

Vivian Binder Neis

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA
AGMATINA EM UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia
Severo Rodrigues

Florianópolis
2013

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

Neis, Vivian Binder

Avaliação do efeito tipo-antidepressivo da agmatina em um modelo animal de depressão [dissertação] / Vivian Binder Neis ; orientador, Ana Lúcia Severo Rodrigues - Florianópolis, SC, 2013.

114 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

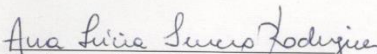
1. Neurociências. 2. depressão. 3. agmatina. 4. inflamação. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

VIVIAN BINDER NEIS

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO
DA AGMATINA EM UM MODELO ANIMAL DE
DEPRESSÃO”**

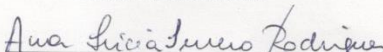
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 18 de fevereiro de 2013.

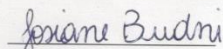


Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Coordenadora do Curso

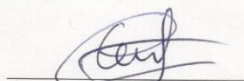
Banca Examinadora:



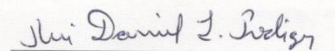
Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora – UFSC



Profa. Josiane Budni
Membro externo



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Membro - UFSC



Prof. Rui Daniel Schroder Prediger
Membro - UFSC

*Este trabalho é dedicado à minha
família.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer...

Aos meus queridos pais, Márcia Elisa Binder Neis e Dauro Canella Neis, que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei e acreditaram em mim. Obrigada pelo carinho, amor, educação e incentivo. Obrigada por serem o meu maior exemplo de vida! Dedico este trabalho a vocês!

Ao meu irmão lindo e fofo Fábio Binder Neis, que independente das brigas e discussões eu amo demais! Agradeço também a minha querida cunhada Jacqueline Ferreira, que é uma flor de pessoa, sempre me tratando com muito carinho.

Ao meu amor, Eduardo Ohira, que sempre me apoiou e me ajudou em todos os momentos. Pelo carinho, companheirismo e paciência. Tenho muita sorte de te ter ao meu lado! Te amo!

As meninas que me ajudaram diretamente nos experimentos: Luana, pelos momentos de estresse e angústia compartilhados nas horas difíceis e também pelos momentos alegres em que as coisas pareciam estar no caminho certo. Com direito a dicas de uma alimentação saudável e balanceada; Morgana, pelo suporte, disponibilidade e paciência. Sou muito grata pela tua ajuda e dedicação, tu fostes muito importante na realização deste trabalho; Ju, por tornar os experimentos mais prazerosos com teu jeitinho doce e cativante e me ajudar em muitos momentos que precisei; Andi, não somente pela ajuda direta nos experimentos e por tudo que já fizesse por mim desde que entrei no mestrado, mas também pela tua amizade! Não consigo expressar em palavras o carinho que sinto por ti. Obrigada!

Aos demais colegas e amigos do laboratório de Neurobiologia da Depressão: Ágatha, André Camille, Camila, Francis, Giordano, Julia, Luis, Maurício e Pri (Pri, obrigada por fazer alguns dos mais belos desenhos que colorei nas páginas deste trabalho). Agradeço a todos pelos momentos de descontração, convivência diária, pelas proveitosas conversas, auxílios e contribuições. Da mesma forma agradeço aos que já fizeram parte do laboratório e

contribuíram para minha formação na pesquisa: Josi, Dani, Dai, Pati, Rica, Kelly, Manu, Daniel, Juliano, Chandra, Roberto.

À minha orientadora Ana Lúcia, pelos ensinamentos, pela competência científica, acompanhamento do trabalho, paciência e confiança depositada.

A todos os Professores da Pós, pelos conhecimentos passados que contribuíram para a minha formação e também aos alunos, em especial a Dai, que esteve comigo em todos os momentos.

Aos amigos queridos que, mesmo sem ter qualquer envolvimento com o trabalho, constituem uma parte fundamental na minha vida: Giugiu (por ser mais do que eu posso querer em uma amiga, por ser uma irmã pra mim), Golin, Julian, Gibran, Luquinhas, Grazi, Taís e Ighinho, meu primo fofo (pelos momentos de descontração e alegria compartilhados).

Aos amigos da faculdade, em especial a Grasi, que foi um presente que ganhei nos cinco anos em que passamos juntas! Por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos!

Aos animais experimentais, serei eternamente grata por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao meu cãozinho Iky, por me receber com carinho todos os dias e me fazer companhia em todos os momentos. Não posso deixar de mencionar a Flor e a Luli, que com seus bigodinhos fofos enchem os meus dias de alegria!!

Ao Nivaldo, pelo auxílio, atenção e disposição diante de qualquer problema.

À Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A agmatina é uma amina catiônica endógena cuja ação antidepressiva é reportada em diversos estudos nos últimos anos. O presente estudo investigou o efeito do tratamento agudo com agmatina no teste da suspensão pela cauda (TSC) em camundongos, um modelo animal preditivo, amplamente utilizado na investigação de novos compostos com ação antidepressiva. O tratamento oral com agmatina em baixas doses (0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC confirmando seu efeito tipo-antidepressivo neste teste. Além disso, considerando a estreita relação entre inflamação e depressão, e a necessidade de investigar o potencial antidepressivo dessa amina em modelos animais de depressão, foi investigado o efeito da agmatina em um modelo que induz um comportamento tipo-depressivo nos animais após administração do fator de necrose tumoral (TNF- α). A administração intracerebroventricular (i.c.v.) de TNF- α (0,001 fg/sítio) promoveu um aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC, caracterizando um comportamento tipo-depressivo, que foi prevenido pelo tratamento com agmatina (0,0001, 0,1 e 1 mg/kg). Adicionalmente, foi avaliado o envolvimento dos sistemas monoaminérgicos, glutamatérgico e da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por TNF- α no TSC. Em animais que não receberam TNF- α , foi observado que a administração de agmatina em uma dose sub-ativa (0,0001 mg/kg) combinada com doses sub-ativas de fluoxetina (5 mg/kg, p.o., inibidor seletivo da recaptção de serotonina), imipramina (0,1 mg/kg, p.o., inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina/antidepressivo tricíclico), bupropiona (1 mg/kg, p.o., inibidor da recaptção de dopamina, com atividade na recaptção de noradrenalina), MK-801 (0,001 mg/kg, p.o., antagonista não competitivo de receptores NMDA) ou 7-nitroindazol (7-NI) (25 mg/kg, i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal), foi capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo sinérgico. Todas essas administrações, inclusive o pré-tratamento com agmatina, antidepressivos, MK-801 e 7-NI isoladamente em suas doses sub-ativas, foram capazes de prevenir o aumento do tempo de imobilidade dos animais induzido pela administração de TNF- α . Nenhuma alteração locomotora dos animais foi verificada no teste do campo aberto. Considerando a relação bem estabelecida entre as citocinas pró-inflamatórias e apoptose, além do potencial anti-apoptótico da agmatina e dos antidepressivos convencionais, foi investigado o

envolvimento de vias de sinalização que regulam neuroplasticidade e sobrevivência celular: proteína anti-apoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax e glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) sobre o efeito antidepressivo da agmatina no modelo do TNF- α . Nenhuma alteração significativa na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 e fosforilação de GSK-3 β (Ser9) foram observadas por western blot. Nosso conjunto de resultados demonstrou que o efeito antidepressivo da agmatina parece ser mediado, pelo menos em parte, por uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, pelo antagonismo de receptores NMDA e inibição da síntese de óxido nítrico, indicando que esta amina catiônica pode se constituir em uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da depressão associada à inflamação.

Palavras chave: agmatina, receptores NMDA, sistema monoaminérgico, teste da suspensão pela cauda, TNF- α , via L-arginina-óxido nítrico

ABSTRACT

Agmatine is an endogenous cationic amine that has been shown to exert antidepressant-like effect. The present study investigated the effect of acute treatment with agmatine in tail suspension test (TST) in mice, a predictive animal model, widely used in research for new compounds with antidepressant action. Oral treatment with agmatine at low doses (0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/kg) reduced the immobility time in the TST confirming its antidepressant-like effect in this test. Furthermore, given the close relationship between inflammation and depression, and the need to investigate the antidepressant potential of this amine in animal models of depression, we investigated the effect of agmatine in a model that induces a depressive-like behavior in animals after administration of factor tumor necrosis factor (TNF- α). Acute administration of TNF- α (0.001 fg/site, i.c.v.) increased immobility time in TST, indicative of a depressive-like behavior, and the treatment with agmatine (0.0001, 0.1 and 1 mg/kg) was able to prevent this effect. Additionally, we examined the involvement of monoaminergic systems, NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effect of agmatine in the model of depression induced by TNF- α in the TST. In control mice (not received TNF- α) administration of sub-effective doses of agmatine (0.0001 mg/kg) combined with sub-effective doses of fluoxetine (5 mg/kg, p.o., a selective serotonin reuptake inhibitor), imipramine (0.1 mg/kg, p.o., tricyclic antidepressant), bupropion (1 mg/kg, p.o., dopamine reuptake inhibitor with subtle activity on noradrenergic reuptake), MK-801 (0.001 mg/kg, p.o. noncompetitive antagonist of NMDA receptors) or 7-nitroindazole (7-NI) (25 mg/kg, i.p. inhibitor of neuronal NOS), produced a synergistic antidepressant-like effect in the TST. All these administrations and also agmatine, antidepressants, MK-801 and 7-NI administered alone at a sub-effective dose were able to prevent the increased immobility time induced by TNF- α . These effects were not accompanied by alterations in mice locomotor activity. Moreover, given the well-established relationship between pro-inflammatory cytokines and apoptosis, beyond the anti-apoptotic potential of agmatine and conventional antidepressants, we investigated the involvement of signaling pathways that regulate neuroplasticity and cellular survival: anti-apoptotic protein Bcl2 protein, pro-apoptotic Bax and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) phosphorylation (Ser9) on the antidepressant effect of agmatine in TNF-

α induced animal model. No significant changes in protein expression of Bax and Bcl-2 and in phosphorylation of GSK-3 β (Ser⁹) were observed by Western blot. Our set of results showed that the acute effect of agmatine on the TNF- α induced animal model of depression appears to be mediated, at least in part by an interaction with monoaminergic systems and by the inhibition of NMDA receptors and nitric oxide synthesis, indicating that this cationic amine may constitute a new therapeutic alternative for the treatment of depression associated with inflammation.

Keywords: agmatine, NMDA receptors, monoaminergic system, tail suspension test, TNF- α , L-arginine-nitric oxide pathway

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hipótese monoaminérgica da depressão.....	23
Figura 2 – Síntese do NO.....	26
Figura 3 – Indução da enzimaIDO por citocinas pró-inflamatórias....	31
Figura 4 – Vias metabólicas da agmatina e compostos relacionados. .	35
Figura 5 – Esquema da participação da agmatina em uma sinapse.....	37
Figura 6 – Protocolo Experimental 1	45
Figura 7 – Protocolo Experimental 2	46
Figura 8 – Protocolo Experimental 3	47
Figura 9 – Efeito da administração aguda de agmatina no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA ..	52
Figura 10 – Efeito da administração aguda de agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	53
Figura 11 – Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina e fluoxetina no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e no TCA.....	55
Figura 12 – Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina e imipramina no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e no TCA.....	56
Figura 13 – Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina e bupropiona no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e no TCA.....	58
Figura 14 – Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina e MK-801 no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e no TCA.....	60
Figura 15 – Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina e 7-NI no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC e no TCA.....	62

Figura 16 – Envolvimento da Bax e da Bcl-2 no efeito antidepressivo da agmatina no modelo depressão induzida por TNF- α64

Figura 17 – Envolvimento da GSK-3 β no efeito antidepressivo da agmatina no modelo depressão induzida por TNF- α65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = análise de variância
DO = densidade óptica
DSM = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
E.P.M. = erro padrão da média
GSK-3 = glicogênio sintase cinase-3
i.c.v. = intracerebroventricular
IDO = indoleamina 2,3-dioxigenase
MAO - inibidores da monoamina oxidase
i.p. = intraperitoneal
ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina
NMDA = N-metil-D-aspartato
7-NI - 7-nitroindazol
NO = óxido nítrico
NOS = óxido nítrico sintase
NOS 1 - óxido nítrico sintase neuronal
NOS 2- óxido nítrico sintase endotelial
NOS 3 - óxido nítrico sintase induzida
p.o. - *per oral* (via oral)
SNC - sistema nervoso central
TCA - teste do campo aberto
TNF - teste do nado forçado
TNF- α - fator de necrose tumoral
TSC - teste da suspensão pela cauda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Depressão	21
1.1.1. Sistemas monoaminérgicos	22
1.1.2. Sistema Glutamatérgico	24
1.1.3. Via L-arginina-óxido-nítrico	25
1.1.4. Hipótese Neuroinflamatória da depressão	28
1.1.5. Vias de sinalização envolvidas na fisiopatologia da depressão	32
1.2. Agmatina	35
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	41
3.2. Objetivos Específicos	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Animais	43
4.2. Modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α	43
4.3. Fármacos e Tratamento	44
4.3.1. Avaliação do efeito antidepressivo da agmatina no teste de suspensão pela cauda e da atividade locomotora no teste do nado forçado	44
4.3.2. Avaliação do efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α	44
4.3.3. Avaliação dos mecanismos envolvidos na ação antidepressiva da agmatina no modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α	45
4.4. Testes Comportamentais	47
4.4.1. Teste de suspensão pela cauda	47
4.4.2. Teste do campo aberto	47
4.5. Western Blotting	48
4.6. Análise Estatística	50
5. RESULTADOS	51
5.1. Efeito da administração aguda de agmatina no tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão pela cauda e na atividade locomotora no teste do campo aberto	51
5.2. Efeito da administração aguda de agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α no teste de suspensão pela cauda e na atividade locomotora no teste do campo aberto	52
5.3. Efeito da co-administração de agmatina e antidepressivos de diferentes classes	54
5.4. Envolvimento dos receptores NMDA no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α	59
5.5. Envolvimento da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α	61

5.6. Envolvimento da expressão de Bax e Bcl-2 no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α	63
5.7. Envolvimento da GSK-3 β no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α	65
6. DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	77
PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

A depressão é uma das condições neuropsiquiátricas mais comuns e, de acordo com a Associação Americana de Psiquiatria envolve manifestações fisiológicas, comportamentais e psicológicas (Associação Americana de Psiquiatria, 1994). Segundo a Organização Mundial de Saúde, será possivelmente a segunda maior causa de incapacitação em adultos até o ano de 2020 (Murray e Lopez, 1997; Skolnick *et al.*, 2009). Possui uma prevalência de 10-30 % em mulheres e 7-15 % em homens (Nair e Vaidya, 2006; Tierney, 2007) e estima-se que na população geral, a prevalência da depressão durante a vida de um indivíduo se situa em torno de 15-17 % (Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de comorbidades e mortalidade com conseqüências econômicas e sociais profundas, (Nemeroff e Owens, 2002; Nemeroff, 2006) uma vez que esse transtorno acarreta consideráveis perdas de produtividade e de qualidade de vida, déficits no relacionamento social, além de estar associado com elevados índices de suicídio (Nemeroff e Owens, 2002; Nestler *et al.*, 2002). A etiologia da depressão ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que é de caráter multifatorial, podendo estar associada a fatores ambientais como, por exemplo, estresse emocional ou doença física ou ainda, fatores genéticos, pois aproximadamente 40-50% do risco de desenvolver o transtorno tem influência genética (Berton e Nestler, 2006).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, IV edição da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV), os transtornos de humor são classificados como transtorno depressivo maior (depressão unipolar ou maior) caracterizado por episódios depressivos recorrentes e transtorno afetivo bipolar (transtorno bipolar), que apresenta episódios de depressão alternados com episódios de mania ou hipomania (American Psychiatric Association, 1994; Frangou, 2006). Os critérios para o diagnóstico da depressão maior se baseiam em seus sintomas, estabelecidos pelo DSM-IV (Associação Americana de Psiquiatria, 2000) dentre eles: humor deprimido na maior parte do tempo, diminuição marcante no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia), aumento ou diminuição de peso ou apetite, insônia ou hipersônia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou falta de energia, sentimentos de culpa ou desvalia excessivos,

diminuição na capacidade de concentração e pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida. Para preencher os critérios de depressão maior é necessária a constatação de no mínimo cinco dentre estes nove sintomas, e é exigida a presença de pelo menos um dos dois primeiros sintomas mencionados (humor deprimido ou anedonia) presentes na maior parte do tempo, com duração mínima de duas semanas (Associação Americana de Psiquiatria, 2000).

A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da depressão age na modulação dos sistemas monoaminérgicos, e uma hipofunção desses sistemas está associada ao transtorno há muitas décadas (Hashimoto, 2011). Existem várias classes de antidepressivos usados para o tratamento da depressão como os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase (iMAO), os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) ou de recaptção dual (serotonina/noradrenalina), além de antidepressivos atípicos (Morilak e Frazer, 2004). No entanto, estes fármacos proporcionam uma remissão completa dos sintomas para apenas cerca de 50% dos indivíduos (Berton e Nestler, 2006), além de causarem efeitos colaterais como dor de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual, hipotensão, arritmia, dentre outros (Demyttenaere, 1997; Brunello *et al.*, 2002; Serretti e Mandelli, 2010), o que muitas vezes contribui para diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento (Brunello *et al.*, 2002). Além disto, a resposta terapêutica destes fármacos só ocorre 3-5 semanas após o início do tratamento, necessitando de um longo período de administração. Portanto, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão.

1.1.1. Sistemas monoaminérgicos da depressão

A etiologia da depressão ainda não está bem esclarecida, no entanto sabe-se que resulta pelo menos em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo (Elhwuegi, 2004). A hipótese monoaminérgica (**Figura 1**) postula que a depressão está associada a uma redução dos níveis de monoaminas - serotonina, noradrenalina e dopamina - na fenda sináptica corroborando com estudos que demonstram que o tratamento da depressão envolve um aumento da atividade monoaminérgica no encéfalo (Schildkraut, 1965; Elhwuegi, 2004; Nemeroff, 2006).

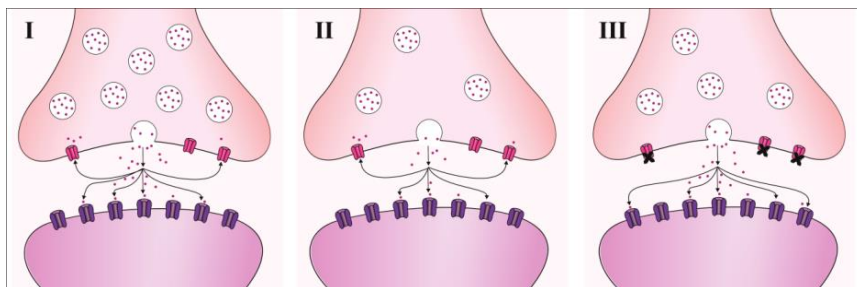


Figura 1. Hipótese monoaminérgica da depressão. **I.** No cérebro normal os neurotransmissores monoaminérgicos (em rosa) são liberados e ativam receptores pós-sinápticos. A neurotransmissão é terminada pela recaptação do neurotransmissor no neurônio pré-sináptico. **II.** Na depressão, a concentração de monoaminas na fenda sináptica está diminuída, acarretando o transtorno de humor. **III.** O bloqueio dos sítios de recaptação (em preto) aumenta a disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos para ativarem seus receptores pós-sinápticos, e o humor é reestabelecido (Adaptado de Castrén, 2005).

O envolvimento do sistema serotoninérgico na etiologia da depressão está bem descrito na literatura. Fármacos que agem sobre este sistema são utilizadas no tratamento dos distúrbios depressivos para o reestabelecimento dos níveis dessa monoamina (Risch e Nemeroff, 1992; Wong *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstram o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} no mecanismo de ação de diferentes classes de antidepressivos incluindo tricíclicos, ISRS e iMAO (Hensler, 2002). Adicionalmente, em pacientes com depressão maior são observados baixos níveis plasmáticos de serotonina (Coppen e Doogan, 1988).

Além do sistema serotoninérgico, evidências mostram anormalidades no sistema noradrenérgico em pacientes com depressão (Wong e Licinio, 2001; Brunello *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2005). Estudos pré-clínicos mostram que a ativação dos receptores α_1 , α_2 e β -adrenérgicos é responsável por mediar a resposta aos antidepressivos (Danysz *et al.*, 1986; Masuda *et al.*, 2001). Fármacos que afetam a neurotransmissão noradrenérgica, como ISRN ou iMAO, são amplamente utilizados para o tratamento da depressão (Páez-Pereda,

2005) demonstrando que este transtorno está associado a uma hipofunção do sistema noradrenérgico (Montgomery, 1999; Taylor *et al.*, 2005).

Estudos postulam que a função dopaminérgica reduzida também está implicada na fisiopatologia da depressão (D'Aquila *et al.*, 2000; Dailly *et al.*, 2004). A literatura indica que existe uma redução da atividade do transportador de dopamina em pacientes com depressão (Meyer *et al.*, 2001; Klimek *et al.*, 2002) e que antidepressivos com efeitos no sistema dopaminérgico são eficazes para o tratamento desse transtorno (Papakostas, 2006). Estudos mostram também que pacientes depressivos e/ou suicidas possuem níveis reduzidos de dopamina quando comparados com os pacientes controle (Mitani *et al.*, 2006; Papakostas, 2006). Esses estudos sugerem que o efeito dos antidepressivos sobre a transmissão dopaminérgica parece ser um importante mecanismo que contribui para a eficácia da terapia antidepressiva.

1.1.2. Sistema Glutamatérgico na depressão

Além do papel bem estabelecido do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão (Cummings, 1993; Delgado *et al.*, 1993), atualmente investiga-se o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores na patogênese deste transtorno, tais como o sistema glutamatérgico (Skolnick *et al.*, 1999; Zarate *et al.*, 2010). Diversas evidências relacionam uma disfunção no sistema glutamatérgico com transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (Bonanno *et al.*, 2005). Entre os diversos dados que relacionam anormalidades glutamatérgicas em pacientes diagnosticados com depressão encontram-se estudos que demonstram a atrofia de regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) diretamente envolvidas com o 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). Além disso, a literatura evidencia níveis séricos elevados de glutamato em pacientes depressivos (Mauri *et al.*, 1998; Mitani *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que esse aumento é revertido pelo tratamento com antidepressivos, sugerindo um possível papel do sistema glutamatérgico na ação dos antidepressivos convencionais (Maes *et al.*, 1998).

Evidências da literatura demonstram que os antidepressivos exercem suas ações antagonizando receptores N-metil-D-aspartato

(NMDA) (Skolnick, 1999; Szasz *et al.*, 2007). Reforçando a hipótese do envolvimento do sistema glutamatérgico na depressão, moduladores glutamatérgicos, incluindo antagonistas dos receptores NMDA, apresentaram propriedades antidepressivas em modelos animais de depressão como o estresse inescapável (Trullas e Skolnick, 1990), estresse crônico moderado (Papp e Moryl, 1994), e testes preditivos de atividade antidepressiva como teste do nado forçado (TNF) (Rosa *et al.*, 2003; Szewczyk *et al.*, 2010; Pałucha-Poniewiera e Pilc, 2012) e teste da suspensão pela cauda (TSC) (Moretti *et al.*, 2011). Adicionalmente, a administração do agonista NMDA possui efeito depressogênico no TNF em ratos (Rada *et al.*, 2003), o que reforça os receptores NMDA como um alvo para novas estratégias no tratamento da depressão.

1.1.3. Via L-arginina-Óxido Nítrico na depressão

O influxo de cálcio ocasionado pela estimulação dos receptores glutamatérgicos NMDA induz a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no terminal pós-sináptico, ocasionando a síntese de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina (**Figura 2**) (Steinert *et al.*, 2010).

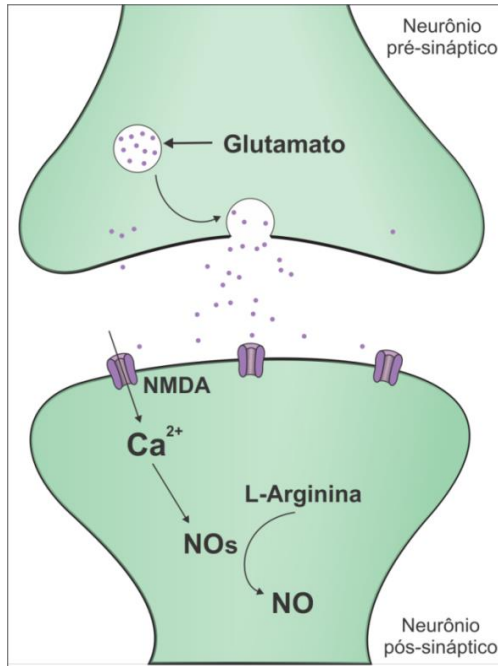


Figura 2. Síntese do NO. A ativação de receptores NMDA promove influxo de cálcio intracelular e ativação da enzima NOS neuronal. A NOS ativada converte L-arginina em NO.

O NO é uma molécula mensageira no encéfalo que participa de diversos processos fisiológicos do organismo tendo uma atuação importante na regulação de muitas funções cognitivas e processos emocionais como ansiedade e depressão (Da Silva *et al.*, 2000; Esplugues, 2002; Edwards e Rickard, 2007; Dhir e Kulkarni, 2011). A síntese de NO pode ocorrer mediante a ação de três diferentes isoformas da NOS que são classificadas de acordo com o tecido ou célula em que foram primeiramente encontradas: óxido nítrico sintase neuronal (NOS 1) expressa principalmente na maior parte das regiões encefálicas como neocórtex, hipocampo e cerebelo (Egberongbe *et al.* 1994; Vruwink *et al.*, 2001), induzível (NOS 2) inicialmente identificada em macrófagos e glia (Xie *et al.*, 1992), e endotelial (NOS 3) principalmente descrita em células endoteliais (Bredt, 1999).

Foi observado que em pacientes depressivos ocorre um aumento na produção de NO (Suzuki *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Maes *et al.*,

2009) ou atividade da NOS 1 no encéfalo (De Oliveira *et al.*, 2000, 2008). Além disso, a redução dos níveis de NO no hipocampo pode induzir um efeito tipo-antidepressivo, demonstrando a implicação endógena do NO na neurobiologia da depressão (Joca e Guimaraes, 2006). Suzuki *et al.* (2001) sugerem que os níveis aumentados de NO na depressão tem etiologia inflamatória e exercem efeitos danosos que resultam na disfunção de células neurais (Bal-Price e Brown, 2001). Estudos pré-clínicos demonstraram que os inibidores da NOS exercem um efeito tipo-antidepressivo em camundongos e ratos submetidos a testes comportamentais como o TNF (Harkin *et al.*, 1999; Yildiz *et al.*, 2000; Harkin *et al.*, 2004; Kaster *et al.*, 2005; Harvey *et al.*, 2010) e que esses efeitos são abolidos pelo pré-tratamento com L-arginina, substrato da NOS (Jefferys e Funder, 1996; Yildiz *et al.*, 2000). Estudos prévios sugerem que o 7-nitroindazol (7-NI, inibidor da enzima NOS 1) aumenta os níveis extracelulares de serotonina e dopamina no hipocampo de ratos após administração local ou sistêmica, enquanto o precursor do NO, L-arginina tem o efeito oposto (Wegener *et al.*, 2000).

Evidências mostram que o NO e a atividade da NOS estão envolvidos no mecanismo de ação de diversas classes de antidepressivos, dentre eles os ISRS, antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoaminoxidase (Finkel *et al.*, 1996; Wegener *et al.*, 2003; Inan *et al.*, 2004; Zhou e Zhu, 2009; Harvey *et al.*, 2010). Estudos mostram que a inibição da NOS pode ser uma estratégia para aumentar a eficácia clínica de antidepressivos serotoninérgicos (Harkin *et al.*, 2004), sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo dos inibidores da NOS pode estar relacionado com mudanças nos níveis de serotonina no encéfalo. Esta hipótese é confirmada pelo fato de que inibidores da NOS modulam a liberação central de serotonina (Kiss, 2000; Smith e Whitton, 2000; Wegener *et al.*, 2000). Além disso, o efeito de antidepressivos convencionais como a imipramina, a bupropiona e a venlafaxina é revertido por substâncias que aumentam os níveis de NO em modelos pré-clínicos (Harkin *et al.*, 1999; Dhir e Kulkarni, 2007a, b; Krass *et al.*, 2011).

1.1.4. Hipótese Neuroinflamatória da depressão

A ativação do sistema imune influencia o funcionamento encefálico podendo levar a alterações de humor e comportamento, portanto, alterações nesse sistema são amplamente investigadas em transtornos psiquiátricos como a depressão maior (Maes, 1995, 1999; Kronfol e Remick, 2000; Muller *et al.*, 2000). Diversos estudos demonstram que a desregulação imune precede o desenvolvimento da depressão (Yirmiya, 1996; Pollak *et al.*, 2000) e que a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias exerce um papel na fisiopatologia e sintomatologia dos transtornos de humor (Muller e Ackenhil, 1998; Dantzer *et al.*, 1999; Kronfol e Remick, 2000; Leonard, 2001). Estudos clínicos mostram que pacientes com depressão apresentam um aumento na produção de marcadores inflamatórios como interferon- α , interferon- γ , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e proteína C reativa, no soro, plasma e/ou líquido cefalorraquidiano (Kiecolt-Glaser e Glaser, 2002; Thomas *et al.*, 2005; Maes, 2008; Simon *et al.*, 2008; Howren *et al.*, 2009; Dowlati *et al.*, 2010). Várias observações são consistentes com esta hipótese como, por exemplo, o fato de que o tratamento de pacientes com citocinas pró-inflamatórias pode induzir sintomas de depressão (Dunn *et al.*, 2005), e que pacientes deprimidos que não respondem ao tratamento com antidepressivos possuem níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β , mais elevados do que pacientes que respondem aos antidepressivos (Maes *et al.*, 1997; Lanquillon *et al.*, 2000; Tuglu *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2009; Loftis *et al.*, 2010).

Estudos evidenciam que os transtornos depressivos são mais prevalentes em pacientes afetados com condições que levam à inflamação crônica (como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e artrite reumatóide), do que na população em geral (Yirmiya *et al.*, 1999; Dantzer *et al.*, 2008; Loftis *et al.*, 2010). Além disso, regiões cerebrais com as maiores concentrações de receptores de citocinas pró-inflamatórias, especificamente receptores para IL-1 β , IL-6, e TNF- α , incluem o hipotálamo, hipocampo e córtex (Parnet *et al.*, 1994 ; Khairova *et al.*, 2009), que são regiões críticas na resposta antidepressiva e cognitiva (Loftis *et al.*, 2010). Adicionalmente, alguns estudos *in vitro* em sangue humano demonstraram que antidepressivos de diversas classes, entre eles os ISRS, são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β),

interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), TNF- α e interferon- γ (Xia *et al.*, 1996; Schiepers *et al.*, 2005).

Estudos em animais experimentais fornecem evidências de que as citocinas pró-inflamatórias induzem uma síndrome chamada “sickness behavior” que têm muitas características similares à depressão, incluindo anedonia (inabilidade em sentir prazer), anorexia e distúrbios do sono (Dantzer, 2004). De modo consistente com a fisiopatologia da depressão, essas citocinas induzem mudanças comportamentais que estão associadas com alterações no metabolismo da serotonina, noradrenalina e dopamina em regiões encefálicas essenciais no controle das emoções incluindo o sistema límbico (amígdala, hipocampo e núcleo accumbens) (Dunn *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2002). Estudos pré-clínicos evidenciam que a administração de citocinas ou indutores de citocinas provoca um aumento na recaptação de monoaminas, principalmente a serotonina (O’Brien *et al.*, 2004; Schiepers *et al.*, 2005; Dantzer *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009), diminuindo o seu conteúdo na fenda sináptica. Outros estudos demonstraram que camundongos com deleção nos receptores do TNF- α possuem comportamento tipo-antidepressivo e diminuição do comportamento anedônico (Simen *et al.*, 2006; Kaster *et al.*, 2012). Alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias também têm sido observadas em modelos animais de depressão. Em camundongos, o estresse crônico moderado foi associado com o aumento na produção de IL-1 e IL-2 (Kubera *et al.*, 1998). Além disso, a administração de ISRS e antidepressivos tricíclicos mostrou diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias em modelos animais de depressão como o da bulbectomia olfatória e estresse crônico moderado em ratos (Schiepers *et al.*, 2005). Estudos com fatias de hipocampo de ratos demonstraram que diversas classes de antidepressivos inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α (Reynolds *et al.*, 2005; Maes *et al.*, 2009).

Existem diversos mecanismos pelos quais as citocinas pró-inflamatórias podem induzir a depressão. Um desses mecanismos pode estar relacionado com o fato de que a depressão frequentemente está associada com a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Vreeburg *et al.*, 2009) e as citocinas pró-inflamatórias são potente ativadores desse eixo (Sapolsky *et al.*, 1987; Kenis e Maes, 2002; O’Brien *et al.*, 2004). Um segundo possível mecanismo pode estar associado com as citocinas pró-inflamatórias modulando a neurogênese hipocampal. A neurogênese é considerada como um mecanismo chave que contribui na fisiopatologia e tratamento da

depressão (Malberg *et al.*, 2000; Saarelainen *et al.*, 2003). Neste contexto, as citocinas pró-inflamatórias podem inibir a neurogênese no hipocampo (Wichers e Maes, 2002; Ekdahl *et al.*, 2003; Santarelli *et al.*, 2003), o que pode levar a redução do volume hipocampal (Marsland *et al.*, 2008) que também é observada na depressão (Campbell *et al.*, 2004). No encéfalo, a ativação de vias inflamatórias pode contribuir para a liberação de glutamato, inibição da sua recaptção, redução do suporte neurotrófico e para potencialização do estresse oxidativo (Miller *et al.*, 2009). Estas alterações podem levar a um aumento da excitotoxicidade e perda de elementos gliais, que são eventos encontrados em pacientes deprimidos (Maes 2008; McNally *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009). Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias afetam o metabolismo da serotonina, pela estimulação da indoleamina 2-3 dioxigenase (IDO) (Fujigaki *et al.*, 2006), que catalisa a conversão de triptofano, precursor da serotonina, em quinurenina, indiretamente reduzindo a disponibilidade de serotonina (Mellor e Munn, 1999; Dantzer *et al.*, 2008) (**Figura 3**).

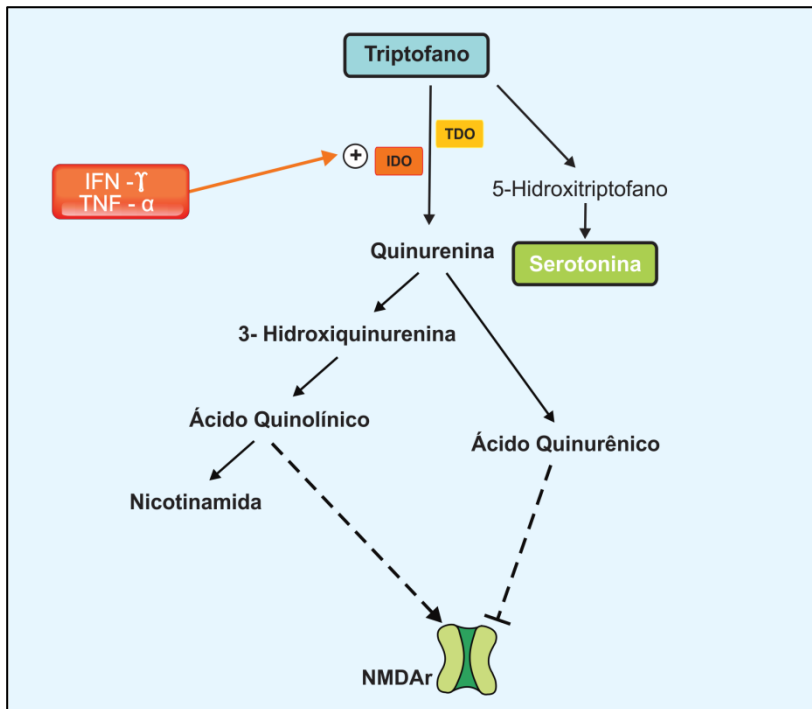


Figura 3. Indução da enzima IDO por citocinas pró-inflamatórias. A oxidação do triptofano é catalisada pela triptofano dioxigenase (TDO). A oxidação do triptofano, no entanto, pode ocorrer também de maneira extra-hepática pela enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO). Embora a degradação do triptofano pela IDO seja normalmente insignificante, IDO é altamente induzida por citocinas pró-inflamatórias como Interferon- γ e TNF- α (Adaptado de Dantzer *et al.*, 2008).

Muitos estudos identificaram a IDO como uma enzima envolvida no desenvolvimento da depressão, não somente por estar afetando a biossíntese de serotonina, mas também devido às suas contribuições para excitotoxicidade e estresse oxidativo (Turner *et al.*, 2006). Foi sugerido que a ocorrência de sintomas depressivos e ansiedade devido à estimulação da IDO, estão associados à menor disponibilidade de triptofano encefálico (reduzindo a síntese de serotonina), podendo resultar em um aumento da produção de certos metabólitos envolvidos na via da quinurenina, como a 3-

hidroxiquinurenina e ácido quinolínico (agonista de receptores NMDA), que podem alterar a neurotransmissão ao longo das vias glutamatérgicas elevando o risco de excitotoxicidade (Wichers e Maes, 2004; Wichers *et al.*, 2005; McNally *et al.*, 2008; Myint *et al.*, 2012). A significância clínica da via da quinurenina é sugerida por estudos que demonstram aumento nas concentrações de quinurenina e seus metabólitos em pacientes com depressão maior (Myint *et al.*, 2007). Tanto a 3-hidroxiquinurenina quanto o ácido quinolínico são substâncias neurotóxicas que estão implicadas em diversas doenças neurodegenerativas (Schiepers *et al.*, 2005). Então, o fato das citocinas estarem mediando esse processo indica que elas podem influenciar a biossíntese serotoninérgica e neurotransmissão encefálica resultando em consequências neuropsiquiátricas significantes (Loftis *et al.*, 2010).

E por fim, diversos genes relacionados à inflamação estão associados com uma maior susceptibilidade à depressão (Vogelzangs *et al.*, 2012). A literatura sugere que variantes alélicas funcionais de genes IL-1B e TNF- α aumentam o risco de depressão e estão associados com redução de resposta ao tratamento antidepressivo (Jun *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003). Entretanto, embora a relação entre as citocinas e a depressão esteja bem estabelecida (Raison *et al.*, 2009; Anisman, 2009), os mecanismos específicos da ativação do sistema imune e expressão de sintomas depressivos permanecem incompreendidos, devido a complexidade e diversidade dos processos envolvidos (Loftis *et al.*, 2010). Portanto, mais estudos são necessários para entender a influência dos antidepressivos na produção de citocinas pró-inflamatórias e dos mecanismos intracelulares por trás de seus efeitos. Sem dúvida, um esclarecimento dessas questões vai fornecer um maior conhecimento da fisiopatologia da depressão e pode contribuir para aumentar a eficácia de novos fármacos antidepressivos.

1.1.5. Vias de sinalização envolvidas na fisiopatologia da depressão

A depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e sobrevivência celular como, por exemplo, a proteína anti-apoptótica (Bcl-2), proteína pró-apoptótica Bax e a enzima glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β) (Skolnick, 1999; Manji *et al.*, 2001; Gould *et al.*, 2004; Picchini *et al.*, 2004; Pittenger e Duman, 2008).

O processo apoptótico é programado e controlado rigorosamente pelo balanço entre a proteína pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2 no exterior da membrana mitocondrial (Cory e Adams, 2002; Lindsten *et al.*, 2005), e a prevalência da Bax sobre a Bcl-2 pode ser interpretada como uma ativação da resposta apoptótica (Oltvai *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 2000; Nesic-Taylor *et al.*, 2005; Cheyuo *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012). A apoptose é um componente normal do desenvolvimento de organismos multicelulares, pois, juntamente com a proliferação, é responsável pelos tecidos e órgãos em desenvolvimento em embriões. Durante a vida adulta, a apoptose é um mecanismo protetor que elimina células velhas, não utilizadas ou danificadas, sendo que em organismos saudáveis, a apoptose e proliferação celular estão em equilíbrio (Inge Van den Oever *et al.*, 2010). No entanto, quando em excesso, a apoptose está envolvida em diversas situações patológicas (Jacobson *et al.*, 1997; Danial e Korsmeyer, 2004; Sung *et al.*, 2010) e é profundamente investigada na depressão (McKernan *et al.*, 2009). Evidências demonstram que este transtorno, além de suprimir a neurogênese (Lucassen *et al.*, 2006), também pode desencadear esse processo de morte celular (DeVries *et al.*, 2001; Lucassen *et al.*, 2001). Estudos clínicos revelam que há um aumento da apoptose no córtex e hipocampo de pacientes depressivos (Eilat *et al.*, 1999; Harlan *et al.*, 2006; McClung, 2007), o que aumenta a vulnerabilidade neuronal na depressão (Lucassen *et al.*, 2006).

Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o tratamento com antidepressivos ISRS e tricíclicos (Peng *et al.*, 2008; Kubera *et al.*, 2011) inibem a apoptose (Lee *et al.*, 2001; D'Sa e Duman, 2002; Lucassen *et al.*, 2004; Duman, 2004; Drzyzga *et al.*, 2009) através do aumento da expressão da proteína Bcl-2 (Gross *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2003; Chiou *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007) e diminuição da proteína Bax (Chang *et al.*, 2005; Youdim *et al.*, 2006; Kosten *et al.*, 2008) em muitas regiões encefálicas envolvidas com a depressão e resposta a antidepressivos incluindo o córtex cingulado, córtex frontal, córtex parietal, amígdala e hipotálamo ventromedial (Kosten *et al.*, 2008).

Além disso, a apoptose foi proposta como um mecanismo que contribui para o estresse relacionado ao comportamento tipo-depressivo. O aumento da morte celular programada foi detectado em estruturas cerebrais de roedores submetidos a modelos animais de depressão como o estresse imprevisível (Kosten *et al.*, 2008), separação materna (Lee *et al.*, 2001) e estresse crônico moderado (Joels *et al.*, 2004; Banasr *et al.*, 2007; Bachis *et al.*, 2008; McKernan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). A morte celular por apoptose exerce um importante papel nos processos

inflamatórios (Rodrigues *et al.*, 2012). Citocinas pró-inflamatórias possuem propriedades pró-apoptóticas em áreas límbicas como hipocampo, estando de acordo com seu papel na fisiopatologia da depressão (Lucassen *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2004). A citocina pró-inflamatória TNF- α , por exemplo, demonstrou exacerbar a morte celular além de impedir a neurogênese, levando a neurodegeneração (Viviani *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2006).

Outra proteína envolvida na modulação da apoptose é a GSK-3 β . Esta é uma serina/treonina cinase multifuncional envolvida em processos relacionados ao metabolismo, apoptose, proliferação e neuroplasticidade (Jope, 2003; Song *et al.*, 2005). Alguns estudos indicam que a superexpressão de GSK-3 β leva à apoptose (Pap e Cooper, 1998; Hetman e Xia, 2000; Culbert *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2012) e que inibidores dessa enzima protegem contra esta morte celular (Perry *et al.*, 2007; Thotala *et al.*, 2008). Além de estar envolvida com a apoptose, a GSK-3 β também é importante na regulação da resposta inflamatória (Cortes-Vieyra *et al.*, 2012; Green *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que diferentes modelos de doenças crônicas com componente inflamatório são suprimidos pela administração de inibidores da GSK-3 β (Cuzzocrea *et al.*, 2006; Whittle *et al.*, 2006; Bao *et al.*, 2007; Dugo *et al.*, 2007; Jope *et al.*, 2007). Adicionalmente, esses inibidores atenuam a produção de citocinas pró-inflamatórias (Schwabe e Brenner, 2002; Dugo *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2008), além de ter um papel importante na regulação da ativação de fator nuclear kappa B (NF κ B) conhecido como um fator de transcrição de genes envolvidos na produção de mediadores inflamatórios (Hoeflich *et al.*, 2000; Haefner, 2003; Takada *et al.*, 2004; Ougolkov *et al.*, 2007; Beurel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Adicionalmente, várias linhas de evidências mostraram que transtornos depressivos estão relacionados com ativação da GSK-3 β (Karege *et al.*, 2007; Shapira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Beaulieu *et al.*, 2009) e que esta enzima está associada a modelos animais de depressão (Beaulieu *et al.*, 2008; Budni *et al.*, 2011). Estudos mostram ainda, que inibidores da GSK-3 β , que promovem a fosforilação na região N-terminal de Ser⁹ da enzima (Beaulieu *et al.*, 2009), podem constituir uma nova classe de fármacos antidepressivos (Gould *et al.*, 2004; Shapira *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2010) e descobertas recentes mostram o potencial anti-inflamatório desses inibidores (Gao *et al.*, 2008; Yuskaitis e Jope, 2009; Gurrieri *et al.*, 2010).

1.2. Agmatina

A agmatina é uma amina catiônica, conhecida como um produto intermediário no metabolismo de monoaminas, encontrada em plantas, bactérias, invertebrados e descoberta em 1994 em mamíferos. Ela é sintetizada pela descarboxilação da L-arginina em uma reação catalisada pela enzima arginina descarboxilase (ADC) no encéfalo e em outros tecidos. A agmatina pode ser metabolizada a 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 (**Figura 4**) (Reis e Regunathan, 2000; Raasch *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Moinard *et al.*, 2005).

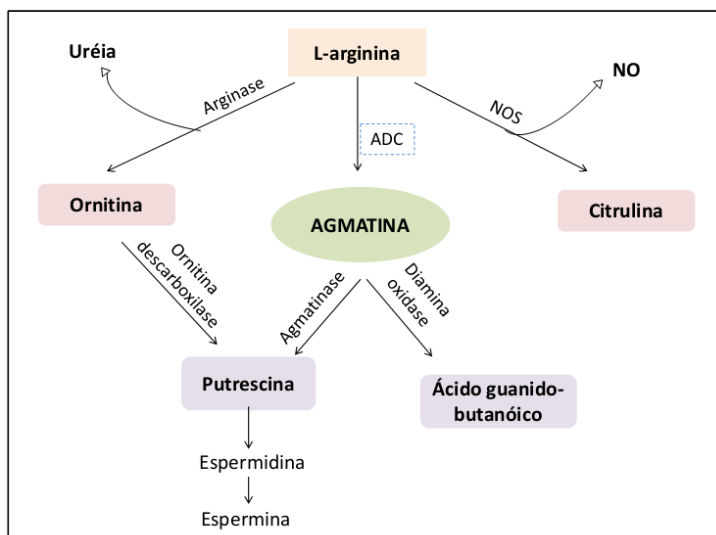


Figura 4. Vias metabólicas da agmatina e compostos relacionados. A agmatina é sintetizada a partir de L-arginina pela ação da arginina descarboxilase (ADC). Durante a biossíntese de poliaminas a agmatina pode ser metabolizada pela agmatinase ou pela diamina oxidase a produtos como espermina ou ácido guanido-butanóico, respectivamente (Adaptado de Reis e Regunathan, 2000).

A agmatina está presente no córtex cerebral, hipocampo, complexo amigdalóide, hipotálamo e tronco cerebral. A nível sub-celular, está presente no corpo celular, dendritos, axônios e terminais axônicos do neurônio. Desta forma, a distribuição da agmatina está concentrada em regiões encefálicas responsáveis pelo controle endócrino e visceral, processamento das emoções, percepção de dor e cognição (Reis e Regunathan, 2000). Atualmente, essa amina catiônica é reconhecida como um importante neuromodulador no SNC (Li *et al.*, 1994; Reis e Regunathan, 1998; Reis e Regunathan, 2000; Raasch *et al.*, 2001), uma vez que 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 agmatinase e captada por sinaptossomas (Reis e Regunathan, 2000; Halaris e Piletz, 2007).

No que diz respeito à função biológica dessa amina, sua administração exógena produz não somente efeito tipo-antidepressivo (Zomkowski *et al.*, 2002, 2004; Li *et al.*, 2003; Farzin e Mansouri, 2006; Budni *et al.*, 2007; Zeidan *et al.*, 2007; Taksande *et al.*, 2009), mas também efeito antinociceptivo (Onal *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005), ansiolítico (Gong *et al.*, 2006), anticonvulsivante (Bence *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004), antiproliferativo (Regunathan e Reis, 1997), neuroprotetor (Olmos *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 2011) e antiamnésico (Arteni *et al.*, 2002). Evidências da literatura demonstram que ela possui a capacidade de seqüestrar radicais livres, protegendo contra o estresse oxidativo induzido pelo aumento do volume mitocondrial, colapso do potencial de membrana e apoptose (Arndt *et al.*, 2010; Battaglia *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Além do seu papel anti-apoptótico, estudos demonstraram propriedades anti-inflamatórias dessa amina catiônica (Satriano *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2011)

Estudos pré-clínicos evidenciaram o efeito tipo-antidepressivo da agmatina em dois modelos animais preditivos para ação antidepressiva, TNF e TSC (Zomkowski *et al.*, 2002; Budni *et al.*, 2007). Um estudo posterior também mostrou o efeito da agmatina (administrada pelas vias oral e subcutânea) no TNF em camundongos e em ratos (Li *et al.*, 2003). Vários agentes farmacológicos foram utilizados para investigar os mecanismos responsáveis pela ação antidepressiva da agmatina no TNF. Foi demonstrado que seu efeito é dependente do antagonismo de receptores NMDA, da inibição de todas as isoformas da enzima NOS 1 no encéfalo (Galea *et al.*, 1996; Yang e Reis 1999; Raasch *et al.*, 2001; Moinard *et al.*, 2005; Halaris e Piletz, 2007) e de uma ativação dos sistemas noradrenérgico (receptores α_2 -

adrenérgicos), serotoninérgico (receptores 5-HT_{1A/1B} e 5-HT₂), opióide (receptores δ - e μ -opióides) (Zomkowski *et al.*, 2002, 2004, 2005), canais de potássio (Budni *et al.*, 2007) e receptores imidazólicos I₁ e I₂ (**Figura 5**) (Zeidan *et al.*, 2007; Taksande *et al.*, 2009). Além disso, foi mostrado que o efeito tipo-antidepressivo dos ISRS no TNF é potencializado pela administração exógena de agmatina (Zomkowski *et al.*, 2002; Taksande *et al.*, 2009) e que pacientes com depressão apresentaram aumentos significativos das concentrações de agmatina no plasma, quando comparado com pacientes controle saudáveis, indicando uma correlação positiva entre depressão e agmatina, provavelmente como um efeito compensatório (Halaris *et al.*, 1999).

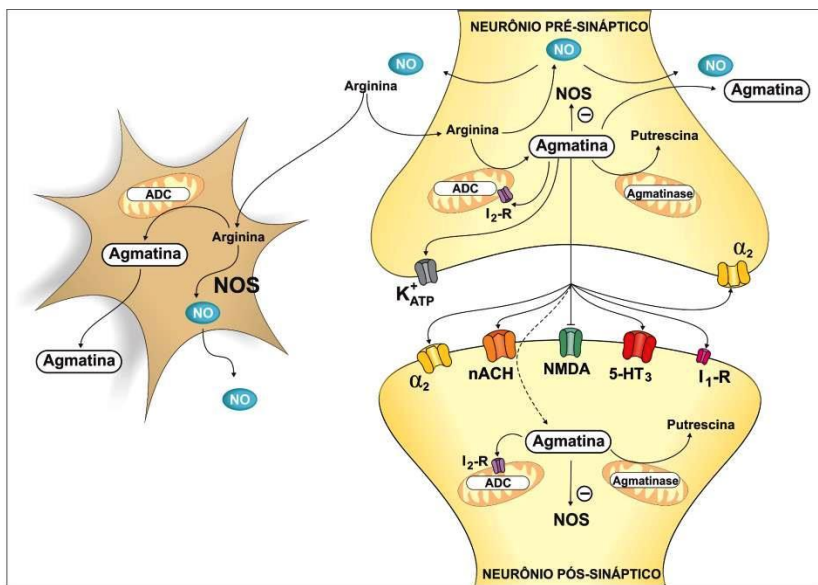


Figura 5. Esquema de uma sinapse contendo agmatina. A arginina (Arg) entra no terminal neuronal ou na glia via um transportador ou um canal, servindo como substrato da arginina descarboxilase (ADC) mitocondrial para sintetizar agmatina, ou substrato da NOS citoplasmática para formar o NO solúvel. A agmatina sintetizada em neurônio ou glia é liberada para o espaço sináptico ou estocada em vesículas e degradada pela enzima agmatinase a putrescina (não mostrado). A agmatina pode bloquear 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 a NOS, ou ser metabolizada a putrescina. (retirado de Reis e Regunathan, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de humor, incluindo a depressão, são altamente prevalentes, heterogêneos e de etiologia multifatorial (Picchini *et al.*, 2004; Prince *et al.*, 2007; Tsankova *et al.*, 2007). Estes transtornos estão associados a índices significativos de morbidade, mortalidade e custo econômico (Picchini *et al.*, 2004; Prince *et al.*, 2007). Apesar dos progressos alcançados no desenvolvimento de fármacos antidepressivos nos últimos anos, essa terapia ainda está longe do ideal, possuindo limitações como atraso na remissão dos sintomas, pois a reversão destes ocorre dentro de semanas ou meses, necessitando assim de um longo período de tratamento, o que, muitas vezes, dificulta à adesão do paciente a terapia (Frangou, 2006; Tsankova *et al.*, 2007). Além disso, muitos pacientes respondem parcialmente ou não respondem ao tratamento (Ruhé *et al.*, 2011), sendo que a remissão completa dos sintomas depressivos após a terapia ocorre em menos de 50% dos casos (Berton e Nestler, 2006) e a terapia farmacológica disponível apresenta muitos efeitos colaterais (Demyttenaere, 1997; Brunello *et al.*, 2002; Serretti e Mandelli, 2010).

Levando em consideração as limitações da terapia antidepressiva atual, existe a necessidade do desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para controle e/ou remissão dos sintomas associados a este transtorno. Tendo em vista a necessidade de novos agentes terapêuticos para a depressão e considerando as crescentes evidências de que a inflamação está envolvida na fisiopatologia dessa doença, bem como as propriedades anti-inflamatórias (Satriano *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2011) e antidepressivas da agmatina, (Li *et al.*, 2003; Zomkowski *et al.*, 2002, 2004, 2005; Zeidan *et al.*, 2007), torna-se relevante ampliar os estudos no que diz respeito a ação antidepressiva dessa amina catiônica em um modelo animal de depressão associado a inflamação.

Considerando também a relação bem estabelecida entre as citocinas pró-inflamatórias, apoptose e depressão, além do potencial anti-apoptótico da agmatina e de antidepressivos convencionais, justifica-se a investigação do envolvimento de vias de sinalização que regulam neuroplasticidade e sobrevivência celular: proteína anti-apoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax e proteína GSK-3 β sobre o efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α . Este estudo pretende fornecer novos dados para o melhor

entendimento da ação antidepressiva dessa amina catiônica, podendo, dessa forma, contribuir para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito tipo-antidepressivo da agmatina no modelo animal de depressão induzida pela administração de TNF- α , analisando parâmetros comportamentais e bioquímicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito tipo-antidepressivo da administração oral de agmatina no TSC.
- Avaliar se quando administrada por via oral, a agmatina em diferentes doses é capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pela citocina pró-inflamatória TNF- α no TSC.
- Investigar o possível efeito sinérgico da administração aguda de agmatina (em doses sub-ativas) com doses sub-ativas de um antagonista de receptores NMDA (MK-801), ou um inibidor da enzima NOS 1 (7-NI) ou antidepressivos convencionais fluoxetina, imipramina e bupropiona sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de TNF- α .
- Analisar amostras do hipocampo de animais controle e tratados com agmatina, bupropiona e/ou TNF- α a fim de determinar o imunconteúdo de proteínas envolvidas na sobrevivência celular e apoptose (GSK-3 β total, GSK-3 β fosforilada, Bax e Bcl-2).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando entre 30-45 g, com idade entre 45 e 55 dias. Os animais foram mantidos a temperatura de 20-22 °C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00 h). Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todos os experimentos foram realizados entre as 11:00 e 17:00 h (N = 7-8 animais por grupo), sendo que cada animal foi utilizado somente uma vez. Os animais foram ambientados no local de realização dos experimentos 24 horas antes dos testes comportamentais e distribuídos de maneira aleatória nos grupos experimentais. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.2. Modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α

A indução de comportamento tipo-depressivo foi realizada pela administração de TNF- α (citocina pró-inflamatória, 0,001 fg/sítio) em camundongos 30 minutos antes dos testes comportamentais em um volume de 5 μ l/sítio. O TNF- α foi administrado por via i.c.v., como descrito por Kaster *et al.* (2012). Os animais foram anestesiados por cerca de 15 segundos utilizando um recipiente com algodão embebido em éter. Este procedimento era necessário para contenção dos animais possibilitando a administração dos agentes farmacológicos, os quais foram administrados utilizando uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 μ l. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral esquerdo, utilizando-se o bregma como referência. O local da injeção foi de 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de uma linha traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). A fim de se verificar o local exato da injeção, os animais

foram dissecados e analisados macroscopicamente após os testes (Kaster *et al.*, 2007; Brocardo *et al.*, 2008). Os resultados de camundongos que apresentaram qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística (total inferior a 5% dos animais utilizados).

4.3. Fármacos e Tratamentos

4.3.1. Avaliação do efeito antidepressivo da agmatina no TSC e da atividade locomotora no TCA

Para a obtenção da curva dose-resposta da administração sistêmica de agmatina (Sigma Chemical Co, USA), os animais foram tratados com doses crescentes dessa amina (0,0001-1 mg/kg, p.o.) ou com água destilada, sendo submetidos ao TSC ou ao TCA após 60 min.

4.3.2. Avaliação do efeito antidepressivo da agmatina no modelo depressão induzida pela administração de TNF- α

Para a obtenção da curva dose-resposta da administração sistêmica de agmatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de TNF- α , os animais foram pré-tratados com doses crescentes de agmatina (0,0001-1 mg/kg, p.o.) ou com água destilada, e após 30 min foram administrados com a citocina pró-inflamatória TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). Decorridos 30 min da administração de TNF- α os mesmos foram submetidos ao TSC ou ao TCA.

A agmatina foi administrada por via oral (p.o.) em um volume de 10 ml/kg, e o TNF- α pela via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume constante de 5 μ l/sítio. O veículo utilizado para os compostos administrados via oral foi água destilada, e para os compostos administrados via intracerebroventricular foi salina (NaCl 0,9%).

4.3.3. Avaliação de diferentes sistemas envolvidos na ação antidepressiva da agmatina no modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α

Para investigação de diferentes sistemas envolvidos na ação antidepressiva da agmatina, os seguintes compostos foram utilizados: agmatina, fluoxetina, imipramina, bupropiona, MK-801 e 7-NI. Os fármacos foram diluídos em água destilada, exceto o 7-NI, que foi diluído em salina (NaCl 0,9%) com 5% de Tween 80. A via de administração utilizada foi p.o., exceto o 7-NI, que foi administrado por via intraperitoneal (i.p.). Os grupos controle receberam o veículo apropriado.

A fim de verificar se o efeito antidepressivo do tratamento agudo com agmatina é dependente de uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, os animais foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) isoladamente ou em conjunto com antidepressivos convencionais: fluoxetina (5 mg/kg, p.o. ISRS), imipramina (0,1 mg/kg, p.o., inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina/antidepressivo tricíclico) ou bupropiona (1 mg/kg, p.o., inibidor da recaptação de dopamina, com atividade na recaptação de noradrenalina). Depois de 30 min, foi realizada a administração i.c.v. de TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). e decorridos 30 min da administração dessa citocina pró-inflamatória, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA conforme demonstrado na **Figura 6**.

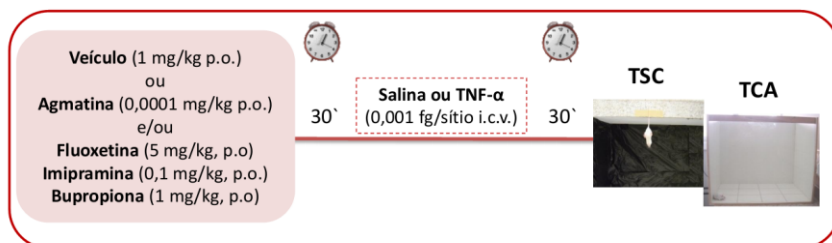


Figura 6. Protocolo Experimental 1. O efeito de doses sub-ativas de agmatina isoladamente ou em conjunto com doses sub-ativas de antidepressivos convencionais (fluoxetina, imipramina e bupropiona) foi avaliado. A agmatina (0,0001 mg/kg p.o.) e os antidepressivos foram administrados por via oral (gavagem) e após 30 minutos, os animais

foram injetados com salina ou TNF- α (0,001 fg/sítio i.c.v.). Decorridos mais 30 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais TSC ou TCA.

Com a finalidade de investigar o envolvimento dos receptores NMDA no efeito antidepressivo da agmatina no TSC, os animais foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) isoladamente ou em associação com uma dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o., antagonista não competitivo de receptores NMDA). Decorridos 30 min os animais foram tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) e após mais 30 min foram submetidos ao TSC ou TCA conforme mostra a **Figura 7**.



Figura 7. Protocolo Experimental 2. Foi investigado o efeito doses sub-ativas de agmatina isoladamente ou em conjunto com doses sub-ativas de MK-801. A agmatina (0,0001 mg/kg p.o.) e o MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.) foram administrados por via oral (gavagem) e após 30 minutos, os animais foram injetados com salina ou TNF- α (0,001 fg/sítio i.c.v.). Decorridos mais 30 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais TSC ou TCA.

Para analisar o envolvimento da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo da agmatina no TSC, os animais foram pré-tratados com doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) e após 30 min foram tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) e/ou 7-NI (25 mg/kg, i.p. inibidor da NOS 1). Decorridos 30 minutos da administração de TNF- α e ou 7-NI, os camundongos foram submetidos ao TSC ou TCA conforme mostra a **Figura 8**.

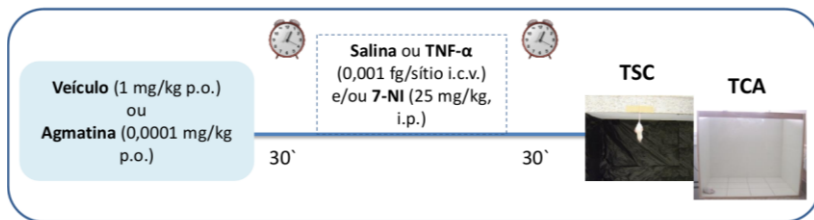


Figura 8. Protocolo experimental 3. Foi investigado o efeito de doses sub-ativas de agmatina isoladamente ou em conjunto com doses sub-ativas de 7-NI. A agmatina (0,0001 mg/kg p.o.) foi administrada por via oral e após 30 minutos, os animais foram injetados com salina ou TNF- α (0,001 fg/sítio i.c.v.) e/ou 7-NI (25 mg/kg, i.p.). Decorridos mais 30 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais TSC ou TCA.

Cabe ressaltar que as doses dos antidepressivos, MK-801 e 7-NI foram utilizadas com base em estudos prévios do nosso grupo (Binfaré *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2011).

4.4. Testes Comportamentais

4.4.1. Teste da suspensão pela cauda (TSC):

O tempo total de duração da imobilidade foi medido de acordo com o método de Steru *et al.* (1985). Os camundongos acústica e visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade registrada durante 6 min. Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Steru *et al.*, 1985; Rodrigues *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2003; Cryan *et al.*, 2005).

4.4.2. Teste do campo aberto (TCA):

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os

animais foram submetidos ao TCA, durante 6 min (Rodrigues *et al.*, 2002). O teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa de madeira foi limpa com álcool 10% entre os testes, sendo estes realizados em uma sala com temperatura e luz controladas.

4.5. Western Blotting

Em um experimento independente, com o objetivo de analisar a expressão de proteínas envolvidas na sobrevivência e morte celular no hipocampo dos animais, os camundongos foram pré-tratados com agmatina na dose sub-ativa (0,0001 mg/kg, p.o.) ou ativa (0,1 mg/kg, p.o) ou ainda com o antidepressivo bupropiona (10 mg/kg p.o.), o qual foi escolhido por ter produzido um efeito tipo-antidepressivo acentuado quando administrado em combinação com a agmatina no modelo do TNF- α . Depois de 30 minutos o TNF- α (0,001 fg/sítio) foi administrado por via i.c.v. nos animais, e após mais 30 minutos da administração do TNF- α , os camundongos foram decapitados para posterior análise bioquímica. O western blotting foi realizado conforme descrito previamente (Leal *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2004). Após a 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 segundo Oliveira *et al.* (2008). Os tecidos hipocampais foram homogeneizados mecanicamente em 400 μ L de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e 34 Cocktail inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300 μ l) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8).

O teor protéico foi estimado através do método descrito por Peterson (1977) e a concentração protéica estimada a partir de uma curva padrão de soro albumina bovina. As proteínas (60 μ g de proteína

total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (concentração 12% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitro-celulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

Após este processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforiladas e total GSK-3 β e a expressão de Bax e Bcl-2 foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:1000. 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 hora com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunoreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante e com o uso de filme radiográfico específico (Amersham Hyperfilm®, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (1:1000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. A fim de se detectarem as formas fosforilada e total da GSK-3 β bem como expressão de Bax, Bcl-2 e actina na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente por (Posser *et al.*, 2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água duplamente deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com água duplamente deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas desprovidas de imunocomplexos foram bloqueadas e submetidas ao mesmo protocolo descrito acima.

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O nível de fosforilação da GSK-3 β (Ser⁹) foi determinado pela razão entre a DO fosforilada / DO total. Os imunocontêúdos da Bax e da Bcl-2 foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da β -actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

Os anticorpos anti-p-GSK-3 β (Ser9), anti-GSK-3 β , anti-Bax, anti-Bcl-2 e anti- β -actina detectam apenas uma banda de aproximadamente 46 kDa, 46 kDa, 20 kDa, 28 kDa e 45 kDa, respectivamente.

4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, seguido pelo *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da administração aguda de agmatina no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA

A **Figura 9A** mostra que a administração sistêmica (p.o.) de agmatina produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC, nas doses de 0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, ($P < 0,01$) caracterizando um efeito tipo-antidepressivo, enquanto a administração da agmatina na dose de 0,0001 mg/kg não causou alteração no tempo de imobilidade dos animais (dose sub-ativa). Na **Figura 9B** a análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

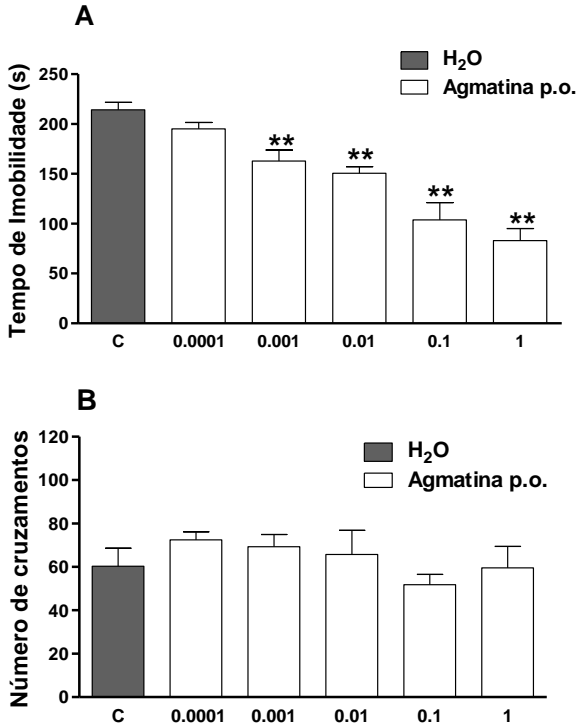


Figura 9. Efeito da administração aguda de agmatina no TSC (0,0001-1 mg/kg, p.o., painel A) e no TCA (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 7-8). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (C). Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan.

5.2. Efeito da administração aguda de agmatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por TNF- α no TSC e na atividade locomotora no TCA

A **Figura 10A** mostra que a administração sistêmica (p.o.) de agmatina nas doses de 0,1 e 1 mg/kg produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC (P<0,01), quando comparado com os camundongos controle, enquanto a dose de 0,0001 foi ineficaz. Além

disso, a administração de TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade dos animais no TSC ($P<0,01$), um efeito que é prevenido pela administração de agmatina nas doses de 0,1, 1 e 0,0001 mg/kg ($P<0,01$). Na **Figura 10B** a análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

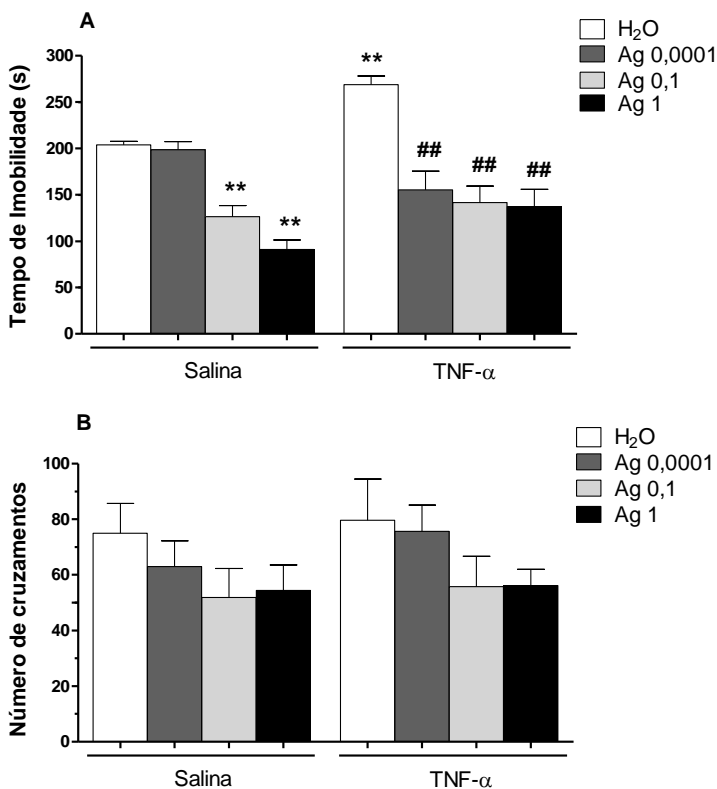


Figura 10. Efeito da administração aguda de agmatina (0,0001, 0,1 e 1 mg/kg, p.o.,) no modelo de depressão induzida por TNF- α no TSC (painel A) e no TCA (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 7-8). ** $P<0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo. ## $P<0,01$ quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan. Ag : agmatina.

Considerando que a dose mais baixa de agmatina utilizada (0,0001 mg/kg) não causou efeito significativo no tempo de imobilidade dos animais controle não tratados com TNF- α , esta foi escolhida para investigar o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, glutamatérgico e via L-arginina-óxido nítrico no efeito tipo-antidepressivo dessa amina catiônica.

5.3. Efeito da administração de agmatina com antidepressivos de diferentes classes

Os resultados da **Figura 11A** demonstram uma redução significativa no tempo de imobilidade dos camundongos controle (não tratados com TNF- α) submetidos ao TSC após tratamento combinado de uma dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) com uma dose sub-ativa de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.) ($P < 0,05$) enquanto a administração desses fármacos *per se* não alterou o tempo de imobilidade. Além disso, observa-se que os animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$) que foi prevenido pelo pré-tratamento desses animais com agmatina ou fluoxetina em suas doses sub-ativas isoladamente ou em conjunto ($P < 0,01$). Na **Figura 11B** a análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

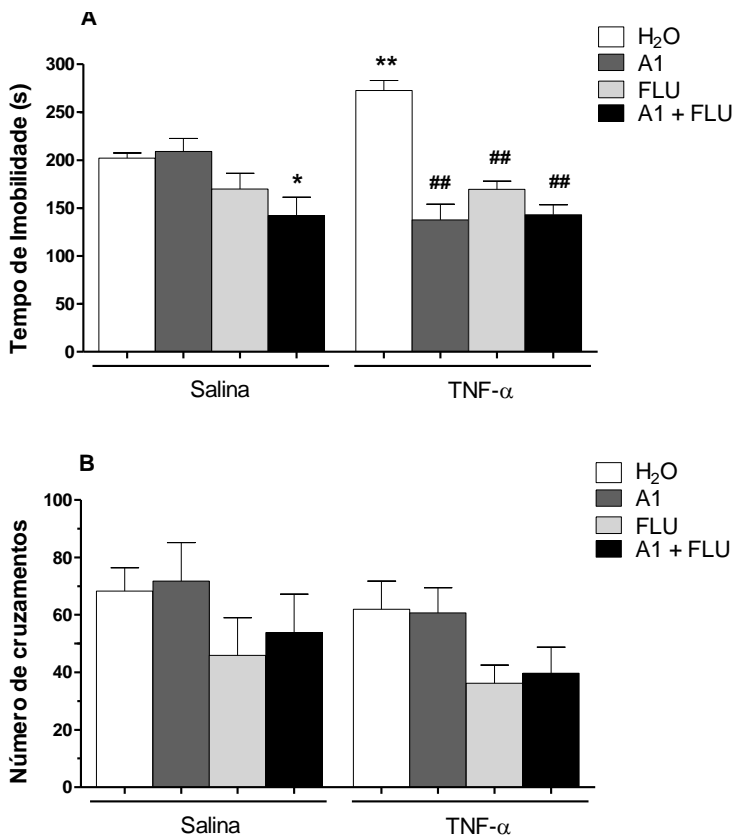


Figura 11. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o. A1) e fluoxetina (5 mg/kg, p.o., FLU) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-8). *P<0,05; **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. ## P<0,01 quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Duncan.

De acordo com a **Figura 12A** observa-se que houve uma redução significativa no tempo de imobilidade dos camundongos controles submetidos ao TSC após tratamento com agmatina em sua dose sub-ativa (0,0001 mg/kg, p.o.) em combinação com a imipramina,

também em sua dose sub-ativa (0,1 mg/kg, p.o.) ($P < 0,01$), o que não ocorreu com a administração desses fármacos isolados. Ainda, os animais tratados com $TNF-\alpha$ (0,001 fg/sítio, i.c.v.) apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$), e o pré-tratamento desses animais com doses sub-ativas de agmatina ou de imipramina isoladamente ou em conjunto aboliu esse efeito causado pelo $TNF-\alpha$ ($P < 0,01$). A **Figura 12B** mostra que em nenhum dos grupos a análise da atividade locomotora demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

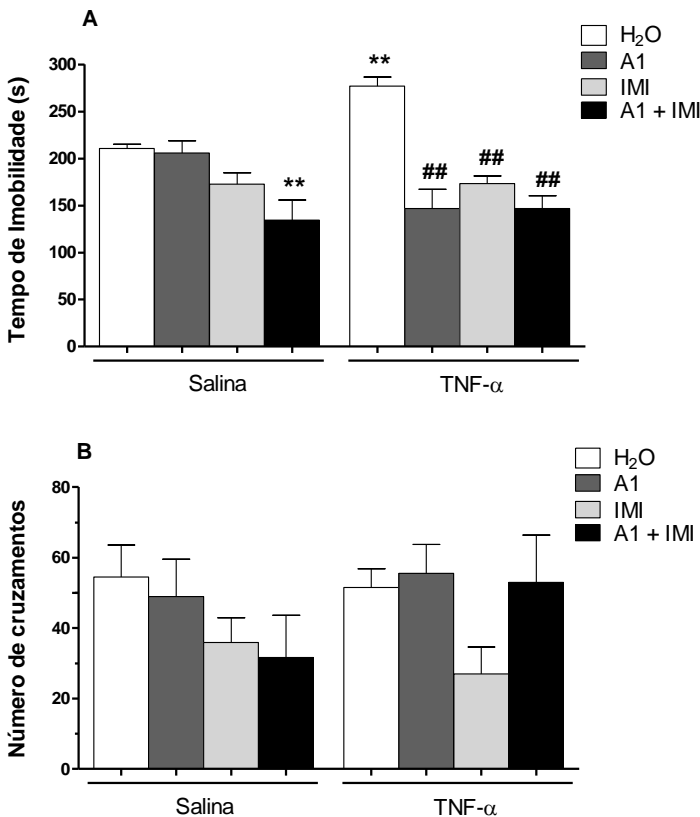


Figura 12. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o. A1) e imipramina (0,1 mg/kg, p.o., IMI) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-8). ** $P < 0,01$ quando comparado aos

animais tratados com veículo. ## $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Duncan.

Os dados expostos na **Figura 13A** demonstram uma redução significativa no tempo de imobilidade dos camundongos controles (não tratados com TNF- α) submetidos ao TSC após tratamento com a dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) em combinação com a dose sub-ativa de bupropiona (1 mg/kg, p.o.) ($P < 0,05$), o que não ocorreu com a administração desses fármacos isolados. Além disso, os animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$), que foi prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com doses sub-ativas de agmatina ou bupropiona administradas isoladamente ou em conjunto ($P < 0,01$). Adicionalmente, nos animais injetados com TNF- α , o tratamento combinado de agmatina e bupropiona produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico, uma vez que o tempo de imobilidade no TSC foi estatisticamente menor quando comparado com os grupos que receberam agmatina ou bupropiona isoladamente ($P < 0,05$). A **Figura 13B** mostra que a análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

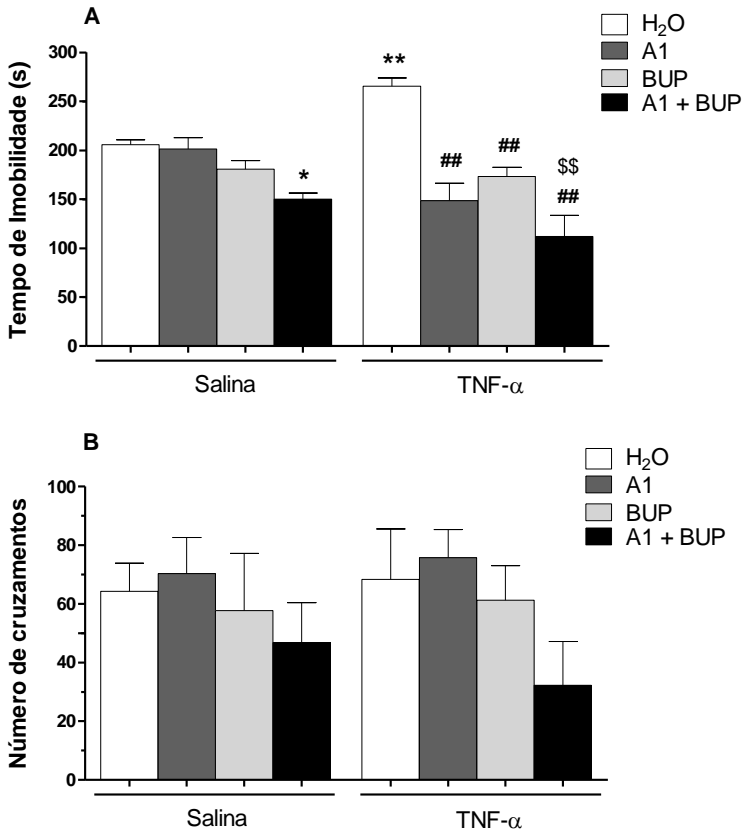


Figura 13. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o., A1) e bupropiona (1 mg/kg, p.o., BUP) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-8). *P<0,05; **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. ## P<0,01 quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). \$\$ P<0,05 quando comparado com o grupo TNF- α + bupropiona. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Duncan.

5.4. Envolvimento dos receptores NMDA no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α

A **Figura 14A** mostra que a administração de uma dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$) em camundongos tratados com salina enquanto a administração desses fármacos *per se* não alterou este parâmetro. Os animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$) e o pré-tratamento desses animais com doses sub-ativas de agmatina ou MK-801 isoladamente ou em conjunto foi capaz de prevenir esse efeito causado pelo TNF- α ($P < 0,01$). A **Figura 14B** demonstra que a administração de MK-801 ou agmatina *per se* ou em combinação, tanto nos animais tratados com salina quanto com TNF- α não afetou a atividade locomotora no TCA.

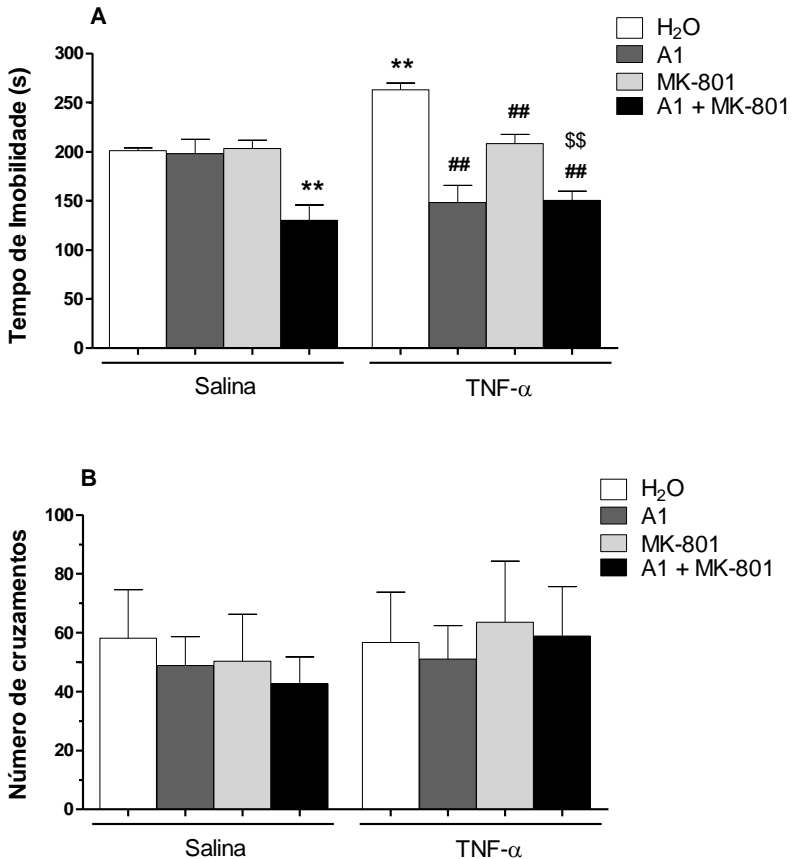


Figura 14. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o., A1) e MK-801 (0,001 mg/kg, p.o., antagonista não competitivo de receptores NMDA) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-8). *P<0,05; **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. ## P<0,01 quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). \$\$ P<0,05 quando comparado com o grupo TNF- α + MK-801. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Duncan.

5.5. Envolvimento da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α

Os resultados apresentados na **Figura 15A** mostram que a administração de uma dose sub-ativa de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose sub-ativa de 7-NI (25 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$) em camundongos controle (não tratados com TNF- α) enquanto a administração desses fármacos *per se* não alterou este parâmetro. Além disso, os animais tratados com TNF- α (0,001 μ g/sítio, i.c.v.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ($P < 0,01$), que foi prevenido pelo tratamento desses animais com agmatina ou fluoxetina administradas em suas doses sub-ativas isoladamente ou em conjunto ($P < 0,01$). A **Figura 15B** mostra que não houve alterações significativas na atividade dos animais no TCA.

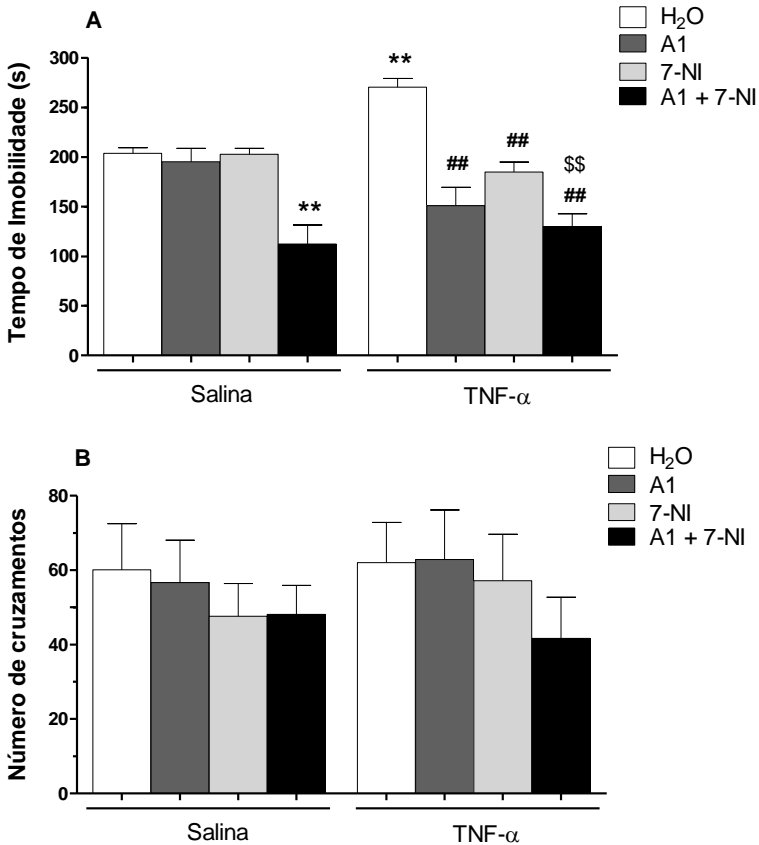


Figura 15. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg, p.o., A1) e 7-NI (25 mg/kg, i.p.,) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-8). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. ## P<0,01 quando comparado aos animais tratados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.). \$\$ P<0,05 quando comparado com o grupo TNF- α + 7-NI. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Duncan.

5.6. Envolvimento da expressão de Bax e Bcl-2 no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α

Os resultados apresentados na **Figura 16** mostram a expressão das proteínas Bax (painel A) e Bcl-2 (painel B) no hipocampo dos animais injetados com TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) e pré-tratados com agmatina (0,0001 e 0,1 mg/kg) ou bupropiona (10 mg/kg) utilizando a técnica de western blotting. A análise por densitometria revela que não há diferença significativa na expressão de Bax (painel A) e Bcl-2 (painel B) no hipocampo dos camundongos em nenhum grupo experimental.

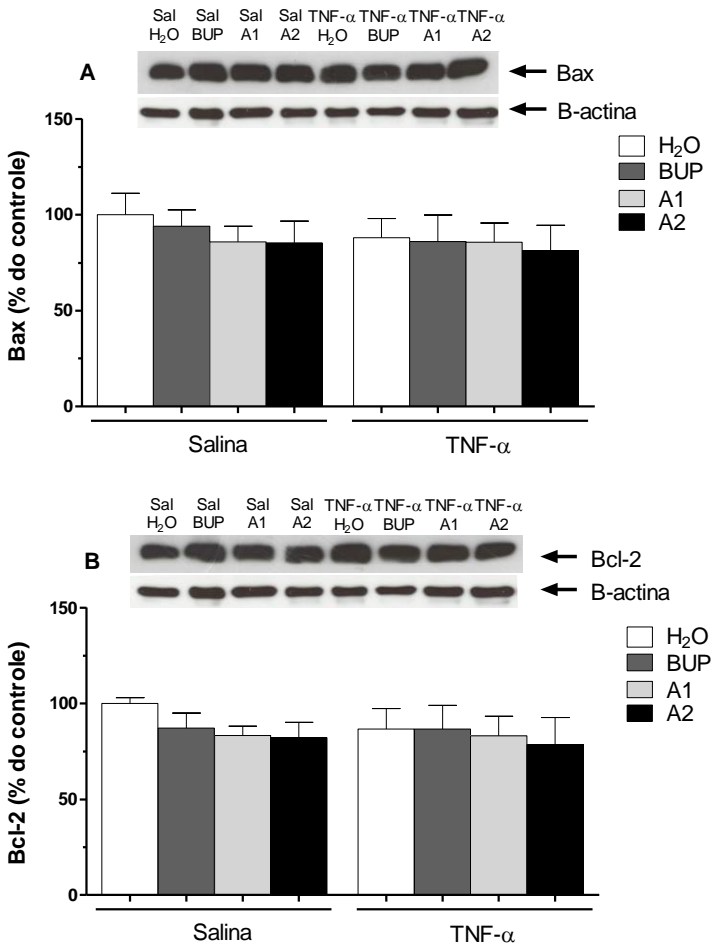


Figura 16. Efeito do pré-tratamento dos animais com agmatina (A1:0,0001 e A2: 0,1 mg/kg) ou bupropiona (BUP, 10 mg/kg) e posterior injeção central de TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) ou salina na expressão das proteínas Bax (painel A) e Bcl-2 (painel B). Os resultados foram avaliados por ANOVA de 1 via seguida pelo *post-hoc* de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 5-6).

5.7. Envolvimento da GSK-3 β no efeito antidepressivo da agmatina no modelo de depressão induzida por TNF- α

De modo similar, os dados da **Figura 17** mostram a fosforilação da proteína GSK-3 β (Ser⁹), utilizando a técnica western blotting. Os resultados dessa figura demonstram que nenhum dos tratamentos alterou a fosforilação dessa proteína.

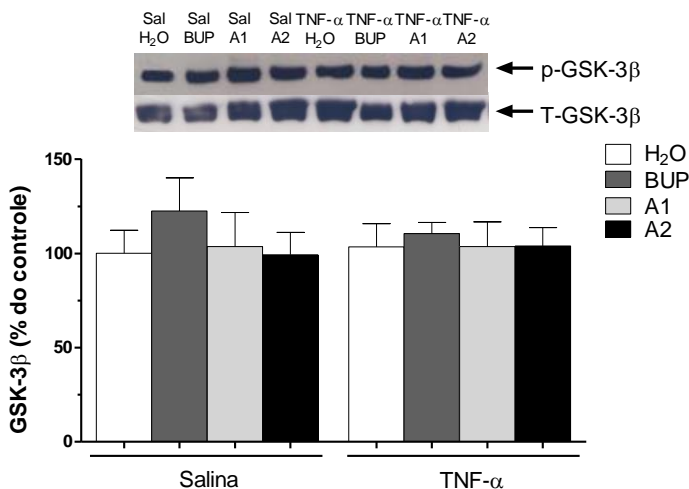


Figura 17. Efeito do pré-tratamento dos animais com agmatina (A1: 0,0001 e A2: 0,1 mg/kg) ou bupropiona (BUP, 10 mg/kg) e posterior injeção central de TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) ou salina na expressão da GSK-3 β fosforilada e total. Os resultados foram avaliados por ANOVA de 1 via seguida pelo *post-hoc* de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 4).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a administração sistêmica de agmatina em baixas doses produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC, um modelo preditivo muito utilizado para avaliar o potencial antidepressivo de compostos (Bourin *et al.*, 2005). Além disso, a administração de agmatina nas doses de 0,1 e 1 mg/kg produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais controles (não tratados com TNF- α) no TSC, enquanto a dose de 0,0001 foi inefetiva (sub-ativa). A administração de TNF- α (0,001 fg/sítio, i.c.v.) produziu um aumento no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao TSC, caracterizando um comportamento tipo-depressivo e o tratamento desses animais com agmatina nas doses de (0,0001, 0,1 e 1 mg/kg, p.o.) preveniu os efeitos causados pelo TNF- α . Adicionalmente, o estudo demonstrou que a administração combinada de doses sub-ativas de agmatina (0,0001 mg/kg) com doses sub-ativas de antidepressivos convencionais (fluoxetina, imipramina e bupropiona), um antagonista de receptores NMDA (MK-801) e um inibidor da NOS 1 (7-NI) causou um efeito tipo-antidepressivo sinérgico nos camundongos controle (não tratados com TNF- α). Ainda, todos esses tratamentos combinados ou administrados isoladamente em doses sub-ativas foram capazes de prevenir o aumento do tempo de imobilidade induzido pela administração de TNF- α . Finalmente, foi observado que nenhum dos tratamentos, incluindo a agmatina em sua dose sub-ativa (0,0001 mg/kg) e ativa (0,1 mg/kg) e a bupropiona em sua dose ativa (10 mg/kg) utilizada como controle positivo, tanto nos animais injetados centralmente com salina quanto no grupo TNF- α causou alguma alteração na fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹), e expressão de Bax e Bcl-2.

Um dos modelos experimentais mais utilizados na pesquisa para avaliação da atividade antidepressiva de compostos é o TSC (Cryan *et al.*, 2002). Nesse teste, é mensurado o tempo de imobilidade dos animais submetidos a uma situação inescapável e uma diminuição no mesmo é considerado como um efeito tipo-antidepressivo (McArthur e Borsini, 2006). Destaca-se que no TSC diversas classes de antidepressivos como ISRS, antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoamina oxidase reduzem o tempo de imobilidade dos animais (Steru *et al.*, 1985; Cryan *et al.*, 2005) além de ser um teste sensível à administração aguda de substâncias com atividade antidepressiva (Porsolt *et al.*, 1977; Steru *et al.*, 1985; Cryan *et al.*, 2005). Apesar de fármacos que aumentam a atividade motora dos animais poderem produzir resultados

falsos positivos no TSC, nossos dados demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo (diminuição da imobilidade) da agmatina não foi atribuído a um efeito psicoestimulante, pois os grupos experimentais que tiveram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, não apresentaram alterações significativas na atividade locomotora no TCA.

O uso de modelos animais pode auxiliar para um melhor entendimento da fisiopatologia da depressão, possibilitando a descoberta de novos fármacos para serem utilizados posteriormente na clínica. Levando em consideração a estreita relação entre a depressão e inflamação (Maes, 1995; Dantzer *et al.*, 1999; Kronfol e Remick, 2000; Leonard, 2001; Howren *et al.*, 2009; Dowlati *et al.*, 2010) um modelo animal de depressão foi recentemente padronizado e publicado pelo nosso grupo. Baseia-se na administração central de TNF- α , que produz um comportamento tipo depressivo em camundongos expostos aos testes comportamentais TNF e TSC, reforçando o possível envolvimento da inflamação nos mecanismos fisiopatológicos da depressão, e sugerindo que esta abordagem experimental pode ser útil para estudar o componente inflamatório relacionado à depressão (Kaster *et al.*, 2012). No estudo em questão, a administração de TNF- α induziu um comportamento tipo-depressivo nos camundongos submetidos ao TSC, confirmando os resultados previamente relatados por Kaster *et al.* (2012). Corroborando com esses achados, dados da literatura mostram que camundongos knockout para o receptor de TNF- α apresentam uma redução no tempo de imobilidade no TSC e TNF (Simen *et al.*, 2006; Kaster *et al.*, 2012). Além disso, Kaster *et al.* (2012) demonstraram que o uso de inibidores da síntese de TNF- α previnem o aumento no tempo de imobilidade induzido por esta citocina, reforçando o fato de que níveis elevados de TNF- α no cérebro de camundongos estão relacionado a um comportamento tipo-depressivo desses animais.

No que diz respeito ao efeito tipo-antidepressivo da agmatina demonstrado no presente estudo, vale ressaltar que ocorreu com a administração oral de baixas doses (0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg/kg no TSC) desse composto. Corroborando com esses achados, estudos mostraram o efeito tipo-antidepressivo da agmatina por via i.p. e i.c.v. no TSC e TNF (Zomkoviski *et al.*, 2002; 2004; 2005). Além disso, um estudo de Li *et al.* (2003) mostra que a agmatina administrada por via oral possui efeito antidepressivo no TSC em doses maiores (40 e 80 mg/kg p.o.). Essa diferença de doses entre o presente estudo e a literatura, pode ser atribuída as diferentes linhagens de camundongos utilizadas ou ainda, pela idade dos animais. Evidências da literatura demonstram ainda, que outras propriedades da agmatina *in vivo* como, por exemplo, ação

ansiolítica e neuroprotetora, ocorreram com a administração de doses mais elevadas, em uma faixa de 20 a 50 mg/kg (Lavinsky *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2011). Esse estudo demonstrou também que a administração de agmatina (0,0001, 0,1 e 1 mg/kg, p.o.) 30 minutos antes da injeção central de TNF- α foi capaz de prevenir o efeito tipo-depressivo (aumento no tempo de imobilidade no TSC) induzido por essa citocina pró-inflamatória, sem afetar a atividade locomotora dos animais no TCA. Esses achados estão de acordo com estudos que reportam que esta amina catiônica apresenta propriedades anti-inflamatórias (Satriano *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2011), podendo reduzir a ativação de NF κ B (Hong *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2003), ou ainda, atenuar a resposta inflamatória induzida pela administração de onzozymosan, um polissacarídeo cuja administração induz intensa resposta inflamatória, em camundongos. Estes eventos levam a redução de TNF- α , IL-6 e NO no soro e no exsudato peritoneal dos animais (Gu *et al.*, 2011). Adicionalmente, a literatura evidencia que a agmatina reduz dores neuropáticas (Onal *et al.*, 2001, 2004), hiperalgia térmica (Horvath *et al.*, 1999) e dor (Fairbanks *et al.*, 2000) induzidas pela inflamação em diferentes modelos animais. Outro dado relevante do presente estudo, é que a agmatina, apesar de não ter efeito tipo-antidepressivo nos animais controle (não tratados com TNF- α) na sua dose sub-ativa (0,0001 mg/kg), foi capaz de prevenir o efeito tipo-depressivo induzido pelo TNF- α , nessa mesma dose. Esses dados corroboram com achados da literatura que demonstram que compostos com ação antidepressiva possuem uma maior sensibilidade em animais submetidos a algum tipo de insulto (Poleszak *et al.*, 2006; Ledo *et al.*, 2012).

Está bem estabelecido o papel das monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na depressão (Elhwuegi, 2004; Andrews *et al.*, 2011), e o envolvimento da neurotransmissão monoaminérgica no efeito antidepressivo de compostos, inclusive em modelos animais de depressão (Elhwuegi, 2004; Yamada *et al.*, 2004). O sistema serotoninérgico foi o primeiro a ter sua importância reconhecida na etiologia e tratamento dos distúrbios psiquiátricos (Risch e Nemeroff, 1992). Além do papel bem estabelecido desse sistema na fisiopatologia da depressão, ele também é alvo da farmacoterapia convencional (Duman *et al.*, 1997; Wong e Licinio, 2001) de modo que fármacos que atuam sobre este sistema representam 80% de todos os antidepressivos no mercado (Risch e Nemeroff, 1992; Elhwuegi, 2004). Neste contexto, o presente estudo demonstrou que a administração por via oral de doses sub-ativas de fluoxetina com agmatina, produziu um efeito tipo-antidepressivo nos camundongos controles (não tratados com TNF- α)

em doses que não têm efeito *per se*, sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura demonstrando um efeito tipo-antidepressivo sinérgico nos animais submetidos ao TNF após administração intraperitoneal de doses sub-ativas de fluoxetina em combinação com agmatina (Zomkowski *et al.*, 2004; Taksande *et al.*, 2009). Além disso, tanto a agmatina quanto a fluoxetina em doses sub-ativas quando combinadas com outros fármacos com atividade antidepressiva, diminuem significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC ou TNF (Rogóz *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2003). Destaca-se ainda que, muitos compostos inclusive a agmatina, (Raasch *et al.*, 2001; Zomkowski *et al.*, 2004) exibem efeito tipo-antidepressivo mediante a ativação do sistema serotoninérgico (McGarry *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007, 2008; Freitas *et al.*, 2010). Adicionalmente, o estudo em questão mostrou que a administração de doses sub-ativas de agmatina e fluoxetina *per se* ou em combinação, preveniram o efeito tipo-depressivo induzido pelo TNF- α , sugerindo que o efeito tipo-antidepressivo da agmatina envolve, pelo menos em parte, a modulação do sistema serotoninérgico.

Aliado a este contexto, a literatura mostrou que pacientes com depressão apresentam distúrbios na interação entre a transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, sugerindo que uma falha na comunicação entre estes sistemas pode estar envolvida na patogênese desta doença (Geraciotti *et al.*, 1997; Gorman e Sullivan, 2000). Evidências experimentais e clínicas demonstram que o sistema noradrenérgico está fortemente implicado na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de antidepressivos (Frazer, 2000; Nutt, 2006). Este estudo demonstrou que a imipramina, quando co-administrada (p.o.) com agmatina em doses que não tem efeito *per se* nos animais tratados com salina (controles), potencializa o efeito tipo-antidepressivo da agmatina, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Esses resultados corroboram com estudos da literatura que mostram que a administração de doses sub-ativas de imipramina com compostos que possuem potencial antidepressivo, resulta em um comportamento tipo antidepressivo sinérgico (Binfaré *et al.*, 2009; Colla *et al.*, 2012). Além disso, um estudo de Zomkowski *et al.* (2002) demonstrou que a agmatina possui efeito sinérgico no TNF quando co-administrada com a imipramina. Adicionalmente, a agmatina ou imipramina administradas em suas doses sub-ativas isoladamente ou em combinação foram capazes de prevenir o efeito tipo-depressivo induzido pelo TNF- α . Esses resultados corroboram com dados da literatura que mostram que o mecanismo de ação antidepressivo da agmatina está associado com o

sistema noradrenérgico (Gonzalez *et al.*, 1996; Zomkowski *et al.*, 2002; Onal *et al.*, 2003).

Além dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, estudos pré-clínicos e clínicos evidenciam o papel do sistema dopaminérgico na depressão (Bonhomme e Esposito, 1998; Elhwuegi, 2004; Millan, 2004; Kulkarni *et al.*, 2008). A literatura sugere que a severidade da depressão está inversamente relacionada aos níveis de metabólitos da dopamina no SNC e existem evidências que indicam que antidepressivos com efeitos no sistema dopaminérgico são eficazes para o tratamento da depressão (Papakostas, 2006). Além disso, estudos pré-clínicos demonstram que agonistas dopaminérgicos potencializam os efeitos tipo-antidepressivos em modelos animais como TNF (Maj e Rogoz, 1999; Joca *et al.*, 2000) e que antagonistas de receptores dopaminérgicos D₁ são efetivos em prevenir o efeito de diferentes compostos com ação tipo-antidepressiva, tanto no TNF quanto no TSC (Yamada *et al.*, 2004; Hirano *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007; Binfaré *et al.*, 2010). Os resultados do presente estudo mostraram que a administração por via oral de doses sub-ativas de bupropiona com agmatina, produziu um efeito tipo-antidepressivo em camundongos controles (não tratados com TNF- α) em doses que não tem efeito *per se*, sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA. Além disso, nos animais tratados com TNF- α , o pré-tratamento com agmatina ou bupropiona administradas em suas doses sub-ativas isoladamente ou em conjunto preveniram o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo TNF- α . Vale ressaltar que a agmatina quando administrada em combinação com a bupropiona em doses sub-ativas produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico nos camundongos tratados com TNF- α . De fato, uma relação entre a agmatina e bupropiona foi demonstrada previamente em um estudo que relaciona uma depleção dos níveis plasmáticos de agmatina em pacientes depressivos, e a normalização desse efeito após o tratamento com o antidepressivo (Halaris *et al.*, 1999). Além disso, a literatura evidencia que a agmatina aumenta o conteúdo de monoaminas (norepinefrina, epinefrina e dopamina), em células PC12, exercendo efeito citoprotetor (Yun *et al.*, 2003). É importante ressaltar que antidepressivos de diversas classes, incluindo aqueles utilizados no presente trabalho, apresentam propriedades anti-inflamatórias promovendo a redução de citocinas pró-inflamatórias ou aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (Lanquillon *et al.*, 2000; Kenis e Maes, 2002; Nishida *et al.*, 2002; Tuglu *et al.*, 2003; Sutcgil *et al.*, 2007; Roumestan *et al.*, 2007), inclusive em modelos animais de depressão (Schiepers *et al.*, 2005).

Além do papel bem estabelecido do sistema monoaminérgico na etiologia da depressão (Cummings, 1993; Delgado *et al.*, 1993), diversos estudos mostram o envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia e tratamento dessa doença, provavelmente através dos receptores NMDA (Swanson *et al.*, 2005; Krystal, 2007; Maeng e Zarate, 2007; Pilc *et al.*, 2008; Skolnick *et al.*, 2009). Evidências da literatura mostram que antagonistas de receptores NMDA possuem propriedades antidepressivas em diversos modelos animais, incluindo o TNF (Rosa *et al.*, 2003; Poleszak *et al.*, 2007; Maeng *et al.*, 2008; Szewczyk *et al.*, 2010) e o TSC (Moretti *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo mostram uma redução significativa no tempo de imobilidade dos camundongos controle (não tratados com TNF- α) submetidos ao TSC após tratamento combinado com doses sub-ativas de agmatina e MK-801 enquanto a administração desses fármacos *per se* não alterou o tempo de imobilidade dos animais. Corroborando com este resultado, um estudo de Zeidan *et al.* (2007) mostrou que a administração de agmatina em combinação com MK-801 produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico em camundongos no TNF. Adicionalmente, a literatura evidencia que a administração de antagonistas de receptores NMDA potencializa a atividade de antidepressivos como fluoxetina, venlafaxina e imipramina no TNF (Pruus *et al.*, 2010; Rogoz *et al.*, 2002). Nos animais injetados com TNF- α , o tratamento com agmatina ou MK-801 isoladamente em suas doses sub-ativas ou em combinação, preveniram o aumento do tempo de imobilidade induzido pela administração de TNF- α . Esses resultados corroboram com estudos prévios, inclusive realizados pelo nosso grupo (Zomkowski *et al.*, 2002) que demonstram que a agmatina produz um efeito tipo-antidepressivo no TSC por um mecanismo que parece envolver o antagonismo de receptores NMDA (Yang *et al.*, 1999; Reis e Regunathan, 2000). De fato, a influência da agmatina no sistema glutamatérgico é evidenciada por estudos que mostram efeitos neuroprotetores da agmatina contra excitotoxicidade glutamatérgica em células de hipocampo (Olmos *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006). Adicionalmente, nossos resultados estão de acordo com evidências da literatura que mostram que antagonistas de receptores NMDA, incluindo MK-801, possuem efeito tipo-antidepressivo em modelos animais (Skolnick, 1999; Trullas e Skolnick, 1990; Mantovani *et al.*, 2003; Machado-Vieira *et al.*, 2009; Skolnick *et al.*, 2009).

A estimulação de receptores NMDA induz a ativação da via L-arginina-NO, resultando em níveis aumentados de NO. A literatura sugere o envolvimento do NO na depressão através de estudos clínicos

mostrando que antagonistas de receptores NMDA reduzem o sintomas depressivos (Zarate *et al.*, 2006; Diaz Granados *et al.*, 2010) e que pacientes depressivos com tendências suicidas apresentam altos níveis plasmáticos de NO (Kim *et al.*, 2006). Além disso, diversos compostos com propriedades antidepressivas demonstraram efeitos que são prevenidos pelo aumento nos níveis de NO (Brocardo *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2011; Bettio *et al.*, 2012). Em concordância com esses achados, nosso estudo demonstrou que a administração de doses sub-ativas de 7-NI ou agmatina administrados isoladamente ou em conjunto, produziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC, nos animais controle (não injetados com TNF- α). Por outro lado, naqueles animais injetados com TNF- α , o pré-tratamento com doses sub-ativas de agmatina e 7-NI isoladamente ou em conjunto foi capaz de prevenir o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo TNF- α . Estes resultados, em conjunto, estão de acordo com achados da literatura que mostram que a agmatina protege os neurônios e a microglia da toxicidade induzida pelo NO (Abe *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2012) além de inibir todas as isoformas da enzima oxido nítrico sintase no encéfalo (Galea *et al.*, 1996; Fairbanks *et al.*, 2000). Adicionalmente, estudos sugerem que o 7-NI exerce efeito tipo-antidepressivo em ratos no TNF (Eroglu e Caglayan, 1997; Yildiz *et al.*, 2000) além de potencializar o efeito tipo-antidepressivo da venlafaxina (Dhir e Kulkarni, 2007b), imipramina e fluoxetina (Harkin *et al.*, 2004) no TNF. Esses resultados são consistentes com estudos que demonstram que inibidores da NOS exercem efeito tipo antidepressivo em modelos animais de depressão (Harkin *et al.*, 1999; Wegener *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008; Jesse *et al.*, 2010).

Destaca-se que tanto o MK-801 quanto o 7-NI utilizados neste estudo, apresentam propriedades anti-inflamatórias, corroborando desta forma com os nossos resultados (Handy *et al.*, 1998; Glezer *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2009; Duma *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2012; Andreasen *et al.*, 2013).

Levando em consideração que adaptações moleculares mediadas pela ativação de vias de sinalização podem estar envolvidas no efeito de agentes antidepressivos (Fisar e Hroudová, 2010), busca-se elucidar com precisão os mecanismos intracelulares e bioquímicos responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos. Para tanto, o presente estudo avaliou se o modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de TNF- α levou a alterações em proteínas envolvidas nas vias apoptóticas, bem como o efeito da agmatina nesse modelo.

A literatura evidencia que as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , além de resultarem em um comportamento tipo-depressivo em modelos animais (Levine *et al.*, 1999 a, b; Capuron *et al.*, 2002; Dantzer *et al.*, 2008), possuem propriedades pró-apoptóticas levando a uma alteração na expressão de genes relacionados ao controle apoptótico e neuroplasticidade no hipocampo (Lucassen *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* têm demonstrado que citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de Bax e reduzem a expressão de Bcl-2 (Ning *et al.*, 2010) e ainda, que o TNF- α aumenta a fosforilação de GSK-3 β (Park *et al.*, 2011). De acordo com o efeito bem estabelecido da inflamação em vias apoptóticas, um estudo recente de revisão correlacionou modelos que induzem comportamento tipo-depressivo nos animais, como estresse crônico moderado e desamparo apreendido, com o aumento da inflamação e alteração nas vias apoptóticas, incluindo redução da expressão de Bcl-2 (Kubera *et al.*, 2011). No entanto, apesar das evidências descritas na literatura acerca do envolvimento das citocinas pró-inflamatórias com a apoptose, o presente estudo não demonstrou alteração na expressão de Bax e Bcl-2 e fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹) no hipocampo dos camundongos que receberam TNF- α . De modo similar aos nossos resultados um estudo de Moretti *et al.* (2012) não observou alteração na fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹) ou expressão de Bax, em animais estressados agudamente (Moretti *et al.*, 2012). Estudos também demonstraram que o tratamento crônico com antidepressivos (como fluoxetina, citalopram, desipramina e imipramina) modificam a expressão de Bax e Bcl-2 (Huang *et al.*, 2007; Murray e Hutson, 2007) e que o tratamento agudo com fluoxetina ou imipramina altera a fosforilação de GSK-3 (Roh *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012). Entretanto, citalopram, imipramina e amitriptilina, quando administradas agudamente, falharam em alterar os níveis de Bcl-2 (Murray e Hutson, 2007). Neste estudo, a administração de agmatina ou bupropiona em doses ativas não afetaram a expressão de Bax e Bcl-2 ou a fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹). Entretanto, a literatura evidencia que a agmatina atenua apoptose em células ganglionares da retina expostas a TNF- α (Hong *et al.*, 2009) e reverte a apoptose hipocampal resultante do tratamento com LPS (Zarifikar *et al.*, 2010). Além disso, a agmatina mostra propriedades anti-apoptóticas, por suprimir o dano celular induzido pela rotenona e reduzir a expressão de Bax (Condello *et al.*, 2011), ou ainda, por aumentar a expressão de Bcl-2 (Arndt *et al.*, 2009).

Considerando que a eutanásia dos animais ocorreu uma hora após o tratamento, pode ter sido tempo insuficiente para haver alteração na expressão das proteínas Bax e Bcl-2 e fosforilação de GSK-3 β . Isso

corroborar com estudos que mostram que a alteração na expressão dessas proteínas ocorre quando os animais são sacrificados 24 horas após o último tratamento (Xu *et al.*, 2003; Murray e Huston, 2007; Chen *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2013). Além disso, os estudos que observam alteração na expressão dessas proteínas utilizam tratamento crônico com antidepressivos (Xu *et al.*, 2003; Murray e Huston, 2007; Kosten *et al.*, 2008). Neste contexto, acredita-se que a diferença dos resultados obtidos neste estudo em comparação com dados da literatura pode ter ocorrido em função da duração do tratamento com agmatina.

Cabe ressaltar que mais experimentos são necessários para confirmar os mecanismos de sinalização intracelular pelos quais a agmatina exerce efeito neuroprotetor. Portanto, considerando todos os resultados obtidos, a agmatina modula, pelo menos em parte, os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico e também glutamatérgico, através do antagonismo de receptores NMDA e diminuição da síntese de NO.

Considerando também que o tratamento da depressão com antidepressivos convencionais produz diversos efeitos colaterais (Brunello *et al.*, 2002), que podem reduzir a adesão dos pacientes ao tratamento (Sleath *et al.*, 2003), o desenvolvimento de terapias antidepressivas mais eficazes ou com menos efeitos adversos é fundamental. Os resultados obtidos com a administração combinada de agmatina com os antidepressivos fluoxetina, imipramina e bupropiona sugerem que esta amina pode ser útil para o tratamento da depressão, diminuindo as doses dos antidepressivos prescritos e, conseqüentemente, os seus efeitos colaterais. Além disso, a agmatina, um composto de baixa toxicidade, que já é utilizado clinicamente para o tratamento da dor neuropática (Keynan *et al.*, 2010), deve continuar a ser investigado como uma nova possibilidade para o tratamento de depressão.

CONCLUSÕES

- A administração aguda de baixas doses de agmatina por via oral produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA, reforçando evidências da literatura de que a agmatina apresenta propriedades antidepressivas.
- O modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por TNF- α provocou um aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC, caracterizando-o como um modelo de depressão associado à inflamação.
- A agmatina em doses ativas e sub-ativa foi efetiva em prevenir o aumento do tempo de imobilidade dos animais tratados com TNF- α , sugerindo que a agmatina apresenta propriedades antidepressivas em um modelo de depressão associado a condições inflamatórias.
- A associação de doses sub-ativas de agmatina com fluoxetina, imipramina, bupropiona, MK-801 e 7-NI, foram capazes de produzir um efeito tipo-antidepressivo sinérgico no TSC.
- A administração isolada ou combinada de doses sub-ativas de agmatina e dos compostos mencionados acima, foram capazes de prevenir o aumento do tempo de imobilidade induzido pela administração de TNF- α . Esses achados nos levam a crer que o efeito tipo-antidepressivo do tratamento agudo com agmatina é dependente, pelo menos em parte, de uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico além do antagonismo de receptores NMDA e inibição da síntese de NO.
- Apesar das evidências descritas na literatura relacionando inflamação com apoptose e a reversão dessa morte celular programada por antidepressivos, o presente estudo não demonstrou diferença significativa em nenhum grupo experimental na expressão de Bax e Bcl-2, bem como na fosforilação de GSK-3 β (Ser⁹) no hipocampo dos animais. Levando em consideração que estes resultados podem ser

atribuídos à duração do tratamento com agmatina, a possibilidade de que esse composto possa modular as vias apoptóticas não deve ser descartada.

- Os resultados em conjunto sugerem que essa amina catiônica pode ser uma alternativa para o tratamento da depressão associada a condições inflamatórias e até mesmo para estudos clínicos abordando um possível efeito benéfico desta amina no tratamento de transtornos depressivos.

PERSPECTIVAS

- Verificar o efeito do tratamento crônico com agmatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo TNF- α .
- Investigar o envolvimento de outras proteínas que participam em etapas diferentes das vias de sinalização envolvidas com apoptose no efeito tipo-antidepressivo da agmatina, como caspase 3.
- Realizar a dosagem de neurotransmissores (serotonina, noradrenalina e dopamina) e seus metabólitos no hipocampo e córtex cerebral de animais submetidos ao tratamento agudo ou repetido com agmatina.
- Avaliar o envolvimento de proteínas envolvidas no controle da apoptose (avaliando, por exemplo, a expressão de Bax, Bcl-2) sobre o efeito do tipo-antidepressivo da agmatina após um maior período de tempo entre o último tratamento e o sacrifício dos animais.
- Realizar a dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 além de verificar a atividade da enzimaIDO em animais submetidos ao modelo de depressão induzida pela administração de TNF- α .

REFERÊNCIAS

- ABE K, ABE Y, SAITO H. Agmatine suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res.*, 872:141-148, 2000.
- AHN SK, HONG S, PARK YM, CHOI JY, LEE WT, PARK KA, *et al.* Protective effects of agmatine on lipopolysaccharide-injured microglia and inducible nitric oxide synthase activity. *Life Sci.*, 91: 1345-1350, 2012.
- ANDREWS PW, KORNSTEIN SG, HALBERSTADT LJ, GARDNER CO, NEALE MC. Blue again: perturbational effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. *Front Psychol.*, 2:159, 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Washington, DC. 4th ed., 1994
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed., 2000.
- ANDREASEN JT, BACH A, GYNTER M, NASSER A, MOGENSEN J, STROMGAARD K *et al.* UCCB01-125, a dimeric inhibitor of PSD-95, reduces inflammatory pain without disrupting cognitive or motor performance: Comparison with the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neuropharmacology*, 67: 193-200, 2013.
- ANISMAN H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci.*, 34: 4-20, 2009.
- ARNDT MA, BATTAGLIA V, PARISI E, LORTIE MJ, ISOME M, BASKERVILLE C, *et al.* The arginine metabolite agmatine protects mitochondrial function and confers resistance to cellular apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 296: C1411-C1419, 2010.
- ARTENI NS, LAVINSKY D, RODRIGUES AL, FRISON VB, NETTO CA. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem.*, 78: 465-469, 2002.
- BACHIS A, CRUZ MI, NOSHENY RL, MOCCHETTI I. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett.*, 442: 104-108, 2008.

BAL-PRICE A, BROWN GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 21: 6480-6491, 2001.

BANASR M, VALENTINE GW, LI XY, GOURLEY SL, TAYLOR JR, DUMAN RS. Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry*, 62: 496-504, 2007.

BAO Z, LIM S, LIAO W, LIN Y, THIEMERMANN C, LEUNG BP, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med.*, 176: 431-438, 2007.

BATTAGLIA V, GRANCARA S, SATRIANO J, SACCOCCIO S, AGOSTINELLI E, TONINELLO A. Agmatine prevents the Ca(2+)-dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria. *Amino Acids*, 38: 431-437, 2010.

BEAULIEU JM, ZHANG X, RODRIGUIZ RM, SOTNIKOVA TD, COOLS MJ, WETSEL WC, *et al.* Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 105:1333-8, 2008.

BEAULIEU JM, GAINETDINOV RR, CARON MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 49: 327-347, 2009.

BENCE AK, WORTHEN DR, STABLES JP, CROOKS PA. An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. *Pharmacol Biochem Behav.*, 74: 771-775, 2003.

BERTON O, NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.*, 7: 137-151, 2006.

BEUREL E, MICHALEK SM, JOPE RS. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol.*, 31: 24-31, 2010.

BETTIO LE, CUNHA MP, BUDNI J, PAZINI FL, OLIVEIRA A, COLLA AR, *et al.* Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behav Brain Res.*, 234:137-148, 2012.

BINFARÉ RW, ROSA AO, LOBATO KR, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Ascorbic acid administration produces an

antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 30: 33:530-540, 2009.

BINFARÉ RW, MANTOVANI M, BUDNI J, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Involvement of dopamine receptors in the antidepressant-like effect of melatonin in the tail suspension test. *Eur J Pharmacol.*, 638: 78-83, 2010.

BONANNO G, GIAMBELLI R, RAITERI L, TIRABOSCHI E, ZAPPETTINI S, MUSAZZI L, *et al.* Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci.*, 25: 3270-3279, 2005.

BONHOMME N, ESPOSITO E. Involvement of serotonin and dopamine in the mechanism of action of novel antidepressant drugs: a review. *J Clin Psychopharmacol.*, 18: 447-454, 1998.

BOURIN M, CHENU F, RIPOLL N, DAVID DJP. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res.*, 164: 266-269, 2005.

BREDT DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.*, 31: 577-596, 1999.

BROCARDO PS, BUDNI J, LOBATO KR, KASTER MP, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol.*, 598: 37-42, 2008.

BRUNELLO N, MENDLEWICZ J, KASPER S, LEONARD B, MONTGOMERY S, NELSON J, *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 12: 461-475, 2002.

BUDNI J, GADOTTI VM, KASTER MP, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol.*, 575: 87-93, 2007.

BUDNI J, LOBATO KR, BINFARÉ RW, FREITAS AE, COSTA AP, MARTIN-DE-SAAVEDRA MD, *et al.* Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of

folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol.*, 26:714-723, 2011.

CAMPBELL S, MARRIOTT M, NAHMIAS C, MACQUEEN GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: A meta-analysis. *Am J Psychiatry*, 161: 598-607, 2004.

CAPURON L, HAUSER P, HINZE-SELCH D, MILLER AH, NEVEU PJ, Treatment of cytokine-induced depression. *Brain Behav Immun.*, 16: 575-580, 2002.

CASTRÉN E. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.*, 6: 241-246, 2005.

CHANG JS, HSU YL, KUO PL, KUO YC, CHIANG LC, LIN CC. Increase of Bax/Bcl-XL ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life Sci.*, 76: 1883-1893, 2005.

CHEN SJ, KAO CL, CHANG YL, YEN CJ, SHUI JW, CHIEN CS, *et al.* Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through bcl-2. *Curr Neurovasc Res.*, 4: 19-29, 2007.

CHEN WQ, MA H, BIAN JM, ZHANG YZ, LI J. Hyperphosphorylation of GSK-3 β : Possible roles in chlorpyrifos-induced behavioral alterations in animal model of depression. *Neurosci Lett.*, 528: 148-152, 2012.

CHEYUO C, JACOB A, WU R, ZHOU M, QI L, DONG W, *et al.* Recombinant human MFG-E8 attenuates cerebral ischemic injury: Its role in anti-inflammation and anti-apoptosis. *Neuropharmacology*, 62: 890-900, 2012.

CHIOU SH, KU HH, TSAI TH, LIN HL, CHEN LH, CHIEN CS, *et al.* Moclobemide upregulated Bcl-2 expression and induced neural stem cell differentiation into serotonergic neuron via extracellular regulated kinase pathway. *Br J Pharmacol.*, 148: 587-98, 2006.

COLLA ARS, MACHADO DG, BETTIO LEB, COLLA G, MAGINA MDA BRIGHENTE IMC, *et al.* Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J Ethnopharmacol.*, 143: 720-731, 2012.

CONDELLO S, CURRO M, FERLAZZO N, CACCAMO D, SATRANO J, IENTILE R. Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF- κ B activation protect against rotenone-

induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 116: 67-75, 2011.

COPPEN AJ, DOOGAN DP. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J Clin Psychiatry*, 49: 4-11, 1988.

CORDOVA FM, RODRIGUES AL, GIACOMELLI MB, OLIVEIRA CS, POSSER T, DUNKLEY PR, *et al.* Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.*, 998: 65-72, 2004.

CORTES-VIEYRA R, BRAVO-PATINO A, VALDEZ-ALARCON JJ, JUAREZ MC, FINLAY BB, BAIZABAL-AGUIRRE VM. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. *J Inflamm (Lond)*, 12: 9-23, 2012.

CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2: 647-656, 2002.

CULBERT AA, BROWN MJ, FRAME S, HAGEN T, CROSS DA, BAX B, *et al.* GSK-3 inhibition by adenoviral FRAT1 overexpression is neuroprotective and induces Tau dephosphorylation and beta-catenin stabilisation without elevation of glycogen synthase activity. *FEBS Lett.*, 507: 288-294, 2001.

CUMMINGS JL. The neuroanatomy of depression. *J. Clin. Psychiatry*, 11: 14-20, 1993.

CUNHA MP, MACHADO DG, BETTIO LE, CAPRA JC, RODRIGUES AL. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32:1913-1920, 2008.

CUZZOCREA S, MAZZON E, DI PR, MUIA C, CRISAFULLI C, DUGO L, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol.*, 120: 57-67, 2006.

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

CRYAN JF, VALENTINO RJ, LUCKI I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev.*, 29: 547-569, 2005.

DAILLY E, CHENU F, RENARD CE, BOURIN M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol.*, 18: 601-607, 2004.

DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205-219, 2004.

DANTZER R, WOLLMAN EE, VITKOVIC L, YIRMIYA R. Cytokines and depression: fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry*, 4: 328-332, 1999.

DANTZER R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol.*, 500: 399-411, 2004.

DANTZER R, O'CONNOR JC, FREUND GG, JOHNSON RW, KELLEY KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 9: 46-56, 2008.

DANYSZ W, KOSTOWSKI W, KOZAK W, HAUPTMANN M. On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. *Pol J Pharmacol Pharm.*, 38: 285-298, 1986.

D'AQUILA PS, COLLU M, GESSA GL, SERRA G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol.*, 405: 365-373, 2000.

DA SILVA GL, MATTEUSSI AS, SANTOS AR, CALIXTO JB, RODRIGUES ALS. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *NeuroReport*, 11: 3699-3702, 2000.

DELGADO PL, CHARNEY DS, PRICE LH, LANDIS H, HENINGER G.R. Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol Bull.*, 29: 389-396, 1993.

DEMYTTENAERE K. Compliance during treatment with antidepressants. *J Affect Disord.*, 43: 27-39, 1997.

DE OLIVEIRA RM, DEL BEL EA, MAMEDE-ROSA ML, PADOVAN CM, DEAKIN JF, GUIMARÃES FS. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci Lett.*, 289: 123-126, 2000.

- DE OLIVEIRA RMW, GUIMARÃES FS, DEAKIN JFW. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res.*, 41: 333-341, 2008.
- DEVRIES AC, JOH HD, BERNARD O, HATTORI K, HURN PD, TRAYSTMAN RJ, *et al.* Social stress exacerbates stroke outcome by suppressing Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11824-11828, 2001.
- DHIR A, KULKARNI SK. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol.*, 568: 177-185, 2007a.
- DHIR A, KULKARNI S.K. Involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*, 31: 921-925, 2007b.
- DHIR A, KULKARNI SK. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*, 24: 125-131, 2011.
- DIAZGRANADOS N, IBRAHIM LA, BRUTSCHE NE, AMELI R, HENTER ID, LUCKENBAUGH DA, *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.*, 71:1605-1611, 2010.
- D'SA C, DUMAN RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord*, 4: 183-194, 2002.
- DOWLATI Y, HERRMANN N, SWARDFAGER W, LIU H, SHAM L, REIM EK, *et al.* A Meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*, 67: 446-457, 2010.
- DREVETS WC, VIDEEN TO, PRICE JL, PRESKORN SH, CARMICHAEL ST, RAICHLER ME. A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci.*, 12: 3628-3641, 1992.
- DRZYZGA R, MARCINOWSKA A, OBUCHOWICZ E. Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull.*, 79: 248-257, 2009.
- DU J, WEI Y, LIU L, WANG Y, KHAIROVA R, BLUMENTHAL R, *et al.* A kinesin signaling complex mediates the ability of GSK-3beta to affect mood-associated behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107: 11573-11578, 2010.

DUGO L, COLLIN M, ALLEN DA, PATEL NS, BAUER I, MERVAALA EM, *et al.* GSK-3beta inhibitors attenuate the organ injury/dysfunction caused by endotoxemia in the rat. *Crit Care Med.*, 33: 1903-1912, 2005.

DUGO L, COLLIN M, THIEMERMANN C. Glycogen synthase kinase 3beta as a target for the therapy of shock and inflammation. *Shock*, 27: 113-123, 2007.

DUMA D, FERNANDES D, BONINI MG, STADLER K, MASON RP, ASSREUY J. NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. *Eur J Pharmacol.*, 668: 285-292, 2011.

DUMAN RS, HENINGER GR, NESTLER EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.*, 54: 597-606, 1997.

DUMAN RS. A case of neuronal life and death? *Biol Psychiatry*, 56: 140-145, 2004.

DUNN AJ, WANG J, ANDO T. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol.*, 461: 117-127, 1999.

DUNN AJ, SWIERGIEL AH, BEAUREPAIRE R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev.*, 29: 891-909, 2005.

EDWARDS TM, RICKARD NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav., Rev.* 31: 413-425, 2007.

EGBERONGBE YI, GENTLEMAN SM, FALKAI P, BOGERTS B, POLAK JM, ROBERTS GW. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience*, 59: 561-578, 1994.

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

EKDAHL CT, CLAASEN JH, BONDE S, KOKAIA Z, LINDVALL O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 13632-13637, 2003.

- ELHWUEGI AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28: 435-451, 2004.
- EROGLU L, CAGLAYAN B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res.*, 36:381-385, 1997.
- ESPLUGUES JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.*, 135: 1079-1095, 2002.
- FAIRBANKS CA, SCHREIBER KL, BREWER KL, YU CG, STONE LS, KITTO KF, *et al.* Agmatine reverse pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 10584-10589, 2000.
- FARZIN D, MANSOURI N. Antidepressant-like effect of harmaline and other beta- carbolines in the mouse forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 16: 324-328, 2006.
- FINKEL MS, LAGHRISSI-THODE F, POLLOCK BG, RONG J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacol Bull.*, 32: 653-658, 1996.
- FISAR Z, HROUDOVÁ J. Intracellular signaling pathways and mood disorders. *Folia Biol.*, 56: 135-148, 2010.
- FRANCIS J, ZHANG Z, WEISS M, FELDER RB. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H791-H797, 2004.
- FRANGOU S. Functional neuroimaging in mood disorders. *Psychiatry*, 5:176-179, 2006.
- FRAZER A. Norepinephrine involvement in antidepressant action. *J Clin Psychiatry*, 1:25-30, 2000.
- FREITAS AE, BUDNI J, LOBATO KR, BINFARÉ RW, MACHADO DG, JACINTO J, *et al.* Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanae* in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34: 335-343, 2010.
- FREITAS AE, MACHADO DG, BUDNI J, NEIS VB, BALEN GO, LOPES MWL *et al.* Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. *Behav Brain Res.*, 237: 176-184, 2013.

FUJIGAKI H, SAITO K, FUJIGAKI S, TAKEMURA M, SUDO K, ISHIGURO H *et al.* The signal transducer and activator of transcription 1 α and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem.*, 139: 655-662, 2006.

GALEA E, REGUNATHAN S, ELIOPOULOS U, FEINSTEIN DL, REIS DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J*, 316: 247-249, 1996.

GAO HM, JIANG J, WILSON B, ZHANG W, HONG J, LIU B. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.*, 81: 1285-1297, 2002.

GAO HK, YIN Z, ZHOU N, FENG XY, GAO F, WANG HC. Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 52: 286-292, 2008.

GERACIOTI TD JR, LOOSEN PT, EKHATOR NN, SCHMIDT D, CHAMBLISS B, BAKER DG, *et al.* Uncoupling of serotonergic and noradrenergic systems in depression: preliminary evidence from continuous cerebrospinal fluid sampling. *Depress Anxiety*, 6: 89-94, 1997.

GLEZER I, MUNHOZ CD, KAWAMOTO EM, MARCOURAKIS T, AVELLAR MCW, SCAVONE C. MK-801 and 7-NI attenuate the activation of brain NF- κ B induced by LPS. *Neuropharmacology*, 45: 1120-1129, 2003.

GONG ZH, LI YF, ZHAO N, YANG HJ, SU RB, LUO ZP, *et al.* Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. *Eur J Pharmacol.*, 550: 112-116, 2006.

GONZALEZ C, REGUNATHAN S, REIS DJ, ESTRADA C. Agmatine, an endogenous modulator of noradrenergic neurotransmission in the rat tail artery. *Br J Pharmacol.*, 119: 677-684, 1996.

GORMAN JM, SULLIVAN G. Noradrenergic approaches to antidepressant therapy. *J. Clin. Psychiatry*, 1: 13-16, 2000.

- GOULD TD, EINAT H, BHAT R, MANJI HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 7: 387-390, 2004.
- GREEN HF, NOLAN YM. GSK-3 mediates the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10 from cortical glia. *Neurochem Int.*, 61: 666-671, 2012.
- GROSS A, MCDONNELL JM, KORSMEYER SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 15: 1899-1911, 1999.
- GU Y, FAN X, ZHANG C, YANG X, BAO YX, LIANG HP. The protective effects of agmatine in zymosan induced acute lung injury in mice. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 23: 665-668, 2011.
- GURRIERI C, PIAZZA F, GNOATO M, MONTINI B, BIASUTTO L, GATTAZZO C, *et al.* 3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (SB21673), a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, displays therapeutic properties in a mouse model of pulmonary inflammation and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.*, 332: 785-794, 2010.
- HAEFNER B. A model for NF-kappa B regulation by GSK-3 beta. *Drug Discov Today*, 8:1062-1063, 2003.
- HALARIS A, ZHU H, FENG Y, PILETZ J. Plasma agmatine and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann N Y Acad Sci*, 881: 445-451, 1999.
- HALARIS A, PILETZ J. Agmatine metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs*, 21: 885-900, 2007.
- HANDY RLC, MOORE PK. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol.*, 123: 1119-1126, 1998.
- HARKIN A, BRUCE KH, CRAFT B, PAUL IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice: Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol.*, 372: 207-213, 1999.
- HARKIN A, CONNOR TJ, BURNS MP, KELLY JP. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 14: 274-281, 2004.

HARLAN J, CHEN Y, GUBBINS E, MUELLER R, ROCH JM, WALTER M, L *et al.* Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. *Mol Psychiatry*, 11: 76-85, 2006.

HARVEY BH, DUVENHAGE I, VILJOEN F, SCHEEPERS N, MALAN SF, WEGENER G, *et al.* Role of monoamine oxidase, nitric oxide synthase and regional brain monoamines in the antidepressant-like effects of methylene blue and selected structural analogues. *Biochem Pharmacol.*, 80: 1580-1591, 2010.

HASHIMOTO K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35: 1558-1568, 2011.

HENSLER JG. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology*, 26: 565-573, 2002.

HETMAN M, XIA Z. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol Exp. (Wars)*, 60: 531-545, 2000.

HIRANO S, MIYATA S, ONODERA K, KAMEI J. Involvement of dopamine D₁ and α_1 -adrenoceptors in the antidepressant-like effect of chlorpheniramine in the mouse tail suspension test. *Eur J Pharmacol.*, 562: 72-76, 2007.

HOEFLICH KP, LUO J, RUBIE EA, TSAO MS, JIN O, WOODGETT JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappa B activation. *Nature*, 406: 86-90, 2000.

HOLTZHEIMER PE, NEMEROFF CB. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx*, 42-56, 2006.

HONG S, LEE JE, KIM CY, SEONG GJ. Agmatine protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis in transformed rat retinal ganglion cell line. *BMC Neurosci.*, 81: 1-11, 2007.

HONG S, KIM CY, LEE JE, SEONG GJ. Agmatine protects cultured retinal ganglion cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *Life Sci.*, 84: 28-32, 2009.

HORVATH G, KEKESI G, SZIKSZAY M, KLIMSCHA W, BENEDEK G. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.*, 368:197-204, 1999.

- HOWREN MB, LAMKIN DM, SULS J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med.*, 71: 171-186, 2009.
- HU J, WANG Z, GUO Y-Y, ZHANG X-N, XU Z-H, LIU S-B, *et al.* A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistente inflammatory pain. *Molecular Pain* 5:71, 2009.
- HUANG MJ, REGUNATHAN S, BOTTA M, LEE K, MCCLENDONYI GB, PEDERSEN ML, *et al.* Structure-activity analysis of guanidine group in agmatine for brain agmatinase. *Ann N Y Acad Sci.*, 1009: 52-63, 2003.
- HUANG YY, PENG CH, YANG YP, WU CC, HSU WM, WANG HJ, *et al.* Desipramine activated Bcl-2 expression and inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived adult neural stem cells. *J Pharmacol Sci.*, 104:61-72, 2007.
- INAN SY, YALCIN I, AKSU F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav.*, 77: 457-464, 2004.
- INGE VAN DEN OEVER AM, RATERMAN HG, NURMOHAMED MT, SIMSEK S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators Inflamm.*, *In Press*, doi: 10.1155/2010/792393, 2010.
- JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354, 1997.
- JEFFERYS D, FUNDER J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol.*, 295: 131-135, 1996.
- JESSE CR, WILHELM EA, BORTOLATTO CF, ROCHA JB, NOGUEIRA CW. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of bis selenide in the mouse tail suspension test. *Eur J Pharmacol.*, 635: 135-141, 2010.
- JOCA SR, SKALISZ LL, BEIJAMINI V, VITAL MA, ANDREATINI R. The antidepressive-like effect of oxcabazepine: possible role of dopaminergic neurotransmission. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 10: 223-228, 2000.

JOCA SR, GUIMARAES FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* (Berlin), 185: 298-305, 2006.

JOELS M, KARST H, ALFAREZ D, HEINE VM, QIN Y, VAN RIEL E, *et al.* Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress*, 7: 221-231, 2004.

JOPE RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci.*, 24: 441-443, 2003.

JOPE RS, YUSKAITIS CJ, BEUREL E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res*, 32: 577-595, 2007.

JUN TY, PAE CU, HOON-HAN, CHAE JH, BAHK WM, KIM KS *et al.* Possible association between -G308A tumour necrosis factor- α gene polymorphism and major depressive disorder in the Korean population. *Psychiatr Genet.*, 13: 179-181, 2003.

KAREGE F, PERROUD N, BURKHARDT S, SCHWALD M, BALLMANN E, LA HARPE R, *et al.* Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry*, 61: 240-245, 2007.

KASTER MP, ROSA AO, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 8: 601-606, 2005.

KASTER MP, BUDNI J, BINFARÉ RW, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31: 690-696, 2007.

KASTER MP, GADOTTI VM, CALIXTO JB, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. *Neuropharmacology*, 62: 419-426, 2012.

KENIS G, MAES M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 5: 401-412, 2002.

KEYNAN O, MIROVSKY Y, DEKEL S, GILAD VH, GILAD GM. 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.*, 11: 356-368, 2010.

KHAIROVA RA, MACHADO-VIEIRA R, DU J, MANJI HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 12: 561-578, 2009.

KIECOLT-GLASER JK, GLASER R. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. *J Psychosom Res.*, 53: 873-876, 2002.

KIM JH, YENARI MA, GIFFARD RG, CHO SW, PARK KA, LEE JE. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp Neurol.*, 189: 122-130, 2004.

KIM YK, PAIK JW, LEE SW, YOON D, HAN C, LEE BH. Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*, 30: 1091-1096, 2006.

KISS JP. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull*, 52: 459-466, 2000.

KLIMEK V, SCHENCK JE, HAN H, STOCKMEIER CA, ORDWAY GA. Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol Psychiatry*, 52: 740-748, 2002.

KOSTEN TA, GALLOWAY MP, DUMAN RS, RUSSELL DS, D'SA C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology*, 33: 1545-1558, 2008.

KRASS M, WENEGER G, VASAR E, VOLKE V. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behav Brain Res.*, 218: 57-63, 2011.

KRONFOL Z, REMICK DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*, 157: 683-694, 2000.

KRYSTAL JH. Ketamine and the potential role for rapid-acting antidepressant medications. *Swiss Med Wkly*, 137: 215-216, 2007.

KUBERA M, BASTA-KAIM A, HOLAN V, SIMBIRTSEV A, ROMAN A, PIGAREVA N, *et al.* Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice. *Int J Immunopharmacol.*, 20: 781-789, 1998.

KUBERA M, OBUCHOWICZ E, GOEHLER L, BRZESZCZ J, MAES M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35: 744-759, 2011.

KULKARNI SK, BHUTA NI MK, BISHNOI M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology*, 201: 435-442, 2008.

KUO JR, LO CJ, CHANG CP, LIN KC, LIN MT, CHIO CC. Agmatine-promoted angiogenesis, neurogenesis, and inhibition of gliosis-reduced traumatic brain injury in rats. *J Trauma, In Press*, doi: 10.1097/TA.0b013e31820932e2, 2011.

LANQUILLON S, KRIEG JC, BENING-ABU-SHACH U, VEDDER H. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 22: 370-379, 2000.

LAVINSKY D, ARTENI NS, NETTO CA. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav Brain Res.*, 141: 19-24, 2003.

LEAL RB, CORDOVA FM, HERD L, BOBROVSKAYA L, DUNKLEY PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 178: 44-51, 2002.

LEDO JH, AZEVEDO EP, CLARKE JR, RIBEIRO FC, FIGUEIREDO CP, FOGUEL D, *et al.* Amyloid- β oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry*. In press. Doi: 10.1038/mp.2012.168, 2012.

LEE H, KIM J, YIM S, KIM M, KIM S, KIM Y, *et al.* Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry*, 6: 725-728, 2001.

LEE GT, HÁ H, LEE HC, CHO YD. Agmatine reduces hydrogen peroxide in mesangial cells under high glucose conditions. *J Biochem Mol Biol.*, 36: 251-257, 2003.

- LEONARD BE. The immune system, depression and the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25:767-780, 2001.
- LEVINE J, BARAK Y, CHENGAPPA KN, RAPOPORT A, REBEY M, BARAK V. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*, 40: 171-176, 1999 a.
- LEVINE J, BARAK Y, CHENGAPPA KR, RAPOPORT A, ANTELMAN SM, BARAK V. Low CSF soluble interleukin 2 receptor levels in acute depression. Short communication. *J Neural Transm.*, 106: 1011-1015, 1999 b.
- LI G, REGUNATHAN S, BARROW CJ, ESHRAGHI J., COOPER, R., REIS, D.J. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263: 966-969, 1994.
- LI YF, GONG ZH, CAO JB, WANG HL, LUO ZP, LI J. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol.*, 469: 81-88, 2003.
- LI Y-F, CHEN H-X, LIU Y, ZHANG Y-Z, LIU Y-Q, LI J. Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. *Acta Pharmacol Sin*, 27: 1395-1400, 2006.
- LI N, LEE B, LIU RJ, BANASR M, DWYER JM, IWATA M *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329: 959-964, 2010.
- LINDSTEN T, ZONG WX, THOMPSON CB. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist*, 11:10-15, 2005.
- LIU C-H, CHERNG C-H, LIN S-L, YEH C-C, WU C-T, TAI Y-H, *et al.* N-methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 suppresses glial pro-inflammatory cytokine expression in morphine-tolerant rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 99: 371-380, 2011.
- LOFTIS JM, HUCKANS M, MORASCO BJ. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis.*, 37: 519-533, 2010.
- LU G, SU RB, LI J, QIN BY. Modulation by a-difluoromethyl-ornithine and aminoguanidine of pain threshold, morphine analgesia and tolerance. *Eur J Pharmacol.*, 478: 139-144, 2003.

LUCASSEN P, MULLER M, HOLSBOER F, BAUER J, HOLTROP A, WOUDA J, *et al.* Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol*, 158: 453-468, 2001.

LUCASSEN PJ, FUCHS E, CZECH B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry*, 55: 789-796, 2004.

LUCASSEN PJ, HEINE VM, MULLER MB, VAN DER BEEK EM, WIEGANT VM, DE KLOET ER, *et al.* Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS neurol disord drug targets*, 5: 531-546, 2006.

MACHADO DG, KASTER MP, BINFARÉ RW, DIAS M, SANTOS ARS, PIZZOLATTI MG, *et al.* Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 31: 421-428, 2007.

MACHADO DG, BETTIO LE, CUNHA MP, SANTOS AR, PIZZOLATTI MG, BRIGHENTE, *et al.* Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol.*, 587: 163-168, 2008.

MACHADO-VIEIRA R, SALVADORE G, DIAZGRANADOS N, ZARATE JR CA Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacol Ther.*, 123: 143-150, 2009.

MAENG S, ZARATE JR CA. 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.*, 9: 467-474, 2007.

MAES M. The Interleukin hypothesis of major depression. *Prog Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 19: 11-38, 1995.

MAES M, BOSMANS E, JONGH R, KENIS G, VANDOOOLAEGHE E, NEELS H. Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine*, 9: 853-858, 1997.

MAES M, VERKERK R, VANDOOOLAEGHE E, LIN A, SCHARPE S. Serum levels of excitatory aminoacids, 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.*, 97: 302-308, 1998.

MAES M. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv Exp Med Biol.*, 25-46, 1999

MAES M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *Neuro Endocrinol Lett.*, 29: 287-291, 2008.

MAES M, YIRMYIA R, NORABERG J, BRENE S, HIBBELN J, PERINI G, *et al.* The inflammatory & neurodegenerative hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis.*, 24: 27-53, 2009.

MAES M, FISAR Z, MEDINA M, SCAPAGNINI G, NOWAK G, BERK M. 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*, 20:127-150, 2012.

MAJ J, ROGOZ Z. Synergistic effect of pramipexole and sertraline in the forced swimming test. *Pol J Pharmacol.*, 51: 471-475, 1999.

MALBERG JE, EISCH AJ, NESTLER EJ, DUMAN RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.*, 20: 9104-9110, 2000.

MANJI HK, DREVETS WC, CHARNEY DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med.*, 7: 541-547, 2001.

MANTOVANI M, PERTILE R, CALIXTO JB, SANTOS AR, RODRIGUES ALS. 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.*, 343: 1-4, 2003.

MARSLAND AL, GIANAROS PJ, ABRAMOWITZ SM, MANUCK SB, HARIRI AR. Interleukin-6 covaries inversely with hippocampal grey matter volume in middle-aged adults. *Biol Psychiatry*, 64: 484-490, 2008.

MARTIN M, REHANI K, JOPE RS, MICHALEK SM. Toll-like receptor- mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.*, 6: 777-784, 2005.

MASUDA Y, OHNUMA S, SUGIYAMA T. α_2 -adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 23: 19-21, 2001.

MAURI MC, FERRARA A, BOSCATI L, BRAVIN S, ZAMBERLAN F, ALECCI M *et al.* Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology*, 37: 124-129, 1998.

McARTHUR R, BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav.*, 84: 436-452, 2006.

MCKERNAN DP, DINAN TG, CRYAN JF. Killing the blues: a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog Neurobiol.*, 88: 246-263, 2009.

MCCLUNG CA. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders, *Pharmacol Ther.*, 114: 222-232, 2007.

MCGARRY H, PIROTTA M, HEGARTY K, GUNN J. General practitioners and St. John's Wort: a question of regulation or knowledge? *Complement Ther Med.*, 15: 142-148, 2007.

MCNALLY L, BHAGWAGAR Z, HANNESTAD J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectrum*, 13: 501-510, 2008.

MELLOR AL, MUNN DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: Immunosuppression by starvation? *Immunol Today*, 20: 469-473, 1999.

MEYER JH, KRÜGER S, WILSON AA, CHRISTENSEN BK, GOULDING VS, SCHAFFER A, *et al.* Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. *NeuroReport*, 12: 4121-4125, 2001.

MILLAN MJ .The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol.*, 500: 371-384, 2004.

- MILLER AH, MALETIC V, RAISON CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, 65: 732-741, 2009.
- MITANI H, SHIRAYAMA Y, YAMADA T, MAEDA K, ASHBY CR Jr, KAWAHARA R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30: 1155-1158, 2006.
- MOINARD C, CYNOBER L, DE BANDT JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr.*, 24: 184-197, 2005.
- MONTGOMERY SA. Predicting response: noradrenaline reuptake inhibition. *Int Clin Psychopharmacol.*, 14: 21-6, 1999.
- MORETTI M, FREITAS AE, BUDNI J, FERNANDES SC, BALEN GO, RODRIGUES AL. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav Brain Res.*, 225: 328-333, 2011.
- MORETTI M, BUDNI J, DOS SANTOS DB, ANTUNES A, DAUFENBACH JF, MANOSSO LM, *et al.* Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. *J Mol Neurosci.*, 2012.
- MORILAK DA, FRAZER A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 7: 193-218, 2004.
- MULLER N, ACKENHEIL M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22: 1-33, 1998.
- MULLER N, RIEDEL M, GRUBER R, ACKENHEIL M, SCHWARZ MJ. The immune system and schizophrenia. An integrative view. *Ann N Y Acad Sci* 917: 456-467, 2000.
- MURPHY KM, RANGANATHAN V, FARNSWORTH ML, KAVALLARIS M, LOCK RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.*, 7: 102-111, 2000.
- MURRAY CJL, LOPEZ AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349: 1498-1504, 1997.

MURRAY F, HUSTON PH. Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT (1A) or 5-HT(2C/2B) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.*, 569: 41-47, 2007.

MYINT AM, KIM YK, VERKERK R, SCHARPE S, STEINBUSCH H, LEONARD B Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. *J Affect Disord.*, 98: 143-151, 2007.

MYINT AM, SCHWARZ MJ, MULLER N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. *J Neural Transm.*, 119:245-251, 2012.

NAIR A, VAIDYA VA. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *J Biosci.*, 31: 423-434, 2006.

NEMEROFF CB, OWENS MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci.*, 5 :1068-1070, 2002.

NEMEROFF CB. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res.*, 41: 189-206, 2006.

NESIC-TAYLOR O, CITTELLY D, YE Z, XU GY, UNABIA G, LEE JC, *et al.* Exogenous Bcl-xL fusion protein spares neurons after spinal cord injury, *J Neurosci Res.*, 79: 628-637, 2005.

NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, MONTEGGIA LM. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34: 13-25, 2002.

NING Y, RIGGINS RB, MULLA JE, CHUNG H, ZWART A, CLARKE R. IFN γ restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IFN regulatory factor 1, NF-kappaB, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis. *Mol Cancer Ther.*, 9:1274-1285, 2010.

NISHIDA A, HISAOKA K, ZENSHO H, UCHITOMI Y, MORINOBU S, YAMAWAKI S. Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *Int Immunopharmacol.*, 2: 1619-1626, 2002.

NUTT DJ. The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry*, 67: 3-8, 2006.

O'BRIEN SM, SCOTT LV, DINAN TG. Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Hum Psychopharmacol.*,19: 397-403, 2004.

OLIVEIRA RM, GUIMARAES FS, DEAKIN JF. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res.*, 41:333-341, 2008.

OLMOS G, DEGREGORIO-ROCASOLANO N, PAZ REGALADO M, GASULL T, ASSUMPCIO BORONAT M, TRULLAS R, *et al.* Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, 127: 1317-1326, 1999.

OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog. Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74: 609-619, 1993.

ONAL A, SOYKAN N. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav.*, 69:93-97, 2001.

ONAL A, DELEN Y, ULKER S, SOYKAN N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci.*, 73: 413-428, 2003.

ONAL A, DELEN Y, ULKER S, SOYKAN N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci*, 73:413-428, 2004.

OUGOLKOV AV, BONE ND, FERNANDEZ-ZAPICO ME, KAY NE, BILLADEAU DD. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappa B target gene and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 110: 735-742, 2007.

PALUCHA-PONIEWIERA A, PILC A. Involvement of mGlu5 and NMDA receptors in the antidepressant-like effect of acamprosate in the tail suspension test. *Prog in NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*, 39:102-106, 2012.

PAPAKOSTAS GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 16: 391-402, 2006.

PAPP M, MORYL E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol.*, 263: 1-7, 1994.

PAP M, COOPER GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem.*, 273: 19929-19932, 1998.

PARK SH, PARK-MIN KH, CHEN J, HU X, IVASHKIV LB. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat Immunol.*, 12:607-615, 2011.

PARNET P, AMINDARI S, WU C, BRUNKE-REESE D, GOUJON E, WEYHENMEYER JA *et al.* Expression of type I and type II interleukin-1 receptors in mouse brain. *Mol Brain Res.*, 27: 63-70, 1994.

PATEL HC, ROSS FM, HEENAN LE, DAVIES RE, ROTHWELL NJ, ALLAN SM. Neurodegenerative actions of interleukin-1 in the rat brain are mediated through increases in seizure activity. *J Neurosci Res.* 83:385-391, 2006.

PENG CHH, CHIOU SH, CHEN SJ, CHOU YC, KU HH, CHENG CK, *et al.* Neuroprotection by imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 18: 128-140, 2008.

PERRY VH, CUNNINGHAM C, HOLMES C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol.*, 7: 161-167, 2007.

PETERSON GL. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem.*, 83: 346-356. 1977.

PICCHINI AM, MANJI HK, GOULD TD. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1: 419-428, 2004.

PILC A, CHAKI S, NOWAK G, WITKIN JM. Mood disorders: regulation by metabotropic glutamate receptors. *Biochem Pharmacol.*, 75: 997-1006, 2008.

- PITTENGER C, DUMAN RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33: 88-109, 2008.
- POLESZAK E, WLAŹ P, KEDZIERSKA E, NIEOCZYM D, WYSKA E, SZYMURA-OLEKSIAK J, *et al.* Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. *Pharmacol Rep.*, 58:746-752, 2006.
- POLESZAK E, WLAŹ P, WRÓBEL A, DYBA Ł A M, SOWA M, FIDECKA S, *et al.* Activation of the NMDA/glutamate receptor complex antagonizes the NMDA antagonist-induced antidepressant-like effects in the forced swim test. *Pharmacol Rep.*, 59:595-600, 2007.
- POLLAK Y, OVADIA H, GOSHEN I, GUREVICH R, MONSA K, AVITSUR R, *et al.* Behavioral aspects of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Neuroimmunol.*,104: 31-36, 2000.
- PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 229: 327-336, 1977.
- POSSER T, DEAGUIAR CB, GARCEZ RC, ROSSI FM, OLIVEIRA CS, TRENTIN AG, *et al.* Exposure of C6 glioma cells to PB (II) increases the phosphorylation of p38 (MAPK) and JNK1/2 but not ERK1/2. *Arch Toxicol.*, 81: 407-414, 2007.
- PRINCE M, PATEL V, SAXENA S, MAJ M, MASELKO J, PHILLIPS M R, *et al.* No health without mental health. *Lancet*, 370: 859-877, 2007.
- PRUUS K, RUDISSAAR R, ALLIKMETS L, HARRO J. The effect of the NMDA receptor antagonist dizocilpine on behavioral manifestations of serotonin and adrenergic antidepressants in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*,32: 123-128, 2010.
- RAASCH W, SCHAFER U, CHUN J, DOMINIAK P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br J Pharmacol.*,133: 755-780, 2001.
- RADA P, MORENO SA, TUCCI S, GONZALEZ LE, HARRISON T, CHAU DT, *et al.* Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the Porsolt swim test. *Neuroscience*, 119: 557-565, 2003.

RAISON CL, BORISOV AS, MAJER M, DRAKE DF, PAGNONI G, WOOLWINE BJ, *et al.* Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha: relationship to monoamines and depression. *Biol Psychiatry*, 65: 296-303, 2009.

REGUNATHAN S, REIS DJ. Stimulation of imidazoline receptors inhibits proliferation of human coronary artery vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 30: 295-300, 1997.

REIS DJ, REGUNATHAN S. Agmatine: a novel neurotransmitter. *Adv Pharmacol.*, 42: 645-649, 1998.

REIS DJ, REGUNATHAN S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci.*, 21: 187-193, 2000.

RISCH SC, NEMEROFF CB. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry*, 53: 3-7, 1992.

REYNOLDS JL, IGNATOWSKI TA, SUD R, SPENGLE RN. An antidepressant mechanism of desipramine is to decrease tumor necrosis factor- α production culminating in increases in noradrenergic neurotransmission. *Neuroscience*, 133:519-531, 2005.

RODRIGUES ALS, SILVA GL, MATEUSSI AS, FERNANDES ES, MIGUEL OG, YUNES RA, *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci.*, 70: 1347-1358, 2002.

RODRIGUES JFN, FUJIYAMA CT, OSHIMA AP, RIBEIRO PAIOTTI M, FRANCO, NSS. MIKI IHARA SS, *et al.* Expression of apoptosis regulatory proteins p53, bcl-2 and bax in recurrent aphthous ulceration *JEADV*, 26: 1247-1251, 2012.

ROGOZ Z, SKUZA G, MAJ J, DANYSZ W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, 42: 1024-1030, 2002.

ROH MS, EOM TY, ZMIJEWSKA AA, DE SARNO P, ROTH KA, JOPE RS. Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. *Biol Psychiatry.*, 57:278-286, 2005.

ROSA AO, LIN J, CALIXTO JB, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in

the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res.*, 144: 87-93, 2003.

ROSA AO, KASTER MP, BINFARÉ RW, MORALES S, MARTÍN-APARICIO E, NAVARRO-RICO ML, *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32: 1549-1556, 2008.

ROUMESTAN C, MICHEL A, BICHON F, PORTET K, DETOC M, HENRIQUET C, *et al.* Anti-inflammatory properties of deisipramine and fluoxetine. *Respiratory Research*, 8:35,2007.

RUHÉ HG, ROOIJEN GV, SPIJKER J, PEETERS FPML, SCHENE AH. Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. *J Affect Disord.*, 137: 35-45, 2011.

SAARELAINEN T, HENDOLIN P, LUCAS G, KOPONEN E, SAIRANEN M, MACDONALD E, *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci.*, 23: 349-357, 2003.

SANACORA G, GUEORGUIEVA R, EPPERSON CN, WU YT, APPEL M, ROTHMAN DL, *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*, 61: 705-713, 2004.

SANCHEZ JF, SNIDERHAN LF, WILLIAMSON AL, FAN S, CHAKRABORTY-SETT S, MAGGIRWAR SB. Glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Mol Cell Biol.*, 23: 4649-4662, 2003.

SANTARELLI L, SAXE M, GROSS C, SURGET A, BATTAGLIA F, DULAWA S, *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301: 805-809, 2003.

SANTOS AR, GADOTTI VM, OLIVEIRA GL, TIBOLA D, PASZCZUK AF, NETO A, *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology*, 48: 1021-1034, 2005.

SAPOLSKY R, RIVIER C, YAMAMOTO G, PLOTSKY P, VALE WW. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, 238: 522-524, 1987.

SATRIANO J, SCHWARTZ D, ISHIZUKA S, LORTIE MJ, THOMSON SC, GABBAI F, *et al.* Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. *J Cell Physiol.*, 188: 313-320, 2001.

SCHIEPERS OJG, WICHERS MC, MAES M. Cytokines and major depression. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29: 201-217, 2005.

SCHILDKRAUT JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, 122:509-522, 1965.

SCHWABE RF, BRENNER DA. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α induced NF- κ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 283: G204-G211, 2002.

SERRETTI A, MANDELLI L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*, 71: 1259-1272, 2010.

SHAPIRA M, LICHT A, MILMAN A, PICK CG, SHOHAMI E, ELDAR-FINKELMAN H. Role of glycogen synthase kinase-3 β in early depressive behavior induced by mild traumatic brain injury. *Mol Cell Neurosci.*, 34: 571-577, 2007.

SHELINE YI, WANG PW., GADO MH, CSERNANSKY JG, VANNIER MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 3908-3913, 1996.

SILVA R, MESQUITA AR, BESSA J, SOUSA JC, SOTIROPOULOS I, LEÃO P, *et al.* Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3 β . *Neuroscience*, 152: 656-669, 2008.

SIMEN BB, DUMAN CH, SIMEN AA, DUMAN RS. TNF α signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol Psychiatry*, 59: 775-785, 2006.

SIMON NM, MCNAMARA K, CHOW CW, MASER RS, PAPAKOSTAS GI, POLLACK MH, *et al.* A detailed examination of cytokine abnormalities in major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.*, 18: 230-233, 2008.

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

SKOLNICK P, POPIK P, TRULLAS R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci.*, 30: 563-569, 2009.

SLEATH B, WURST K, LOWERY T. Drug information sources and antidepressant adherence. *Community Ment Health J.*, 39:359-368, 2003.

SMITH JCE, WHITTON PS. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Lett.*, 291: 5-8, 2000.

SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.*, 9: 59-71, 2005.

STEINERT JR, CHERNOVA T, FORSYTHE ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*, 16: 435-452, 2010.

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

SU RB, WEI XL, ZHENG JQ, LIU Y, LU XQ, LI J. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacol Biochem Behav.*, 77: 345-349, 2004.

SU HC, MA CT, YU BC, CHIEN YC, TSAI CC, HUANG WC, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. *Int Immunopharmacol.*, 14:150-156, 2012.

SUNG YH, SHIN MS, CHO S, BAIK HH, JIN BK, CHANG HK, *et al.* Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neurosci Lett.*, 470: 86-90, 2010.

SUTCIGIL L, OKTENLI C, MUSABAK U, BOZKURT A, CANSEVER A, UZUN O, *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. *Clin Dev Immunol., In Press*, doi: 10.1155/2007/76396, 2007.

SUZUKI E, YAGI G, NAKAKI T, KANBA S, ASAI M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J Affect Disord.*, 63: 221-224, 2001.

SWANSON CJ, BURES M, JOHNSON MP, LINDEN AM, MONN JA, SCHOEPP DD. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 131-144, 2005.

SZASZ BK, MIKE A, KAROLY R, GEREVICH Z, ILLES P, VIZI ES *et al.* Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, 62: 1303-1309, 2007.

SZEWCZYK B, POLESZAK E, SOWA- KUĆMA M, WRÓBEL A, SŁOTWIŃSKI S, LISTOS J, *et al.* The involvement of NMDA and AMPA receptors in the mechanism of antidepressant-like action of zinc in the forced swim test. *Amino Acids*, 39: 205-217, 2010.

TAKADA Y, FANG X, JAMALUDDIN MS, BOYD DD, AGGARWAL BB. Genetic depletion of glycogen synthase kinase-3 β abrogates activation of Ikappa-B alpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.*, 279: 39541-39554, 2004.

TAKSANDE BG, KOTAGALE NR, TRIPATHI SJ, UGALE RR, CHOPDE CT. Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine. *Neuropharmacology*, 57: 415-424, 2009.

TAYLOR C, FRICKER AD, DEVI LA, GOMES I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal*, 17: 549-57, 2005.

THOMAS AJ, DAVIS S, MORRIS C, JACKSON E, HARRISON R, O'BRIEN JT. Increase in interleukin-1 β in late-life depression. *Am J Psychiatry*, 162:175-177, 2005.

THOTALA DK, HAL LAHAN DE, YAZLOV ITSKAYA EM. "Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β attenuates neurocognitive dysfunction resulting from cranial irradiation," *Cancer Res.*, 68: 5859-5868, 2008.

TIERNEY JG. Treatment-resistant depression: managed care considerations. *J Manag Care Pharm* 13: S2-7, 2007.

TRULLAS R, SKOLNICK P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol.*, 185:1-10, 1990.

TSAI SJ, LIOU YJ, HONG CJ, YU YW, CHEN TJ. Glycogen synthase kinase-3beta gene is associated with antidepressant treatment response in Chinese major depressive disorder. *Pharmacogenomics J.*, 8:384-390, 2008.

TSANKOVA N, RENTHAL W, KUMAR A, NESTLER EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.*, 8: 355-367, 2007.

TUGLU C, KARA SH, CALIYURT O, VARDAR E, ABAY E. Increased serum tumor necrosis factor-alpha levels and treatment response in major depressive disorder. *Psychopharmacology*, 170: 429-433, 2003.

TURNER EH, LOFTIS JM, BLACKWELL AD. Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther.*, 109: 325-338, 2006.

VASQUEZ C, SÁNCHEZ M, HERRERA J, QUINTERO G. Reduction of inflammatory pain in female rats after NR2B NMDA cortical antagonism. *Psicothema*, 24: 296-301, 2012.

VIVIANI B, BARTESAGHI S, CORSINI E, GALLI CL, MARINOVICH M. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett.*, 149:85-89, 2004.

VOGELZANGS N, DUIVIS HE, BEEKMAN ATF, KLUFT C, NEUTEBOOM J, HOOGENDIJK W, *et al.* Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. *Transl Psychiatry.*, 21:20-79, 2012.

VREEBURG SA, HOOGENDIJK WJ, VAN PELT J, DERIJK RH, VERHAGEN JC, VAN DR *et al.* Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch Gen Psychiatry*, 66: 617-626, 2009.

VRUWINK M, SCHMIDT HH, WEINBERG RJ, BURETTE A. Substance P and nitric oxide signaling in cerebral cortex: anatomical evidence for reciprocal signaling between two classes of interneurons. *J Comp Neurol.*, 441: 288-301, 2001.

WANG W-P, IYO AH, MIGUEL-HIDALGO J, REGUNATHAN S, ZHU M-Y. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.*, 1084: 210-216, 2006.

WANG D, AN SC, ZHANG X. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor. *Neurosci Lett.*, 433: 59-64, 2008.

WANG CC, CHIO CC, CHANG CH, KUO JR, CHANG CP. Beneficial effect of agmatine on brain apoptosis, astrogliosis, and edema after rat transient cerebral ischemia. *BMC Pharmacol., In Press*, doi:10.1186/1471-2210-10-11, 2010.

WANG H, BROWN J, MARTIN M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine*, 53:130-140, 2011.

WEGENER G, VOLKE V, ROSENBERG R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol.*, 130: 575-580, 2000.

WEGENER G, VOLKE V, HARVEY BH, ROSENBERG R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res.*, 959: 128-134, 2003.

WHITTLE BJ, VARGA C, POSA A, MOLNAR A, COLLIN M, THIEMERMANN C. Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *Br J Pharmacol.*, 147: 575-582, 2006.

WICHERS M, MAES M. The psychoneuroimmuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 5:375-388, 2002.

WICHERS MC, MAES M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the pathophysiology of interferon-alpha-induced depression. *J Psychiatry Neurosci.*, 29: 11-17, 2004.

WICHERS MC, KOEK GH, ROBAEYS G, VERKERK R, SCHARPE S, MAES M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry*, 10: 538-544, 2005.

WONG M, LICINIO J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.*, 2: 343-351, 2001.

WONG DT, PERRY KW, BYMASTER FP. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov.*, 4: 764-774, 2005.

- XIA Z, DEPIERRE JW, NÄSSBERGER L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology*, 34: 27-37, 1996.
- XIE QW, CHO HJ, CALAYCAY J, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD, *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256: 225-228, 1992.
- XU H, STEVEN RICHARDSON J, LI XM. Dose-related effects of chronic antidepressants on neuroprotective proteins BDNF, Bcl-2 and Cu/Zn-SOD in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, 28:53-62, 2003.
- YAMADA J, SUGIMOTO Y, YAMADA S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol.*, 504: 207-211, 2004.
- YANG XC, REIS DJ. Agmatine selectively blocks the NMDA subclass of glutamate receptor channels in cultured mouse hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.*, 288: 544-549, 1999.
- YILDIZ F, ERDEN BF, ULAK G, UTKAN T, GACAR N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, 149: 41-44, 2000.
- YIRMIYA R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res.*, 711: 163-174, 1996.
- YIRMIYA R, WEIDENFELD J, POLLAK Y, MORAG M, MORAG A, AVITSUR R, *et al.* Cytokines, depression due to a general medical condition and antidepressant drugs. *Adv Exp Med Biol.*, 283-316, 1999.
- YODIM MB, EDMONDSON D, TIPTON KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.*, 7: 295-309, 2006.
- YU YW, CHEN T, HONG C, CHEN H, TSAI S. Association study of the interleukin-1 beta (C-511T) genetic polymorphism with major depressive disorder, associated symptomatology, and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology*, 28:1182-1185, 2003.
- YUN FL, ZHENG HG, JIANG BC, HENG LW, ZHI PL, JIN L. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol.*, 469: 81-88, 2003.

YUSKAITIS CJ, JOPE RS. Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity. *Cell Signal* 21: 264-273, 2009.

ZARATE CA, JR., SINGH JB, CARLSON PJ, BRUTSCHE NE, AMELI R, LUCKENBAUGH DA, *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry.*, 63:856-864, 2006.

ZARATE C Jr, MACHADO-VIEIRA R, HENTER I, IBRAHIM L, DIAZGRANADOS N, SALVADORE G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv Rev Psychiatry*, 18: 293-303, 2010.

ZARIFKAR A, CHOOPANI S, GHASEMI R, NAGHDI N, MAGHSOUDI AH, MAGHSOUDI N. *et al.* Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. *Eur J Pharmacol.*, 634: 84-88, 2010.

ZEIDAN MP, ZOMKOWSKI AD, ROSA AO, RODRIGUES ALS, GABILAN NH. Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol.*, 565: 125-131, 2007.

ZHOU L, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase : structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223–230, 2009.

ZOMKOWSKI ADE, HAMMES L, LIN J, CALIXTO JB, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport*, 13: 387-391, 2002.

ZOMKOWSKI ADE, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res.*, 1023: 253-263, 2004.

ZOMKOWSKI ADE, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett.*, 381: 279-283, 2005.