com a síntese de proteínas sinápticas no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais (LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2014). No entanto, levando em consideração que existe uma maior densidade de receptores glicocorticoides no hipocampo dos animais e o fato de não ter sido encontrada alteração nas proteínas sinápticas no córtex pré-frontal (dados mostrados no Capítulo III), nesse Capítulo optou-se por avaliar o imunoconteúdo de proteínas sinápticas no

hipocampo dos camundongos. Para isso, foram investigadas também as diferenças nas vias de sinalização celular que culminam na fosforilação de p70S6K e aumento de proteínas sinápticas (PSD-95, GluA1 e seus sítios de fosforilação Ser831 e Ser845, além da sinapsina 1) no hipocampo dos camundongos, comparando esses mecanismos entre a agmatina e cetamina. Os resultados mostram que os animais controle tratados com agmatina, cetamina ou fluoxetina apresentaram aumento no imunoconteúdo de GluA1, mas não no nível de fosforilação nos sítios Ser831 e Ser845. Esses achados reforçam aqueles encontrados no Capítulo II, que mostram que a agmatina, 1 h após sua administração, aumentou o imunoconteúdo de GluA1 no córtex pré-frontal dos animais. Além disso, reforçam o fato de que a agmatina apresenta similaridades com a cetamina em relação ao seu mecanismo de ação, uma vez que essa última causa aumento dessa proteína sináptica, que pode ser observado até 72 h após sua administração (LI *et al.*, 2010). De fato, tem sido proposto que a capacidade que a cetamina tem de reverter os déficits sinápticos induzidos pelo estresse crônico está relacionada com a síntese de proteínas sinápticas mediada pela atividade da mTOR. A sinalização que leva a essa modulação pode ser estimulada pela atividade de fatores de crescimento e ativação das vias da PI3K/Akt (DUMAN; VOLETI, 2012), os quais são eventos implicados nos efeitos biológicos desencadeados pela agmatina, conforme os resultados mostrados no Capítulo II. Entretanto, os achados experimentais do Capítulo II, mostram uma resposta antidepressiva da cetamina em animais não-estressados, diferente do presente Capítulo. Quanto à fluoxetina, apesar da grande maioria de estudos mostrarem que o tratamento crônico com antidepressivos convencionais leva ao aumento dos níveis GluA1 (MARTINEZ-TURRILLAS, FRECHILLA e DEL RIO, 2002; TALIAZ *et al.*, 2011), o presente estudo mostra que esse ISRS aumentou agudamente o imunoconteúdo dessa subunidade. Embora estudos acerca do efeito agudo da fluoxetina sobre o imunoconteúdo de GluA1 sejam inexistentes, estudos mostram que esse antidepressivo aumenta a fosforilação dos sítios GluA1-Ser831 e GluA1-Ser845 após seu tratamento agudo, mas não crônico (SVENNINGSSON *et al.*, 2002), o que sugere a modulação dos receptores AMPA como um possível efeito associado à sua administração aguda. Ademais, já foi reportado que uma única administração de fluoxetina induz outras alterações bioquímicas no cérebro de roedores, como o aumento da autofosforilação dos receptores TrkB (RANTAMAKI *et al.*, 2007). Outros estudos mostram que ISRS aumentam agudamente os níveis de serotonina no hipocampo, além de mostrar o efeito agudo dessa monoamina na expressão de BDNF

(ZETTERSTROM *et al.*, 1999). Contudo, vale ressaltar que esses efeitos da fluoxetina parecem não estar relacionados com modificações comportamentais, uma vez que uma única administração desse fármaco foi ineficaz em reverter o comportamento tipo-depressivo desencadeado pela administração crônica de corticosterona.

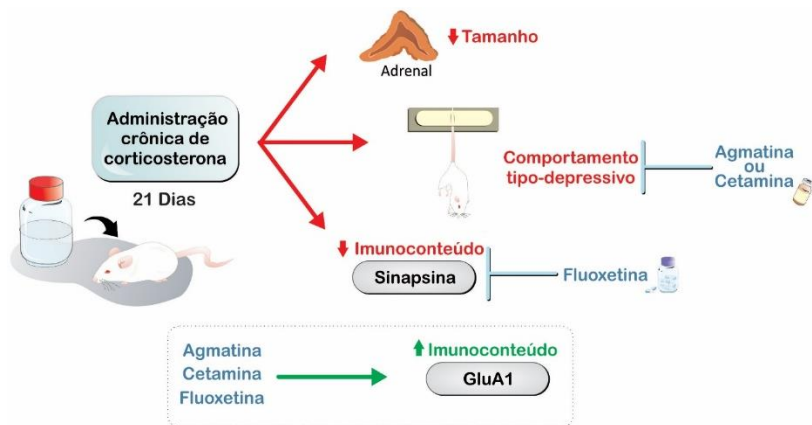
Os camundongos tratados com corticosterona apresentaram uma redução no imunocontéudo de sinapsina 1 no hipocampo, corroborando achados da literatura que mostram que protocolos de estresse induzem a redução dessa proteína no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais (PARIANTE e LIGHTMAN, 2008; LI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015). No entanto, apesar de dados da literatura mostrarem que a fluoxetina induz o aumento de proteínas sinápticas apenas após seu tratamento crônico (O'LEARY, WU e CASTREN, 2009; LIU *et al.*, 2015), o presente estudo surpreendentemente mostrou que nos animais submetidos ao protocolo de corticosterona, ela foi capaz de reverter a diminuição da sinapsina induzida pela administração do glicocorticoide. Esses dados corroboram achados que mostram um aumento da sensibilidade dos compostos quando administrados em animais submetidos a determinados insultos (POLESZAK *et al.*, 2006; NEIS *et al.*, 2014), sugerindo que a presença de um estressor poderia ser capaz de exacerbar os mecanismos envolvidos nos efeitos biológicos da fluoxetina. O fato de não ter sido encontrada alteração no imunocontéudo de sinapsina 1 nos animais tratados com cetamina pode ter ocorrido possivelmente devido à dose utilizada no protocolo, a via de administração (administração oral por gavagem, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular) espécie (ratos ou camundongos), sexo e linhagem utilizada. Quanto à agmatina, possivelmente o efeito não tenha sido observado pois esteja relacionado a ocorrência de uma resposta tempo-dependente, uma vez que no presente capítulo o *Western blotting* foi realizado 24 h após sua administração. É importante ressaltar a necessidade de analisar essas proteínas em tempos diferentes ou até mesmo em outras estruturas do cérebro dos animais.

4. CONCLUSÃO

A identificação de antidepressivos que possuam ação rápida sem apresentar os efeitos adversos da cetamina (efeitos psicomiméticos, tolerância e toxicidade) pode ser considerada um avanço significativo para o tratamento da depressão. Uma abordagem importante envolve a investigação de propriedades antidepressivas de compostos que

apresentam similaridade com os mecanismos da cetamina. Nesse contexto, estudos recentes têm sugerido que a agmatina age como um modulador da plasticidade sináptica, de modo similar a cetamina. No estudo em questão, essa hipótese ganha força uma vez que uma única administração de agmatina, de modo similar a cetamina, foi capaz de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona, enquanto a fluoxetina não foi responsiva. Além disso, os animais submetidos ao protocolo da corticosterona apresentaram uma redução no peso das adrenais (que não foi revertido por nenhum dos tratamentos), bem como uma diminuição no imunoconteúdo de sinapsina 1 no hipocampo, sendo que apenas a fluoxetina foi capaz de reverter esse efeito. Adicionalmente, os animais controles tratados com agmatina, cetamina e fluoxetina apresentaram um aumento no imunoconteúdo de GluA1, o que sugere o envolvimento de proteínas sinápticas no efeito tipo-antidepressivo desses compostos (**Figura 8**). Apesar de terem sido encontrados alguns resultados inesperados quanto ao efeito tipo-antidepressivo da fluoxetina, de um modo geral, os achados desse Capítulo sugerem que a agmatina e cetamina possuem similaridades quanto ao seu perfil de resposta antidepressiva e possivelmente aos seus mecanismos de ação, sugerindo a necessidade de melhor investigar os efeitos desses compostos.

Figura 8. Resumo dos resultados encontrados no capítulo IV



Legenda: O modelo animal de depressão induzida por corticosterona induziu um aumento no tempo de imobilidade dos animais, caracterizando um comportamento tipo-depressivo, bem como reduziu o peso da adrenal e o imunoconteúdo de sinapsina 1 no hipocampo dos animais. Tanto a agmatina quanto a cetamina, administradas agudamente 24 h antes dos testes comportamentais, foram capazes de reverter o aumento do tempo de imobilidade no TSC, mas não as demais alterações induzidas pelo modelo. O tratamento dos animais controle com agmatina, cetamina e fluoxetina foi capaz de aumentar o imunoconteúdo de GluA1 no hipocampo dos animais e apenas a fluoxetina foi capaz de reverter a diminuição do imunoconteúdo de sinapsina no córtex pré-frontal dos animais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos recentes mostram que moduladores glutamatérgicos são alvos promissores para novas alternativas terapêuticas no tratamento da depressão (SCAPAGNINI *et al.*, 2012; NICIU *et al.*, 2013b). Nesse sentido, está cada vez mais evidente o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito neuroprotetor e antidepressivo da agmatina. O efeito neuroprotetor deste composto tem sido evidenciado por sua habilidade em inibir a excitotoxicidade glutamatérgica (YANG e REIS, 1999; ZHU *et al.*, 2003), bem como proteger neurônios hipocâmpais dos danos causados por glicocorticoides (ZHU, WANG e BISSETTE, 2006). Já o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo da agmatina vem sendo demonstrado pelo nosso grupo desde 2002. Nesse contexto, o presente trabalho ampliou os conhecimentos acerca do envolvimento do sistema glutamatérgico e mecanismos de ação envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, além de reforçar seu potencial no tratamento da depressão.

No primeiro capítulo desse estudo, foi observado que a agmatina administrada em dose sub-efetiva foi capaz de potencializar o efeito de antidepressivos convencionais, em especial do MK-801, um antagonista de receptores NMDA que teve sua potência antidepressiva aumentada em 100 vezes por essa amina endógena. Esse resultado chamou a atenção pelo fato de que a agmatina poderia estar modulando em maior escala o sistema glutamatérgico. Além disso, uma das estratégias na busca por compostos mais eficazes para o tratamento da depressão que vem apresentando resultados positivos na prática clínica é a utilização de drogas que atuem em múltiplos alvos farmacológicos (OF, DINAN e CRYAN, 2014). De fato, a combinação de diferentes classes de fármacos para o tratamento da depressão vem crescendo consideravelmente (DEBATTISTA, 2006; BERMAN *et al.*, 2007; MARCUS *et al.*, 2008; BERMAN *et al.*, 2009), uma vez que é considerada uma alternativa para os pacientes que não respondem a terapia convencional com antidepressivos e ainda tem o objetivo de reduzir os efeitos colaterais, facilitando a adesão do paciente ao tratamento. Nesse contexto, a agmatina, que apresenta baixa toxicidade, vem sendo considerada um composto em potencial para atuar como adjuvante no tratamento da depressão uma vez que sua associação com outros compostos (como fluoxetina, imipramina, bupropiona e MK-801) foi capaz de exercer um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC.

A fim de obter mais detalhes sobre seu efeito tipo-antidepressivo e envolvimento desse efeito com o sistema glutamatérgico, no segundo

capítulo da tese, foram verificadas vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo da agmatina. Esse efeito foi investigado com base em dados da literatura que mostram que a cetamina exerce um efeito antidepressivo rápido a partir da ativação de vias de sinalização intracelular dependentes da liberação de BDNF, ativação de mTOR, e aumento de proteínas sinápticas (LI *et al.*, 2010). Foi observado, pela primeira vez, que a ação tipo-antidepressiva da agmatina está relacionada, pelo menos em parte, com os receptores AMPA e TrkB bem como as vias de sinalização intracelular mediadas por BDNF/PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR, que culminam no aumento de proteínas sinápticas. Esse aumento também foi observado após 1 h do tratamento dos animais com agmatina (PSD-95 e GluA1, mas não sinapsina 1), reforçando o envolvimento dessas vias de sinalização no efeito tipo-antidepressivo dessa amina endógena. Em conjunto, esses dados mostram perspectivas inovadoras em relação às similaridades encontradas nas vias de sinalização intracelular ativadas por essa amina quando comparada com a cetamina (vias de sinalização de efeito rápido).

Além dos testes comportamentais de validade preditiva como o TSC e o TNF, os modelos animais de indução de comportamento tipo-depressivo atuam dando mais robustez aos dados que reportam a ação de compostos antidepressivos, uma vez que tais modelos levam a alterações comportamentais e neurobiológicas paralelas a sintomas associados com a depressão humana, as quais podem ser prevenidas pela administração crônica de diferentes classes de antidepressivos. Dentre os diferentes modelos, destacam-se aqueles baseados na exposição dos animais ao estresse, como o ECI. Portanto, no capítulo III desse trabalho, os animais foram submetidos a esse modelo de indução de comportamento tipo-depressivo e receberam diferentes tratamentos a fim de comparar os efeitos induzidos por cada um deles. Esse capítulo mostrou que uma única administração de agmatina, de modo similar à cetamina, foi capaz de prevenir alterações comportamentais (avaliadas no TSC) em um modelo animal de depressão validado, sugerindo que esses compostos compartilham de mecanismos de ação. No entanto, não foi observado comportamento anedônico nos animais, além de não ter sido observada alteração no imunoconteúdo das proteínas sinápticas PSD-95, GluA1 e sinapsina 1 no córtex pré-frontal dos camundongos. Dessa forma, acredita-se que seja necessária uma extensão do período de estresse, além de ser necessário verificar o imunoconteúdo dessas proteínas em tempos diferentes daquele avaliado nesse estudo, ou ainda, em outras regiões do encéfalo dos animais. Por esses motivos, o capítulo IV teve por objetivo comparar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina, cetamina e fluoxetina

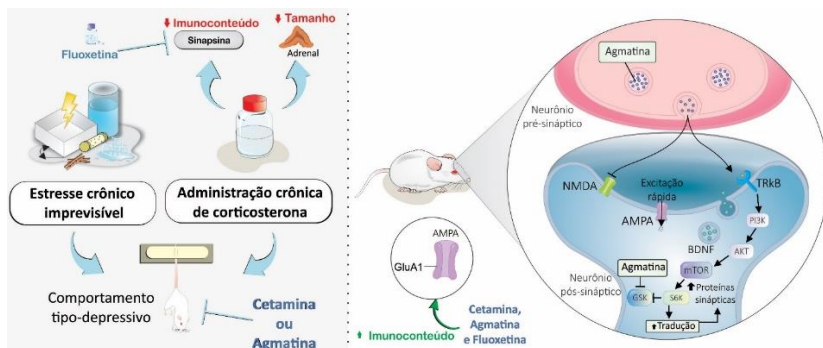
no modelo de depressão induzida pela administração de corticosterona (21 dias), e avaliar o imunoc conteúdo de proteínas sinápticas no hipocampo dos animais. Corroborando com os achados do capítulo III, foi observado que tanto a agmatina quanto a cetamina possuem a capacidade de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido por esse glicocorticoide no TSC. A fim de confirmar se a exposição à corticosterona foi capaz de alterar o eixo HPA dos animais, as adrenais foram pesadas, e observou-se que os camundongos administrados com corticosterona tiveram uma redução no peso dessa estrutura, sendo que nenhum dos tratamentos foi capaz de reverter essa diminuição. No entanto, não foram observadas alterações no comportamento anedônico dos animais no TBS e no TCS em nenhum dos grupos, sugerindo que exista a necessidade de se administrar a corticosterona por um período mais prolongado, além de realizar o protocolo e avaliar a anedonia em machos também, para verificar se existe alguma diferença relacionado ao sexo.

Com relação às análises bioquímicas, os animais controle tratados com agmatina, cetamina ou fluoxetina apresentaram um aumento no imunoc conteúdo de GluA1, reforçando achados na literatura que mostram que esses compostos exercem efeito sob essa subunidade de receptores AMPA. Além disso, os animais submetidos ao protocolo da corticosterona apresentaram uma redução no imunoc conteúdo da proteína sinapsina 1, efeito que foi revertido somente após o tratamento com fluoxetina. Entretanto, estudos futuros ainda são necessários para esclarecer como esse processo ocorre a partir de variações no protocolo experimental, como diferentes doses e tempos de administração.

Em conjunto, os dados aqui presentes reforçam a hipótese de que a agmatina compartilha similaridades com o efeito tipo-antidepressivo da cetamina, tanto no que diz respeito a alterações comportamentais quanto bioquímicas. Estudos pré-clínicos futuros acrescentarão mais detalhes a respeito de sua eficácia e alvos moleculares subjacentes a esses efeitos encontrados. A baixa toxicidade apresentada por essa amina endógena, a alta demanda por compostos capazes de aliviar os sintomas da depressão de forma eficaz, juntamente com os resultados apresentados nessa tese sugerem que a agmatina é um alvo interessante para futuros estudos clínicos que possam verificar o potencial terapêutico desse composto. É importante ressaltar que embora existam similaridades entre os mecanismos de ação da agmatina e cetamina, uma diferença entre esses compostos diz respeito principalmente aos efeitos colaterais, uma vez que a agmatina vem mostrando baixa toxicidade, principalmente em função das baixas doses dessa amina usadas no estudo em questão. Além disso, a cetamina possui um efeito tipo-antidepressivo persistente (dias),

enquanto a agmatina em 24 horas não possui mais efeito tipo-antidepressivo no TSC em animais controles. Essa diferença pode se dar em função da metabolização da cetamina a norcetamina, que possui um terço de sua potência, prolongando dessa forma seu efeito (COHEN e TREVOR, 1974; DOMINO *et al.*, 1984). Esses achados reforçam a necessidade de investigar de maneira mais aprofundada os mecanismos de ação pelos quais a agmatina exerce seu efeito tipo-antidepressivo, principalmente relacionados à sua capacidade de aumentar a resposta dos pacientes ao tratamento e possivelmente promover um efeito clínico mais rápido. Com base nos resultados encontrados nos capítulos I II e III e IV, a **Figura 1** apresenta, de maneira esquemática, as vias pela qual a agmatina pode agir, induzindo um comportamento tipo-antidepressivo nos animais.

Figura 1. Representação esquemática dos resultados obtidos nos Capítulos I, II, III e IV



Legenda: Os resultados do presente trabalho indicam que a administração aguda de agmatina é capaz de exercer um efeito tipo-antidepressivo tanto em testes preditivos de atividade antidepressiva quanto contra os efeitos deletérios do estresse, prevenindo alterações neuroquímicas e comportamentais. Fonte: Priscila Batista da Rosa.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos capítulos I, II, III e IV, conclui-se que:

- A agmatina em doses sub-efetivas apresenta a habilidade de aumentar os efeitos de antidepressivos convencionais (efeito sinérgico) e, com maior destaque, do MK-801, uma vez que uma dose sub-efetiva dessa amina quando administrada em conjunto com doses sub-efetivas de MK-801 foi capaz de reduzir a MDE desse antagonista de receptores NMDA em 100 vezes. Este resultado sugere que a agmatina pode ter uma maior afinidade por receptores NMDA do que por alvos monoaminérgicos.
- Os receptores AMPA e TrkB estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da agmatina 1 h após sua administração. Além disso, a administração dessa amina endógena induz o aumento de BDNF, a ativação das vias PI3K/Akt/mTOR e inibição de GSK-3 β , resultando em um aumento dos níveis de proteínas sinápticas GluA1 e PSD-95. Estes resultados sugerem que a agmatina apresenta similaridades com o mecanismo de ação da cetamina, uma vez que essa última induz efeito tipo-antidepressivo rápido mediante a ativação dessas vias de sinalização.
- Tanto a agmatina quanto a cetamina (mas não a fluoxetina) quando administradas agudamente 24 h antes dos testes comportamentais, foram capazes de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pelo protocolo de ECI no TSC. Apesar disso, não foram encontradas alterações em nenhum dos grupos quanto ao comportamento anedônico, ou em relação ao imunoconteúdo de proteínas sinápticas PSD-95, sinapsina e GluA1 no córtex pré-frontal dos animais. Apesar da ausência de comportamento anedônico e de não terem sido observadas alterações nas proteínas sinápticas em camundongos expostos ao ECI, esses resultados sugerem que existem similaridades comportamentais entre os efeitos benéficos da agmatina e da cetamina no protocolo de ECI.
- A agmatina e cetamina quando administradas agudamente 24 h antes dos testes comportamentais, foram capazes de reverter o aumento do tempo de imobilidade no TSC, mas não a diminuição do peso da adrenal e redução do imunoconteúdo de sinapsina induzidas pela corticosterona. O tratamento dos animais controle com agmatina, cetamina e fluoxetina 24 h após a administração foram capazes de

aumentar o imunoconteúdo de GluA1 no hipocampo bem como a fluoxetina reverteu a redução de sinapsina induzida pelo protocolo da corticosterona no hipocampo dos animais. Apesar dos achados acerca do efeito da fluoxetina, esses dados sugerem que a agmatina compartilha similaridades com o efeito tipo-antidepressivo da cetamina, tanto no que diz respeito a alterações comportamentais quanto bioquímicas, e reforçam a necessidade de se continuar investigando esse efeito.

7. PERSPECTIVAS

Capítulo 1

Avaliar se a agmatina, em doses sub-efetivas, quando administrada juntamente com a cetamina também em doses sub-efetivas é capaz de exercer um efeito tipo-antidepressivo sinérgico e aumentar a potência com que a cetamina exerce seu efeito;

Verificar se a associação entre a agmatina e MK-801, antidepressivos convencionais ou cetamina são revertidas por ferramentas farmacológicas como DNQX, NMDA e rapamicina;

Verificar se associação da agmatina com antidepressivos convencionais ou MK-801 são capazes de induzir o aumento nas proteínas sinápticas no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais por *Western blotting*.

Capítulo 2

Verificar se a agmatina é capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF e PSD-95 6, 12 ou 18 após sua administração aguda;

Investigar o efeito agudo da agmatina no imunoconteúdo do receptor TrkB (formas total e fosforilada);

Verificar se o tratamento com agmatina é capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF, PSD-95, sinapsina 1 e GluA1 1h após sua administração, no hipocampo dos animais.

Investigar a capacidade da agmatina em promover exocitose de vesículas contendo BDNF em cultivo primário de neurônios corticais e hipocampais.

Capítulo 3

Verificar se o tratamento com agmatina em diferentes tempos após a submissão ao ECI (tempo superior a 24 h) ainda é capaz de proteger os animais da ocorrência de comportamento tipo-depressivo observado no TSC;

Avaliar as alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao ECI, assim como os efeitos dos tratamentos com agmatina, fluoxetina e cetamina sobre as concentrações desse hormônio;

Comparar alterações no imunoconteúdo de proteínas envolvidas na plasticidade sináptica (BDNF, mTOR, PSD-95 e sinapsina 1) no hipocampo dos animais.

Capítulo 4

Dosar os níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais submetidos ao protocolo de corticosterona e/ou tratados com agmatina, cetamina ou fluoxetina.

Verificar se a associação de agmatina e cetamina em doses sub-efetivas é capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo no TSC, bem como alterar proteínas sinápticas no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

Avaliar as alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao à administração de corticosterona, assim como os efeitos dos tratamentos com agmatina, fluoxetina e cetamina sobre as concentrações desse hormônio.

REFERÊNCIAS

AAN HET ROT, M. *et al.* Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 139-45, 2010.

ABDUL SHUKKOOR, M. S. *et al.* Antidepressant-Like Effect of Lipid Extract of *Channa striatus* in Chronic Unpredictable Mild Stress Model of Depression in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 1-17, 2016.

ABE, K.; ABE, Y.; SAITO, H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. **Brain Res**, v. 872, n. 1-2, p. 141-8, 2000.

AGO, Y. *et al.* Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1355-63, 2008.

AGO, Y. *et al.* Metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists improve behavioral and prefrontal dopaminergic alterations in the chronic corticosterone-induced depression model in mice. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 29-38, 2013.

AHN, S. K. *et al.* Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible nitric oxide synthase activity. **Life Sci**, v. 91, n. 25-26, p. 1345-50, 2012.

AHN, S. K. *et al.* Effects of agmatine on hypoxic microglia and activity of nitric oxide synthase. **Brain Res**, v. 1373, p. 48-54, 2011.

AKINFIRESOYE, L.; TIZABI, Y. Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 230, n. 2, p. 291-8, 2013.

ALFONSO, J.; FRASCH, A. C.; FLUGGE, G. Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. **Rev Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 43-56, 2005.

ALMAS, A. *et al.* Depression is linked to uncontrolled hypertension: a case-control study from Karachi, Pakistan. **J Ment Health**, v. 23, n. 6, p. 292-6, 2014.

ALT, A.; WITKIN, J. M.; BLEAKMAN, D. AMPA receptor potentiators as novel antidepressants. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 12, p. 1511-27, 2005.

AMIDFAR, M. *et al.* Effect of memantine combination therapy on symptoms in patients with moderate-to-severe depressive disorder: randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Pharm Ther**, 2016a.

AMIDFAR, M. *et al.* Effect of co-administration of memantine and sertraline on the antidepressant-like activity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the rat brain. **Brain Res Bull**, 2016b.

AMPUERO, E. *et al.* Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 98-108, 2010.

ANDRADE, C.; RAO, N. S. How antidepressant drugs act: A primer on neuroplasticity as the eventual mediator of antidepressant efficacy. **Indian J Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 378-86, 2010.

ANDREASEN, J. T. *et al.* Differential role of AMPA receptors in mouse tests of antidepressant and anxiolytic action. **Brain Res**, v. 1601, p. 117-26, 2015.

ANDREASEN, J. T. *et al.* Does increasing the ratio of AMPA-to-NMDA receptor mediated neurotransmission engender antidepressant action? Studies in the mouse forced swim and tail suspension tests. **Neurosci Lett**, v. 546, p. 6-10, 2013.

ARCHER, J. Rodent sex differences in emotional and related behavior. **Behav Biol**, v. 14, n. 4, p. 451-79, 1975.

ARICIOGLU, F.; ALTUNBAS, H. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 136-40, 2003.

ARNDT, M. A. *et al.* The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, n. 6, p. C1411-9, 2009.

ARTENI, N. S. *et al.* Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 78, n. 2, p. 465-9, 2002.

ATTWELL, D.; GIBB, A. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 841-9, 2005.

AUTRY, A. E. *et al.* NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 91-5, 2011.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 2, p. 238-58, 2012.

BAHREMAND, A. *et al.* Agmatine enhances the anticonvulsant effect of lithium chloride on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: Involvement of L-arginine/nitric oxide pathway. **Epilepsy Behav**, v. 18, n. 3, p. 186-92, 2010.

BAI, F.; BERGERON, M.; NELSON, D. L. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 8, p. 1013-21, 2003.

BANASR, M. *et al.* Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 496-504, 2007.

BARBON, A. *et al.* Chronic antidepressant treatments induce a time-dependent up-regulation of AMPA receptor subunit protein levels. **Neurochem Int**, v. 59, n. 6, p. 896-905, 2011.

BATTAGLIA, V. *et al.* Agmatine transport in brain mitochondria: a different mechanism from that in liver mitochondria. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 423-30, 2010.

BAUM, V.C.; TECSON, M.E. Ketamine inhibits transsarcolemmal calcium entry in guinea pig myocardium : direct evidence by single cell voltage clamp. **Anesth Analg** v. 73, p. 804–807, 1991.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 327-47, 2009.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biol Mood Anxiety Disord**, v. 1, n. 1, p. 9, 2011.

BEN HAIM, L. *et al.* Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 278, 2015.

BENCE, A. K. *et al.* An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 3, p. 771-5, 2003.

BERGIN, D. H.; LIU, P. Agmatine protects against beta-amyloid₂₅₋₃₅-induced memory impairments in the rat. **Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 794-811, 2010.

BERMAN, R. M. *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-354, 2000.

BERMAN, R. M. *et al.* Aripiprazole augmentation in major depressive disorder: a double-blind, placebo-controlled study in patients with inadequate response to antidepressants. **CNS Spectr**, v. 14, n. 4, p. 197-206, 2009.

BERMAN, R. M. *et al.* The efficacy and safety of aripiprazole as adjunctive therapy in major depressive disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Psychiatry**, v. 68, n. 6, p. 843-53, 2007.

BERNSTEIN, H. G. *et al.* Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 237-46, 2012.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BETTIO, L. E. *et al.* Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, 2012.

BEUREL, E.; SONG, L.; JOPE, R. S. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 11, p. 1068-1070, 2011.

BHAGWAGAR, Z.; HAFIZI, S.; COWEN, P. J. Increased salivary cortisol after waking in depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 1, p. 54-7, 2005.

BHUTADA, P. *et al.* Agmatine, an endogenous ligand of imidazoline receptor protects against memory impairment and biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 37, n. 1, p. 96-105, 2012.

BINFARE, R. W. *et al.* Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530-40, 2009.

BIRKENHAGER, T. K.; PLUIJMS, E. M. Possible Synergy Between Electroconvulsive Therapy and Imipramine: A Case Report. **J Psychiatr Pract**, v. 22, n. 6, p. 478-480, 2016.

BJORKHOLM, C. *et al.* Ketamine-like effects of a combination of olanzapine and fluoxetine on AMPA and NMDA receptor-mediated transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 10, p. 1842-7, 2015.

BOKARA, K. K. *et al.* Retroviral expression of arginine decarboxylase attenuates oxidative burden in mouse cortical neural stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 3, p. 527-37, 2011.

BONANNO, G. *et al.* Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. **J Neurosci**, v. 25, n. 13, p. 3270-9, 2005.

BORNSTEIN, S.R.; GONZALEZ-HERNANDEZ, J.A.; EHRHART-BORNSTEIN, M.; ADLER, G.; SCHERBAUM, W.A. Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, p. 225–32, 1994.

BOURIN, M. *et al.* A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res**, v. 164, n. 2, p. 266-9, 2005.

BOURKE, C. H.; NEIGH, G. N. Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. **Horm Behav**, v. 60, n. 1, p. 112-20, 2011.

BRAMBILLA, P. *et al.* Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. **Pharmacopsychiatry**, v. 38, n. 2, p. 69-77, 2005.

BREMNER, J. D. *et al.* Hippocampal volume reduction in major depression. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 1, p. 115-8, 2000.

BROWN, E. S.; VARGHESE, F. P.; MCEWEN, B. S. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 1, p. 1-9, 2004.

BRUNELLO, N. *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 5, p. 461-475, 2002.

BUDNI, J. *et al.* Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, v. 575, n. 1-3, p. 87-93, 2007.

BUDNI, J. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**, v. 240, p. 112-21, 2013.

BURKE, N. N. *et al.* Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. **Physiol Behav**, v. 167, p. 28-34, 2016.

BURT, C. W.; MCCAIG, L. F.; RECHTSTEINER, E. A. Ambulatory medical care utilization estimates for 2005. **Adv Data**, n. 388, p. 1-15, 2007.

CAI, X. *et al.* Local potentiation of excitatory synapses by serotonin and its alteration in rodent models of depression. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 464-72, 2013.

CALABRESE, F. *et al.* Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. e37916, 2012.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 417-26, 2004.

CAPRA, J. C. *et al.* Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 232-8, 2010.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-72, 2003.

CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 27-34, 2013.

CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.

CASTREN, E. Is mood chemistry? **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 241-6, 2005.

CASTREN, E.; VOIKAR, V.; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 1, p. 18-21, 2007.

CHANDRAN, A. *et al.* Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 40, p. 240-5, 2013.

CHANG, C. M.; SATO, S.; HAN, C. Evidence for the Benefits of Nonantipsychotic Pharmacological Augmentation in the Treatment of Depression. **CNS Drugs**, v. 27, p. S21-S27, 2013.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Sci STKE**, v. 2004, n. 225, p. re5, 2004.

CHEN, B. *et al.* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, K. T. *et al.* AMPA Receptor-mTOR Activation is Required for the Antidepressant-Like Effects of Sarcosine during the Forced Swim Test in Rats: Insertion of AMPA Receptor may Play a Role. **Front Behav Neurosci**, v. 9, p. 162, 2015.

CHEN, K. T. *et al.* Antidepressant-like effects of long-term sarcosine treatment in rats with or without chronic unpredictable stress. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 1-10, 2016.

CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurosci Bull**, v. 30, n. 2, p. 271-81, 2014.

CHEN, X.; SHU, S.; AND BAYLISS, D.A. HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine. **J Neurosci**, v. 29, p. 600–609, 2009.

CHEON, E. J. *et al.* Effectiveness of Duloxetine Monotherapy Compared to Combination Therapy with Other Antidepressants in Patients with Major Depressive Disorder: A Short-Term, Retrospective Study. **Psychiatry Investig**, v. 13, n. 4, p. 447-52, 2016.

CHESNEY, E.; GOODWIN, G. M.; FAZEL, S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. **World Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 153-60, 2014.

CHILUKURI, H. *et al.* Acute antidepressant effects of intramuscular versus intravenous ketamine. **Indian J Psychol Med**, v. 36, n. 1, p. 71-6, 2014.

CHOURBAJI, S. *et al.* AMPA receptor subunit 1 (GluR-A) knockout mice model the glutamate hypothesis of depression. **FASEB J**, v. 22, n. 9, p. 3129-34, 2008.

CHUNG, C. New perspectives on glutamate receptor antagonists as antidepressants. **Arch Pharm Res**, v. 35, n. 4, p. 573-7, 2012.

CLEMENTS, J. A.; NIMMO, W. S. Pharmacokinetics and analgesic effect of ketamine in man. **Br J Anaesth**, v. 53, n. 1, p. 27-30, 1981.

COHEN-CORY, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 770-6, 2002.

COHEN, M. L.; TREVOR, A. J. On the cerebral accumulation of ketamine and the relationship between metabolism of the drug and its pharmacological effects. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 189, n. 2, p. 351-8, 1974.

CONDELLO, S. *et al.* Protective effects of agmatine in rotenone-induced damage of human SH-SY5Y neuroblastoma cells: fourier transform infrared spectroscopy analysis in a model of Parkinson's disease. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 775-81, 2012.

CONDELLO, S. *et al.* Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF-kappaB activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. **J Neurochem**, v. 116, n. 1, p. 67-75, 2011.

CONTI, A. C. *et al.* cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. **J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 3262-8, 2002.

COPPEN, A. J.; DOOGAN, D. P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 49 Suppl, p. 4-11, 1988.

CORTES-VIEYRA, R. *et al.* Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. **J Inflamm (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 23, 2012.

COUTINHO, V.; KNOPFEL, T. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 551-61, 2002.

COVINGTON, H. E., 3RD; VIALOU, V.; NESTLER, E. J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 4-5, p. 683-93, 2010.

CRANE, G. E. Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. **Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc**, v. 8, p. 142-52, 1957.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CUIJPERS, P. *et al.* Adding psychotherapy to pharmacotherapy in the treatment of depressive disorders in adults: a meta-analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 70, n. 9, p. 1219-29, 2009a.

CUIJPERS, P.; SMIT, F. Excess mortality in depression: a meta-analysis of community studies. **J Affect Disord**, v. 72, n. 3, p. 227-36, 2002.

CUIJPERS, P. *et al.* Psychotherapy versus the combination of psychotherapy and pharmacotherapy in the treatment of depression: a meta-analysis. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 3, p. 279-88, 2009b.

CUNHA, A. S. *et al.* Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. **Behav Brain Res**, v. 312, p. 64-76, 2016.

CUNHA, M. P. *et al.* Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 2954-68, 2016.

CUNHA, M. P. *et al.* Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1913-1920, 2008.

CUNHA, M. P. *et al.* The modulation of NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide pathway is implicated in the anti-immobility effect of creatine in the tail suspension test. **Amino Acids**, v. 47, n. 4, p. 795-811, 2015.

CURTIS, K. S. *et al.* Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. **Physiol Behav**, v. 80, n. 5, p. 657-64, 2004.

CVRCEK, P. Side effects of ketamine in the long-term treatment of neuropathic pain. **Pain Med**, v. 9, n. 2, p. 253-7, 2008.

CZEH, B.; LUCASSEN, P. J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 257, n. 5, p. 250-60, 2007.

D'AQUILA, P. S. *et al.* The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 405, n. 1-3, p. 365-73, 2000.

DAILLY, E. *et al.* Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 18, n. 6, p. 601-607, 2004.

DALLA, C. *et al.* Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiol Behav**, v. 93, n. 3, p. 595-605, 2008.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DAVID, D. J. *et al.* . Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479-93, 2009.

DEBATTISTA, C. Augmentation and combination strategies for depression. **J Psychopharmacol**, v. 20, n. 3, p. 11-18, 2006.

DELAY, J.; LAINE, B.; BUISSON, J. F. [The action of isonicotinyldihydrate used in the treatment of depressive states]. **Ann Med Psychol (Paris)**, v. 110, n. 2 5, p. 689-92, 1952.

DELL'OSSO, B. *et al.* . The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 6, p. 723-32, 2011.

DEMEHRI, S. *et al.* Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 4, p. 534-42, 2003.

DENK, M. C. *et al.* Monitoring ketamine treatment response in a depressed patient via peripheral mammalian target of rapamycin activation. **Am J Psychiatry**, v. 168, n. 7, p. 751-2, 2011.

DETTENBORN, L. *et al.* Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. **Stress**, v. 15, n. 3, p. 348-53, 2012.

DEUSCHLE, M. *et al.* Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 1, p. 234-8, 1997.

DIAZGRANADOS, N. *et al.* Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1605-11, 2010.

DIKEOS, D. G. *et al.* Association between the dopamine D3 receptor gene locus (DRD3) and unipolar affective disorder. **Psychiatr Genet**, v. 9, n. 4, p. 189-95, 1999.

DIXIT, M. P. *et al.* Imidazoline binding sites mediates anticomulsive-like effect of agmatine in marble-burying behavior in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 732, p. 26-31, 2014.

DOMINO, E. F. *et al.* Ketamine kinetics in unmedicated and diazepam-premedicated subjects. **Clin Pharmacol Ther**, v. 36, n. 5, p. 645-53, 1984.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1136-43, 2006.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct**, v. 213, n. 1-2, p. 93-118, 2008.

DREVETS, W. C. *et al.* A functional anatomical study of unipolar depression. **J Neurosci**, v. 12, n. 9, p. 3628-41, 1992.

DSM-5. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. **American Psychiatric Publishing**, n. 5th Ed, 2013.

DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med**, v. 5, n. 1, p. 11-25, 2004.

DUMAN, R. S. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 11, n. 3, p. 239-55, 2009.

DUMAN, R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depress Anxiety**, v. 31, n. 4, p. 291-6, 2014a.

DUMAN, R. S. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 11-27, 2014b.

DUMAN, R. S.; KEHNE, J. H. Depression. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 161-2, 2007.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

DUMAN, R. S. *et al.* Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 35-41, 2012.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 2012.

DURIC, V.; DUMAN, R. S. Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 39-53, 2013.

DWIVEDI, Y. *et al.* Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. **Arch Gen Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 804-15, 2003.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; PANDEY, G. N. Antidepressants reverse corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 1017-29, 2006.

DWIVEDI, Y. *et al.* Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 916-28, 2001.

DWIVEDI, Y. *et al.* Lower phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity and differential expression levels of selective catalytic and regulatory PI 3-kinase subunit isoforms in prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 10, p. 2324-40, 2008.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. *et al.* Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2424-32, 2006.

EHRlich, I. *et al.* PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 10, p. 4176-81, 2007.

EHRlich, I.; MALINOW, R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 916-27, 2004.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

ENGSTROM, G. *et al.* Reduced cerebrospinal HVA concentrations and HVA/5-HIAA ratios in suicide attempters. Monoamine metabolites in 120 suicide attempters and 47 controls. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 5, p. 399-405, 1999.

ESTEBAN, J. A. *et al.* PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 136-43, 2003.

FAIRBANKS, C. A. *et al.* Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 19, p. 10584-9, 2000.

FARAH, J. M., JR. *et al.* N-methyl-D-aspartate treatment increases circulating adrenocorticotropin and luteinizing hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1875-80, 1991.

FAVA, M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8, p. 649-59, 2003.

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**, v. 390, n. 3, p. 129-33, 2005.

FENG, Y.; PILETZ, J. E.; LEBLANC, M. H. Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. **Pediatr Res**, v. 52, n. 4, p. 606-11, 2002.

FEYISSA, A. M. *et al.* Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 70-5, 2009.

FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 3-12, 1996.

FILHO, C. B. *et al.* Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na(+),K(+)-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v. 289, p. 367-80, 2015.

FINCK, A.D.; NGAI, S.H. Opiate receptor mediation of ketamine analgesia. **Anesthesiology**, v. 56, p. 291-297, 1982.

FINK, K. *et al.* Stimulation of serotonin release in the rat brain cortex by activation of ionotropic glutamate receptors and its modulation via alpha 2-heteroreceptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 352, n. 4, p. 394-401, 1995.

FLEMING, J. J.; ENGLAND, P. M. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 2, p. 89-97, 2010.

FLUGGE, G. Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress. **J Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 7132-40, 1995.

FREITAS, A. E. *et al.* Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **J Psychiatr Res**, v. 58, p. 137-46, 2014a.

FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 50, p. 143-50, 2014b.

FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Mol Neurobiol**, 2015a.

FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 3, p. 1504-19, 2015b.

FRODL, T.; O'KEANE, V. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. **Neurobiol Dis**, v. 52, p. 24-37, 2013.

GABLE, R. S. Acute toxic effects of club drugs. **J Psychoactive Drugs**, v. 36, n. 3, p. 303-13, 2004.

GALEA, E. *et al.* Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. **Biochem J**, v. 316 (Pt 1), p. 247-9, 1996.

GALGANO, F. *et al.* Focused review: agmatine in fermented foods. **Front Microbiol**, v. 3, p. 199, 2012.

GARAKANI, A. *et al.* Cerebrospinal fluid levels of glutamate and corticotropin releasing hormone in major depression before and after treatment. **J Affect Disord**, v. 146, n. 2, p. 262-5, 2013.

GARCIA, L. S. *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140-4, 2008.

GARCIA, L. S. *et al.* Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-5, 2009.

GAWALI, N. B. *et al.* Agmatine ameliorates lipopolysaccharide induced depressive-like behaviour in mice by targeting the underlying inflammatory and oxido-nitrosative mediators. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 149, p. 1-8, 2016a.

GAWALI, N. B. *et al.* Involvement of nitric oxide in anticomulsive-like effect of agmatine on marble-burying behaviour in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 770, p. 165-71, 2016b.

GBD. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. 2013.

GHASEMI, M. *et al.* Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder. **Psychiatry Res**, v. 215, n. 2, p. 355-61, 2014.

GHASEMI, M.; RAZA, M.; DEHPOUR, A. R. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. **J Psychopharmacol**, v. 24, n. 4, p. 585-94, 2010.

GHOSAL, S.; HARE, B.; DUMAN, R. S. Prefrontal Cortex GABAergic Deficits and Circuit Dysfunction in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Stress and Depression. **Curr Opin Behav Sci**, v. 14, p. 1-8, 2017.

GILAD, G. M.; GILAD, V. H. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. **Neurosci Lett**, v. 296, n. 2-3, p. 97-100, 2000.

GILAD, G. M. *et al.* Neurochemical evidence for agmatine modulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. **Neurochem Res**, v. 30, n. 6-7, p. 713-9, 2005.

GILAD, G. M. *et al.* Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. **Life Sci**, v. 58, n. 2, p. PL 41-6, 1996.

GILL, I. *et al.* Presynaptic NMDA receptors - dynamics and distribution in developing axons *in vitro* and *in vivo*. **J Cell Sci**, v. 128, n. 4, p. 768-80, 2015.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med**, v. 67 Suppl 1, p. S26-8, 2005.

GOEL, N.; BALE, T. L. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. **J Neuroendocrinol**, v. 21, n. 4, p. 415-20, 2009.

GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Mol Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 32-47, 2015.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 254-75, 2002.

GOLD, P. W. *et al.* Corticotropin releasing hormone in the pathophysiology of melancholic and atypical depression and in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Ann N Y Acad Sci**, v. 771, p. 716-29, 1995.

GOLD, P. W. *et al.* Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. **Mol Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 257-64, 1996.

GOMEZ, F. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. **Neuroendocrinology**, v. 63, n. 4, p. 327-37, 1996.

GONDA, X. Basic pharmacology of NMDA receptors. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 12, p. 1558-67, 2012.

GONG, Z. H. *et al.* . Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. **Eur J Pharmacol**, v. 550, n. 1-3, p. 112-6, 2006.

GOODKIND, M. *et al.* Identification of a common neurobiological substrate for mental illness. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 305-15, 2015.

GOOSENS, K. A.; SAPOLSKY, R. M. Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging. In: RIDDLE, D. R. (Ed.). **Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms**. Boca Raton (FL), 2007.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 11, p. 1472-9, 1999.

GOULD, T. D. *et al.* AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 4, p. 387-90, 2004.

GOURLEY, S. L. *et al.* Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 884-90, 2008a.

GOURLEY, S. L.; TAYLOR, J. R. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 9, p. Unit 9 32, 2009.

GOURLEY, S. L. *et al.* Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 353-9, 2008b.

GRAY, J. A. Sex differences in emotional behaviour in mammals including man: endocrine bases. **Acta Psychol (Amst)**, v. 35, n. 1, p. 29-46, 1971.

GREEN, S. M.; LI, J. Ketamine in adults: what emergency physicians need to know about patient selection and emergence reactions. **Acad Emerg Med**, v. 7, n. 3, p. 278-81, 2000.

GREENBERG, S. *et al.* The effect of agmatine administration on ischemic-reperfused isolated rat heart. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**, v. 6, n. 1, p. 37-45, 2001.

GREGUS, A. *et al.* Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 1, p. 105-14, 2005.

GROENEWEG, F. L. *et al.* Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **J Endocrinol**, v. 209, n. 2, p. 153-67, 2011.

GRONLI, J. *et al.* Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 4, p. 842-9, 2006.

GUPTA, D. *et al.* Antidepressant-like effects of a novel 5-HT₃ receptor antagonist 6z in acute and chronic murine models of depression. **Acta Pharmacol Sin**, v. 35, n. 12, p. 1493-503, 2014.

GUSTAVSSON, A. *et al.* Cost of disorders of the brain in Europe 2010. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 10, p. 718-79, 2011.

GUTIERREZ-GARCIA, A. G.; CONTRERAS, C. M. Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 4, p. 542-8, 2009.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? **Pharmacol Ther**, v. 147, p. 1-11, 2015.

HAENISCH, B. *et al.* Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, n. 5, p. G1104-10, 2008.

HALARIS, A.; PLIETZ, J. Agmatine : metabolic pathway and spectrum of activity in brain. **CNS Drugs**, v. 21, n. 11, p. 885-900, 2007.

HALARIS, A. *et al.* Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 881, p. 445-451, 1999.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 1, p. 293-319, 2005.

HAMMEN, C. *et al.* Chronic and acute stress and the prediction of major depression in women. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 8, p. 718-23, 2009.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 54-63, 2013.

HAN, N. *et al.* Agmatine protects Muller cells from high-concentration glucose-induced cell damage via N-methyl-D-aspartic acid receptor inhibition. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 1, p. 1098-106, 2015.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1558-68, 2011.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310-6, 2007.

HASLER, G. *et al.* Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765-81, 2004.

HAZRA, S. *et al.* Reversion of BDNF, Akt and CREB in Hippocampus of Chronic Unpredictable Stress Induced Rats: Effects of Phytochemical, Bacopa Monnieri. **Psychiatry Investig**, v. 14, n. 1, p. 74-80, 2017.

HENN, F. A.; VOLLMAJR, B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 799-804, 2005.

HERMAN, J. P. *et al.* Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-13, 2005.

HERMES, G. *et al.* Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats. **Physiol Behav**, v. 104, n. 2, p. 354-9, 2011.

HILL, M. N. *et al.* Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 9, p. 2085-117, 2012.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2015.

HINDMARCH, I. Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. **Hum Psychopharmacol**, v. 16, n. 3, p. 203-218, 2001.

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev**, v. 17, n. 2, p. 187-205, 1996.

HONG, S. *et al.* Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. **Life Sci**, v. 84, n. 1-2, p. 28-32, 2009.

HONG, S. *et al.* Agmatine protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis in transformed rat retinal ganglion cell line. **BMC Neurosci**, v. 8, p. 81, 2007.

HORI, H.; KUNUGI, H. The Efficacy of Pramipexole, a Dopamine Receptor Agonist, as an Adjunctive Treatment in Treatment-Resistant Depression: An Open-Label Trial. **Scientific World Journal**, 2012.

HOSANG, G. M. *et al.* Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC Med**, v. 12, p. 7, 2014.

HOSHAW, B. A.; MALBERG, J. E.; LUCKI, I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. **Brain Res**, v. 1037, n. 1-2, p. 204-8, 2005.

HUANG, Z. *et al.* Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neurosci Lett**, v. 493, n. 3, p. 145-8, 2011.

HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 387-407, 2003.

HUISMAN, H. *et al.* Novel ELISAs for screening of the biogenic amines GABA, glycine, beta-phenylethylamine, agmatine, and taurine using one derivatization procedure of whole urine samples. **Anal Chem**, v. 82, n. 15, p. 6526-33, 2010.

HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int**, v. 45, n. 5, p. 583-95, 2004.

IJIMA, M. *et al.* Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats. **Brain Res**, v. 1359, p. 75-80, 2010.

IRWIN, S. A.; IGLEWICZ, A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. **J Palliat Med**, v. 13, n. 7, p. 903-8, 2010.

IRWIN, S. A. *et al.* Daily oral ketamine for the treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care: a 28-day open-label proof-of-concept trial. **J Palliat Med**, v. 16, n. 8, p. 958-65, 2013.

ISINGRINI, E. *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. e10404, 2010.

IZQUIERDO, A.; WELLMAN, C. L.; HOLMES, A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. **J Neurosci**, v. 26, n. 21, p. 5733-8, 2006.

JACOBS, B. L.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 262-9, 2000.

JACOBSON, L. H.; CRYAN, J. F. Feeling strained? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. **Behav Genet**, v. 37, n. 1, p. 171-213, 2007.

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Biexponential kinetics of [3H]MK-801 binding: evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels. **Mol Pharmacol**, v. 35, n. 4, p. 387-93, 1989.

JEN-PEI, L. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics. **Taylor & Francis**, p. 1493, 2010.

JERNIGAN, C. S. *et al.* The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1774-9, 2011.

JEZOVA, D.; OLIVER, C.; JURCOVICOVA, J. Stimulation of adrenocorticotropin but not prolactin and catecholamine release by N-methyl-aspartic acid. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 5, p. 488-92, 1991.

JIANG, J.; AMARA, S. G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 1, p. 172-81, 2011.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Prog Neurobiol**, v. 43, n. 1, p. 1-36, 1994.

JOELS, M. *et al.* Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 221-31, 2004.

JOPE, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 441-3, 2003.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 2, p. 95-102, 2004.

KALRA, S. P. *et al.* Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release *in vitro*. **Neurosci Lett**, v. 194, n. 3, p. 165-8, 1995.

KAMALI, M. *et al.* Associations between suicide attempts and elevated bedtime salivary cortisol levels in bipolar disorder. **J Affect Disord**, v. 136, n. 3, p. 350-8, 2012.

KANG, H. J. *et al.* Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1413-7, 2012.

KANCZKOWSKI, W.; SUE, M.; ZACHAROWSKI, K.; REINCKE, M.; BORNSTEIN, S.R. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 408, p. 241-8, 2015.

KARADAG, H. C. *et al.* Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 88-90, 2003.

KAREGE, F. *et al.* Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 1068-72, 2005a.

KAREGE, F. *et al.* Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 240-5, 2007.

KAREGE, F. *et al.* Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 136, n. 1-2, p. 29-37, 2005b.

KARISHMA, K. K.; HERBERT, J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 445-53, 2002.

KASTER, M. P. *et al.* Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-26, 2012a.

KASTER, M. P. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 3, p. 706-13, 2012b.

KATO, M.; CHANG, C. M. Augmentation treatments with second-generation antipsychotics to antidepressants in treatment-resistant depression. **CNS Drugs**, v. 27 Suppl 1, p. S11-9, 2013.

KATON, W.; LIN, E. H.; KROENKE, K. The association of depression and anxiety with medical symptom burden in patients with chronic medical illness. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 147-55, 2007.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; SCHMALTZ, K. Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 5, n. 2, p. 259-64, 1981.

KELLER, M. B. *et al.* Optimizing outcomes in depression: focus on antidepressant compliance. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 17, n. 6, p. 265-71, 2002.

KELLY, A.; LYNCH, M. A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 4, p. 643-51, 2000.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 499-503, 2003.

KESSELS, H. W.; MALINOW, R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. **Neuron**, v. 61, n. 3, p. 340-50, 2009.

KESSLER, R. C. The effects of stressful life events on depression. **Annu Rev Psychol**, v. 48, p. 191-214, 1997.

KESSLER, R. C. *et al.* The epidemiology of major depressive disorder - Results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-3105, 2003.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annu Rev Public Health**, v. 34, p. 119-38, 2013.

KESSLER, R. C. *et al.* Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, v. 21, n. 3, p. 169-84, 2012.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.

KEYNAN, O. *et al.* Safety and Efficacy of Dietary Agmatine Sulfate in Lumbar Disc-associated Radiculopathy. An Open-label, Dose-escalating

Study Followed by a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. **Pain Med**, v. 11, n. 3, p. 356-368, 2010.

KIERAN, N.; OU, X. M.; IYO, A. H. Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 469, n. 3, p. 380-4, 2010.

KIM, D. J. *et al.* Protective effect of agmatine on a reperfusion model after transient cerebral ischemia: Temporal evolution on perfusion MR imaging and histopathologic findings. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 27, n. 4, p. 780-5, 2006.

KIM, J. H. *et al.* Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. **Exp Neurol**, v. 189, n. 1, p. 122-30, 2004.

KIM, W. K.; SHIN, D.; SONG, W. O. Depression and Its Comorbid Conditions More Serious in Women than in Men in the United States. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 24, n. 12, p. 978-85, 2015.

KITTSTEINER MANUBENS, L.; LOBOS URBINA, D.; ACEITUNO, D. Is electroconvulsive therapy effective as augmentation in clozapine-resistant schizophrenia? **Medwave**, v. 16, n. Suppl5, p. e6577, 2016.

KODAMA, M.; RUSSELL, D. S.; DUMAN, R. S. Electroconvulsive seizures increase the expression of MAP kinase phosphatases in limbic regions of rat brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 360-71, 2005.

KOHR, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: teaching an old drug new tricks. **Anesth Analg**, v. 87, n. 5, p. 1186-93, 1998.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. **Behav Brain Res**, v. 224, n. 1, p. 107-11, 2011.

KOLESNIKOV, Y.; JAIN, S.; PASTERNAK, G. W. Modulation of opioid analgesia by agmatine. **Eur J Pharmacol**, v. 296, n. 1, p. 17-22, 1996.

KOPONEN, E. *et al.* Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. **Cell Mol Neurobiol**, v. 25, n. 6, p. 973-80, 2005.

KORF, J.; VAN PRAAG, H. M.; SEBENS, J. B. Effect of intravenously administered probenecid in humans on the levels of 5-hydroxyindoleacetic acid, homovanillic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in cerebrospinal fluid. **Biochem Pharmacol**, v. 20, n. 3, p. 659-68, 1971.

KORNHUBER, J.; WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. **Biol Psychiatry**, v. 41, n. 2, p. 135-44, 1997.

KOSSEL. Über das Agmatin. **Z Für Physiol Chem**, v. 66, p. 257-261, 1910.

KOTAGALE, N. R. *et al.* Chronic agmatine treatment prevents behavioral manifestations of nicotine withdrawal in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 754, p. 190-8, 2015.

KOTAGALE, N. R. *et al.* Evidences for the agmatine involvement in antidepressant like effect of bupropion in mouse forced swim test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 107, p. 42-47, 2013.

KOTIL, K. *et al.* Investigation of the dose-dependent neuroprotective effects of agmatine in experimental spinal cord injury: a prospective randomized and placebo-control trial. **J Neurosurg Spine**, v. 4, n. 5, p. 392-9, 2006.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305-20, 2010.

KUCUKIBRAHIMOGLU, E. *et al.* The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 571-7, 2009.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectr**, v. 10, n. 10, p. 808-19, 2005.

KUHN, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). **Am J Psychiatry**, v. 115, n. 5, p. 459-64, 1958.

KUMAR, A. *et al.* Stress: Neurobiology, consequences and management. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 5, n. 2, p. 91-7, 2013.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 214, n. 4, p. 819-28, 2011.

KUO, J. R. *et al.* Agmatine-promoted angiogenesis, neurogenesis, and inhibition of gliosis-reduced traumatic brain injury in rats. **J Trauma**, v. 71, n. 4, p. E87-93, 2011.

KUO, J. R. *et al.* Resuscitation from experimental traumatic brain injury by agmatine therapy. **Resuscitation**, v. 75, n. 3, p. 506-14, 2007.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 6, p. 787-93, 2009.

LAJE, G. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and antidepressant efficacy of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 72, n. 11, p. e27-8, 2012.

LAMERS, F. *et al.* Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 692-9, 2013.

LANG, U. E.; BORGWARDT, S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. **Cell Physiol Biochem**, v. 31, n. 6, p. 761-77, 2013.

LAPIDUS, K. A. *et al.* A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 12, p. 970-6, 2014.

LARA, D. R.; BISOL, L. W.; MUNARI, L. R. Antidepressant, mood stabilizing and procognitive effects of very low dose sublingual ketamine in refractory unipolar and bipolar depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 9, p. 2111-7, 2013.

LAUTERBORN, J. C. *et al.* Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 8-21, 2000.

LAVINSKY, D.; ARTENI, N. S.; NETTO, C. A. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 141, n. 1, p. 19-24, 2003.

LEE, B. H. *et al.* Decreased plasma BDNF level in depressive patients. **J Affect Disord**, v. 101, n. 1-3, p. 239-44, 2007.

LEE, G. T. *et al.* Agmatine reduces hydrogen peroxide in mesangial cells under high glucose conditions. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 3, p. 251-7, 2003.

LEE, H. K.; KIRKWOOD, A. AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. **Semin Cell Dev Biol**, v. 22, n. 5, p. 514-20, 2011.

LEE, H. K. *et al.* Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 631-43, 2003.

LEE, W. T. *et al.* Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. **Brain Res**, v. 1281, p. 64-70, 2009.

LEITCH, B. *et al.* Spatial learning-induced increase in agmatine levels at hippocampal CA1 synapses. **Synapse**, v. 65, n. 2, p. 146-53, 2011.

LENZE, E. J.; SKIDMORE, E. R.; BEGLEY, A. E. *et al.* Memantine for late-life depression and apathy after a disabling medical event: a 12-week, double-blind placebo-controlled pilot study. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 27, n. 9, p. 974-80, 2012.

LEPACK, A. E. *et al.* BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 1, 2015.

LEPINE, J. P.; BRILEY, M. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 7, n. Suppl 1, p. 3-7, 2011.

LEVINE, J. *et al.* Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 7, p. 586-93, 2000.

LI, G. *et al.* Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science**, v. 263, n. 5149, p. 966-9, 1994.

LI, J. *et al.* Late gestational maternal serum cortisol is inversely associated with fetal brain growth. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 3, p. 1085-92, 2012.

LI, J. *et al.* Nobiletin Ameliorates the Deficits in Hippocampal BDNF, TrkB, and Synapsin I Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 359682, 2013.

LI, K. W.; CHEN, N.; SMIT, A. B. Interaction proteomics of the AMPA receptor: towards identification of receptor sub-complexes. **Amino Acids**, v. 44, n. 5, p. 1247-51, 2013.

LI, M.; D'ARCY, C.; MENG, X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. **Psychol Med**, v. 46, n. 4, p. 717-30, 2016.

LI, N. *et al.* Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-61, 2011.

LI, N. X. *et al.* mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-964, 2010.

LI, X. *et al.* Agmatine protects against zymosan-induced acute lung injury in mice by inhibiting NF-kappaB-mediated inflammatory response. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 583736, 2014.

LI, X. *et al.* Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 1028-33, 2001.

LI, X. *et al.* Enhancement of antidepressant potency by a potentiator of AMPA receptors. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 3, p. 419-30, 2003.

LI, Y. *et al.* TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron**, v. 59, n. 3, p. 399-412, 2008.

LI, Y. F. *et al.* Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. **Acta Pharmacol Sin**, v. 27, n. 11, p. 1395-400, 2006.

LI, Y. F. *et al.* Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. **Eur J Pharmacol**, v. 469, n. 1-3, p. 81-8, 2003.

LINDHOLM, J. S.; CASTREN, E. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 143, 2014.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, 1994.

LIU, D. *et al.* Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264, p. 9-16, 2014.

LIU, P. *et al.* Behavioral effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats. **Behav Neurosci**, v. 122, n. 3, p. 557-69, 2008.

LIU, R. J. *et al.* GSK-3 Inhibition Potentiates the Synaptogenic and Antidepressant-Like Effects of Subthreshold Doses of Ketamine. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2268-2277, 2013.

LIU, R. J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. **Biol Psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 996-1005, 2012.

LIU, X. L. *et al.* Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. **Sci Rep**, v. 5, p. 16024, 2015.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 14, p. 1563-86, 2009.

LOPEZ LEON, S. *et al.* The dopamine D4 receptor gene 48-base-pair-repeat polymorphism and mood disorders: a meta-analysis. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 999-1003, 2005.

LOSCHER, W.; ANNIES, R.; HONACK, D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. **Neurosci Lett**, v. 128, n. 2, p. 191-4, 1991.

LOWY, M. T.; WITTENBERG, L.; YAMAMOTO, B. K. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. **J Neurochem**, v. 65, n. 1, p. 268-74, 1995.

LU, W. *et al.* Agmatine inhibits morphine-induced memory impairment in the mouse step-down inhibitory avoidance task. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 97, n. 2, p. 256-61, 2010.

LU, X. Y. *et al.* Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1593-8, 2006.

LUDKA, F. K. *et al.* Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 400-12, 2013.

LUFT, A.; MENDES, F. F. Low S(+) ketamine doses: a review. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 55, n. 4, p. 460-9, 2005.

LUPIEN, S. J. *et al.* . Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 434-45, 2009.

LUSSIER, A. L. *et al.* The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 174-83, 2013.

LUSZCZKI, J. J. *et al.* Agmatine enhances the anticonvulsant action of phenobarbital and valproate in the mouse maximal electroshock seizure model. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 115, n. 11, p. 1485-94, 2008.

MA, M. *et al.* Antidepressant effects of combination of brexpiprazole and fluoxetine on depression-like behavior and dendritic changes in mice after inflammation. **Psychopharmacology (Berl)**, 2016.

MACHADO-VIEIRA, R.; MANJI, H. K.; ZARATE, C. A. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. **Neuroscientist**, v. 15, n. 5, p. 525-39, 2009.

MACHADO-VIEIRA, R. *et al.* Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. **Pharmacol Ther**, v. 123, n. 2, p. 143-50, 2009.

MACKOWIAK, M. *et al.* An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2002.

MACQUEEN, G.; FRODL, T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 252-64, 2011.

MAENG, S. *et al.* Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: Role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349-352, 2008.

MAENG, S.; ZARATE, C. A., JR. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. **Curr Psychiatry Rep**, v. 9, n. 6, p. 467-74, 2007.

MAES, M. *et al.* New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--

Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 127-50, 2012.

MAES, M. *et al.* Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. **Acta Psychiatr Scand**, v. 97, n. 4, p. 302-8, 1998.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 83-8, 1995.

MAGARINOS, A. M.; VERDUGO, J. M.; MCEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 14002-8, 1997.

MAGNI, L. R. *et al.* Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 7, p. CD004185, 2013.

MAI, L.; JOPE, R. S.; LI, X. BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. **J Neurochem**, v. 82, n. 1, p. 75-83, 2002.

MANOSSO, L. M. *et al.* Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 123, n. 3, p. 339-52, 2016.

MANOSSO, L. M. *et al.* Antidepressant-like effect of alpha-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF-alpha. **Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 48-57, 2013.

MANTOVANI, M. *et al.* Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci Lett**, v. 343, n. 1, p. 1-4, 2003.

MARCUS, R. N. *et al.* The efficacy and safety of aripiprazole as adjunctive therapy in major depressive disorder: a second multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J Clin Psychopharmacol**, v. 28, n. 2, p. 156-65, 2008.

MARTINEZ-TURRILLAS, R.; FRECHILLA, D.; DEL RIO, J. Chronic antidepressant treatment increases the membrane expression of AMPA receptors in rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 8, p. 1230-7, 2002.

MARTIN, L.L.; BOUCHAL, R.L.; SMITH, D.J. Ketamine inhibits serotonin uptake *in vivo*. **Neuropharmacology**, v. 21, p. 113-118, 1982.

MATHEUS, F. C. *et al.* Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav Brain Res**, v. 235, n. 2, p. 263-72, 2012.

MATHEW, S. J.; KEEGAN, K.; SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, n. 3, p. 243-8, 2005.

MATTISON, H. A. *et al.* The role of glutamate in the morphological and physiological development of dendritic spines. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 11, p. 1761-70, 2014.

MATTSON, M. P. Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death. **Perspect Dev Neurobiol**, v. 3, n. 2, p. 79-91, 1996.

MAURI, M. C. *et al.* Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 3, p. 124-9, 1998.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 3, p. 436-52, 2006.

MCEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. **Annu Rev Med**, v. 62, p. 431-45, 2011.

MCGEER, P. L.; YASOJIMA, K.; MCGEER, E. G. Inflammation in Parkinson's disease. **Adv Neurol**, v. 86, p. 83-9, 2001.

MCGONAGLE, K. A.; KESSLER, R. C. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. **Am J Community Psychol**, v. 18, n. 5, p. 681-706, 1990.

MCNULTY, J. P.; HAHN, K. Compounded oral ketamine. **Int J Pharm Compd**, v. 16, n. 5, p. 364-8, 2012.

MENDOZA, M. C.; ER, E. E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 6, p. 320-8, 2011.

MERCIER, G. *et al.* MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. **J Mol Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 207-16, 2004.

MEYLAN, E. M. *et al.* Involvement of the agmatinerbic system in the depressive-like phenotype of the *Crtc1* knockout mouse model of depression. **Transl Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. e852, 2016.

MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 371-84, 2004.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001.

MION, G.; VILLEVIEILLE, T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 6, p. 370-80, 2013.

MITANI, H. *et al.* Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 531-4, 2006a.

MITANI, H. *et al.* Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1155-1158, 2006b.

MOEZI, L. *et al.* The interaction of melatonin and agmatine on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. **Epilepsy Behav**, v. 22, n. 2, p. 200-6, 2011.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, v. 24, n. 2, p. 184-97, 2005.

MOOSAVI, M. *et al.* Agmatine protects against scopolamine-induced water maze performance impairment and hippocampal ERK and Akt inactivation. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 5-6, p. 2018-23, 2012.

MOOSAVI, M. *et al.* Agmatine protects against intracerebroventricular streptozotocin-induced water maze memory deficit, hippocampal apoptosis and Akt/GSK3beta signaling disruption. **Eur J Pharmacol**, v. 736, p. 107-14, 2014.

MORALES-MEDINA, J. C. *et al.* Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. **J Chem Neuroanat**, v. 38, n. 4, p. 266-72, 2009.

MORETTI, M. *et al.* TNF-alpha-induced depressive-like phenotype and p38(MAPK) activation are abolished by ascorbic acid treatment. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 6, p. 902-12, 2015a.

MORETTI, M. *et al.* Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2014.

MORETTI, M. *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, 2012.

MORETTI, M. *et al.* Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 1, p. 328-33, 2011.

MORETTI, M. *et al.* Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). **Neurotox Res**, v. 28, n. 3, p. 222-31, 2015b.

MORETTI, M. *et al.* Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP). **Neurotox Res**, 2015c.

MUIR, K. W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 53-60, 2006.

MUN, C. H. *et al.* Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. **Anat Cell Biol**, v. 43, n. 3, p. 230-40, 2010.

MUNHOZ, T. N. *et al.* A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J Affect Disord**, v. 192, p. 226-33, 2016.

MURAKAMI, S. *et al.* Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neurosci Res**, v. 53, n. 2, p. 129-39, 2005.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-504, 1997.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 115-27, 2008.

MURROUGH, J. W. *et al.* Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. **Am J Psychiatry**, v. 170, n. 10, p. 1134-42, 2013a.

MURROUGH, J. W. *et al.* Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 250-6, 2013b.

NACHER, J. *et al.* Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. **Neuroscience**, v. 126, n. 2, p. 503-9, 2004.

NARDI, A. E. Depressão no ciclo da vida. . **Rev Bras Psiquiatr**, v. 22, p. 149-152, 2000.

NEIS, V. B. *et al.* Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 150-151, p. 108-114, 2016a.

NEIS, V. B. *et al.* Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. **Behav Brain Res**, v. 261, p. 336-344, 2014.

NEIS, V. B. *et al.* Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 26, n. 6, p. 959-71, 2016b.

NEIS, V. B. *et al.* Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 130, p. 9-14, 2015.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336-42, 1996.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

NESTLER, E. J. *et al.* Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A., JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-9, 2006.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 1161-9, 2010.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 2365-72, 1996.

NICIU, M. J. *et al.* Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part II: bipolar disorder. **CNS Spectr**, v. 18, n. 5, p. 242-51, 2013a.

NICIU, M. J. *et al.* Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **J Neural Transm**, 2013b.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 656-64, 2012.

NING, L. N. *et al.* Gender-Related Hippocampal Proteomics Study from Young Rats After Chronic Unpredicted Mild Stress Exposure. **Mol Neurobiol**, 2017.

NIRMAL, J. *et al.* Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* Link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **BMC Complement Altern Med**, v. 8, p. 15, 2008.

NISHIMURA, M.; SATO, K.; OKADA, T.; YOSHIYA, I.; SCHLOSS, S. *et al.* Ketamine inhibits monoamine transporters expressed in human embryonic kidney 293 cells. **Anesthesiology**, v. 88, p. 768–774, 1998.

NOSYREVA, E. *et al.* Acute suppression of spontaneous neurotransmission drives synaptic potentiation. **J Neurosci**, v. 33, n. 16, p. 6990-7002, 2013.

O'LEARY, O. F.; WU, X.; CASTREN, E. Chronic fluoxetine treatment increases expression of synaptic proteins in the hippocampus of the ovariectomized rat: role of BDNF signalling. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 367-81, 2009.

OBERLANDER, T. F. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function in 3-month old infants with prenatal selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressant exposure. **Early Hum Dev**, v. 84, n. 10, p. 689-97, 2008.

OF, O. L.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Faster, better, stronger: Towards new antidepressant therapeutic strategies. **Eur J Pharmacol**, 2014.

OH, D. H.; PARK, Y. C.; KIM, S. H. Increased glycogen synthase kinase-3beta mRNA level in the hippocampus of patients with major depression: a study using the stanley neuropathology consortium integrative database. **Psychiatry Investig**, v. 7, n. 3, p. 202-7, 2010.

OLAUSSON, P. *et al.* Persistent effects of prior chronic exposure to corticosterone on reward-related learning and motivation in rodents. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 225, n. 3, p. 569-77, 2013.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Ketamine and preemptive analgesia. **Rev Bras Anestesiol**, v. 54, n. 5, p. 739-52, 2004.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int J Dev Neurosci**, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, 2008.

OLMOS, G. *et al.* Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br J Pharmacol**, v. 127, n. 6, p. 1317-1326, 1999.

ONAL, A. *et al.* Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: Possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. **Life Sci**, v. 73, n. 4, p. 413-428, 2003.

OTTE, C. *et al.* Depression and 24-hour urinary cortisol in medical outpatients with coronary heart disease: The Heart and Soul Study. **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 4, p. 241-7, 2004.

PACHECO, D.F.; ROMERO, T.R.L.; ANDDUARTE, I.D.G. Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and μ and δ - opioid receptors. **Brain Res**, v. 1562, p. 69–75, 2014.

PANDEY, G. N. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 8, p. 1047-61, 2008.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 383-400, 2013.

PAPAKOSTAS, G. I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 391-402, 2006.

PAPP, M.; MORYL, E. Antidepressant Activity of Noncompetitive and Competitive Nmda Receptor Antagonists in a Chronic Mild Stress Model of Depression. **Eur J Pharmacol**, v. 263, n. 1-2, p. 1-7, 1994.

PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 9, p. 464-8, 2008.

PASZCUK, A. F. *et al.* Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. **Brain Res**, v. 1159, p. 124-33, 2007.

PATKAR, A. A.; PAE, C. U. Atypical Antipsychotic Augmentation Strategies in the Context of Guideline-based Care for the Treatment of Major Depressive Disorder. **CNS Drugs**, v. 27, p. S29-S37, 2013.

PAZINI, F. L. *et al.* Creatine Prevents Corticosterone-Induced Reduction in Hippocampal Proliferation and Differentiation: Possible Implication for Its Antidepressant Effect. **Mol Neurobiol**, 2016a.

PAZINI, F. L. *et al.* Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol**, 2015.

PAZINI, F. L. *et al.* Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 10, p. 6818-6834, 2016b.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.

PFENNINGER, E. G.; DURIEUX, M. E.; HIMMELSEHER, S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. **Anesthesiology**, v. 96, n. 2, p. 357-66, 2002.

PILETZ, J. E. *et al.* Agmatine crosses the blood-brain barrier. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 64-74, 2003.

PITTENGER, C. *et al.* Riluzole in the treatment of mood and anxiety disorders. **CNS Drugs**, v. 22, n. 9, p. 761-86, 2008.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

PITYCHOUTIS, P. M. *et al.* Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: sex differences exposed. **Neuroscience**, v. 159, n. 4, p. 1216-32, 2009.

PIWOWARSKA, J. *et al.* Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with fluoxetine. **Psychiatry Res**, v. 198, n. 3, p. 407-11, 2012.

PLAYER, M. J. *et al.* Neuroplasticity in depressed individuals compared with healthy controls. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2101-8, 2013.

POLESZAK, E. *et al.* Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 5, p. 746-52, 2006.

POPOLI, M. *et al.* The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, 2011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.

PRESKORN, S. H.; BAKER, B.; KOLLURI, S. *et al.* An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. **J Clin Psychopharmacol**, v. 28, n. 6, p. 631-7, 2008.

PRINCE, M. *et al.* No health without mental health. **Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 859-77, 2007.

PRUUS, K. *et al.* The effect of the NMDA receptor antagonist dizocilpine on behavioral manifestations of serotonin and adrenergic antidepressants in rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 32, n. 2, p. 123-8, 2010.

QI, X. *et al.* A role for the extracellular signal-regulated kinase signal pathway in depressive-like behavior. **Behav Brain Res**, v. 199, n. 2, p. 203-9, 2009.

QIN XH, S. R., WU N, WEI XL, ZHANG H, LI J. The analgesic effect of agmatine on inflammatory pain and its influence on the analgesia effect of morphine. **Chin Pharmacol Bull**, v. 22, p. 1070–1074, 2005.

RAASCH, W. *et al.* Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci**, v. 56, n. 26, p. 2319–30, 1995.

RAASCH, W. *et al.* Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 6, p. 755–80, 2001.

RADLEY, J. J. *et al.* Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 16, n. 3, p. 313–20, 2006.

RAJKOWSKA, G. *et al.* Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1085–98, 1999.

RANTAMAKI, T. *et al.* Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 10, p. 2152–62, 2007.

RAY, M. T.; SHANNON WEICKERT, C.; WEBSTER, M. J. Decreased BDNF and TrkB mRNA expression in multiple cortical areas of patients with schizophrenia and mood disorders. **Transl Psychiatry**, v. 4, p. e389, 2014.

REGUNATHAN, S.; PILETZ, J. E. Regulation of inducible nitric oxide synthase and agmatine synthesis in macrophages and astrocytes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 20–9, 2003.

REINER, A.; ARANT, R. J.; ISACOFF, E. Y. Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex. **Cell Rep**, v. 1, n. 3, p. 234-40, 2012.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol Sci**, v. 21, n. 5, p. 187-193, 2000.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1219-33, 1999.

REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505-11, 1985.

REUS, G. Z. *et al.* Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 1, p. 166-171, 2011.

REYNOLDS, I. J.; MILLER, R. J. Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. **Br J Pharmacol**, v. 95, n. 1, p. 95-102, 1988.

RIAZI, K. *et al.* The synergistic anticonvulsant effect of agmatine and morphine: possible role of alpha 2-adrenoceptors. **Epilepsy Res**, v. 65, n. 1-2, p. 33-40, 2005.

RICCI, L. C.; WELLMAN, M. M. Monoamines: biochemical markers of suicide? **J Clin Psychol**, v. 46, n. 1, p. 106-16, 1990.

RIEGER, D. K. *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **J Mol Recognit**, v. 27, n. 12, p. 746-54, 2014.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical Alterations of Serotonergic Neuronal Systems in Depression. **J Clin Psychiatry**, v. 53, p. 3-7, 1992.

ROBERTS, J. C. *et al.* Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies of agmatine after spinal administration in the mouse. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 3, p. 1226-33, 2005.

RODRIGUES, A. L. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

ROGOZ, Z. Combined treatment with atypical antipsychotics and antidepressants in treatment-resistant depression: preclinical and clinical efficacy. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1535-44, 2013.

ROGOZ, Z. *et al.* Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 8, p. 1024-1030, 2002.

ROSA, A. O. *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1549-56, 2008.

ROSA, P. B. *et al.* Antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine involve modulation of GABAA and GABAB receptors. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 5, p. 996-1001, 2016.

ROSA, P. B. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 1-6, 2014.

RUHE, H. G. *et al.* Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. **J Affect Disord**, v. 137, n. 1-3, p. 35-45, 2012.

RUSH, A. J. *et al.* Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905-17, 2006a.

RUSH, A. J. *et al.* Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. **N Engl J Med**, v. 354, n. 12, p. 1231-42, 2006b.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 609-25, 2013.

SAALTINK, D. J.; VREUGDENHIL, E. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 13, p. 2499-515, 2014.

SAHIN, C. *et al.* Agmatine Reverses Sub-Chronic Stress-induced Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) Activation and Cytokine Response in Rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2016.

SALOMON, R. M. *et al.* Lack of behavioral effects of monoamine depletion in healthy subjects. **Biol Psychiatry**, v. 41, n. 1, p. 58-64, 1997.

SAMEER, S. M.; CHAKRABORTY, S. S.; UGALE, R. R. Agmatine attenuates acquisition but not the expression of ethanol conditioned place preference in mice: a role for imidazoline receptors. **Behav Pharmacol**, v. 24, n. 2, p. 87-94, 2013.

SANACORA, G. *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 705-13, 2004.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63-77, 2012.

SANACORA, G. *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-437, 2008.

SANACORA, G.; SMITH, M. A.; PATHAK, S. *et al.* Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 9, p. 978-85, 2014.

SANDERSON, J. L.; DELL'ACQUA, M. L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 321-36, 2011.

SANTARELLI, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805-9, 2003.

SANTOS, A. R. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 7, p. 1021-34, 2005.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive,

suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr Rev**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SARKAR, A.; KABBAJ, M. Sex Differences in Effects of Ketamine on Behavior, Spine Density, and Synaptic Proteins in Socially Isolated Rats. **Biol Psychiatry**, v. 80, n. 6, p. 448-56, 2016.

SASTRE, M. *et al.* Metabolism of agmatine in macrophages: modulation by lipopolysaccharide and inhibitory cytokines. **Biochem J**, v. 330 (Pt 3), p. 1405-9, 1998.

SATRIANO, J. *et al.* Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15313-6, 1998.

SATRIANO, J. *et al.* Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. **J Cell Physiol**, v. 188, n. 3, p. 313-20, 2001.

SAVITZ, J.; DREVETS, W. C. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 5, p. 699-771, 2009.

SCAPAGNINI, G. *et al.* Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477-90, 2012.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHIPPER, P.; VANMOLKOT, L.; PEETERS, F. P. [Combining a classic monoamine oxidase inhibitor with a tricyclic antidepressant in

therapy-resistant depression: a case report and literature review]. **Tijdschr Psychiatr**, v. 58, n. 12, p. 886-890, 2016.

SCHMAAL, L. *et al.* Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 6, p. 806-12, 2016.

SCHMIDT, H. D.; BANASR, M.; DUMAN, R. S. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. **Drug Discov Today Ther Strateg**, v. 5, n. 3, p. 151-156, 2008.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2378-91, 2010.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Exp Neurol**, v. 233, n. 1, p. 12-21, 2012.

SCHOSSER, A. *et al.* European Group for the Study of Resistant Depression (GSRD)--where have we gone so far: review of clinical and genetic findings. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22, n. 7, p. 453-68, 2012.

SCHOUSBOE, A.; BAK, L. K.; WAAGEPETERSEN, H. S. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 102, 2013.

SCHWARTZ, D. *et al.* Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. **Am J Physiol**, v. 272, n. 5 Pt 2, p. F597-601, 1997.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: Meta-analyses and implications. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527-532, 2008.

SENER, A. *et al.* Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Insulinotropic action of agmatine. **Biochem Pharmacol**, v. 38, n. 2, p. 327-30, 1989.

SEO, S.; LIU, P.; LEITCH, B. Spatial learning-induced accumulation of agmatine and glutamate at hippocampal CA1 synaptic terminals. **Neuroscience**, v. 192, p. 28-36, 2011.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 10, p. 1259-72, 2010.

SHANSKY, R. M. *et al.* Stress-induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. **Cereb Cortex**, v. 19, n. 10, p. 2479-84, 2009.

SHAPIRA, M. *et al.* Role of glycogen synthase kinase-3beta in early depressive behavior induced by mild traumatic brain injury. **Mol Cell Neurosci**, v. 34, n. 4, p. 571-7, 2007.

SHELIN, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1516-8, 2003.

SHELIN, Y. I. *et al.* Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 9, p. 3908-13, 1996.

SHELTON, R. C.; PAPAKOSTAS, G. I. Augmentation of antidepressants with atypical antipsychotics for treatment-resistant major depressive disorder. **Acta Psychiatr Scand**, v. 117, n. 4, p. 253-9, 2008.

SHIMIZU, E. *et al.* Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70-5, 2003.

SHIRAYAMA, Y. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 3251-61, 2002.

SHOPSIN, B. The clinical antidepressant effect of exogenous agmatine is not reversed by parachlorophenylalanine: a pilot study. **Acta Neuropsychiatr**, v. 25, n. 2, p. 113-8, 2013.

SIEGRIST, J. *et al.* Depressive symptoms and psychosocial stress at work among older employees in three continents. **Global Health**, v. 8, p. 27, 2012.

SILVA, M. T. *et al.* Olanzapine plus fluoxetine for bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 146, n. 3, p. 310-8, 2013.

SILVA, R. *et al.* Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. **Neuroscience**, v. 152, n. 3, p. 656-69, 2008.

SIUCIAK, J. A. *et al.* Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 1, p. 131-7, 1997.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.

SKOLNICK, P. *et al.* Current perspectives on the development of non-biogenic amine-based antidepressants. **Pharmacol Res**, v. 43, n. 5, p. 411-23, 2001.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 11, p. 563-569, 2009.

SMITH, D.J.; BOUCHAL, R.L.; DESANCTIS, C.A. *et al.* Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites *in vivo* and *in vitro*. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 1253–1260, 1987.

SNYDER, J. S. *et al.* Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458-61, 2011.

SOARES, C. N.; ZITEK, B. Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: a continuum of vulnerability? **J Psychiatry Neurosci**, v. 33, n. 4, p. 331-43, 2008.

SONG, J. *et al.* Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. **Yonsei Med J**, v. 55, n. 3, p. 689-99, 2014.

SONG, J. *et al.* The Effect of Agmatine on Expression of IL-1beta and TLX Which Promotes Neuronal Differentiation in Lipopolysaccharide-Treated Neural Progenitors. **Exp Neurobiol**, v. 22, n. 4, p. 268-76, 2013.

SORIANO, F. X.; HARDINGHAM, G. E. Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 2, p. 381-7, 2007.

SOWA-KUCMA, M. *et al.* Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. **J Affect Disord**, v. 151, n. 3, p. 924-31, 2013.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777-90, 2010.

STERU, L. *et al.* The Tail Suspension Test - a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**, v. 447, n. 2-3, p. 285-96, 2002.

SU, R. B. *et al.* Anticonvulsive effect of agmatine in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 2, p. 345-9, 2004.

SU, X. W. *et al.* Chronic treatment with AMPA receptor potentiator Org 26576 increases neuronal cell proliferation and survival in adult rodent hippocampus. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 206, n. 2, p. 215-22, 2009.

SULAKHIYA, K. *et al.* Effect of Beta vulgaris Linn. Leaves Extract on Anxiety- and Depressive-like Behavior and Oxidative Stress in Mice after Acute Restraint Stress. **Pharmacognosy Res**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2016.

SVENNINGSSON, P. *et al.* Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3182-7, 2002.

SZEWCZYK, B. *et al.* Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 517-26, 2015.

TAKAMORI, S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? **Neurosci Res**, v. 55, n. 4, p. 343-51, 2006.

TAKATSU-COLEMAN, A. L. *et al.* Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, n. 4, p. 259-68, 2013.

TAKSANDE, B. G. *et al.* Agmatine attenuates lipopolysaccharide induced anorexia and sickness behavior in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 132, p. 108-114, 2015.

TAKSANDE, B. G. *et al.* Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 720, n. 1-3, p. 115-20, 2013.

TAKSANDE, B. G. *et al.* Neuropeptide Y in the central nucleus of amygdala regulates the anxiolytic effect of agmatine in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 24, n. 6, p. 955-63, 2014.

TAKSANDE, B. G. *et al.* Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 4, p. 415-424, 2009.

TALIAZ, D. *et al.* Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **J Neurosci**, v. 31, n. 12, p. 4475-83, 2011.

TAO, W. *et al.* . Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. **Behav Brain Res**, v. 308, p. 177-86, 2016.

TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5549-56, 2006.

TAYLOR, C. *et al.* Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, n. 5, p. 549-57, 2005.

THAIPISUTTIKUL, P. *et al.* Psychiatric comorbidities in patients with major depressive disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 10, p. 2097-103, 2014.

THASE, M. E. *et al.* Cognitive therapy versus medication in augmentation and switch strategies as second-step treatments: a STAR*D report. **Am J Psychiatry**, v. 164, n. 5, p. 739-52, 2007.

THIERRY, B. *et al.* The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 90, n. 2, p. 284-5, 1986.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 593-8, 1995.

THOMPSON RAY, M. *et al.* Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. **J Psychiatry Neurosci**, v. 36, n. 3, p. 195-203, 2011.

TIZABI, Y. *et al.* Antidepressant-like effects of low ketamine dose is associated with increased hippocampal AMPA/NMDA receptor density ratio in female Wistar-Kyoto rats. **Neuroscience**, v. 213, p. 72-80, 2012.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur J Pharmacol**, v. 185, n. 1, p. 1-10, 1990.

TZSCHENTKE, T. M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. **Amino Acids**, v. 23, n. 1-3, p. 147-52, 2002.

ULRICH-LAI, Y. M. *et al.* Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 5, p. E965-73, 2006.

VAN DER FELTZ-CORNELIS, C. M. *et al.* Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 380-95, 2010.

VAN DER KOOY K, V. H. H., MARWIJK H, MARTEN H, STEHOUWER C, BEEKMAN A. . Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. **Int J Geriatr Psychiatry** v. 22, p. 613-26., 2007.

VAN RIEL, E. *et al.* Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 649-58, 2003.

VENERO, C.; BORRELL, J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 2465-73, 1999.

VIGO, D.; THORNICROFT, G.; ATUN, R. Estimating the true global burden of mental illness. **Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 171-8, 2016.

VOS, T. *et al.* The burden of major depression avoidable by longer-term treatment strategies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 11, p. 1097-103, 2004.

VOSS, O. P. *et al.* Molecular mechanisms of neurite growth with AMPA receptor potentiation. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 590-7, 2007.

VYTHILINGAM, M. *et al.* Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment. **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 101-12, 2004.

WANG, C. C. *et al.* Beneficial effect of agmatine on brain apoptosis, astrogliosis, and edema after rat transient cerebral ischemia. **BMC Pharmacol**, v. 10, p. 11, 2010.

WANG, J. *et al.* Effects of Chronic Stress on Cognition in Male SAMP8 Mice. **Cell Physiol Biochem**, v. 39, n. 3, p. 1078-86, 2016.

WANG, W. P. *et al.* Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 1084, n. 1, p. 210-6, 2006.

WANG XL, S. R., YANG HJ, WU N, MI WD, LI J Effect of agmatine on morphine analgesia, and tolerance in a rat model of neuropathic pain. **Chin J Anesthesiol** v. 25, p. 584–588, 2005.

WEISS, J. M. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 368-70; discussion 371-7, 1997.

WHO. Suicide. <http://www.who.int/topics/suicide/en/> 2016.

WIEBER, J. *et al.* Pharmacokinetics of ketamine in man. **Anaesthesist**, v. 24, n. 6, p. 260-3, 1975.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, 1997.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WILLNER, P.; HALE, A. S.; ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **J Affect Disord**, v. 86, n. 1, p. 37-45, 2005.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-34, 1992.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, n. 3, p. 358-64, 1987.

WONG, D. T.; PERRY, K. W.; BYMASTER, F. P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 9, p. 764-74, 2005.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Res**, v. 531, n. 1-2, p. 225-31, 1990.

XIONG, F.; ZHANG, L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Front Neuroendocrinol**, v. 34, n. 1, p. 27-46, 2013.

XU, H. *et al.* High dosage of agmatine alleviates pentylenetetrazole-induced chronic seizures in rats possibly by exerting an anticonvulsive effect. **Exp Ther Med**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2014.

XU, L. Z. *et al.* BDNF-GSK-3beta-beta-Catenin Pathway in the mPFC Is Involved in Antidepressant-Like Effects of Morinda officinalis Oligosaccharides in Rats. **Int J Neuropsychopharmacol**, 2016.

YALCIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behav Brain Res**, v. 193, n. 1, p. 140-3, 2008.

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C.A.; CROXTON, T.L. Inhibitory effects of thiopental, ketamine and propofol on voltage-dependent Ca₂C channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **Anesthesiology**, v. 83, p. 1274–1282, 1995.

YANG, C. *et al.* Acute increases in plasma mammalian target of rapamycin, glycogen synthase kinase-3beta, and eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation after ketamine treatment in three depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. e35-6, 2013.

YANG, C. H.; HUANG, C. C.; HSU, K. S. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. **J Neurosci**, v. 25, n. 17, p. 4288-93, 2005.

YANG, P. C. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. **J Biol Chem**, v. 283, n. 5, p. 2631-43, 2008.

YANG, X. C.; REIS, D. J. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 288, n. 2, p. 544-9, 1999.

YANG, Y.; RAINE, A. Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. **Psychiatry Res**, v. 174, n. 2, p. 81-8, 2009.

YESILYURT, O.; UZBAY, I. T. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an alpha(2)-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 98-103, 2001.

YOSHIMURA, S. *et al.* Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. **Steroids**, v. 68, n. 5, p. 439-45, 2003.

YOUNG, E. A.; CARLSON, N. E.; BROWN, M. B. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 267-76, 2001.

YU, C. G. *et al.* Agmatine improves locomotor function and reduces tissue damage following spinal cord injury. **Neuroreport**, v. 11, n. 14, p. 3203-7, 2000.

ZAFRA, F. *et al.* Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **EMBO J**, v. 9, n. 11, p. 3545-50, 1990.

ZARATE, C., JR. *et al.* Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harv Rev Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 293-303, 2010.

ZARATE, C. A. *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-864, 2006.

ZARATE, C. A., JR.; MATHEWS, D.; IBRAHIM, L. *et al.* A randomized trial of a low-trapping nonselective N-methyl-D-aspartate channel blocker in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 257-64, 2013.

ZARIFKAR, A. *et al.* Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. **Eur J Pharmacol**, v. 634, n. 1-3, p. 84-8, 2010.

ZEIDAN, M. P. *et al.* Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, v. 565, n. 1-3, p. 125-131, 2007.

ZETTERSTROM, T. S. *et al.* Manipulations of brain 5-HT levels affect gene expression for BDNF in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 7, p. 1063-73, 1999.

ZHANG, K. *et al.* Continuous GSK-3beta overexpression in the hippocampal dentate gyrus induces prodepressant-like effects and increases sensitivity to chronic mild stress in mice. **J Affect Disord**, v. 146, n. 1, p. 45-52, 2013.

ZHANG, Q. G. *et al.* Positive modulation of AMPA receptors prevents downregulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia. **Hippocampus**, v. 20, n. 1, p. 65-77, 2010.

ZHAO, Y. *et al.* A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **Eur J Pharmacol**, v. 581, n. 1-2, p. 113-20, 2008.

ZHAO, Y. *et al.* The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. **Brain Res**, v. 1261, p. 82-90, 2009.

ZHOU, M. *et al.* Abnormal Expression of MicroRNAs Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress in Rat Hippocampal Tissues. **Mol Neurobiol**, 2017.

ZHOU, W. *et al.* Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **Eur Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 419-23, 2014.

ZHOU, C.; DOUGLAS, J.E.; KUMAR, N.N. Forebrain HCN1 channels contribute to hypnotic actions of ketamine. **Anesthesiology**, v. 118, p. 785-795, 2013.

ZHOU, C.; LIANG, P.; LIU, J. *et al.* HCN1 channels contribute to the effects of amnesia and hypnosis but not immobility of volatile anesthetics. **Anesth Analg**, v. 121, p. 661-666, 2015.

ZHU, L. *et al.* Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice. **Physiol Behav**, v. 163, p. 184-92, 2016.

ZHU, M. Y. *et al.* Effect of agmatine against cell death induced by NMDA and glutamate in neurons and PC12 cells. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 4-5, p. 865-872, 2003.

ZHU, M. Y.; WANG, W. P.; BISSETTE, G. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 2019-27, 2006.

ZHU, M. Y. *et al.* Exogenous agmatine has neuroprotective effects against restraint-induced structural changes in the rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1320-32, 2008.

ZHUANG, F. *et al.* The antidepressant-like effect of alarin is related to TrkB-mTOR signaling and synaptic plasticity. **Behav Brain Res**, v. 313, p. 158-71, 2016.

ZINK, M. *et al.* Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 465-73, 2010.

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**, v. 381, n. 3, p. 279-83, 2005.

ZOMKOWSKI, A. D. E. *et al.* Putrescine produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 1419-25, 2006.

ZOMKOWSKI, A. D. E. *et al.* Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport**, v. 13, n. 4, p. 387-391, 2002.

ZOMKOWSKI, A. D. E. *et al.* Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res**, v. 1023, n. 2, p. 253-263, 2004.