



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Marina Souza Zarske de Mello

INVESTIGAÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS AO EFEITO
ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA POR MÉTODOS DE BIOINFORMÁTICA

Florianópolis
2024

Marina Souza Zarske de Mello

INVESTIGAÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS AO EFEITO
ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA POR MÉTODOS DE BIOINFORMÁTICA

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Coorientadora: Me. Glorister Alves Altê

Florianópolis

2024

Mello, Marina Souza Zarske de
INVESTIGAÇÃO DOS ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS AO
EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA AGMATINA POR MÉTODOS DE
BIOINFORMÁTICA / Marina Souza Zarske de Mello ;
orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues, coorientadora,
Glorister Alves Altê, 2024.

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. agmatina. 3. depressão. 4. NLRP3. 5.
bioinformática. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II. Altê,
Glorister Alves. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um distúrbio psiquiátrico muito prevalente e caracterizado por sintomas como anedonia, insônia, fadiga e humor deprimido. A sua fisiopatologia ainda não está completamente elucidada, mas há evidências de que o processo inflamatório pode desempenhar um papel importante no TDM, indicado por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com depressão. Um modelo experimental amplamente utilizado para estudar essa relação é a administração de lipopolissacarídeo (LPS), que induz resposta inflamatória e culmina na ativação do inflamassoma NLRP3 e produção das citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas (IL)-1 β e IL-18. A agmatina, 2-(4-aminobutil)guanidina, tem demonstrado efeitos antidepressivos e neuroprotetores em modelos animais. Além disso, estudos sugerem um impacto da agmatina na resposta inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, posicionando-a como um potencial agente terapêutico para o TDM. Neste trabalho foram utilizadas ferramentas de bioinformática para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos no efeito antidepressivo da agmatina. Foram usadas bases de dados como *Mouse Genome Informatics*, PDB e PubChem para pesquisa de genes, proteínas e moléculas envolvidas na fisiopatologia do TDM. Também, o programa SwissTargetPrediction para obtenção de possíveis alvos da agmatina, e o Venny v.2.1 para predizer os alvos moleculares compartilhados entre TDM e a agmatina. A análise de redes foi feita por meio do GeneMANIA, STRING e Cytoscape. O atracamento molecular foi realizado no DockThor e o resultado visualizado tridimensionalmente pelo Chimera USFC v.1.12. Como resultado foram obtidas duas redes de alvos moleculares da agmatina em camundongos envolvendo o TDM, que após filtradas indicaram a interleucina-6, o receptor de serotonina 2C, o transportador de serotonina, o receptor de dopamina D2 e a proteína cinase B como alvos promissores. Foi realizado o atracamento molecular da agmatina com estes alvos, com os receptores P2X7 e TLR4 e com o domínio NACHT da proteína NLRP3. Com a proteína codificada pelo gene DRD2, o receptor de dopamina D2, a agmatina demonstrou resultado promissor, sugerindo o envolvimento deste alvo no seu efeito antidepressivo.

Palavras chave: agmatina; depressão; DRD2; NLRP3; bioinformática.

ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent psychiatric condition characterized by symptoms such as anhedonia, insomnia, fatigue, and depressed mood. Its pathophysiology remains not fully elucidated, but evidence suggests that inflammation may play a significant role, as indicated by elevated levels of pro-inflammatory cytokines in individuals with depression. An experimental model widely used to study this relationship is the administration of lipopolysaccharide (LPS), which induces an inflammatory response, leading to the activation of the NLRP3 inflammasome and the production of pro-inflammatory cytokines such as interleukins (IL)-1 β and IL-18. Agmatine, 2-(4-aminobutyl)guanidine, has shown antidepressant and neuroprotective effects in animal models. Moreover, studies suggest that agmatine influences the inflammatory response by reducing pro-inflammatory cytokine production, positioning it as a potential therapeutic agent for MDD. In this study, bioinformatics tools were used to investigate the molecular mechanisms underlying the antidepressant effects of agmatine. Databases such as Mouse Genome Informatics, PDB, and PubChem were used to identify genes, proteins, and molecules involved in MDD pathophysiology. Additionally, the SwissTargetPrediction tool was used to identify potential targets for agmatine, and Venny v.2.1 was used to predict molecular targets shared between MDD and agmatine. Network analyses were performed using GeneMANIA, STRING, and Cytoscape. Molecular docking was performed using DockThor, and the results were visualized in 3D using UCSF Chimera v.1.12. The study identified two molecular target networks of agmatine in mice related to MDD. After filtering, promising targets included interleukin-6, serotonin receptor 2C, serotonin transporter, dopamine receptor D2, and protein kinase B. Molecular docking was performed for agmatine with these targets, as well as with P2X7 and TLR4 receptors and the NACHT domain of the NLRP3 protein. Agmatine showed a promising result with the protein encoded by the DRD2 gene. This suggests that the DRD2 gene may be involved in the antidepressant action of agmatine.

Keywords: agmatine; depression; DRD2 NLRP3; bioinformatics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HTT - Transportador de serotonina

5HT2A/2C - Receptor de serotonina

AGM - Agmatina

AKT1 - Proteína Cinase B

ALA - Alanina

ASP - Aspartato

ATP - Adenosina Trifosfato

CAR13 - Anidrase Carbônica 13

CAR7 - Anidrase Carbônica 7

CHRM2 - Receptor Muscarínico de Acetilcolina M₂

CHRM5 - Receptor Colinérgico Muscarínico 5

CRCTC3 - Coativador De Transcrição 3 Regulado por CREB

CYP2D10 - Polipeptídeos 10 da Subfamília D da Família 2 Do Citocromo P450

CYP2D11 - Polipeptídeos 11 da Subfamília D da Família 2 Do Citocromo P450

CYP2D9 - Polipeptídeos 9 da Subfamília D da Família 2 Do Citocromo P450

CYS - Cisteína

DAMP - Danos Moleculares Associados ao Patógeno

DISC1 - Proteína Interrompida na Esquizofrenia 1

DOXL2 - Proteína Tipo Diamina Oxidase 2

DRD2 - Receptor de Dopamina D2

FKBP5 - Proteína de Ligação FK-506

GABA- Ácido γ -Aminobutírico

GABRD - Subunidade Delta do Receptor do Ácido Gama-Aminobutírico Tipo A

GLU - Glutamato

HAP1 - Proteína Associada À Huntingtina 1

HMDC - Human Mouse Disease Connection

HPA - Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal

HTR2C - Receptor 2C de 5-hidroxitriptamina

IL-18 - Interleucina 18

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

ILE -Isoleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

MGI - *Mouse Genome Informatics*

NACHT - Domínio Presente Na Proteína NLRP3

NFkB - Fator Nuclear Kappa B

NLRP3 - Receptor da Família tipo NOD, Contendo Domínio de Pirina

P2X7 - Receptor de Purinas do tipo P2X

PAMP - Padrões Moleculares Associados a Patógeno

PHE - Fenilalanina

RD2 - Receptor de Dopamina D2

SLC6A4 - Transportador de Serotonina

SLC6A3 - Transportador de Dopamina

SER - Serina

SMILES - Simplified Molecular Input Line Entry System

TDAH - Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade

TDM - Transtorno Depressivo Maior

THR - Treonina

TLR4 - Receptor do Tipo Toll 4

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

TYR - Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização mediada por receptores TLR4 e P2X7.....	13
Figura 2. Fluxograma de trabalho.....	23
Figura 3. Gráfico de proporcionalidade dos tipos de alvos moleculares da agmatina em camundongos preditos na base de dados Swisstargetprediction.....	24
Figura 4. Genes de camundongos correspondentes a genes humanos relacionados a TDM obtidos da base de dados MGI.....	25
Figura 5. Diagrama de Venn resultante do cruzamento de alvos moleculares da AGM em camundongos obtidos no Swisstargetprediction e genes de camundongos correspondentes aos genes de humanos relacionados ao TDM obtidos no Mouse Genome Informatics.....	26
Figura 6. Rede completa de interação gênica da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM.....	27
Figura 7. Rede filtrada de interação gene-gene da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM.....	28
Figura 8. Rede completa de interação proteína-proteína da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM.....	29
Figura 9. Rede filtrada de interação proteína-proteína da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM.....	30
Figura 10. Atracamento molecular da agmatina com receptor muscarínico M ₂	32
Figura 11. Atracamento molecular da agmatina com complexo il-6/il-6R/gp130.....	32
Figura 12. Atracamento molecular da agmatina com HTR2C.....	33
Figura 13. Atracamento molecular da agmatina com o transportador de serotonina.....	33
Figura 14. Atracamento molecular da agmatina com DRD2.....	35
Figura 15. Análise de interação da agmatina com o receptor DRD2 pelo Ligplot....	35
Figura 16. Atracamento molecular da agmatina com AKT1.....	36
Figura 17. Atracamento molecular da agmatina com o TLR4.....	37
Figura 18. Atracamento molecular da agmatina com P2X7.....	38
Figura 19. Atracamento molecular da agmatina no domínio NACHT da proteína NLRP3.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Predição da afinidade de ligação por atracamento molecular em diferentes sítios.....	36
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Predição dos alvos biológicos da Agmatina.....	18
4.2 Identificação dos genes relacionados à depressão em <i>Mus musculus</i>	18
4.3 Análise da união dos alvos em <i>Mus musculus</i>	19
4.4 Construção e análise das redes biológicas.....	20
4.5 Atracamento molecular e análise das interações.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Bancos de dados e alvos compartilhados.....	24
5.2 Análise de redes.....	26
5.3 Atracamento molecular.....	31
6. CONCLUSÃO.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

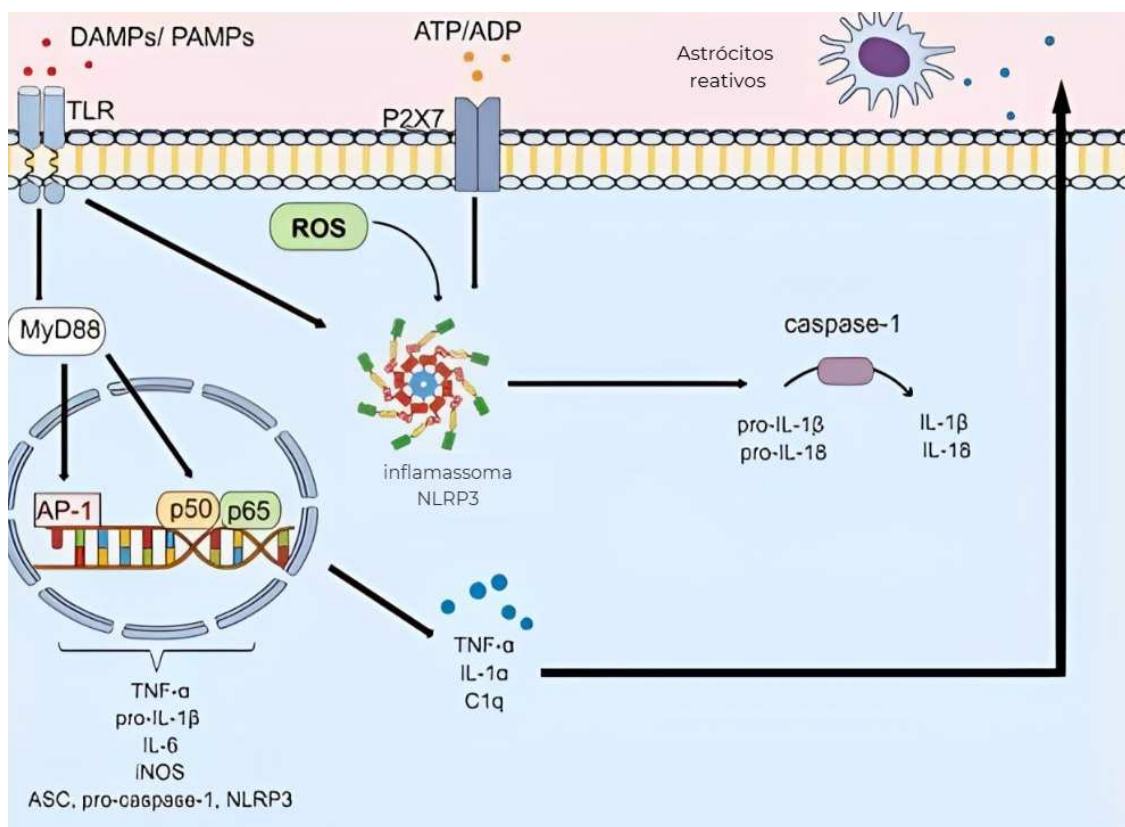
O transtorno depressivo maior (TDM), ou depressão, é um transtorno psiquiátrico grave e comum em todo o mundo, com uma prevalência de aproximadamente 15,5% na população brasileira, o que coloca o Brasil como o país com maior prevalência da América Latina, e o segundo com maior prevalência das Américas (Ministério da Saúde, 2022; 2024). Esse transtorno é caracterizado por sintomas como perda de interesse e energia, tristeza intensa, aumento da fadiga, insônia, entre outros, além de anedonia ou humor deprimido por ao menos duas semanas (Organização Mundial da Saúde, 2023; National Institute of Mental Health 2024). De acordo com a Organização Mundial Da Saúde (OMS), pessoas que passaram por eventos traumáticos ou estressores como desemprego, luto, desastres climáticos ou guerras, são mais suscetíveis ao desenvolvimento deste transtorno ou agravo no quadro clínico, quando já diagnosticado, prejudicando a qualidade de vida do indivíduo (Marx *et al.*, 2023).

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) resulta da interação de múltiplos fatores e mecanismos cuja base fisiopatológica ainda não foi completamente elucidada. A hipótese mais difundida sugere que em casos de transtornos depressivos as concentrações de monoaminas, como serotonina, noradrenalina e dopamina, encontram-se reduzidas na fenda sináptica (Otte *et al.*, 2016; Marx *et al.*, 2023), denominada como “Hipótese da disfunção da neurotransmissão monoaminérgica”. Apesar dessa compreensão, os fármacos monoaminérgicos de primeira escolha apresentam duas limitações importantes: a demora no início da ação terapêutica e uma alta taxa de refratariedade, com cerca de $\frac{2}{3}$ dos pacientes não respondendo ao primeiro tratamento (Otte *et al.*, 2016). Esses fatores representam um grande desafio, especialmente em pacientes com ideação suicida que demandam manejo ágil. Fica implícita a necessidade de expandir as possibilidades de intervenção terapêutica que apresentem ação mais rápida e maior eficácia.

Estudos demonstram que parte dos indivíduos diagnosticados com depressão apresentam níveis circulantes mais elevados de citocinas pró-inflamatórias quando comparados a indivíduos controles, que não apresentam depressão, evidenciando o papel do processo inflamatório nesse transtorno (Kaufmann *et al.*, 2017). Um modelo animal de depressão resultante de processo inflamatório utilizado em pesquisa básica é a administração de lipopolissacarídeo (LPS), um importante componente da

parede celular de bactérias gram negativas que tem a capacidade de estimular resposta inflamatória por induzir uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Chai *et al.*, 2016). O LPS atua em receptores do tipo toll 4 (TLR4) presentes principalmente em células do sistema imune e sensíveis a padrões moleculares associados a dano (DAMP) e padrões moleculares associados a patógeno (PAMP). Essa interação inicia uma resposta imune inata (Stierschneider *et al.*, 2023) e ativa a via de transcrição de proteínas pró inflamatórias via (NfKB) culminado na montagem do inflamassoma NLRP3 e elevação da produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1beta e IL-18 (Kouba *et al.*, 2024). O receptor purinérgico do tipo P2X7 (P2X7) é também capaz de ativar a via de sinalização mediada pelo Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), levando a montagem do inflamassoma NLRP3 e promovendo a maturação e liberação de fatores inflamatórios. Ele está distribuído nas membranas celulares e é um subtipo P2X intimamente associado à depressão (Chai *et al.*, 2022). O acúmulo de ATP, liberado em situações de estresse, presente no meio extracelular sinaliza para o receptor P2X7 iniciar a cascata que causará a montagem do inflamassoma NLRP3, a maturação de pró-IL-1β e a pró-IL-18 inativas em sua forma biologicamente ativa e liberação das mesmas para o meio extracelular (Pelegriin *et al.*, 2020). As vias de sinalização ativadas por TLR4 e P2X7 estão ilustradas na Figura 1.

Figura 1. Via de sinalização mediada por receptores TLR4 e P2X7



Fonte: Adaptado de Kouba *et al.*, 2024

A agmatina (AGM) é produto da descarboxilação da L-arginina, sendo parte da via de biossíntese de poliaminas, via essa associada à síntese de neurotransmissores importantes, como o glutamato e GABA (Petroff, 2002). A agmatina apresentou efeito do tipo antidepressivo em modelos animais de depressão, em testes comportamentais como tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda e no teste de nado forçado (Zomkowski *et al.*, 2002; 2005; Li *et al.*, 2003; Neis *et al.*, 2015), também demonstrou efeito neuroprotetor envolvendo mecanismos de proteção contra a excitotoxicidade pelo bloqueio de receptores NMDA e inibição do aumento descontrolado das concentrações intracelulares de cálcio (Piletz *et al.*, 2013). Outros estudos indicam que a agmatina pode modular a resposta inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (Milosevic *et al.*, 2022).

Apesar de os mecanismos relacionados ao efeito tipo antidepressivo da agmatina não estarem completamente esclarecidos, existem ferramentas, além de testes bioquímicos, que podem auxiliar na elucidação. A bioinformática destaca-se

como uma área essencial para o progresso das pesquisas em biologia molecular desde os anos 1960 (Hagen, 2000), e, em um contexto contemporâneo, no qual a inteligência artificial desempenha um papel crescente, tendo presença cada vez maior no cotidiano e na indústria, onde ajuda a reduzir os custos e tempo exorbitantes envolvidos na descoberta e produção de novos fármacos (Chan. *et al.*, 2019) é natural que essa tecnologia seja aplicada em estudos acadêmicos relacionados a fármacos e doenças. As ferramentas de bioinformática têm contribuído para a descoberta de possíveis biomarcadores e mecanismo de ação de moléculas promissoras para tratamento de doenças (He *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2021). Com auxílio de bases de dados e alvos compartilhados, análise de redes e atracamento molecular é possível esclarecer um pouco mais sobre o efeito do tipo antidepressivo apresentado pela agmatina em estudos com animais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- a) Investigar alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito antidepressivo da agmatina em vias de sinalização associadas com depressão em modelos animais, por métodos de bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar alvos moleculares envolvidos no efeito antidepressivo da agmatina por métodos de bioinformática.
- b) Efetuar estudos preditivos de ancoragem molecular computacional indicativos do envolvimento da agmatina na via de sinalização do inflamassoma NLRP3 na modulação da depressão
- c) Verificar se os tipos de interações preditas *in silico* entre a agmatina e as proteínas-alvo através de servidores e de programas que identificam interações entre ligante-proteína.

3. JUSTIFICATIVA

Dados da OMS (2024), estimam que aproximadamente 280 milhões de pessoas no planeta apresentam diagnóstico de depressão. Além da alta prevalência, e diversos sintomas que afetam o cotidiano dos pacientes, outro desafio do TDM está relacionado com a proposta de intervenção terapêutica e com a adesão ao tratamento medicamentoso. Por volta de 50 a 60% dos pacientes não respondem adequadamente ao primeiro tratamento (Otte *et al.*, 2016), e os tratamentos de primeira escolha demoram de duas a três semanas para apresentar efeito, tempo muito longo ao levar em conta pacientes com ideação suicida.

Considerando os altos índices de pessoas com depressão, o impacto que este transtorno causa no cotidiano dos indivíduos, a parcela de pacientes refratários aos tratamentos existentes e a demora para início de ação terapêutica, é de suma importância estudar novas opções medicamentosas na busca de fármacos mais eficazes e ágeis como resposta para a sociedade.

Neste sentido, a bioinformática se destaca como uma ferramenta poderosa na identificação de moléculas com potencial terapêutico, bem como na descoberta de biomarcadores e no esclarecimento de mecanismos de ação para o tratamento de diversas doenças (He *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2022; Qi *et al.*, 2021). Além disso, contribui significativamente para reduzir os elevados custos e longos prazos geralmente associados ao desenvolvimento de novos medicamentos (Chan *et al.*, 2019). Adicionalmente, a bioinformática é útil para a priorização e direcionamento de estudos futuros, respeitando os princípios dos 3Rs (refinar, reduzir e substituir) do bem-estar animal, promovendo abordagens mais éticas e eficazes no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos.

Diversas substâncias apresentam efeitos tipo-antidepressivos por meio de múltiplos mecanismos, incluindo a modulação do processo inflamatório em modelos de depressão. Entre essas substâncias, encontra-se a agmatina, uma amina catiônica que tem sido objeto de pesquisa pelo grupo de pesquisa do LANED. O primeiro registro do efeito antidepressivo da agmatina foi publicado pelo grupo em 2002 (Zomkowski *et al.*, 2002), e desde então seus mecanismos de ação antidepressiva e propriedade neuroprotetora têm sido amplamente investigados. Esses efeitos neuroprotetores envolvem mecanismos como o bloqueio de receptores NMDA e a inibição do aumento descontrolado das concentrações intracelulares de cálcio (Piletz *et al.*, 2013), prevenindo a excitotoxicidade. Além disso, pesquisas

indicam que a agmatina pode modular a resposta inflamatória, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) (Milosevic *et al.*, 2022). Esses efeitos reforçam o perfil polifarmacológico da molécula, que quimicamente apresenta estrutura semelhante a de outros neurotransmissores e neuromoduladores. Essa similaridade permite que ela interaja com diversas enzimas e receptores, o que sugere um potencial significativo para influenciar múltiplos processos neurais (Neurolaunch, 2024).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Predição dos alvos biológicos da Agmatina

Os alvos da agmatina em *Mus musculus* foram obtidos através da busca da estrutura da molécula no PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) seguida da inserção do SMILES da mesma (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) no programa *SwissTargetPrediction* (Daina *et al.*, 2019), realizada no dia 16 de agosto de 2024.

O PubChem é um extenso e altamente integrado banco de dados químico público mantido pelo *National Institute of Health* (NIH), que reúne mais de 1000 fontes de dados, 119 milhões de compostos, 322 milhões de substâncias e 295 milhões de bioatividades (Kim *et al.*, 2024). Nele podem ser obtidos SMILES de moléculas (traduzindo o termo em inglês Sistema Simplificado de Entrada de Linha para Representação Molecular), um sistema que utiliza caracteres específicos para representar átomos, ligações, ramificações e ciclos de forma linear, em vez de tridimensional. Ele traduz a estrutura 3D de uma substância química em uma sequência de símbolos facilmente interpretável por programas computacionais. Isso permite que as estruturas sejam armazenadas, pesquisadas e filtradas de maneira eficiente em bancos de dados, otimizando análises químicas e modelagens moleculares (U.S EPA, 2016).

O *SwissTargetPrediction* (<http://swisstargetprediction.ch/>) é uma plataforma digital (servidor) de acesso livre que foi projetada para identificar os alvos proteicos mais prováveis de pequenas moléculas. Suas previsões são baseadas no princípio da similaridade estrutural, utilizando uma abordagem de triagem reversa para correlacionar compostos a potenciais proteínas-alvo (Daina *et al.*, 2019).

4.2 Identificação dos genes relacionados à depressão em *Mus musculus*

No dia 16 de agosto de 2024, os genes de camundongo, correspondentes aos de humanos, relacionados ao TDM, foram obtidos do *Human Mouse Disease Connection* (HMDC) (<https://www.informatics.jax.org/humanDisease.shtml>) da base de dados *Mouse Genome Informatics* (MGI) (<https://www.informatics.jax.org/>) pela busca da palavra chave “*major depressive disorder*”, termo em inglês correspondente ao TDM.

O *Mouse Genome Informatics* (MGI) é composto por um conjunto de recursos de informações cuidadosamente curadas por especialistas, concebido para apoiar tanto investigações experimentais quanto computacionais relacionadas a aspectos genéticos e genômicos biológicos e das doenças humanas, utilizando o camundongo como modelo experimental. O MGI se destaca como a principal plataforma comunitária integrada, oferecendo informações detalhadas sobre características do genoma de camundongos, variações genéticas, expressão gênica, funções de genes, fenótipos e modelos de doenças humanas, com dados provenientes de publicações revisadas por pares, submissões de pesquisadores e importantes recursos de bioinformática (Baldarelli, 2024).

O *Human-Mouse: Disease Connection* (HMDC) é uma ferramenta projetada para facilitar a identificação de modelos experimentais com camundongos, relacionados a doenças humanas, bem como para auxiliar na descoberta de genes candidatos e na análise da similaridade fenotípica entre modelos de camundongos e pacientes humanos. Integrando dados sobre mutações, fenótipos e modelos de doenças do banco de dados *Mouse Genome Informatics* (MGI) com informações de relações gene-doença humanas fornecidas pela *Alliance of Genome Resources* — que inclui dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Rat Genome Database* (RGD), *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e *Human Phenotype Ontology* (HPO) —, o HMDC apresenta os resultados das buscas em arquivos no formato de gráfico e de lista, permitindo uma avaliação visual e interativa das relações fenotípicas e genéticas entre espécies (Mouse Genome Informatics, 2024).

4.3 Análise da união dos alvos em *Mus musculus*

Ambos os arquivos contendo dados referentes à mutações, fenótipos, modelos de doenças, relações gene-doença listados no item 4.2 obtidos nos programas *SwissTargetPrediction* e *Mouse Genome Informatics*, foram inseridas no programa Venny v.2.1.0 para análise dos alvos compartilhados através do diagrama de Venn (Oliveros, 2007-2015).

O Venny 2.1 (<https://csbg.cnb.csic.es/BioinfoGP/venny.html>) é uma ferramenta digital interativa que permite comparar listas de dados utilizando diagramas de Venn (Oliveros, 2007-2015). Esses diagramas destacam as interseções entre os

conjuntos, revelando elementos compartilhados e exclusivos de cada grupo, facilitando a análise visual e interpretativa dos dados.

4.4 Construção e análise das redes biológicas

Foram construídas redes de interação da união dos genes relacionados a agmatina em camundongos e genes relacionados ao TDM em camundongos no programa GeneMANIA (Montejo *et al.*, 2010; Montejo *et al.*, 2014) e no STRING (Szklarczyk *et al.*, 2019). As redes foram importadas, analisadas e refinadas no Cytoscape v. 3.9.1 (Shannon *et al.*, 2003).

O GeneMANIA é uma plataforma digital flexível e fácil de usar, criada para ajudar na geração de hipóteses sobre funções genéticas e na análise e priorização de genes para experimentos funcionais. A ferramenta amplia suas buscas incluindo genes funcionalmente semelhantes, identificados por meio de dados genômicos e proteômicos disponíveis. O GeneMANIA fornece informações sobre a importância preditiva de cada conjunto de dados selecionado, com base em pesos que indicam o valor de confiabilidade de cada fonte (Warde-Farley *et al.*, 2010).

O STRING (<https://string-db.org/>) é um banco de dados de interações proteína-proteína, tanto conhecidas quanto previstas, abrangendo associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). As interações são derivadas de fontes como previsões computacionais, coexpressão gênica, dados genômicos, literatura científica e bancos de dados primários. Todas as interações passam por uma avaliação que gera pontuações de confiabilidade, classificadas de 0 a 1, onde 1 representa alta confiança. Essas pontuações indicam a probabilidade de uma interação ser verdadeira, com base nas evidências disponíveis.

O Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) é um software de código aberto projetado para integrar redes de interação biomolecular com dados de expressão gênica e outros estados moleculares em uma estrutura unificada. Ele é especialmente eficiente quando aplicado em conjunto com grandes bancos de dados de interações proteína-proteína, proteína-DNA e interações genéticas. Embora seja adaptável a diversos sistemas formados por componentes e interações moleculares, sua maior utilidade está na análise de redes biológicas complexas (Shannon *et al.*, 2003).

4.5 Atracamento molecular e análise das interações

Foram realizados os atracamentos moleculares da agmatina com a proteína presente nas duas bases de dados (CHRM2); com os alvos biológicos em comum entre as duas redes filtradas; com os receptores P2X7 e TLR4 (envolvidos na montagem do inflamassoma) e com o domínio NACHT da proteína NLRP3.

As estruturas dos alvos biológicos foram obtidas da base de dados PDB (do inglês, protein data bank), foram removidas as moléculas de água e adicionados os átomos de hidrogênio no programa Chimera v.1.14.

O atracamento molecular foi realizado pelo programa DockThor (Guedes *et al.*, 2021) e as poses tridimensionais dos ligantes foram visualizadas no Chimera v.1.14 (Pettersen *et al.*, 2021). Os resultados de mais promissores tiveram interações realizadas no programa LigPlot+ v.2.2.5 (Wallace *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 2011).

O *Protein Data Bank* (PDB) é uma base de dados de acesso livre global que fornece dados de estruturas 3D de grandes moléculas biológicas, como proteínas, DNA e RNA, essenciais para pesquisas em biologia, saúde, energia e biotecnologia, sendo o primeiro recurso digital de dados de acesso aberto em biologia e medicina, acessado por meio de um portal de informações na internet onde estão disponíveis alguns formatos de arquivos estruturais (Berman *et al.*, 2007).

O programa DockThor é um software desenvolvido por pesquisadores do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) no Brasil, especializado na realização de experimentos de atracamento molecular e triagem virtual. Ele utiliza um algoritmo genético para busca e seleção das poses dos ligantes, sendo ideal para estudar as interações entre proteínas e pequenas moléculas ou peptídeos. A plataforma DockThor-VS (<https://dockthor.lncc.br/v2/>) é um servidor de atracamento proteína-ligante gratuito, projetado para apoiar projetos de descoberta de medicamentos. Ela realiza triagens virtuais precisas por meio de atracamento, aproveitando computação de alto desempenho. O algoritmo DockThor é baseado em um método grid, adequado para ligantes flexíveis e receptores rígidos (Guedes *et al.*, 2024).

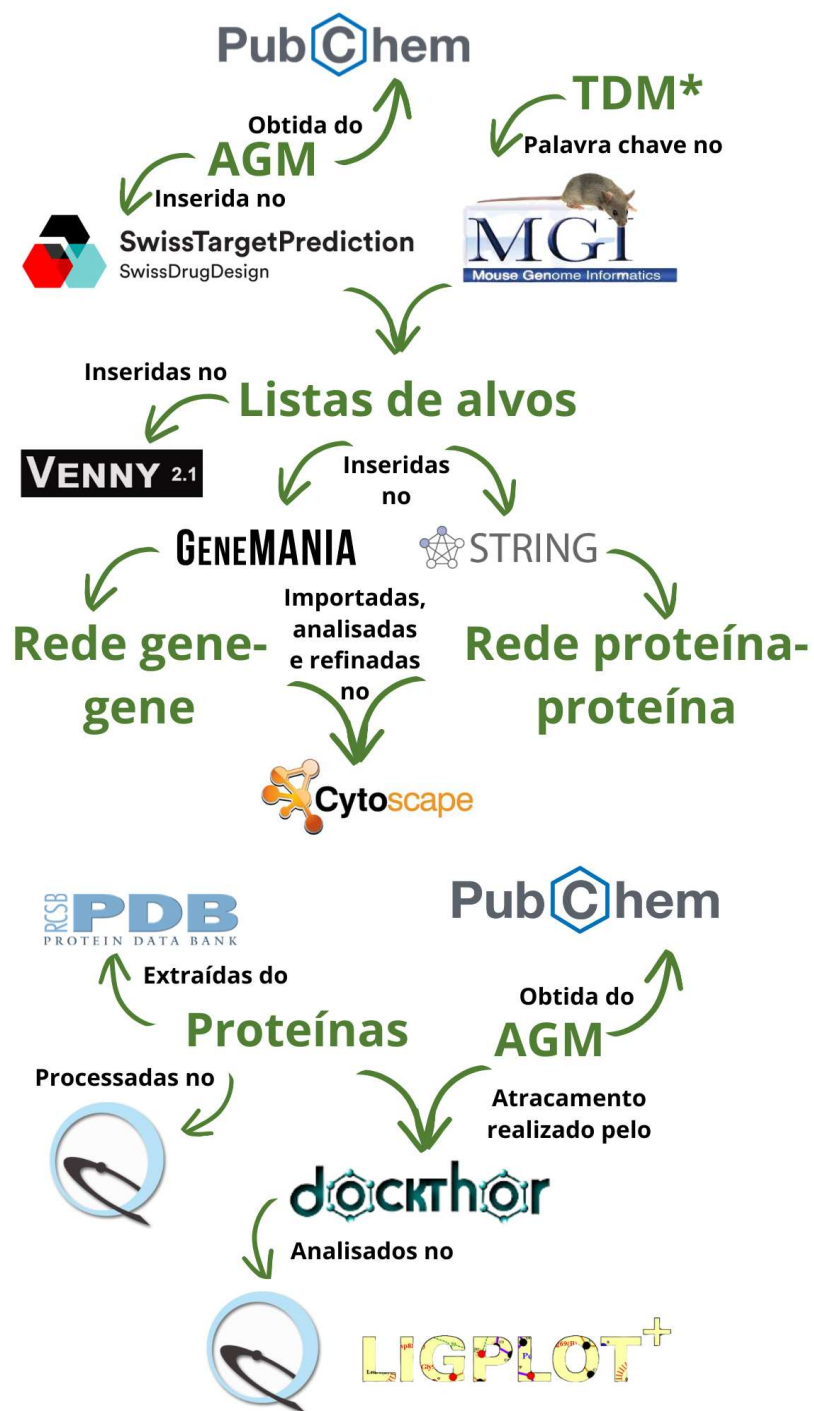
O UCSF Chimera, ou simplesmente Chimera, é um programa gratuito para visualização interativa e análise de estruturas moleculares e dados relacionados, incluindo mapas de densidade, trajetórias e alinhamentos de sequências,

desenvolvido com o apoio do NIH (National Institutes of Health), da iniciativa Chan Zuckerberg (Chan Zuckerberg Initiative), e do Escritório de Infraestrutura Cibernética e Biologia Computacional do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (*Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases*) (RBVI UCSF, 2024). O programa é estruturado em um núcleo e extensões, com o núcleo fornecendo os serviços essenciais e os recursos básicos para gráficos moleculares. As funcionalidades avançadas são oferecidas por meio de extensões. Esse modelo de design garante que o mecanismo de extensão seja suficientemente robusto para suportar as necessidades de pesquisadores externos que desejam expandir as capacidades do Chimera de novas maneiras (Pettersen *et al.*, 2021).

O LigPlot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) é uma ferramenta gráfica projetada para criar automaticamente diagramas 2D de interações entre ligantes e proteínas, utilizando coordenadas 3D. A interface, baseada em Java, permite a fácil edição dos gráficos na tela por meio de arrastar e soltar. Esses diagramas ilustram as interações, como ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, entre o ligante e as partes principais ou laterais da proteína (Laskowski *et al.*, 2011).

As ferramentas utilizadas e a ordem de execução das etapas do trabalho estão resumidas na Figura 2 em forma de fluxograma para melhor entendimento do processo.

Figura 2. Fluxograma de trabalho



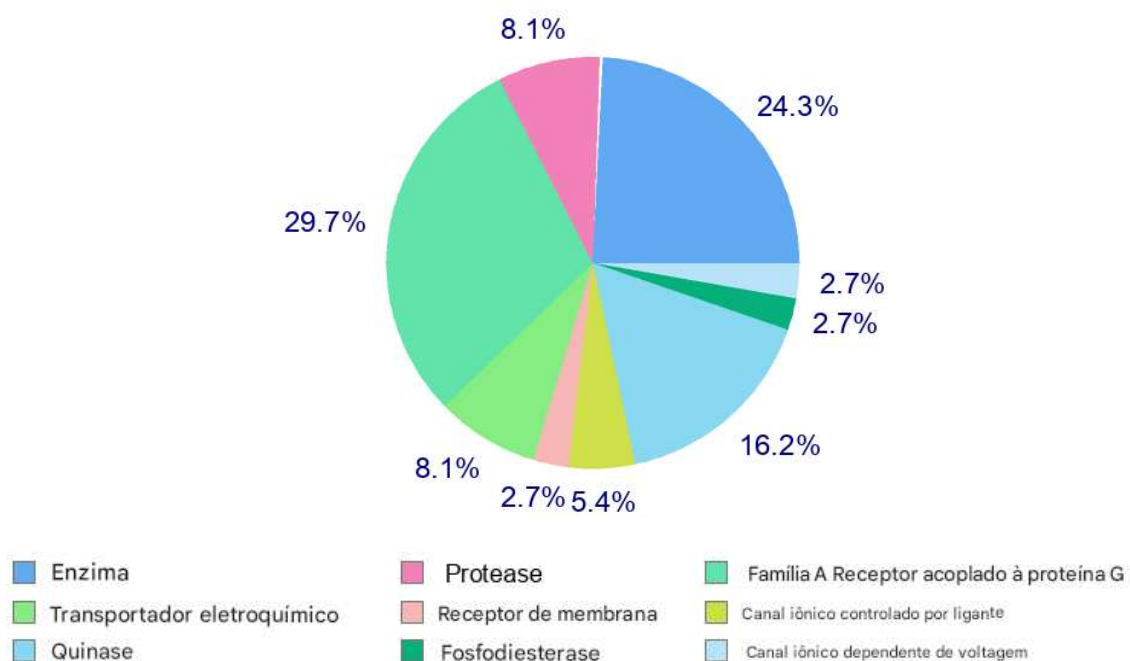
Fonte: elaborada pela autora

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bancos de dados e alvos compartilhados

No programa *SwissTargetPrediction* foram preditos 37 alvos da agmatina em *Mus musculus*. Conforme pode ser verificado na Figura 3, a maioria desses potenciais alvos moleculares são proteínas pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (29.7%), seguido por enzimas (24,3%) e quinases (16,2%). Porém há muitos outros alvos potenciais menos explorados.

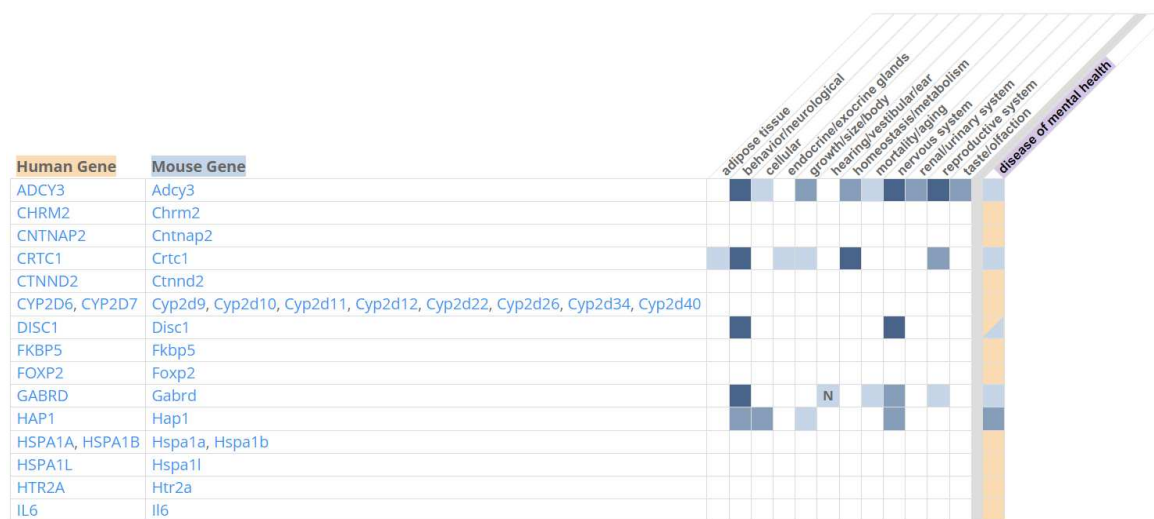
Figura 3. Gráfico de proporcionalidade dos tipos de alvos moleculares da agmatina em camundongos preditos na base de dados SwissTargetPrediction



Fonte: elaborada pela autora

Com o objetivo de dar continuidade ao trabalho experimental sobre o efeito tipo antidepressivo da agmatina em modelos animais de depressão, realizado em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa, foram verificados no banco de dados *Mouse Genome Informatics* os genes em camundongos que poderiam estar associados ao transtorno depressivo maior em humanos. Ao todo foram encontrados 23 genes de camundongo correspondentes aos genes humanos relacionados a TDM, que podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4. Genes de camundongos correspondentes a genes humanos relacionados a TDM obtidos da base de dados MGI

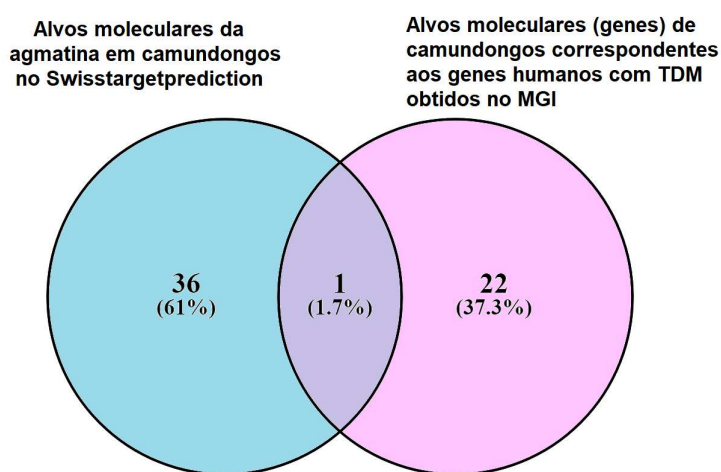


A coloração laranja indica gene relacionado a humanos, enquanto a coloração azul indica gene relacionado à camundongo. Coloração mais escura indica maior número de anotações. A coluna destacada contém pelo menos um fenótipo ou resultado de doença que corresponde ao termo pesquisado

Fonte: elaborada pela autora

Foi realizado o cruzamento dos alvos moleculares da agmatina em camundongos, preditos pelo *SwissTargetPrediction*, com os genes obtidos no MGI relacionados ao TDM. Como resultado, um único gene foi encontrado na intersecção entre os dois conjuntos de dados: o receptor muscarínico de acetilcolina M₂ (CHRM2), como pode ser observado na Figura 5. O gene CHRM2 está envolvido na excitabilidade neuronal, na plasticidade sináptica e na regulação de feedback da liberação de acetilcolina, e tem sido implicado no processamento cognitivo superior (Gosso *et al.*, 2007). Estudos post-mortem e de neuroimagem relatam que os indivíduos com distúrbios de humor, como o TDM, apresentam níveis mais baixos do CHRM2 no córtex cingulado anterior- parte do córtex pré-frontal medial (Cannon *et al.*, 2006; Gibbons *et al.*, 2009; Gibbons *et al.*, 2016).

Figura 5. Diagrama de Venn resultante do cruzamento de alvos moleculares da AGM em camundongos obtidos no SwissTargetPrediction e genes de camundongos correspondentes aos genes de humanos relacionados ao TDM obtidos no *Mouse Genome Informatics*.



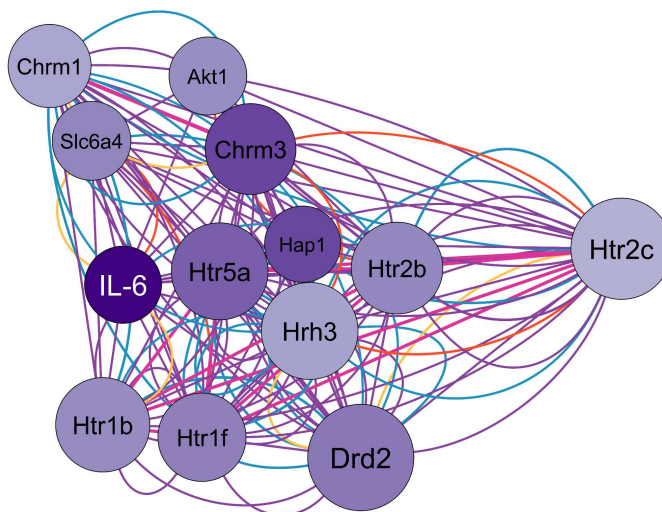
Fonte: elaborada pela autora

5.2 Análise de redes

A partir da união dos alvos moleculares obtidos nos bancos de dados MGI e *SwissTargetPrediction*, que resultou em um total de 59 alvos moleculares, foram montadas duas redes: uma rede de interações gênicas no GeneMANIA e uma rede de interações proteína-proteína no STRING. A rede construída no GeneMANIA, que pode ser visualizada na Figura 6, apresentou 76 nós e 1269 arestas. A natureza das interações gene-gene nessa rede foram preferencialmente do tipo co-expressão (45,4%), domínios proteicos compartilhados (19,63%), relações preditas (16,70%), outros tipos de interações (13,62%), co-localização (3,57%) e interações físicas (1,04%). O gene com maior pontuação de grau (número de interações entre outros genes da rede) foi o gene que codifica o receptor de dopamina D₂ (DRD2) com a pontuação igual a 86. Este receptor é endogenamente estimulado pela dopamina, o que leva a uma estimulação da proteína G inibitória (Gi) e inibição da adenilato ciclase (Yin *et al.*, 2020). Os genes com menor pontuação de grau foram o gene codificador de proteína “receptor colinérgico muscarínico 5” (CHRM5) e o coativador de transcrição 3 regulado por CREB (CRT3), ambos com valor igual a 3. Em relação aos valores de *closeness* -que seria o caminho mais curto entre um nó e todos os outros nós da rede (Verli, 2014)- DRD2 foi o que obteve maior pontuação (0,6696), enquanto o CRT3 obteve o menor valor (0,3605). O gene com maior pontuação de *betweenness* -número de caminhos mais curtos que passam por um

Optou-se por filtrar a rede com os seguintes parâmetros de centralidade: grau maior que 50, *betweenness* maior que 0,017 e *closeness* maior que 0,477. Como resultado, foi obtida a rede filtrada mostrada na Figura 7.

Figura 7. Rede filtrada de interação gene-gene da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM.



O tamanho do nó, representado pelos círculos, está diretamente relacionado à pontuação de grau, enquanto a coloração das arestas - linhas- está relacionada ao tipo de interação entre os genes.

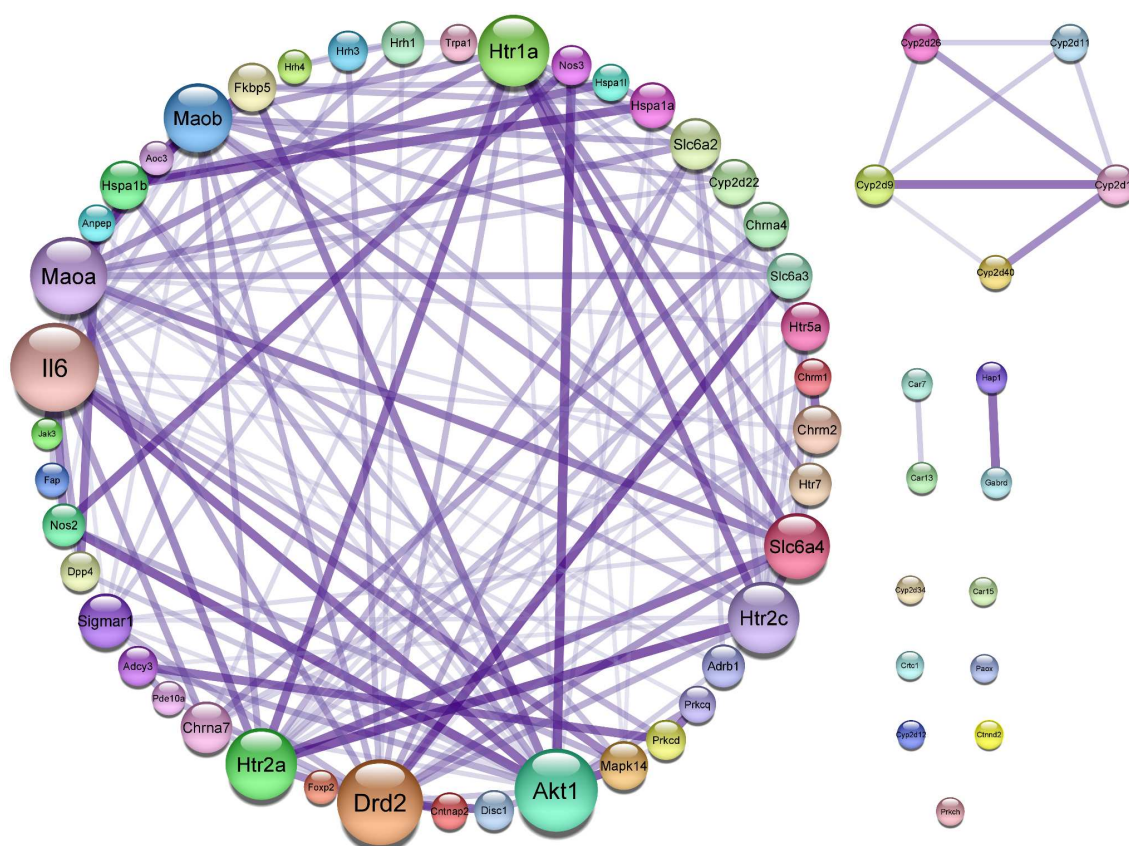
Interações físicas são representadas em verde, coexpressão em amarelo, domínios proteicos compartilhados em rosa, colocalizações em azul, predições em cinza, interações genéticas em roxo e vias metabólicas em preto.

Fonte: elaborada pela autora

A rede construída no STRING, que pode ser visualizada na Figura 8, apresentou 59 nós e 163 arestas. O tamanho dos nós está diretamente relacionado à pontuação de grau. A IL-6 apresentou maior valor de grau (21) e *betweenness* (0,2818). Em relação aos maiores valores de *closeness*, 6 proteínas apresentaram valores iguais a 1: anidrase carbônica 13 (CAR13), anidrase carbônica 7 (CAR7), subunidade delta do receptor do ácido gama-aminobutírico tipo A (GABRD), proteína associada à huntingtina 1 (HAP1), polipeptídeos 9 da subfamília D da família 2 do citocromo P450 (CYP2D9) e polipeptídeos 10 da subfamília D da família 2 do citocromo P450 (CYP2D10). As interações proteína-proteína foram pontuadas pelo score do STRING, sendo a maior intensidade da coloração roxa, a maior espessura

e a menor transparência das arestas diretamente relacionadas à maior confiabilidade dessas interações. As interações mais relevantes (com score acima de 0,99) foram: 1) DRD2-Transportador de dopamina dependente de sódio; 2) Transportador de dopamina (SLC6A3); 3) Proteína de ligação FK-506 (FKBP5) que atua como uma proteína reguladora do receptor glicocorticóide; 4) Receptor 2C de 5-hidroxitriptamina (serotonina) (HTR2C).

Figura 8. Rede completa de interação proteína-proteína da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM

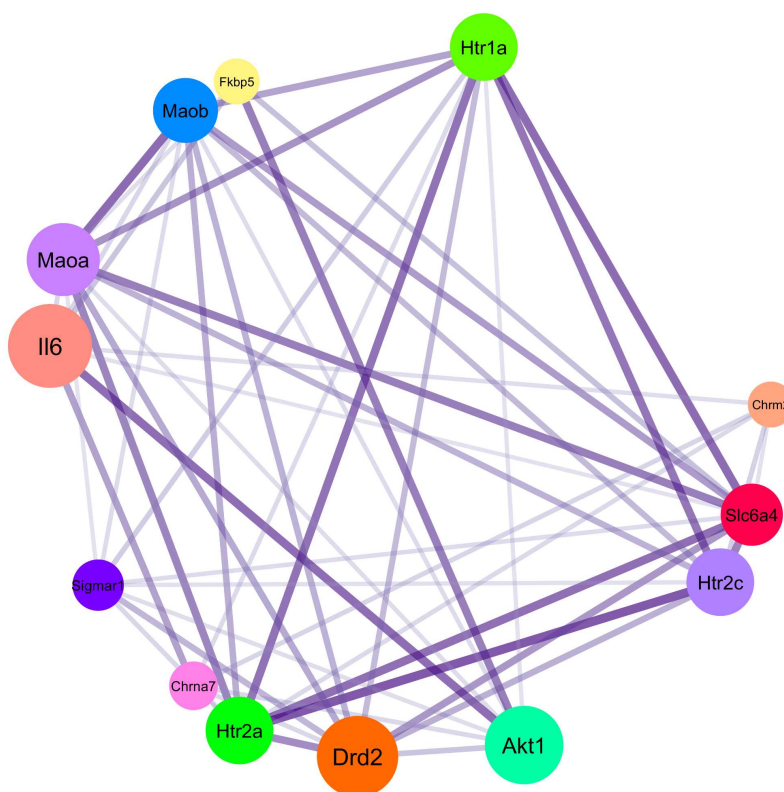


O tamanho do nó, representado pelos círculos, está diretamente relacionado à pontuação de grau, enquanto as arestas indicam a pontuação do score de STRING. A maior intensidade da coloração roxa, a maior espessura e a menor transparência das arestas estão diretamente relacionadas à maior confiabilidade dessas interações.

Fonte: elaborada pela autora

A rede foi filtrada com os seguintes parâmetros de centralidade: grau maior que 7, *betweenness* maior que 0,015 e *closeness* maior que 0,418. Como resultado, foi obtida a rede mostrada na Figura 9.

Figura 9. Rede filtrada de interação proteína-proteína da união de alvos moleculares da agmatina em camundongos e dos relacionados ao TDM



Fonte: elaborada pela autora

Para priorização dos alvos moleculares, foi realizado o cruzamento dos nós das redes filtradas do STRING e GeneMANIA e obtidos cinco nós presentes em ambas: interleucina-6 (IL-6), receptor de serotonina 2C (HTR2C), transportador de serotonina (SLC6A4), receptor de dopamina D2 (DRD2) e proteína cinase B (AKT1).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, frequentemente elevada em pacientes com TDM, estando associada à neuroinflamação que contribui para os sintomas depressivos (Roohi *et al.*, 2021). Recentemente foi reportado que o efeito protetor da agmatina em um modelo de doença de Huntington foi acompanhado por um efeito antidepressivo e uma redução dos níveis desta citocina pró-inflamatória em ratos (Katariya *et al.*, 2024). O gene SLC6A4, que codifica o transportador de serotonina (5-HTT), apresenta variações de expressão, especialmente por metilação,

o que pode aumentar a vulnerabilidade ao TDM (Sanwald *et al.*, 2021). O receptor HTR2C regula funções como apetite e humor, e polimorfismos nesse gene têm sido associados à resposta ao estresse e disfunções no eixo HPA, podendo estar relacionados ao desenvolvimento da depressão (Brummett *et al.*, 2014). Há poucas evidências da participação deste receptor no efeito antidepressivo da agmatina. Um estudo de Zomkowski e colaboradores (2004) reportou que o efeito tipo antidepressivo da agmatina no teste de nado forçado em camundongos foi revertido pelo antagonista de receptores 5HT2A/2C, cetanserina. O gene DRD2 que codifica o receptor de dopamina D2 afeta o sistema de recompensa e motivação, sendo sua disfunção associada a sintomas do TDM (Belujon *et al.*, 2017). Vale destacar que há evidências que a agmatina além de modular o sistema serotoninérgico também module o sistema dopaminérgico. A administração de agmatina por 21 dias foi capaz de elevar os níveis de serotonina e dopamina no hipocampo de camundongos (Freitas *et al.*, 2016).

A AKT1 participa da sinalização celular e da plasticidade neuronal, e alterações nesta via estão ligadas a respostas inadequadas ao estresse e ao desenvolvimento de sintomas depressivos (Guo *et al.*, 2024). Uma evidência de que o efeito antidepressivo da agmatina pode envolver uma ativação de Akt foi fornecida pelo estudo de Freitas e colaboradores (2020) que mostrou que a agmatina potencializa o efeito antidepressivo da cetamina, sendo este efeito associado com ativação da via de sinalização mediada por AKT no córtex pré-frontal em camundongos.

Portanto, as proteínas acima mencionadas podem ser possíveis alvos para a agmatina no TDM, porém é necessário confirmar essa hipótese através de análises adicionais como atracamento e dinâmica molecular.

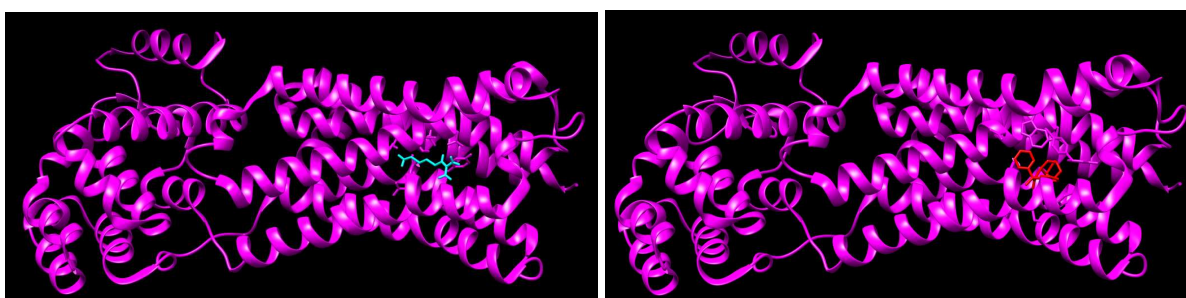
5.3 Atracamento molecular

Foi realizado o atracamento molecular da agmatina com a proteína codificada pelo gene CHRM2 - único gene compartilhado por ambas listas de dados "alvos da agmatina em camundongos" e "genes de camundongos correspondentes a genes humanos relacionados ao TDM"-, com os cinco nós presentes nas redes filtradas proteína-gene e proteína-proteína (IL-6, HTR2C, SLC6A4, DRD2 e AKT1), e adicionalmente com P2X7R, TLR4 e com o domínio NACHT da proteína NLRP3 -a fim de dar continuidade a hipótese inicial de que a via do inflamassoma NLRP3

estaria envolvida no TDM e no efeito tipo antidepressivo da agmatina.

Como primeiro resultado, a agmatina apresentou energia de ligação igual a -6,944 kcal/mol com o receptor muscarínico de acetilcolina M₂, e duas ligações de hidrogênio com os resíduos do aminoácido aspartato (Asp) 103A e serina (Ser) 433A, de 2,067 Å e 1,633 Å, respectivamente. A energia de ligação do receptor com seu controle positivo QNB foi de -10,933 kcal/mol. O modelo tridimensional deste atracamento pode ser visualizado na Figura 10. Esses resultados sugerem que existe a possibilidade de ocorrer uma interação da agmatina com o receptor M₂ neste sítio. Porém, devido o valor da AGM, -6,944 kcal/mol, ser menor que o obtido com o controle QNB, -10,933 kcal/mol, seria necessário realizar mais estudos para confirmar essa possibilidade.

Figura 10. Atracamento molecular da agmatina com receptor muscarínico M₂

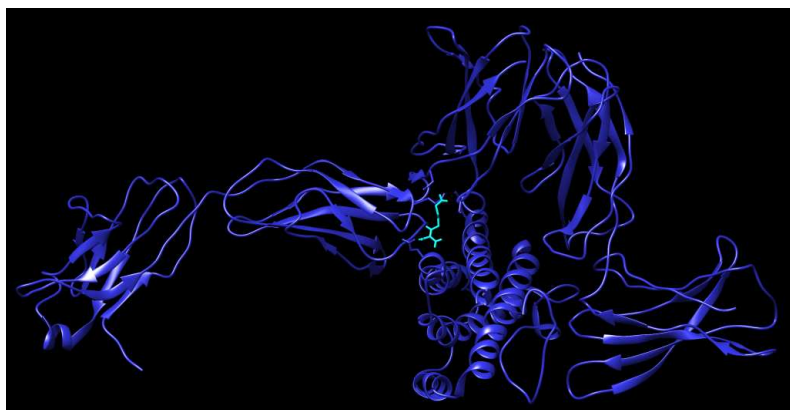


A esquerda em azul ciano AGM, a direita em vermelho controle positivo QNB.

Fonte: elaborada pela autora

Na interação com o complexo il-6/il-6R/gp130, a energia de ligação da agmatina foi de -5,925 kcal/mol, com três ligações de hidrogênio nos resíduos Ser 107B, glutamato (Glu) 110B e Glu 116A, de 1,511 Å, 1,930 Å e 1,475 Å, respectivamente. O modelo tridimensional encontra-se na Figura 11.

Figura 11. Atracamento molecular da agmatina com complexo il-6/il-6R/gp130



Em azul ciano, está representada a molécula da agmatina. Fonte: elaborada pela autora

Para o HTR2C, a energia de ligação foi de -6,295 kcal/mol, com quatro ligações de hidrogênio: alanina (Ala) 222 (1,951 Å), treonina (Thr) 139 (2,135Å), Ser 138 (2,139 Å) e Asp 134 (1,618 Å). A energia de ligação do controle positivo E2J foi de -11,794 kcal/mol (modelo na Figura 12).

Figura 12. Atracamento molecular da agmatina com HTR2C

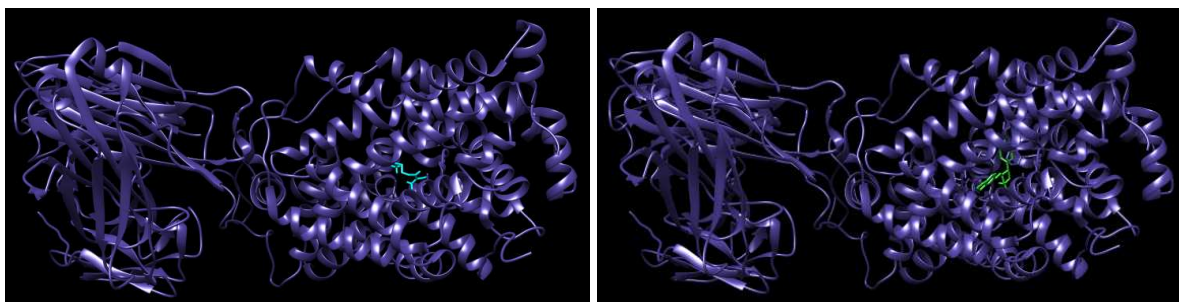


A esquerda em azul ciano AGM, a direita em laranja controle positivo E2J.

Fonte: elaborada pela autora

A energia de ligação entre a agmatina e o transportador de serotonina codificado pelo gene SLC6A4 foi de -6,562 kcal/mol, com cinco interações do tipo ligação de hidrogênio: duas com Asp 98 (1,605 Å e 2,318 Å) e outras com fenilalanina (Phe) 335, Ser 336 e Tyr 95A (2,073 Å, 1,925 Å e 1,774 Å, respectivamente). O controle positivo 8PR apresentou -10,569 kcal/mol de energia de ligação (Figura 12).

Figura 13. Atracamento molecular da agmatina com o transportador de serotonina



A esquerda em azul ciano AGM, a direita em verde controle positivo 8PR.

Fonte: elaborada pela autora

Com o receptor D2 de dopamina, a agmatina apresenta energia de ligação de -6,728 kcal/mol, com interações do tipo ligação de hidrogênio em Asp 114 (1,653 Å), Cys 118 (2,005 Å) e Ser 197 (2,231 Å), enquanto o controle positivo 8NU teve energia de -6,568 kcal/mol (Figura 14).

O receptor de dopamina D2 (RD2), amplamente estudado devido à sua relevância no sistema dopaminérgico cerebral, desempenha um papel crucial na regulação de emoções, motivação, recompensas e comportamentos de reforço, especialmente por meio da via mesocorticolímbica, também conhecida como 'via da recompensa' (He *et al.*, 2019). Além de estar associado a diversos transtornos neuropsiquiátricos, como o TDM, polimorfismos no gene DRD2 têm sido sugeridos como potenciais fatores predisponentes para o desenvolvimento do TDM (He *et al.*, 2019).

A literatura sugere a modulação dopaminérgica promovida pela administração de agmatina (AGM) (Freitas *et al.*, 2016; Azar *et al.*, 2022), no entanto, os mecanismos subjacentes a esse efeito ainda necessitam de maior elucidação. Os resultados obtidos por meio do estudo de atracamento molecular podem fornecer uma explicação plausível para a modulação dopaminérgica observada, apontando para possíveis interações específicas entre a agmatina e o receptor D2.

Devido ao resultado promissor do atracamento molecular, foi feita a análise da interação do receptor D2 com a AGM e com o 8NU no programa Ligplot (Figura 15). O programa identificou que o controle apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio com Asp114, Ser197 e Thr119, além de interações hidrofóbicas com Cys118 e Phe198. A AGM pode interagir com estes mesmos resíduos de aminoácido, estabelecendo ligação de H com a Asp114, interações hidrofóbicas com

Ser197, Thr119, Cys118, Phe198, além de Phe382, Ala122, Trp368 e Phe390. Porém, enquanto o atracamento molecular predisse que o controle positivo interage com 5 resíduos de aminoácidos do receptor DRD2, a AGM interage com 9 resíduos, fato que poderia justificar sua energia de ligação mais negativa e mais favorável para a manutenção do complexo proteína-ligante.

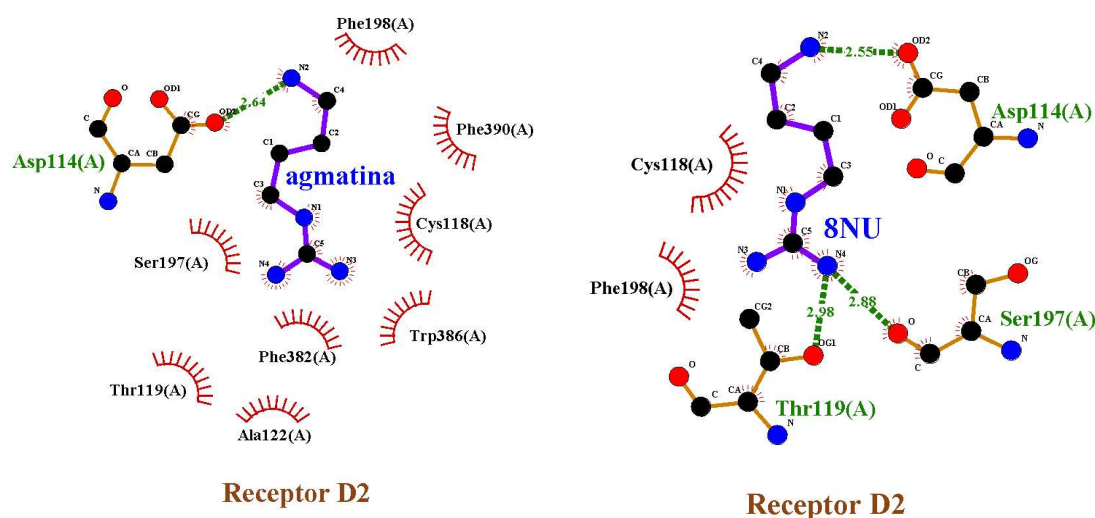
Figura 14. Atracamento molecular da agmatina com DRD2



A esquerda em azul ciano AGM, a direita em azul controle positivo 8NU.

Fonte: elaborada pela autora

Figura 15. Análise de interação da agmatina com o receptor DRD2 pelo Ligplot

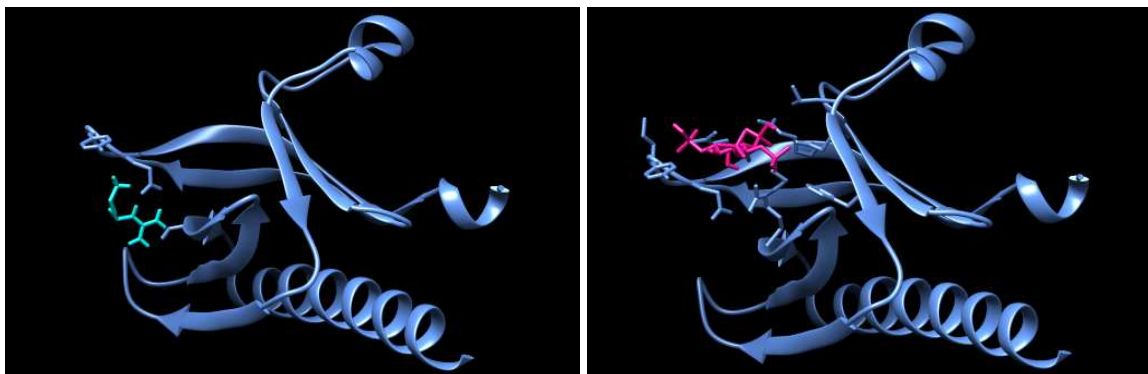


Fonte: elaborada pela autora

Em relação ao atracamento molecular da agmatina com a proteína cinase B (AKT1), a energia de ligação foi de -6,028 kcal/mol, com duas ligações de hidrogênio no Glu 17 (1,586 Å e 2,043 Å). O controle positivo 4IP apresentou -7,405 kcal/mol de energia de ligação (Figura 16). Um estudo de 2017 de Kim e colaboradores demonstrou que a agmatina reduziu os níveis de expressão de Akt-1 de forma

dependente da dose, sugerindo a possibilidade de interação da AGM com a via PI3K/AKT-1.

Figura 16. Atracamento molecular da agmatina com AKT1.



A esquerda em azul ciano AGM, a direita em rosa controle positivo 4IP.

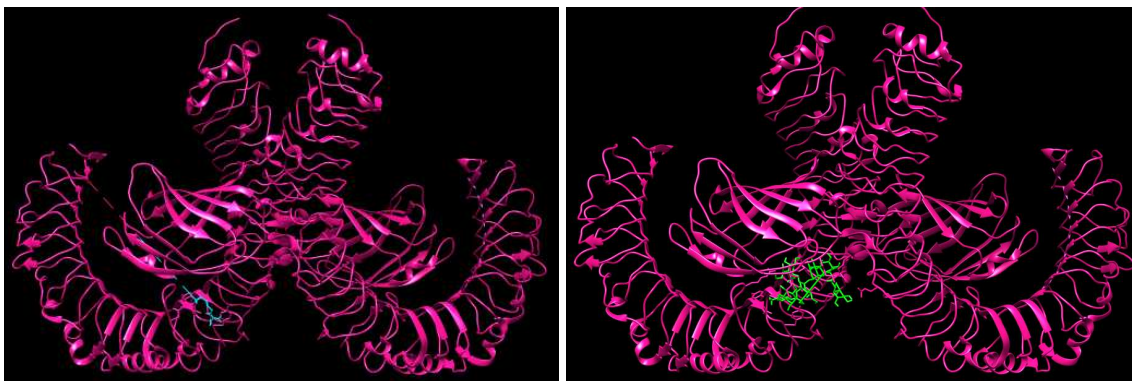
Fonte: elaborada pela autora

Os resultados obtidos com o atracamento molecular da agmatina com os alvos moleculares obtidos na interseção das duas redes filtradas demonstraram que, apesar de ser possível que ocorra interação da AGM com as proteínas codificadas por IL-6, HTR2C, SLC6A4 e AKT1, ainda são necessários testes complementares por exemplo ensaios *in vitro* por dicroísmo circular, onde se avaliam as curvas da proteína purificada interagindo com o ligante para afirmar que essas interações ocorrem *in vivo*, uma vez que os valores de energia de ligação da agmatina com os alvos foram inferiores aos valores obtidos com os controles positivos. Os resultados desses ensaios justificam a continuidade dos estudos com modelos animais. Contudo, entre os genes das redes filtradas o resultado de atracamento molecular mais promissor foi o com a proteína DRD2, único cuja ligação com a agmatina teve energia superior à apresentada pelo seu controle positivo.

A agmatina teve energia de ligação com o TLR4 de -6,218 kcal/mol, e três ligações de hidrogênio, todas com a Asp 294, com energias de 1,544Å, 1,528Å e 1,949Å. O controle positivo LPS apresentou energia de ligação de -10,552 kcal/mol (Figura 17). O TLR4 é um componente da família dos receptores tipo toll (TLR), que estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram estar associados ao TDM (Figuroa-Hall *et al.*, 2020). Ademais, resultados experimentais em estudo de 2021 de Li e colaboradores demonstrou que a agmatina levou a inibição da expressão de

TLR4 e sugere seu envolvimento na inibição da via TLR4/MyD88/NF- κ B do inflamassoma NLRP3.

Figura 17. Atracamento molecular da agmatina com o TLR4

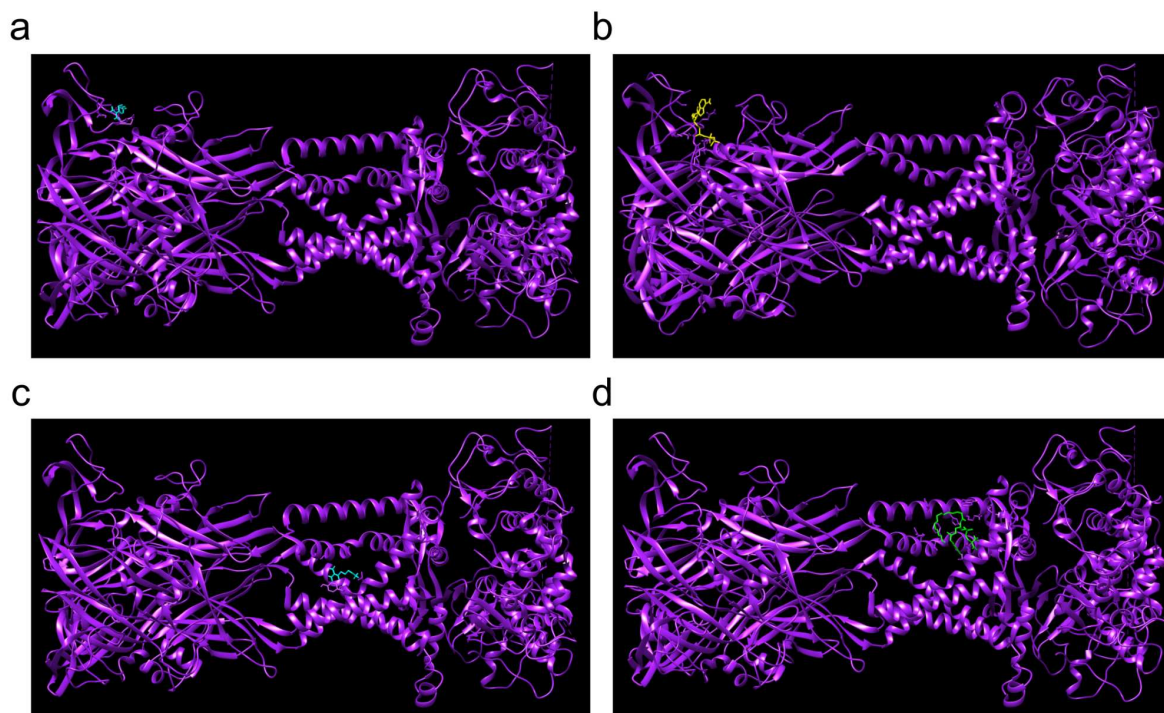


A esquerda em azul ciano AGM, a direita em verde controle positivo LPS.

Fonte: elaborada pela autora

O receptor P2X7 (P2X7R) é um canal de cátions não seletivo regulado por adenosina 5'-trifosfato (ATP), amplamente expresso na membrana de células do sistema imunológico. Sob condições de estresse, dor crônica e doenças físicas comórbidas, a ativação do P2X7R pelo ATP em células gliais induz uma resposta neuroinflamatória, e essa está associada ao desenvolvimento de distúrbios emocionais, como ansiedade e depressão. Estudos indicam que o P2X7R tem um papel crítico na patogênese desses transtornos, sugerindo sua participação na comorbidade entre ansiedade e depressão, por meio de mecanismos inflamatórios e disfunção neuronal (Liu *et al.*, 2024). A ativação do P2X7R, e subsequentemente do inflamassoma NLRP3, pode mediar comportamentos do tipo depressivo (Yue *et al.*, 2017). No sítio ATP do receptor a energia de ligação da agmatina foi de -6,024 kcal/mol, e foram identificadas 6 ligações de hidrogênio, duas com Ser124 (1,854Å e 2,624Å), duas com Gln143 (2,414Å e 1,824Å), uma com Pro142 (1,780Å) e uma com Asp141A (1,585Å). No sítio do Q3G a energia de ligação foi de -5,936 kcal/mol com a agmatina. O atracamento molecular prediz que ocorram 3 ligações de hidrogênio da agmatina neste sítio da proteína: duas com o resíduo de Ser342 (1,735Å e 2,321Å) e uma com Gly338 (1,961Å). Os controles ATP e Q3G tiveram energia -7,467 kcal/mol e -8,024 kcal/mol, respectivamente, e os modelos tridimensionais podem ser visualizados na Figura 18.

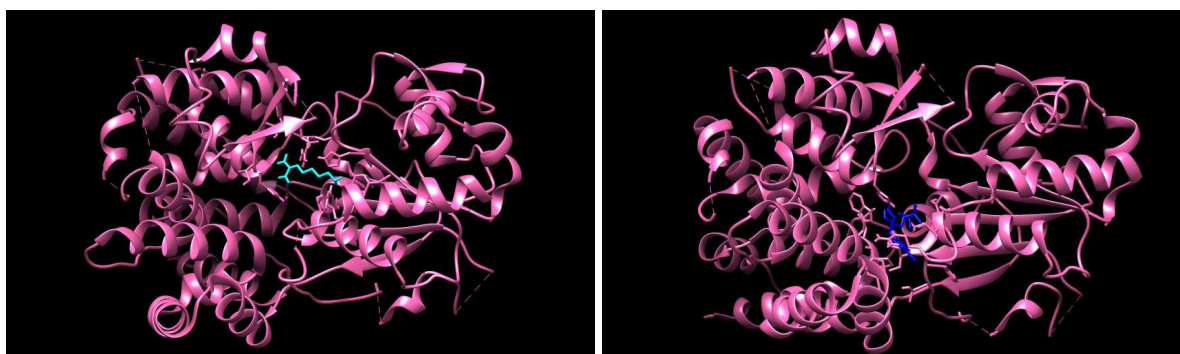
Figura 18. Atracamento molecular da agmatina com P2X7



- a) Em azul ciano AGM no sítio do ATP; b) Em amarelo controle ATP.
 c) Em azul ciano AGM no sítio do QRG; d) Em verde o controle QRG

Fonte: elaborada pela autora

Para prever se o efeito da agmatina pode estar relacionado a uma interação direta com o NLRP3 foi realizado o atracamento molecular no sítio NACHT do mesmo. O inflamassoma NLRP3 é um complexo constituído por três componentes: um sensor (proteína NLRP3), um adaptador (ASC, também conhecido por PYCARD) e um efetor (Caspase-1). A proteína NLRP3 contém três sítios: um domínio de pirina (PYD), um domínio de repetição rica em leucina (LRR) e um domínio central NACHT que é crucial para a auto-associação e função do NLRP3 (Dekker *et al.*, 2021; Brinkschulte *et al.*, 2022; Duncan *et al.*, 2007). A AGM teve -6,472 kcal/mol de energia de ligação com o domínio NACHT e apresentou interações de hidrogênio com tirosina (Tyr) 258 (2,615Å), fenilalanina (Phe) 520 (2,686Å) e duas com isoleucina (Ile) 521 (2,154Å e 2,149Å). O controle positivo ADP teve energia de ligação de -7,549 kcal/mol, conforme ilustrado na Figura 19.

Figura 19. Atracamento molecular da agmatina no domínio NACHT da proteína NLRP3

A esquerda em azul ciano AGM, a direita em azul escuro controle Q3G

Fonte: elaborada pela autora

Existe a possibilidade da agmatina interagir com o TLR4, P2X7 e com o domínio NACHT da proteína NLRP3, porém uma vez que os valores preditos de energia de ligação da agmatina em kcal/mol, respectivamente -6,218, -6,024, -5,936 e -6,472, foram inferiores aos valores dos controles -10,552 para LPS, -7,467 para ATP, -8,024 para Q3G e -7,549 para ADP, é necessário realizar experimentos futuros para confirmação.

Todos os resultados acima mencionados estão resumidos na Tabela 1, em ordem crescente em relação ao valor de energia de ligação da AGM em kcal/mol.

Tabela 1. Predição da afinidade de ligação por atracamento molecular em diferentes sítios.

Gene	ID PDB	ID Ligante (sítio de ligação)	Valor de energia de ligação controle positivo	Valor de energia de ligação agmatina
CHRM2	3UON	QNB	-10,933	-6,944
DRD2	6CM4	8NU	-6,568	-6,728
SLC6A4	5I6X	8PR	-10,569	-6,562
NLRP3 (domínio NACHT)	8ETR	ADP	-7,549	-6,472
HTR2C	6BQH	E2J	-11,794	-6,295
TLR4	3FXI	LPS	-10,552	-6,218

Gene	ID PDB	ID Ligante (sítio de ligação)	Valor de energia de ligação controle positivo	Valor de energia de ligação agmatina
CHRM2	3UON	QNB	-10,933	-6,944
DRD2	6CM4	8NU	-6,568	-6,728
SLC6A4	5I6X	8PR	-10,569	-6,562
AKT1	1UNQ	4IP	-7,405	-6,028
P2X7	6U9W	ATP (A)	-7,467	-6,024
P2X7	6U9W	Q3G (C)	-8,024	-5,936
IL-6	1P9M	–	–	-5,925

Fonte: elaborada pela autora

6. CONCLUSÃO

Este estudo utilizou ferramentas de bioinformática como bancos de dados, redes de interação, atracamento molecular e análise de interações para investigar alvos moleculares envolvidos no efeito antidepressivo da agmatina. Das listas de alvos “genes de camundongos correspondentes a genes humanos relacionados a TDM” e “alvos da agmatina em *Mus musculus*”, respectivamente oriundas das bases de dados MGI e SwissTargetPrediction, houve apenas um gene em comum, o CHRM2. As redes de interações gênicas e protéicas, obtidas da união das listas de alvos, após passarem por filtragem, apontaram 5 alvos promissores para análises dos mecanismos de ação da agmatina. O atracamento molecular e análise de interação, realizados com os alvos apontados e com alvos relacionados a via do inflamassoma NLRP3, apontaram a proteína DRD2 como promissora, sendo esta a única que apresentou energia de ligação com a agmatina mais negativa do que com seu ligante controle, sugerindo a possibilidade de seu envolvimento no mecanismo de ação da agmatina. São necessários estudos mais aprofundados de bioinformática e também experimentais para a validação do receptor de dopamina D2 como alvo potencial da agmatina responsável pelos efeitos antidepressivos. Apesar de existir a possibilidade de interação da agmatina com as demais proteínas, é necessário realizar estudos complementares confirmatórios, uma vez que o atracamento molecular não foi promissor.

Embora existam estudos que indiquem modulação dopaminérgica causada pela agmatina, não foi encontrado relato prévio de interação direta desta com o receptor dopaminérgico D2, o que constitui uma descoberta inédita que contribui para um melhor entendimento do mecanismo de ação da agmatina.

7. REFERÊNCIAS

Azar YO, Badawi GA, Zaki HF, Ibrahim SM. Agmatine-mediated inhibition of NMDA receptor expression and amelioration of dyskinesia via activation of Nrf2 and suppression of HMGB1/RAGE/TLR4/MYD88/NF- κ B signaling cascade in rotenone lesioned rats. *Life Sci.* 2022 Dec 15;311(Pt A):121049. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121049. Epub 2022 Oct 6. PMID: 36209830.

Baldarelli RM, Smith CL, Ringwald M, Richardson JE, Bult CJ; Mouse Genome Informatics Group. Mouse Genome Informatics: an integrated knowledgebase system for the laboratory mouse. *Genetics.* 2024 May 7;227(1):iyae031. doi: 10.1093/genetics/iyae031. PMID: 38531069; PMCID: PMC11075557.

Belujon P, Grace AA. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2017 Dec 1;20(12):1036-1046. doi: 10.1093/ijnp/pyx056. PMID: 29106542; PMCID: PMC5716179.

Berman H, Henrick K, Nakamura H, Markley JL. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue):D301-3. doi: 10.1093/nar/gkl971. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17142228; PMCID: PMC1669775.

Brinkschulte R, Fußhöller DM, Hoss F, Rodríguez-Alcázar JF, Lauterbach MA, Kolbe CC, Rauen M, Ince S, Herrmann C, Latz E, Geyer M. ATP-binding and hydrolysis of human NLRP3. *Commun Biol.* 2022;5(1):1176. doi: 10.1038/s42003-022-04120-2.

Brummett BH, Babyak MA, Williams RB, Harris KM, Jiang R, Kraus WE, Singh A, Costa PT, Georgiades A, Siegler IC. A putatively functional polymorphism in the HTR2C gene is associated with depressive symptoms in white females reporting significant life stress. *PLoS One.* 2014 Dec 16;9(12):e114451. doi: 10.1371/journal.pone.0114451. PMID: 25514629; PMCID: PMC4267787.

Chai J, Luo L, Hou F, Fan X, Yu J, Ma W, Tang W, Yang X, Zhu J, Kang W, Yan J, Liang H. Agmatine Reduces Lipopolysaccharide-Mediated Oxidant Response via Activating PI3K/Akt Pathway and Up-Regulating Nrf2 and HO-1 Expression in Macrophages. *PLoS One*. 2016 Sep 29;11(9):e0163634. doi: 10.1371/journal.pone.0163634. PMID: 27685463; PMCID: PMC5042521.

Chai Y, Cai Y, Fu Y, Wang Y, Zhang Y, Zhang X, Zhu L, Miao M, Yan T. Salidroside Ameliorates Depression by Suppressing NLRP3-Mediated Pyroptosis via P2X7/NF- κ B/NLRP3 Signaling Pathway. *Front Pharmacol*. 2022 Apr 12;13:812362. doi: 10.3389/fphar.2022.812362. PMID: 35496273; PMCID: PMC9039222.

Cannon, D.M., Carson, R.E., Nugent, A.C., Eckelman, W.C., Kiesewetter, D.O., Williams, J., Rollis, D., Drevets, M., Gandhi, S., Solorio, G., Drevets, W.C., 2006. Reduced muscarinic type 2 receptor binding in subjects with bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 741–747. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.7.741>.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W357-W364. doi: 10.1093/nar/gkz382. PMID: 31106366; PMCID: PMC6602486.

Dekker C, Mattes H, Wright M, Boettcher A, Hinniger A, Hughes N, Kapps-Fouthier S, Eder J, Erbel P, Stiefl N, Mackay A, Farady CJ. Crystal Structure of NLRP3 NACHT Domain With an Inhibitor Defines Mechanism of Inflammasome Inhibition. *J Mol Biol*. 2021;433(24):167309. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167309.

Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Ting JP. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):8041-6. doi: 10.1073/pnas.0611496104.

Figuroa-Hall LK, Paulus MP, Savitz J. Toll-Like Receptor Signaling in Depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2020 Nov;121:104843. doi:

10.1016/j.psyneuen.2020.104843. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32911436; PMCID: PMC7883590.

Freitas AE, Egea J, Buendía I, Gómez-Rangel V, Parada E, Navarro E, Casas AI, Wojnicz A, Ortiz JA, Cuadrado A, Ruiz-Nuño A, Rodrigues ALS, Lopez MG. Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. *Mol Neurobiol.* Jul;53(5):3030-3045, 2016. doi: 10.1007/s12035-015-9182-6.

Freitas AE, Heinrich IA, Moura TM, Fraga DB, Costa AP, Azevedo D, Brocardo PS, Kaster MP, Leal RB, Rodrigues ALS. Agmatine potentiates antidepressant and synaptic actions of ketamine: Effects on dendritic arbors and spines architecture and Akt/S6 kinase signaling. *Exp Neurol.* 333:113398, 2020. doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113398.

Gibbons, A.S., Jeon, W.J., Scarr, E., Dean, B., 2016. Changes in muscarinic M2 receptor levels in the cortex of subjects with bipolar disorder and major depressive disorder and in rats after treatment with mood stabilisers and antidepressants. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19, pyv118. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv118>.

Gibbons, A.S., Scarr, E., McLean, C., Sundram, S., Dean, B., 2009. Decreased muscarinic receptor binding in the frontal cortex of bipolar disorder and major depressive disorder subjects. *J. Affect. Disord.* 116, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.11.015>.

Gosso FM, de Geus EJ, Polderman TJ, Boomsma DI, Posthuma D, Heutink P. Exploring the functional role of the CHRM2 gene in human cognition: results from a dense genotyping and brain expression study. *BMC Med Genet.* 2007 Nov 8;8:66. doi: 10.1186/1471-2350-8-66. PMID: 17996044; PMCID: PMC2198911.

Guedes IA, Pereira da Silva MM, Galheigo M, Krempser E, de Magalhães CS, Correa Barbosa HJ, Dardenne LE. DockThor-VS: A Free Platform for

Receptor-Ligand Virtual Screening. *J Mol Biol.* 2024 Sep 1;436(17):168548. doi: 10.1016/j.jmb.2024.168548. Epub 2024 Mar 20. PMID: 39237203.

Guo N, Wang X, Xu M, Bai J, Yu H, Le Zhang. PI3K/AKT signaling pathway: Molecular mechanisms and therapeutic potential in depression. *Pharmacol Res.* 2024 Aug;206:107300. doi: 10.1016/j.phrs.2024.107300.

He M, He H, Yang L, Zhang J, Chen K, Duan Z. Functional tag SNPs inside the DRD2 gene as a genetic risk factor for major depressive disorder in the Chinese Han population. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019 Feb 1;12(2):628-639. PMID: 31933869; PMCID: PMC6945087.

He PK, Gao YY, Lyu FJ, Chen JN, Zhang YH, Nie K, Zhang QX, Huang R, Duan QR, Guo ML, Liu ZH, Huang HL, Ma GX, Wang LJ, Wang LM. Idebenone-Activating Autophagic Degradation of α -Synuclein via Inhibition of AKT-mTOR Pathway in a SH-SY5Y-A53T Model of Parkinson's Disease: A Network Pharmacological Approach. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021 Sep 16;2021:8548380. doi: 10.1155/2021/8548380. PMID: 34567221; PMCID: PMC8463184.

Jadhav KK, Daouk J, Kurkinen K, Kraav SL, Eriksson P, Tolmunen T, Kanninen KM. Blood cytokines in major depressive disorder in drug-naïve adolescents: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord [Internet].* Nov 2024 [citado 3 dez 2024]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.11.071>

Katariya R, Mishra K, Sammeta S, Umekar M, Kotagale N, Taksande B. Agmatine mitigates behavioral abnormalities and neurochemical dysregulation associated with 3-Nitropropionic acid-induced Huntington's disease in rats. *Neurotoxicology.* 102:12-28, 2024. doi: 10.1016/j.neuro.2024.03.002.

Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues ALS, Peluffo H, Kaster MP. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: Clinical and preclinical findings. *Brain Behav Immun.* 64:367-383, 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.002.

Kim H, Kim MM. Effect of Agmatine Sulfate on Modulation of Matrix Metalloproteinases via PI3K/Akt-1 in HT1080 Cells. *Anticancer Res.* 2017 Nov;37(11):6303-6309. doi: 10.21873/anticancerres.12081. PMID: 29061813.

Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 2024 Nov 18:gkae1059. doi: 10.1093/nar/gkae1059. Epub ahead of print. PMID: 39558165.

Kouba BR, de Araujo Borba L, Borges de Souza P, Gil-Mohapel J, Rodrigues ALS. Role of Inflammatory Mechanisms in Major Depressive Disorder: From Etiology to Potential Pharmacological Targets. *Cells.* 2024 Feb 28;13(5):423. doi: 10.3390/cells13050423. PMID: 38474387; PMCID: PMC10931285.

Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model.* 2011 Oct 24;51(10):2778-86. doi: 10.1021/ci200227u. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21919503.

Li YF, Gong ZH, Cao JB, Wang HL, Luo ZP, Li J. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol.* 2003 May 23;469(1-3):81-8. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01735-7. PMID: 12782188.

Li X, Lin J, Hua Y, Gong J, Ding S, Du Y, Wang X, Zheng R, Xu H. Agmatine Alleviates Epileptic Seizures and Hippocampal Neuronal Damage by Inhibiting Gasdermin D-Mediated Pyroptosis. *Front Pharmacol.* 2021 Aug 6;12:627557. doi: 10.3389/fphar.2021.627557. PMID: 34421582; PMCID: PMC8378273.

Liu J, Liu TT, Mou L, Zhang Y, Chen X, Wang Q, Deng BL, Liu J. P2X7 receptor: a potential target for treating comorbid anxiety and depression. *Purinergic Signal.* 2024 Apr 20. doi: 10.1007/s11302-024-10007-0. Epub ahead of print. PMID: 38642324.

Wolfgang Marx, Brenda W. J. H. Penninx, Marco Solmi, Toshi A. Furukawa, Joseph Firth, Andre F. Carvalho, Michael Berk. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers* 9, 44 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00454-1>

Milosevic K, Stevanovic I, Bozic ID, Milosevic A, Janjic MM, Laketa D, Bjelobaba I, Lavrnja I, Savic D. Agmatine Mitigates Inflammation-Related Oxidative Stress in BV-2 Cells by Inducing a Pre-Adaptive Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(7):3561. <https://doi.org/10.3390/ijms23073561>

Ministério da Saúde. Assuntos. Notícias. 2022. Setembro. Na América Latina, Brasil é o país com maior prevalência de depressão. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/setembro/na-america-latina-brasil-e-o-pais-com-maior-prevalencia-de-depressao>. Acesso em: 20 ago. 2024.

Ministério da Saúde. Avaliação e conduta: diagnóstico do episódio depressivo. Diagnóstico do episódio depressivo. Disponível em: <https://linhasdecuidado.saude.gov.br/portal/depressao/unidade-hospitalar-especializada/avaliacao-conduta/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

Montejo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, Morris Q, Bader GD. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*. 2010 Nov 15;26(22):2927-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btq562. Epub 2010 Oct 5. PMID: 20926419; PMCID: PMC2971582.

Montejo J, Zuberi K, Rodriguez H, Bader GD, Morris Q. GeneMANIA: Fast gene network construction and function prediction for Cytoscape. *F1000Res*. 2014 Jul 1;3:153. doi: 10.12688/f1000research.4572.1. PMID: 25254104; PMCID: PMC4168749.

Mouse Genome Informatics (MGI). About the Human - Mouse: Disease Connection Disponível em:

<https://www.informatics.jax.org/mgihome/projects/aboutHMDC.shtml>. Acesso em 27 nov. 2024.

Neis VB, Moretti M, Manosso LM, Lopes MW, Leal RB, Rodrigues AL. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 130:9-14, 2015. doi: 10.1016/j.pbb.2014.12.009.

NeuroLaunch. Home. Articles. 2024. Agmatine and Dopamine: Exploring the Neurochemical Connection. Disponível em: https://neuroLaunch.com/agmatine-dopamine/#google_vignette. Acesso em 10 dez 2024.

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Disponível em: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. Acessado em 10 de março de 2024

Organização Mundial da Saúde, 2023. Depressive disorder (depression). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 30 ago. 2024.

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers.* 2:16065, 2016. doi: 10.1038/nrdp.2016.65.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 2021 Jan;30(1):70-82. doi: 10.1002/pro.3943. Epub 2020 Oct 22. PMID: 32881101; PMCID: PMC7737788.

Piletz JE, Aricioglu F, Cheng JT, Fairbanks CA, Gilad VH, Haenisch B, Halaris A, Hong S, Lee JE, Li J, Liu P, Molderings GJ, Rodrigues AL, Satriano J, Seong GJ, Wilcox G, Wu N, Gilad GM. Agmatine: clinical applications after 100 years in

translation. *Drug Discov Today*. 2013 Sep;18(17-18):880-93. doi: 10.1016/j.drudis.2013.05.017. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23769988.

Portal de medicina da USP. Depressão infantil: como identificar o transtorno em crianças e adolescentes?. Disponível em: <https://hcxfmusp.org.br/portal/online/depressao-infantil/>. Acesso em: 24 nov. 2024

RBVI UCSF. Projects. UCSF Chimera. Disponível em: <https://www.cgl.ucsf.edu/Overview/index.html>. Acesso em: 10 nov. 2024

Roohi E, Jaafari N, Hashemian F. On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos? *J Neuroinflammation*. 2021 Feb 16;18(1):45. doi: 10.1186/s12974-021-02100-7. PMID: 33593388; PMCID: PMC7884972.

Sanwald S, Widenhorn-Müller K, Schönfeldt-Lecuona C; GenEmo Research Group; Montag C, Kiefer M. Factors related to age at depression onset: the role of SLC6A4 methylation, sex, exposure to stressful life events and personality in a sample of inpatients suffering from major depression. *BMC Psychiatry*. 2021 Mar 25;21(1):167. doi: 10.1186/s12888-021-03166-6. Erratum in: *BMC Psychiatry*. 2021 Apr 29;21(1):220. doi: 10.1186/s12888-021-03215-0. PMID: 33765975; PMCID: PMC7995700.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003 Nov;13(11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303. PMID: 14597658; PMCID: PMC403769.

Stierschneider A, Wiesner C. Shedding light on the molecular and regulatory mechanisms of TLR4 signaling in endothelial cells under physiological and inflamed conditions. *Front Immunol*. 2023 Nov 24;14:1264889. doi: 10.3389/fimmu.2023.1264889. PMID: 38077393; PMCID: PMC10704247.

Verli, Hugo. *Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular / Organização de Hugo Verli*. - 1. ed. - São Paulo : SBBq, 2014.

Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 1995 Feb;8(2):127-34. doi: 10.1093/protein/8.2.127. PMID: 7630882.

Yin J, Chen KM, Clark MJ, Hijazi M, Kumari P, Bai XC, Sunahara RK, Barth P, Rosenbaum DM. Structure of a D2 dopamine receptor-G-protein complex in a lipid membrane. *Nature.* 2020 Aug;584(7819):125-129. doi: 10.1038/s41586-020-2379-5.

Yue N, Huang H, Zhu X, Han Q, Wang Y, Li B, Liu Q, Wu G, Zhang Y, Yu J. Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation.* 2017 May 10;14(1):102. doi: 10.1186/s12974-017-0865-y. PMID: 28486969; PMCID: PMC5424302.

Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues ALS. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport.* 13(4):387-391, 2002. doi: 10.1097/00001756-200203250-00005.

Zomkowski AD, Santos AR, Rodrigues ALS. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett.* 381(3):279-283, 2005. doi: 10.1016/j.neulet.2005.02.026.

Zomkowski AD, Oscar Rosa A, Lin J, Santos AR, Calixto JB, Rodrigues ALS. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res.* 1023(2):253-263, 2004. doi: 10.1016/j.brainres.2004.07.041.