

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO  
ANTIDEPRESSIVO DO 2-BFI, LIGANTE  
IMIDAZOLÍNICO I<sub>2</sub>, EM CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Raquel Tonello**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIDEPRESSIVO  
DO 2-BFI, LIGANTE IMIDAZOLÍNICO I<sub>2</sub>, EM  
CAMUNDONGOS**

**Raquel Tonello**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), para o requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-Orientador: Juliano Ferreira**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tonello, Raquel  
Avaliação do potencial efeito antidepressivo do 2-BFI,  
ligante imidazolinico I2, em camundongos / Raquel  
Tonello.-2012.  
62 p.; 30cm

Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Coorientador: Juliano Ferreira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, RS, 2012

1. Depressão 2. Sítios Imidazolinicos I2 3. Monoamina  
Oxidase A I. Rubin, Maribel Antonello II. Ferreira,  
Juliano III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO 2-BFI,  
LIGANTE IMIDAZOLÍNICO I<sub>2</sub>, EM CAMUNDONGOS**

elaborada por  
**Raquel Tonello**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



\_\_\_\_\_  
Maribel Antonello Rubin, Dr<sup>a</sup>  
(Presidente/ Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Roselei Fachinnetto, Dr<sup>a</sup> (UFSM)



\_\_\_\_\_  
Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr<sup>a</sup> (UFSM)

**Santa Maria, 02 de março de 2012.**

## AGRADECIMENTOS

A vida é feita de caminhos, como se fosse uma gigantesca variedade de direções. Podemos decidir qual direção tomar e passo a passo trilhar o nosso caminho. Durante este caminho encontramos muitas pessoas, algumas delas seguem conosco nesta caminhada, outras, permanecem por um curto período de tempo ao nosso lado, mas deixam sempre um aprendizado. A estas pessoas que de alguma forma fazem parte da minha caminhada (que está só começando) minha sincera gratidão.

Inicialmente agradeço a Deus, que sempre está a meu lado e guia meus passos para seguir o melhor caminho. Em especial, agradeço aos meus pais, Neuri e Resinha, que estiveram comigo desde o início da minha caminhada. Obrigada pelo incentivo, pelo apoio para seguir em frente, além do amor e paciência. Também agradeço aos meus irmãos, Augusto e Ismael, pelo carinho, amizade e compreensão.

Aos mestres, que me ajudam a trilhar o caminho do conhecimento, também gostaria de manifestar a minha gratidão. À professora Maribel Antonello Rubin, pela oportunidade de fazer parte do grupo LabNeuro, pela orientação, dedicação e amizade. Obrigada! Ao professor Juliano Ferreira, meu co-orientador, agradeço pela confiança, empenho, amizade e principalmente pelos ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento.

Agradeço a todos os colegas do LabNeuro que tornam minha caminhada mais leve. Por dividirem os dias comigo, pela amizade, cumplicidade, ajuda e pelos momentos alegres que vivenciamos juntos. Em especial gostaria de lembrar os que participaram como colaboradores deste trabalho, Gabriela Sant'Anna, Gabriela Trevisan, Jardel e Lídia, e os que estiveram sempre ao meu lado Cristiani e Mateus.

Também agradeço aos professores da banca, Roselei Fachineto e Maria Rosa Chitolina Schetinger, por avaliarem este trabalho; à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

*“Ando devagar porque já tive pressa,  
E levo esse sorriso, porque já chorei demais.  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe,  
Só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei.”*

Almir Sater

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO 2-BFI, LIGANTE IMIDAZOLÍNICO I<sub>2</sub>, EM CAMUNDONGOS.**

AUTORA: RAQUEL TONELLO

ORIENTADOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

CO-ORIENTADOR: JULIANO FERREIRA

Local e data da Defesa: Santa Maria, 02 de março de 2012.

A depressão é uma doença psiquiátrica complexa, crônica e incapacitante, que acarreta um alto custo social. Dentre as diversas classes de antidepressivos encontram-se os inibidores da monoamina oxidase-A (MAO-A), que reduzem o metabolismo das monoaminas. Um sítio importante para a regulação da MAO-A é o sítio imidazolínico I<sub>2</sub>. Recentemente, foi demonstrado que derivados 2-imidazolínicos, como o 2-BFI, mostram boa potência e seletividade em inibir a atividade *in vitro* da MAO em cérebro de ratos, porém o potencial antidepressivo deste composto e seu mecanismo de ação não foram bem definidos. Com base nisso, o objetivo desse trabalho consiste em investigar o efeito tipo-antidepressivo do 2-BFI em camundongos. Para este propósito, foram avaliados os efeitos do 2-BFI em dois testes preditivos de atividade antidepressiva em animais, o teste de suspensão da cauda (TSC) e o teste do nado forçado (TNF). O TSC também foi empregado após o uso de antagonistas específicos de diferentes receptores envolvidos na depressão. O 2-BFI (100 e 300 µmol/kg, s.c.) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC, sem alterar a atividade locomotora no teste de campo aberto. A redução do tempo de imobilidade de 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) foi confirmada com o TNF. O efeito tipo-antidepressivo do 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) no TSC foi prevenido pelo pré-tratamento com idazoxan (0,4 µmol/kg, i.p., um antagonista do sítio I<sub>2</sub>), metisergida (4 µmol/kg, i.p., um antagonista não-seletivo dos receptores serotoninérgicos) e haloperidol (0,1 µmol/kg, i.p., um antagonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos). O efeito ansiolítico do 2-BFI também foi avaliado, utilizando o teste de labirinto em cruz elevado. O 2-BFI (300 µmol/kg, s.c.) aumentou significativamente a % do número de entradas e a % do tempo gasto nos braços abertos, indicando que ele possui um efeito ansiolítico em altas doses. Em conclusão, estes resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo de 2-BFI pode estar envolvido com os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e imidazolínico, e assim o sítio imidazolínico poderia representar um novo alvo farmacológico para o tratamento da depressão.

Palavras chaves: 2-BFI, Depressão, Sítio imidazolínico I<sub>2</sub>, Monoamina oxidase – A, teste de suspensão da cauda

**ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Graduating Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria

**EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF  
IMIDAZOLINE I<sub>2</sub> 2-BFI IN MICE.**

AUTHOR: RAQUELTONELLO

ADVISOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

CO-ADVISOR: JULIANO FERREIRA

Place and date: Santa Maria, March, 02<sup>nd</sup>, 2012.

Depression is a complex, chronic and disabling psychiatric disease that carries a high social cost. Among the various classes of antidepressants are the monoamine oxidase A (MAO-A) inhibitors that reduce monoamine metabolism. An important site of MAO-A regulation is the imidazoline-2 binding site (I<sub>2</sub>). In fact, it was recently shown that 2-imidazoline derivatives, such as 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI), showed good potency and selectivity in inhibiting *in vitro* the activity of MAO-A, but the antidepressant potential of this compound and its mechanism of action have not been well defined. Therefore, in this study we investigated the antidepressant-like effect of 2-BFI in mice. For this purpose, we evaluated the effects of 2-BFI in two predictive tests of antidepressant-like activity in animals, the tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). The TSC was utilized after the use of specific antagonists of different receptors involved in depression. 2-BFI (100 and 300 µmol/kg, s.c.) significantly reduced the immobility time on the tail suspension test (TST) without changing locomotion in the open field test. The reduced the immobility time of 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) was confirmed with the forced swimming test (FST). The antidepressant-like effect of 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) in the TST was prevented by pretreatment with idazoxan (0.4 µmol/kg, i.p., a I<sub>2</sub> site antagonist), methysergide (4 µmol/kg, i.p., a non-selective serotonergic receptor antagonist) and haloperidol (0.1 µmol/kg, i.p., a non-selective dopaminergic receptor antagonist). The anxiolytic effect of 2-BFI was also evaluated, using the elevated plus-maze test. 2-BFI (300 µmol/kg, s.c.) was able to significantly increase the % of number of entries and the % of time spent in the open arms, indicating that it possesses an anxiolytic effect at high doses. In conclusion, these results suggest that the antidepressant-like effect of 2-BFI might involve serotonergic, dopaminergic and imidazoline systems, and then the imidazoline site could represent a new pharmacological target for the treatment of depression.

**Key words:** 2-BFI, depression, I<sub>2</sub> imidazoline site, monoamine oxidase - A, tail suspension test.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Estrutura da MAO-A (A; monômero) e da MAO-B (B; dímero) humanas. Cter: porção C-terminal; Nter: porção N-terminal; domínio do substrato (vermelho); domínio flavina (azul); grupamento flavina em amarelo representando o domínio de ligação dos inibidores clássicos; domínio de membrana (verde) (EDMONDSON et al., 2007).....29

**Figura 2-** Fórmula estrutural do 2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1*H*-imidazol (2-BFI) (SANT'ANNA, 2008).....39

### ARTIGO

**Fig. 1-** Effect of 2-BFI administration on immobility time in the TST and in the FST in mice. (A) Time-course curve of 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. (B) Dose-response curve of 2-BFI (30-300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. (C) 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) on immobility time in the FST. The values are means  $\pm$  SEM (n=6-8 animals in each group). \*P<0.01 compared with the respective vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni test (A), one-way ANOVA followed by SNK (B) or Student's t-test (C).....44

**Fig. 2-** Effect of pretreatment of mice with idazoxan (0.4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; A), methysergide (4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; B) and haloperidol (0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; C) on the anti-immobility effect of 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. The values are means  $\pm$  SEM (n=7-11 animals in each group). \*p<0.05 compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni test.....45

**Fig. 3-** Effects of diazepam (7  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), 2-BFI (100 and 300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) or vehicle on the % of number of entries (A) and the % of time spent (B) in the open arms by mice submitted to a 5-min test in the elevated plus maze. The values are means  $\pm$  SEM (n=10 animals in each group). \*p<0.05 or \*\*p<0.01 compared with the vehicle group; one-way ANOVA followed by SNK.....45

## LISTA DE TABELA

<b>Table 1-</b> Effects of vehicle or 2-BFI (100 or 300 $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) treatment and 2-BFI (100 $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) plus idazoxan (0.4 $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), methysergide (4 $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or haloperidol (0.1 $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) co-treatment on the number of crossing in open-field test and fall latency and number of falls in rota-rod test in mice.....	45
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADT</b>	Antidepressivo tricíclico
<b>FNDC</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BU224</b>	2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-quinolina
<b>BU226</b>	2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-isoquinolina
<b>CaMKII</b>	Cálcio calmodulina cinase II
<b>SDC</b>	Sustância deslocadora de clonidina
<b>CREB</b>	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
<b>DA</b>	Dopamina
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>FAD</b>	Dinucleotídeo de flavina-adenina
<b>GSK-3</b>	Glicogênio sintase cinase 3
<b>HHA</b>	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>I<sub>2</sub>BS</b>	Sítio de ligação imidazólico tipo I <sub>2</sub>
<b>IGRSs</b>	Sítios receptivos à substâncias imidazólicas e guanidínicas
<b>IMAO</b>	Inibidor da monoaminas oxidase
<b>MAO</b>	Monoamina oxidase
<b>MAO-A</b>	Monoamina oxidase tipo A
<b>MAO-B</b>	Monoamina oxidase tipo B
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno
<b>PKA</b>	Proteína cinase A
<b>PKB</b>	Proteína cinase B

<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TDM</b>	Transtorno Depressivo Maior
<b>TEC</b>	Terapia eletroconvulsivante
<b>TNF</b>	Teste do nado forçado
<b>2-BFI</b>	2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol
<b>5-TH</b>	Serotonina

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1. Objetivo Geral .....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1. Depressão .....	22
3.1.1. Tratamento da depressão .....	23
3.2. Teoria Monoaminérgica da Depressão .....	25
3.3. Monoamino Oxidase .....	28
3.3.1. Inibidores da MAO .....	30
3.4. Sítios Imidazolínicos .....	32
3.5. Sítios Imidazolínicos I <sub>2</sub> .....	34
3.6. Sítios Imidazolínicos I <sub>2</sub> e Depressão .....	37
3.7. 2-BFI - 2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1 <i>H</i> -imidazol .....	38
<b>4. ARTIGO</b> .....	41

<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## APRESENTAÇÃO

Na introdução desta dissertação estão brevemente descritos os temas abordados neste trabalho. A revisão bibliográfica apresenta diferentes visões para um maior entendimento do tema desta dissertação. Os Materiais e Métodos, Resultados e Discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo publicado na revista científica *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. Os itens conclusões e referências bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

As referências bibliográficas referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução e revisão de literatura desta dissertação.

## 1. INTRODUÇÃO

---



## 1. Introdução

A depressão é uma doença psiquiátrica crônica e recorrente que atinge em torno de 20% da população mundial (BERTON & NESTLER, 2006), sendo as mulheres duas vezes mais acometidas do que homens. A incidência ao longo da vida é de 13% para homens e pode chegar até 25% nas mulheres (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). É uma neuropatologia heterogênea, que inclui sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (NESTLER et al., 2002).

A principal hipótese postulada para explicar a fisiopatologia da depressão é a hipótese das monoaminas, segundo a qual há uma deficiência na neurotransmissão monoaminérgica (serotonina, noradrenalina e dopamina) no cérebro de pacientes depressivos (BELMAKER & AGAM, 2008). Apesar de a hipótese monoaminérgica ser a mais estudada, outras hipóteses têm sido postuladas, as quais envolvem outros sistemas de neurotransmissores, como os sistemas glutamatérgico, opióide, gabaérgico, colinérgico e dopaminérgico. Além disso, a depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (PERERA et al., 2007; PITTENGER & DUMAN, 2008). Contudo, apesar de haver inúmeros fármacos antidepressivos no mercado, todos exercem seus efeitos farmacológicos via modulação da neurotransmissão monoaminérgica, em particular nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (WONG & LICINIO, 2004; BERTON & NESTLER, 2006). Alguns estudos também sugerem que os receptores dopaminérgicos desempenham um papel fundamental na resposta biológica aos tratamentos antidepressivos (ROGOZ & DZIEDZICKA-WASYLEVSKA, 1999).

Os níveis destes neurotransmissores monoaminérgicos nos tecidos neuronais são regulados pela monoamina oxidase (MAO; EC 1.4.3.4). A MAO é a enzima responsável pela desaminação oxidativa de diversas aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (SHIH et al., 1999). Segundo Jonhston (1968), a MAO consiste em um sistema binário de enzimas, designadas MAO-A e MAO-B, que se distinguem pela sua seletividade a substratos e inibidores, e distribuição tecidual. Devido à sua função no metabolismo desses neurotransmissores, a MAO parece exercer um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas. De fato, os inibidores da MAO

(IMAOs) foram os primeiros fármacos antidepressivos descritos e continuam sendo utilizados até hoje com grande sucesso (BERTON & NESTLER, 2006). Logo, a diminuição da neurotransmissão monoaminérgica, relacionada à depressão, faz dos inibidores da MAO-A agentes terapêuticos potenciais para serem utilizados no tratamento deste distúrbio afetivo (BERTON & NESTLER, 2006). Além de relacionados com a depressão, os IMAOs também podem possuir propriedades ansiolíticas, que foi relatado em estudos com pacientes com ansiedade e em diferentes modelos animais relacionados a este tipo de transtorno (VERSIANI et al., 1992; DE ANGELIS, 1996; EROGLU & GÜVEN, 1998).

Na década de 90, foi identificado um sítio regulatório da MAO, chamado de sítio de ligação imidazólico tipo I<sub>2</sub> (I<sub>2</sub>BS) (TESSON et al., 1995; RADDATZ et al., 1995). A maior característica destes sítios é a sua alta afinidade para uma série de compostos com grupamentos imidazólicos. Além disso, este sítio é distinto do sítio catalítico da enzima (TESSON et al., 1995) e independe do grupo prostético FAD, ou do domínio de ligação de inibidores clássicos da MAO (RADDATZ et al., 1995; CARPENÉ et al., 1995; LIMON-BOULEY et al., 1996). Estudos demonstram que diversos ligantes imidazólicos I<sub>2</sub> são capazes de inibir a atividade da MAO (RAASCH et al., 1999; JONES et al., 2007), como é o caso dos compostos 2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1H-imidazol (2-BFI) e 2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-quinolina (BU224) que inibem a enzima de maneira não-seletiva. Provavelmente por esta ação inibitória sobre MAO-A, ligantes seletivos para os sítios I<sub>2</sub>, possam apresentar propriedades antidepressivas (FINN et al., 2003).

Recentemente, foi demonstrado que derivados 2-imidazólicos mostram boa potência e seletividade em inibir a atividade *in vitro* da MAO em cérebro de ratos (SANT'ANNA et al., 2009). Dentre estes compostos, o 2-BFI exibe uma ótima potência em inibir reversivelmente a atividade *in vitro* da MAO-A (LALIES et al., 1999; SANT'ANNA et al., 2009) e apresenta um efeito tipo antidepressivo (TAKSANDE et al., 2009). Porém, este efeito antidepressivo não está bem esclarecido, visto que existem resultados contraditórios mostrando que ligantes imidazólicos I<sub>2</sub> não apresentam atividade tipo antidepressiva (O'NEILL et al., 2001).

Assim, devido à existência de poucos trabalhos relatando os efeitos antidepressivos do 2-BFI, torna-se interessante a realização de estudos utilizando

modelos de depressão, como também a verificação do mecanismo de ação pelo qual este composto atua.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o possível efeito tipo-antidepressivo do derivado 2-imidazólico, 2-BFI, bem como seu mecanismo de ação em camundongos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1. Avaliar o potencial efeito tipo-antidepressivo do 2-BFI no teste de suspensão da cauda e no teste do nado forçado em camundongos.

2.2.2. Estudar o envolvimento do 2-BFI com o sítio imidazólico e receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos utilizando o teste de suspensão da cauda em camundongos.

2.2.3. Examinar os efeitos do 2-BFI sobre a ansiedade utilizando-se o labirinto em cruz elevado.

2.2.4. Verificar os efeitos do 2-BFI sobre a função locomotora utilizando-se o cilindro giratório e o campo aberto.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Depressão

A depressão é uma doença heterogênea, que inclui sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. Esta é uma neuropatologia que atinge em torno de 20% da população mundial (BERTON & NESTLER, 2006), sendo as mulheres duas vezes mais acometidas do que os homens. A incidência ao longo da vida é de 13% para homens e pode chegar até 25% para mulheres (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Estima-se que no Brasil aproximadamente 54 milhões de pessoas terão algum tipo de depressão em algum momento de suas vidas, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos ou graves, muitas vezes com risco de suicídio (NARDI, 2000). A depressão é uma doença afetiva considerada a segunda principal causa de incapacidade no mundo, superada apenas pelas doenças isquêmicas do coração (NEMEROFF & OWENS, 2002).

A depressão é definida como um distúrbio afetivo (distúrbio de humor), que pode variar de uma afecção muito leve, beirando a normalidade, à depressão grave (psicótica), acompanhada por alucinações e delírios (RANG & DALE, 2007). A depressão é conhecida como uma síndrome clínica ou comportamental, normalmente chamada de Transtorno Depressivo Maior (TDM). Quando o TDM ocorre em indivíduos que também possuem histórico de episódios de mania, isso é chamado de Transtorno Bipolar (anteriormente chamada de doença maniaco-depressiva) (FAVA & KENDLER, 2000).

Diferente da depressão, a tristeza caracteriza-se por um estado de humor transitório experimentado por praticamente todos os indivíduos em algum momento de sua vida, diante de situações adversas como perda, derrota e desapontamentos (DURÀ-VILÀ et al., 2011).

De acordo com o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, quarta edição (DSM-IV), o TDM se caracteriza por episódios isolados ou recorrentes de humor deprimido ou perda do interesse por quase todas as atividades habituais num período superior a duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Os indivíduos também apresentam sintomas adicionais que incluem alterações neurovegetativas sobre o apetite, peso, sono, libido, diminuição da

energia e mudança no nível habitual da atividade psicomotora. Sintomas de ordem cognitiva são expressos através do relato de sentimentos injustificados de culpa, ideação ou plano suicida, pensamentos obsessivos sobre morte, dificuldades de concentração e memória prejudicada. Na esfera somática podem estar presentes sintomas dolorosos como cefaleias e dores musculares (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000; FAVA & KENDLER, 2000; WISE et al., 2007; GOODWIN, 2006).

O diagnóstico do TDM só é feito quando os sintomas promovem prejuízo significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo. Em muitos casos, a depressão não tem uma causa clínica identificável. Entretanto, existem fatores genéticos, fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e ambientais associados ao episódio depressivo (NESTLER et al., 2002; BERTON & NESTLER, 2006). Estudos epidemiológicos mostraram que aproximadamente 40-50% dos riscos de depressão são genéticos (SANDERS et al., 1999; FAVA & KENDLER, 2000). Isso faz da depressão uma doença hereditária, como diversas patologias complexas comuns (diabetes tipo II, hipertensão, asma, certos tipos de câncer, etc...). Ainda assim, a busca por genes específicos que confere este risco tem sido frustrante, sem anormalidades genéticas identificadas até o momento (NESTLER et al., 2002; LANNI et al., 2009). Dentre os fatores ambientais que influenciam na etiologia da depressão incluem-se, fatores pré-natais, perdas, estresse, desastres naturais, guerras, nutrição, efeitos de medicamentos e doenças (WONG & LICINIO, 2001). Assim, a depressão não deve ser vista como uma doença única, mas uma síndrome heterogênea composta de inúmeras doenças de causas e fisiopatologias distintas.

### **3.1.1. Tratamento da Depressão**

Existem diversos tipos de tratamento para indivíduos com depressão. A maioria das pessoas depressivas apresenta melhora com o uso de fármacos antidepressivos ou com a terapia eletroconvulsivante (TEC) (NESTLER et al., 2002). Apesar de muito eficaz, o uso da TEC é na maior parte limitada a pacientes com TDM que são altamente resistentes ao tratamento (FAVA & KENDLER, 2000). Além disso, diversas formas de psicoterapia (terapia cognitiva e comportamental) podem



ser eficazes para pacientes com depressão branda a moderada. A psicoterapia apresenta resultado positivo na forma de tratamento único para casos leves ou, em combinação com antidepressivos pode exercer efeito sinérgico, em casos moderados a graves de depressão (WONG & LICINIO, 2001; NESTLER et al., 2002).

O tratamento farmacoterápico da depressão revolucionou a forma como ela é atualmente entendida e deu início à era moderna da pesquisa neurobiológica nesta área. A imipramina (antidepressivo tricíclico (ADT)) foi descoberta por seu efeito antidepressivo em pacientes que a utilizavam como anti-histamínico e a iproniazida (inibidor da enzima monoamina oxidase (IMAO)) no tratamento de tuberculosos há pouco mais de meio século atrás (NESTLER et al., 2002). O mecanismo de ação dos ADTs baseia-se na inibição da recaptação de serotonina (5-HT) e noradrenalina. Já os IMAO, tem como função inibir a enzima monoamina oxidase (MAO) (principal enzima responsável pelo catabolismo de neurotransmissores monoaminérgicos) (BERTON & NESTLER, 2006). Assim, a descoberta de que a depressão poderia ser tratada com estes medicamentos ajudou na compreensão sobre neurotransmissores e seus receptores. Além disso, forneceu informações sobre os tipos de mudanças químicas no cérebro que regulam os sintomas depressivos.

Essas descobertas levaram ao desenvolvimento de medicamentos de segunda geração: os inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, como a venlafaxina e a duloxetina; os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, como a fluxetina e o citalopram e os inibidores da recaptação de noradrenalina, como a atomoxetina e a reboxetina, que são amplamente utilizados atualmente (NESTLER et al., 2002; BERTON & NESTLER, 2006). A nova geração de antidepressivos é claramente superior aos antigos ADTs e IMAO em termos de tolerância, a overdose não é letal e não ocorrem efeitos adversos cardíacos (NEMEROFF e OWENS, 2002).

Os antidepressivos são na verdade um grupo heterogêneo de drogas que agem principalmente aumentando a disponibilidade das monoaminas na fenda sináptica. Assim, a compreensão de sua farmacologia forneceu meios para o estudo da hipótese monoaminérgica da depressão (WONG & LICINIO, 2004).

Contudo, todos estes medicamentos precisam ser usados durante algumas semanas pelo paciente para que a sua ação antidepressiva comece a se manifestar.

E, mais importante, menos de 50% de todos os pacientes com depressão apresentam completa remissão com o tratamento (BERTON & NESTLER, 2006). Desta forma, ainda há uma grande necessidade de estudos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, de rápida ação e mais seguros para a depressão.

### **3.2. Teoria Monoaminérgica da Depressão**

Durante vários anos a depressão foi considerada como tendo uma origem neuroquímica e apesar de esta neuropatologia ser tratada há três décadas, apenas recentemente a compreensão sobre os mecanismos de ação dos antidepressivos tem registrado maiores avanços (MANJI et al., 2001; TAYLOR et al., 2005).

A principal hipótese postulada para explicar a fisiopatologia da depressão é a teoria monoaminérgica, segundo a qual há uma deficiência na transmissão de monoaminas (noradrenalina, dopamina (DA) e 5-HT) no sistema nervoso central (SNC) de pacientes depressivos (BELMAKER & AGAM, 2008). Estas conclusões foram baseadas em observações de que vários antidepressivos são capazes de aumentar as concentrações sinápticas de noradrenalina e/ou 5-HT, através do bloqueio do transportador de monoaminas pré-sináptico, que remove o neurotransmissor liberado do espaço extracelular; ou pela inibição da enzima MAO, responsável pela degradação das monoaminas neurotransmissoras; ou ainda, através da inibição ou excitação de receptores pré e pós-sinápticos que regulam a liberação das monoaminas (NEMEROFF & OWENS, 2002).

Além da redução sináptica das monoaminas, foi descoberto que alterações estruturais ou funcionais dos receptores pré e pós-sinápticos para estas substâncias contribuem para o desenvolvimento do quadro depressivo e suas variantes (BELMAKER & AGAM, 2008).

Em particular, o papel da serotonina na depressão tem sido extensivamente estudado, em parte devido aos efeitos terapêuticos da maioria dos antidepressivos tais como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (OWENS & NEMEROFF, 1994). Estudos post-mortem têm mostrado tanto um aumento na densidade dos sítios de ligação do receptor de serotonina 5-HT<sub>2</sub>, como uma diminuição do número de sítios de ligação do transportador de 5-HT no tecido cerebral de pacientes com depressão e vítimas de suicídio (OWENS & NEMEROFF,

1994), bem como um aumento dos autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> na rafe dorsal do mesencéfalo de vítimas de suicídio com TDM (STOCKMEIER et al., 1998). Esta evidência *post-mortem* da diminuição da atividade serotoninérgica na depressão é apoiada por resultados de estudos de imagens que evidenciaram redução generalizada na ligação do autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> por tomografia de emissão de pósitrons (SARGENT et al., 2000) e uma redução na densidade de sítios de ligação do transportador de 5-HT cerebral, em pacientes deprimidos, por tomografia computadorizada de emissão de um único fóton (MALISON et al., 1998). Desta maneira, estes dados reforçam a relação entre o sistema serotoninérgico e a depressão.

Outros neurotransmissores também têm sido investigados. Estudos *post-mortem* mostraram uma diminuição da ligação de transportadores de noradrenalina no *locus coeruleus* de pacientes deprimidos (KLIMEK et al., 1997). Este achado foi interpretado como um down-regulation compensatório desta proteína transportadora em resposta a uma disponibilidade insuficiente de noradrenalina na sinapse (KLIMEK et al., 1997). Além disso, uma sensibilidade intensificada do  $\alpha_2$ -adrenoreceptor, que modula a liberação de noradrenalina por feedback inibitório, tem sido descrita em pacientes com depressão, o que sugere uma redução da liberação de noradrenalina em casos de depressão (ORDWAY et al., 2003).

Além do envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico na fisiopatologia da depressão, estudos em humanos e animais sugerem uma relação entre a transmissão de DA no SNC e a depressão (DAILLY et al., 2004). Em estudos com pacientes deprimidos, foi observada uma up-regulation compensatória na densidade do receptor de dopamina D<sub>2</sub> nos gânglios da base e cerebelo se comparado com indivíduos saudáveis (D'HAENEN & BOSSUYT, 1994). Surpreendentemente, um aumento da regulação do transportador de dopamina, o que resulta em uma forma mais eficaz de recaptação de DA para os neurônios pré-sinápticos, foi encontrado em pacientes com depressão (LAASONEN-BALK et al., 1999). Porém o esperado seria uma down-regulation do transportador de dopamina em pacientes com depressão para compensar a deficiência de transmissão dopaminérgica. Os autores explicam este resultado inesperado através da alteração do transportador dopaminérgico, sendo um mecanismo compensatório primário e que levaria a baixa concentração de DA na fenda sináptica. Além disso, o papel da

deficiência de DA na depressão é sugerido pela frequência de casos de depressão em pacientes com doença de Parkinson, doença que se caracteriza por uma depleção de DA no SNC (BELMAKER & AGAM, 2008).

Apesar de tais evidências corroborarem com o envolvimento do sistema serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico na depressão, a hipótese monoaminérgica não explica a falta de correlação temporal entre os eventos bioquímicos rápidos (efeito agudo dos antidepressivos) que aumentam as monoaminas na fenda sináptica e o início tardio dos efeitos clínicos do tratamento com antidepressivos. Contudo, apesar de haver inúmeros fármacos antidepressivos no mercado, todos exercem seus efeitos farmacológicos via modulação monoaminérgica, em particular nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (WONG & LICINIO, 2004; BERTON & NESTLER, 2006).

Além do sistema monoaminérgico, outros sistemas parecem estar envolvidos na fisiopatologia da depressão, como o sistema glutamatérgico (PETRIE et al., 2000), o sistema opióide (GABILONDO et al., 1995), o sistema gabaérgico (NAKAGAWA et al., 1996), o sistema colinérgico (JANOWSKY & OVERSTREET, 1995), os canais de potássio (GALEOTTI et al., 1999) e os canais de cálcio (GALEOTTI et al., 2006). Além disso, a depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (cálcio calmodulina cinase II (CaMKII), proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/cinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (FNDc), proteína antiapoptótica Bcl<sub>2</sub>, glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) e proteína cinase B (PKB)) (PERERA et al., 2007; PITTENGER & DUMAN, 2008). Ainda, podem estar envolvidos o aumento do estresse oxidativo (BILICI et al., 2001; KANARIK et al., 2008; LUCCA et al., 2009), a liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune (DUNN et al., 2005), o aumento dos níveis plasmáticos dos glicocorticoides e a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (PERERA et al., 2007; PITTENGER & DUMAN, 2008), com aumento tanto da hipófise como das glândulas adrenais (GOLD et al., 1996; HOLSBOER & BARDEN, 1996).

No entanto, é evidente que o desenvolvimento da teoria monoaminérgica tem sido de grande importância para a compreensão da fisiopatologia da depressão e no

desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes para o seu tratamento (LANNI et al., 2009). Sendo a MAO um dos alvos terapêuticos importantes para o tratamento deste distúrbio afetivo (BERTON & NESTLER, 2006), visto que, em tecidos neuronais, a MAO participa na regulação dos níveis de neurotransmissores monoaminérgicos e regula os estoques intracelulares de monoaminas.

### 3.3. Monoamina Oxidase

A MAO (E.C: 1.4.3.4) é uma flavoproteína localizada na membrana externa da mitocôndria em neurônios, glia e outras células. Ela é uma enzima que utiliza o dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD) como cofator e catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como monoaminas neurotransmissoras (5-HT, noradrenalina, DA) e neuromoduladoras ( $\beta$ -feniletilamina), assim como monoaminas bioativas exógenas (tiramina) (SHIH et al., 1999).

Baseado nas evidências de estudos conduzidos com vários inibidores, Jonhston (1968) conclui que a MAO consiste de um sistema binário de enzimas, designadas MAO-A e MAO-B (Figura 1). Estas duas isoformas da MAO distinguem-se pela sua seletividade a substratos e inibidores, e distribuição tecidual. A MAO-A é inibida irreversivelmente por baixas concentrações de clorgilina e catalisa preferencialmente a oxidação de 5-HT (FOWLER et al., 1982), enquanto MAO-B é inativada irreversivelmente por baixas concentrações de selegilina (L-Deprenil) e preferencialmente oxida a  $\beta$ -feniletilamina e a benzilamina (KNOLL & MAGYAR, 1972). As aminas DA, noradrenalina, adrenalina, triptamina e tiramina são oxidadas por ambas as isoformas da enzima na maioria das espécies (YOU DIM et al., 2006).

Contudo, existem diversas exceções, pois a especificidade da MAO por seu substrato depende da concentração, da afinidade e da taxa de renovação do substrato e da concentração da enzima, assim como da espécie analisada (SHIH et al., 1999). Por exemplo, apenas a MAO-A está envolvida no metabolismo da DA em cérebro de rato, enquanto que ambas MAO-A e MAO-B podem contribuir para o metabolismo da DA no cérebro humano (YOU DIM et al., 2006). Já no estriado de camundongo, a DA é metabolizada apenas pela MAO-A em condições basais, mas por ambas as isoformas quando em altas concentrações (FORNAI et al., 1999).

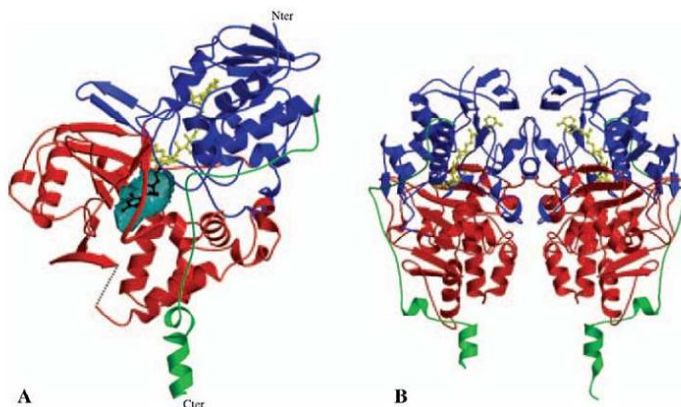


Figura 1 – Estrutura da MAO-A (A; monômero) e da MAO-B (B; dímero) humanas. Cter: porção C-terminal; Nter: porção N-terminal; domínio do substrato (vermelho); domínio flavina (azul); grupamento flavina em amarelo representando o domínio de ligação dos inibidores clássicos; domínio de membrana (verde) (EDMONDSON et al., 2007).

A distribuição da MAO no cérebro apresenta pequenas variações entre as espécies. A MAO-A, predominantemente, é encontrada em regiões com alta densidade de neurônios catecolaminérgicos como locus coeruleus, substância nigra e regiões periventriculares do hipotálamo. Em contraste, a MAO-B é preferencialmente expressa em neurônios serotoninérgicos (células do núcleo dorsal da rafe) e em astrócitos (WESTLUND et al., 1985; SAURA et al., 1996; JAHNG et al., 1997). Em relação a sua distribuição em tecidos periféricos, a MAO varia dentro de um mesmo organismo. Alguns tecidos como plaquetas de humanos ou rim e fígado de bovinos, apresentam maior quantidade de MAO-B (GRIMSBY et al., 1990). Já outros, como o intestino e a placenta humana e a tireóide de bovinos predomina MAO-A (SIVASUBRAMANIAM et al., 2003; NAGATSU, 2004).

Devido à sua função no metabolismo dos neurotransmissores 5-HT, noradrenalina e DA, a MAO parece exercer um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas. Logo, a diminuição da neurotransmissão monoaminérgica relacionada à depressão, faz dos inibidores da MAO-A agentes terapêuticos potenciais para serem utilizados no tratamento deste

distúrbio afetivo (BERTON & NESTLER, 2006). Além disso, Meyer e colaboradores (2006) demonstraram que pacientes com depressão apresentam uma densidade aumentada de MAO-A em diversas regiões do cérebro quando comparados com indivíduos saudáveis. Os autores sugerem que esse aumento na quantidade de MAO-A poderia ser a causa dos baixos níveis de monoaminas encontrados em pacientes deprimidos. De fato, os IMAOs foram os primeiros fármacos antidepressivos descritos e continuam sendo utilizados até hoje com grande sucesso (BERTON & NESTLER, 2006).

### **3.3.1. Inibidores da MAO**

O primeiro IMAO introduzido na clínica foi a iproniazida. Ela foi sintetizada em 1951 como um análogo da isoniazida, uma droga usada no tratamento da tuberculose (SELIKOFF et al., 1952). Mudanças no humor foram observadas durante o tratamento crônico de pacientes com tuberculose que recebiam a iproniazida. Estes efeitos de elevação do humor conduziram a uma triagem clínica em pacientes depressivos, que mostrou uma utilidade clínica da iproniazida como um fármaco antidepressivo (CRANE, 1956).

A partir deste achado, durante os anos 1950 passou-se a desenvolver a primeira geração de IMAOs irreversíveis e não-seletivos (por exemplo, fenelzina e tranilcipromina). Apesar de apresentarem atividade antidepressiva, seu uso acarretava uma série de efeitos colaterais indesejáveis, como crises hipertensivas agudas. Este efeito colateral, chamado de reação do queijo, ocorre quando a tiramina e outras aminas simpatomiméticas, que são encontradas em alimentos fermentados como queijo (DA PRADA et al., 1988), entram na circulação, e potencializam a atividade cardiovascular simpática pela liberação de noradrenalina. Normalmente, estas aminas são metabolizadas pela MAO-A presente no intestino e no fígado. No entanto, com o uso de inibidores irreversíveis, a MAO-A fica constantemente inibida, inviabilizando o metabolismo destas aminas exógenas (YODIM e WEINSTOCK, 2004).

Essas limitações impulsionaram o desenvolvimento dos IMAOs de segunda geração, os quais ainda apresentavam um perfil de atividade irreversível, porém

seletivo para MAO-A (clorgilina) ou MAO-B (selegilina). Contudo, as indesejáveis crises hipertensivas continuavam a limitar o uso dos inibidores seletivos da MAO-A. Além disso, estes inibidores da MAO tendem a perder a seletividade inicial com doses maiores ou com administrações repetidas. Dessa forma, as ações produzidas pelo uso destes compostos podem ter limitações importantes na terapia, como efeitos nervosos centrais (insônia, irritabilidade, agitação, hipomania, supressão do sono REM), disfunções cardiovasculares (hipotensão ortostática), reações hipertensivas graves e distúrbios sexuais (CESURA et al., 1992; STROLIN-BENEDETTI et al., 1992).

Durante os anos 80, uma terceira geração de inibidores da MAO foi desenvolvida: os inibidores seletivos reversíveis. A partir de considerações teóricas, esperou-se que estes inibidores possuíssem alta seletividade ao longo de uma vasta faixa de doses e durante o uso crônico, induzindo mínimos efeitos adversos. O desenvolvimento de inibidores seletivos e reversíveis da MAO propiciou a perda de muitos efeitos colaterais indesejáveis, em nível central e periférico.

Alguns inibidores seletivos da MAO-A com perfil reversível (p. ex. moclobemida) têm sido desenvolvidos na tentativa de fornecer fármacos com um melhor perfil de segurança, uma vez que a ligação reversível do inibidor com a enzima pode ser facilmente rompida na presença de altas concentrações do substrato (tiramina) (ROBINSON, 2002; LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2007). No entanto, estes inibidores ainda desenvolvem outros tipos de reações adversas. No caso da moclobemida, por exemplo, estes efeitos adversos incluem: distúrbios do sono, agitação e dor de cabeça (YAMADA & YASUHARA, 2004).

Outra indicação clínica para utilização de IMAOs, além do tratamento da depressão, é para a ansiedade. A moclobemina e outros inibidores reversíveis da MAO-A, mostraram-se drogas promissoras para o tratamento desta doença (YAMADA & YASUHARA, 2004). De fato, um estudo demonstrou que a moclobemida apresenta uma resposta ansiolítica comparável à da fenzolona e superior ao tratamento placebo em pacientes com fobia social, um tipo de ansiedade (VERSIANI et al., 1992). Estudos em diferentes modelos animais de ansiedade também demonstraram que agentes antidepressivos, incluindo os IMAOs, apresentam propriedades ansiolíticas. De Angelis (1996) relatou que a moclobemida



reduziu significativamente o comportamento aversivo de camundongos para a área iluminada no teste de aversão claro/escuro, o que sugere um efeito tipo-ansiolítico.

Dessa forma, os IMAOs demonstraram serem alternativas terapêuticas importantes para o tratamento de doenças psiquiátricas (como depressão e ansiedade) e neurodegenerativas (como doença de Parkinson). Contudo, estudos continuam buscando novas moléculas, de diferentes classes químicas (ATOMARE et al., 1998; CARRIERI et al., 2002; MANNA et al., 2002; SOUTHAM et al., 2005; CHIMENTI et al., 2006; BERG et al., 2007) capazes de inibir as isoformas da MAO de maneira seletiva, potente, reversível, e ausentes de efeitos adversos. Diante disso, muitos estudos ressaltam uma classe química de compostos que apresenta, em comum, um núcleo imidazólico como tendo um importante papel sobre a atividade da MAO (CARPENÉ et al., 1995; HARTENIST et al., 1996; OZAITA et al., 1997; LALIES et al., 1999; RAASCH et al., 1999; BOUR et al., 2006; GHAZALEH et al., 2007; PATERSON et al., 2007; SANT'ANNA et al., 2009). Embora se acredite que estes compostos não interajam com a enzima da mesma forma que os inibidores clássicos, muitos estudos tratam este grupo de compostos como uma nova ferramenta de inibição da MAO.

### 3.4. Sítios Imidazólicos

A proposta de pesquisa de sítios imidazólicos começou com a descoberta das propriedades hipotensoras de um derivado imidazólico, a clonidina. É descrito que vários compostos com núcleo imidazólico ou guanidínicos podem possuir efeitos farmacológicos via interação com  $\alpha$ -adrenoceptores e sistemas de transporte de íons (TIMMERMANS & VAN ZWIETEN, 1982; CONTIELLO & LANIER, 1989). No entanto, tornou-se evidente que o mecanismo de ação  $\alpha_2$ -adrenérgico para clonidina não explicava completamente o seu efeito hipotensor, e uma hipótese alternativa foi criada envolvendo um receptor específico para a estrutura imidazólica.

Sugeriu-se então a existência de um sítio imidazólico não adrenérgico. Uma das primeiras demonstrações da funcionalidade de sítios imidazólicos foi proposta por Bousquet e colaboradores (1984). Neste estudo, os pesquisadores forneceram evidências de que a ação anti-hipertensiva da clonidina e de outros compostos

imidazolínicos foi devido a suas interações, na medula rostral ventrolateral, com estruturas imidazolínicas, ao invés de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Nos anos subsequentes, a caracterização farmacológica, através de ensaios de ligação específica, veio corroborar com o proposto por Bousquet (BOYAJIAN et al., 1987; ERNSBERGER et al., 1987; WIKBERG, 1989).

Estes sítios de ligação não-adrenérgicos podem ser denominados genericamente como receptores imidazolínicos (ATLAS, 1991), sítios com preferência à imidazolininas (BRICCA et al., 1989), receptores imidazóis (ERNSBERGER et al., 1987) ou sítios receptivos à substâncias imidazolínicas e guanidínicas (IGRSs) (COUPRY et al., 1990). Todavia, não se deve assumir que estes sítios representem receptores, mas sim que eles possam representar proteínas com outras funções, que também possuam regiões de reconhecimento para ligantes imidazolínicos.

Um exame cuidadoso destes sítios sugere que eles são formados por pelo menos três populações, denominadas sítios imidazolínicos  $I_1$ ,  $I_2$  e  $I_3$  (MICHEL & ERNSBERGER, 1992; MORGAN et al., 1995; HEAD & MAYOROV, 2006). Cada família difere nas propriedades de reconhecimento de seus ligantes, na distribuição tecidual, e possivelmente na sua localização dentro da célula. Os sítios  $I_1$  tem uma alta afinidade pela clonidina, encontram-se localizados no cérebro, em membranas plasmáticas celulares e estão associados com o controle da pressão arterial (BOUSQUET et al., 1984); sítios  $I_2$  são caracterizados pelo ligante idazoxan, encontrados predominantemente no cérebro e fígado. Algumas evidências suportam uma associação com a MAO, creatina cinase e enzimas amina oxidases sensíveis a semicarbazida solúveis (TESSON et al., 1995; KIMURA et al., 2003; HOLT et al., 2004). Já a terceira família destes sítios, os sítios imidazolínicos  $I_3$ , estão localizados nas células beta do pâncreas e estudos mostram que estes sítios parecem modular a secreção de insulina dependente de glicose (CHAN et al., 1991; EFENDIC et al., 2002), provavelmente via uma interação com canais de potássio sensíveis a ATP.

Um aspecto interessante na pesquisa de sítios imidazolínicos tem sido a busca por ligantes endógenos. Em 1984, Atlas e colaboradores purificaram parcialmente uma substância do cérebro de mamíferos, a qual deslocava a clonidina de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos e que eles chamaram de CDS. Esta substância também

deslocava ligantes imidazolínicos I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>. Esta molécula foi identificada como sendo a agmatina, uma poliamina encontrada em mamíferos que liga em receptores α<sub>2</sub>-adrenérgicos e sítios imidazolínicos (LI et al., 1994).

No entanto, a agmatina é apenas uma das várias moléculas nativas que podem interagir com sítios imidazolínicos e que são tratadas como possíveis ligantes endógenos destes sítios. Estudos mostraram que certas substâncias chamadas β-carbolinas, como a harmana e harmalina, apresentam muitas das características funcionais associadas com CDS e exibem alta afinidade para sítios de ligação imidazolínicos I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> (HUDSON et al., 1999; HUBBANDS, 2001). Estes achados aliam-se ao fato de que estas β-carbolinas que apresentam alta afinidade também são encontradas endogenamente em tecidos de mamíferos (AIRAKSINEN & KARI, 1981), criando a possibilidade que elas possam representar ligantes endógenos para estes sítios. Outro ligante endógeno que tem sido recentemente caracterizado é o ácido acético imidazol-4-ribotídeo. Este agente também tem sido extraído de SDC, e é considerado ligante dos sítios imidazolínicos I<sub>1</sub> e I<sub>3</sub> (PRELL et al., 2004).

### 3.5. Sítios Imidazolínicos I<sub>2</sub>

O avanço na descoberta de novos ligantes seletivos para sítios imidazolínicos I<sub>2</sub>, proporcionou maior entendimento sobre a função, localização e distribuição destas proteínas. Um destes ligantes tradicionalmente utilizados para caracterizar o sítio imidazolínico I<sub>2</sub> é o [<sup>3</sup>H]-idazoxan, antagonista α<sub>2</sub>-adrenérgico (MICHEL & INSEL, 1989). Posteriormente, foram desenvolvidos novos ligantes com alta afinidade por este sítio, especialmente o 2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1*H*-imidazol (2-BFI) e seus análogos quinolina e isoquinolina, 2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-quinolina (BU224) e 2-(4,5-diidro-imidazo-2-il)-isoquinolina (BU226) (NUTT et al., 1995; LIONE et al., 1998).

Os sítios I<sub>2</sub> podem ser encontrados em uma variedade de espécies animais, por exemplo, coelho (LIONE et al., 1996), rato (LIONE et al., 1998), camundongo (ANDERSON et al., 2006), galinha (DANBURY et al., 1999) e humanos (DE VOS et al., 1994), sendo identificados em diversos órgãos, tecidos e tipos celulares. Em humanos, estes sítios são localizados em alta densidade no SNC, plaquetas, fígado,

adipócitos e em menor quantidade no rim. Estudos utilizando autorradiografia com [<sup>3</sup>H]-idazoxan revelaram alta densidade de sítios imidazolínicos I<sub>2</sub> no córtex, hipocampo, gânglios basais e tronco cerebral no cérebro humano (DE VOS et al., 1991; DE VOS et al., 1994). Em nível subcelular, os sítios imidazolínicos I<sub>2</sub> estão associados à membrana da mitocôndria (TESSON et al., 1991; LIMON-BOULEZ et al., 1992). Embora muito bem distribuído, tanto no cérebro como em tecidos periféricos, os sítios I<sub>2</sub> não são expressos em todos os tecidos (TESSON et al., 1992), mesmo aqueles ricos em mitocôndrias. Assim, nem todas as mitocôndrias dos tecidos expressam sítios I<sub>2</sub>, indicando a variabilidade de alguns órgãos com respeito à localização subcelular. Além disso, estes sítios de ligação possuem natureza heterogênea e são divididos em dois subtipos de I<sub>2</sub>: I<sub>2A</sub>, sensível à amilorida; I<sub>2B</sub>, insensível a amilorida (OLMOS et al., 1999).

A partir da demonstração de que sítios de ligação imidazolínicos I<sub>2</sub> estão presentes na membrana mitocondrial externa (TESSON et al., 1991), muitos estudos geraram evidências de que estes sítios estão relacionados com a MAO. Lanier e colaboradores (1993) revelaram que o peso molecular aparente dos dois subtipos de sítios I<sub>2</sub> (60-61 e 55 kDa) correspondem aos observados para MAO-A e MAO-B. Outra pesquisa mostrou que as duas entidades são co-purificadas usando diferentes procedimentos cromatográficos (TESSON et al., 1991). Além disso, outros estudos corroboram com esta evidência, como o de Tesson e colaboradores (1995), que demonstra que a purificação parcial da sequência de aminoácidos dos sítios I<sub>2</sub> indica homologia com a MAO e também que a expressão da MAO em cultura resulta na geração de sítios I<sub>2</sub>. Ainda, em camundongos knockout para MAO, estes sítios imidazolínicos I<sub>2</sub> foram perdidos quando a expressão da MAO-B, mas não da MAO-A, foi bloqueada (REMAURY et al., 2000). Em contraste com este estudo, Anderson e colaboradores (2006) mostraram claramente uma redução significativa da afinidade dos radioligantes imidazolínicos I<sub>2</sub>, [<sup>3</sup>H]-idazoxan e [<sup>3</sup>H]-2-BFI, no cérebro de camundongos knockout para MAO-A. Isto, juntamente com evidências indicando que proteínas de ligação imidazolínica I<sub>2</sub> foto-marcadas podem ser imunoprecipitadas com anticorpo monoclonal para MAO-A e MAO-B (RADDATZ et al., 1995) e que tratamento crônico com vários inibidores irreversíveis da MAO causam uma diminuição na densidade (down-regulation) de sítios I<sub>2</sub> em cérebro de

ratos (OLMOS et al., 1993; ALEMANY et al., 1995), o que sugere uma forte relação entre os sítios I<sub>2</sub> e a MAO.

Outro fato que mostra a relação importante entre sítios I<sub>2</sub> e MAO, é a capacidade de ligantes I<sub>2</sub> inibirem reversivelmente a enzima (CARPENÉ et al., 1995; RAASCH et al., 1999; JONES et al., 2007). Experimentos *in vitro* mostraram que imidazolínicos, incluindo 2-BFI e BU224, inibem reversivelmente a MAO-A com uma potência semelhante à do inibidor reversível da MAO-A, moclobemida (LALIES et al., 1999). Provavelmente por esta ação inibitória sobre MAO-A, ligantes seletivos para os sítios I<sub>2</sub>, possam apresentar propriedades antidepressivas (FINN et al., 2003).

Embora esteja estabelecida uma importante associação dos sítios I<sub>2</sub> com MAO-A e MAO-B, a natureza exata desta interação ainda não está bem esclarecida (TESSON & PARINI, 1991; RADDATZ et al., 1995; RADDATZ & LANIER, 1997; HEAD & MAYOROV, 2006). Estudos mostram que os compostos imidazolínicos não agem como substratos da enzima e não competem com inibidores radio-marcados pela ligação na enzima (SASTRE & GARCÍA-SEVILLA, 1993). Por esta razão, os autores sugerem que o domínio de ligação I<sub>2</sub> na MAO não está localizado no sítio ativo da enzima, no grupo prostético FAD, ou no domínio de ligação de inibidores clássicos da MAO (RADDATZ et al., 1995; LIMON-BOULEZ et al., 1996; RADDATZ & LANIER, 1997). Acredita-se que os sítios I<sub>2</sub> na enzima representam sítios regulatórios ainda desconhecidos capazes de modular a atividade enzimática através de mecanismos alostéricos de modulação negativa (PARINI et al., 1996; HALARIS & PILETZ, 2003).

Contudo, a distribuição dos sítios I<sub>2</sub> não é contígua com a distribuição da MAO-A e da MAO-B (EGLIN et al., 1998) e discrepâncias em relação aos níveis de enzima comparados a quantidade de proteínas de ligação I<sub>2</sub> em um mesmo tecido (CESURA et al., 1996; RADDATZ et al., 1995; 1997) indicou que deve haver outras proteínas que contém domínios I<sub>2</sub> de ligação. Corroborando com esta evidencia, Kimura e colaboradores (2003) revelaram a existência de uma proteína ligante I<sub>2</sub> não relacionada com a MAO, isolada de cérebro de coelho e identificada com uma proteína do cérebro de 45 kD, a creatina cinase.

Assim, ainda não está claramente estabelecida qual a relação entre a MAO e os sítios imidazolínicos. Contudo, acredita-se que de fato os sítios I<sub>2</sub> estão presentes

em determinadas subpopulações da enzima (CESURA et al., 1996; RADDATAZ et al., 1995, 1997). Portanto, sabendo que a localização dos sítios I<sub>2</sub> parece ser uma região crítica para a atividade da enzima, a manipulação específica da MAO, através destes sítios, representa um novo alvo terapêutico, dado o papel da enzima em várias doenças neurodegenerativas, do humor e comportamentais (FOLEY et al., 2000).

### 3.6. Sítios Imidazolínicos I<sub>2</sub> e Depressão

Estando estabelecida uma importante associação entre os sítios imidazolínicos I<sub>2</sub> e a MAO e sabendo que os IMAO são utilizados até hoje com sucesso no tratamento da depressão, surgiram evidências indicando que os sítios I<sub>2</sub> poderiam ser usados para modular estados comportamentais como a depressão (PARINI et al., 1996). Alterações na densidade dos sítios I<sub>2</sub> têm sido relatadas em pacientes com depressão, por exemplo, a densidade de sítios I<sub>2</sub> expressos na membrana de plaquetas é significativamente reduzida em plaquetas de pacientes depressivos (PILETZ et al., 1994). Além disso, a expressão destes sítios é alterada no tecido cerebral. Sítios I<sub>2</sub> encontram-se reduzidos em 40% no córtex frontal de vítimas de suicídio (SASTRE et al., 1995).

Estudos em animais parecem estar de acordo com esta possibilidade. Zhu e colaboradores (1997) relataram que o tratamento crônico com imipramina, um antidepressivo tricíclico, resultou em um aumento na densidade (up-regulation) (32%) do receptor imidazolínico I<sub>2</sub> no cérebro de ratos. Em outro estudo, o tratamento crônico com desipramina, principal metabólito ativo da imipramina, não alterou a densidade dos sítios I<sub>2</sub>, mas aumentou significativamente (30%) a afinidade do radioligante ([<sup>3</sup>H]-idazoxan) pelo sítio (OLMOS et al., 1993).

Além disso, foi relatado que o ligante seletivo I<sub>2</sub>, BU224, com afinidade em nanomolar para sítios I<sub>2</sub>, aumentou os níveis de 5-HT no córtex frontal e hipotálamo de ratos expostos ao teste do nado forçado (TNF), e reduziu o tempo de imobilidade dos ratos neste teste, sugerindo uma atividade tipo-antidepressiva (FINN et al., 2003). Outros estudos mostram que a agmatina também reduz o tempo de imobilidade em outro teste preditivo para avaliação de possíveis agentes

antidepressivos, o teste de suspensão da cauda (ZOMKOWSKI et al., 2002; LI et al., 2003). Ainda, Nutt e colaboradores (1995) revelaram que em ratos, o 2-BFI exibiu atividade comparável a desipramina, inibidor da recaptação de noradrenalina, no TNF, o que consiste em uma atividade tipo-antidepressiva. Este efeito tipo-antidepressivo de agentes  $I_2$  pode estar relacionado com a inibição da MAO (NUTT et al., 1995), que foi o primeiro mecanismo descoberto de ação antidepressiva.

Desta forma, estes estudos evidenciam uma relação entre os sítios imidazolínicos  $I_2$  e a depressão, além de uma possível atividade antidepressiva de compostos imidazolínicos, sugerindo que estes sítios  $I_2$  possam representar um alvo farmacológico para o tratamento da depressão.

Além da depressão, os sítios imidazolínicos podem estar envolvidos com outras doenças psiquiátricas, como a ansiedade. Alguns estudos mostraram que a agmatina, ligante endógeno dos sítios imidazolínicos  $I_1$  e  $I_2$ , apresenta atividade ansiolítica em roedores (ARICIOGLU & ALTUNBAS, 2003; LAVINSKY et al., 2003; LIU et al., 2008). Posteriormente, Taksande e colaboradores (2009a) evidenciou que o efeito ansiolítico da agmatina poderia estar relacionado com sítios imidazolínicos  $I_1$  e  $I_2$ . Neste estudo, utilizando-se um modelo animal de ansiedade à abstinência alcoólica, a agmatina e outros ligantes imidazolínicos, como o 2-BFI, atenuaram a ansiedade apresentada pelos ratos. Este efeito foi bloqueado com o uso de antagonistas dos sítios imidazolínicos  $I_1$  e  $I_2$ , sugerindo o envolvimento destes sítios. Porém, há um número limitado de estudos demonstrado a relação entre os sítios imidazolínicos e a ansiedade.

### **3.7. 2-BFI - 2-benzofurano-2-il-4,5-diidro-1H-imidazol**

2-BFI é um derivado 2-imidazolínico (Figura 2), desenvolvido a partir de modificações químicas da estrutura do idazoxan, que possui uma alta afinidade por sítios imidazolínicos  $I_2$  e com um melhor perfil seletivo  $I_2/\alpha_2$  (HUDSON et al., 1997). Concordando com o envolvimento do 2-BFI com sítios  $I_2$ , estudos relataram que o [ $^3\text{H}$ ]2-BFI liga-se com maior afinidade que o [ $^3\text{H}$ ]idazoxan a um número semelhante de sítios  $I_2$  no cérebro (ALEMANY et al., 1997).

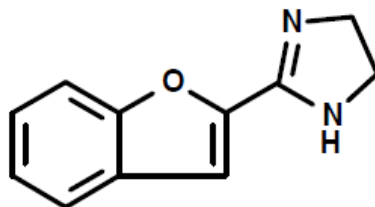


Figura 2. Fórmula estrutural do 2-benzofurano-2-il-4,5-dihidro-1H-imidazol (2-BFI) (SANT'ANNA, 2008).

Recentemente, foi demonstrado que derivados 2-imidazolínicos apresentam alta potência e seletividade em inibir a atividade *in vitro* da MAO em cérebro de ratos (SANT'ANNA et al., 2009). Dentre estes compostos, o 2-BFI exibiu uma alta potência em inibir reversivelmente a atividade *in vitro* da MAO-A (LALIES et al., 1999; SANT'ANNA et al., 2009). Tendo em vista estes estudos e sabendo da associação entre os sítios I<sub>2</sub> e a MAO (RADDATAZ et al., 1995), pode-se sugerir que este efeito inibitório da MAO, possa ser devido à alta afinidade do 2-BFI por sítios I<sub>2</sub> que possuem interação com as isoformas da MAO. Então, o 2-BFI estaria agindo sobre os sítios I<sub>2</sub> e estes seriam capazes de modular a atividade enzimática da MAO através de mecanismos inibitórios alostéricos de modulação negativa.

Além disso, o 2-BFI mostrou efeito sobre os níveis de monoaminas. Ugedo e colaboradores (1999) demonstraram que o 2-BFI causa um aumento no nível extracelular de 5-HT no núcleo dorsal da rafe. No entanto, em um estudo *in vivo*, o 2-BFI diminuiu a síntese de dopamina no estriado de ratos através de um mecanismo de ação independente do sítio imidazolínicos I<sub>2</sub> ou do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico (SASTRE-COLL et al., 1999). Este fato foi explicado por um estudo desenvolvido pelo mesmo grupo através de outro mecanismo de ação. Sastre-Coll e colaboradores (2001), em ratos com depleção nos níveis de dopamina, revelaram que o 2-BFI não causou inibição da síntese de dopamina no estriado, indicando que este efeito do 2-BFI era indiretamente mediado pela dopamina endógena através de ativação do autoreceptor de dopamina D<sub>2</sub>.

Além de interagir com sítios imidazolínicos I<sub>2</sub>, o 2-BFI pode interagir com receptores de dopamina. Sastre-Coll e colaboradores (2001) demonstraram que o 2-BFI apresenta uma baixa afinidade por receptores de dopamina D<sub>2</sub> *in vitro*. Porém



até agora não tem nenhum estudo mostrando uma afinidade do 2-BFI por receptores de 5-HT.

Taksande e colaboradores (2009b), demonstraram que o 2-BFI foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade no TNF e em potencializar o efeito tipo antidepressivo de um inibidor da recaptção de 5-HT em camundongos. Porém, este efeito tipo antidepressivo apresentado pelo 2-BFI não está bem esclarecido, visto que em um estudo de O'Neill e colaboradores (2001), ligantes I<sub>2</sub> imidazolínicos não mostraram atividade tipo antidepressiva no TNF em camundongos.

Assim, devido à existência de poucos trabalhos relatando os efeitos antidepressivos do 2-BFI, torna-se interessante a realização de estudos utilizando modelos de depressão, como também a verificação do mecanismo de ação pelo qual este composto atua.

**4. ARTIGO**

---



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pnp](http://www.elsevier.com/locate/pnp)

## The potential antidepressant-like effect of imidazoline I<sub>2</sub> ligand 2-BFI in mice

Raquel Tonello<sup>a</sup>, Jardel Gomes Villarinho<sup>b</sup>, Gabriela da Silva Sant'Anna<sup>b</sup>, Lídia Tamiozzo<sup>a</sup>, Pablo Machado<sup>c</sup>, Gabriela Trevisan<sup>a</sup>, Marcos Antônio Pinto Martins<sup>c</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,b</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 August 2011

Received in revised form 31 October 2011

Accepted 14 November 2011

Available online 21 November 2011

#### Keywords:

2-BFI

Depression

I<sub>2</sub> imidazoline site

Monoamine oxidase-A

Tail suspension test

### ABSTRACT

The compound 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) is a 2-imidazoline derivative that selectively inhibits the *in vitro* activity of monoamine oxidase-A and it is also an imidazoline I<sub>2</sub> agonist. However, the antidepressant potential of this compound and its mechanism of action have not been well defined. Therefore, in this study we investigated the antidepressant-like effect of 2-BFI in mice. 2-BFI (100 and 300 μmol/kg, s.c.) significantly reduced the immobility time on the tail suspension test (TST) without changing locomotion in the open field test. The reduced the immobility time of 2-BFI (100 μmol/kg, s.c.) was confirmed with the forced swimming test (FST). The antidepressant-like effect of 2-BFI (100 μmol/kg, s.c.) in the TST was prevented by pretreatment with idazoxan (0.4 μmol/kg, i.p., a I<sub>2</sub> site antagonist), methysergide (4 μmol/kg, i.p., a non-selective serotonergic receptor antagonist) and haloperidol (0.1 μmol/kg, i.p., a non-selective dopaminergic receptor antagonist). The anxiolytic effect of 2-BFI was also evaluated, using the elevated plus-maze test. 2-BFI (300 μmol/kg, s.c.) was able to significantly increase the % of number of entries and the % of time spent in the open arms, indicating that it possesses an anxiolytic effect at high doses. In conclusion, these results suggest that the antidepressant-like effect of 2-BFI might involve serotonergic, dopaminergic and imidazoline systems, and then the imidazoline site could represent a new pharmacological target for the treatment of depression.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The existence of non-adrenoceptor binding sites for imidazolin(e)/guanidine drugs has been shown in various tissues of several species, including the central nervous system (Eglen et al., 1998; Regunathan and Reis, 1996). Such sites have been separated into at least three entities: the I<sub>1</sub> site, which is found in the brainstem and is associated with blood pressure control (Bousquet et al., 1984); the I<sub>2</sub> site that is predominantly found in the brain and liver, where it regulates monoamine turnover (Alemany et al., 1997); and the I<sub>3</sub> site, that is located in pancreatic β-cells and regulates insulin secretion (Chan et al., 1994).

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; BU224, 2-(4,5-dihydroimidaz-2-yl)-quinoline; BU226, 2-(4,5-dihydroimidaz-2-yl)-isoquinoline; DA, dopamine; FST, forced swimming test; MAO, monoamine oxidase; MAO-A, monoamine oxidase-A; NUQUIMHE, Núcleo de Química de Heterociclos; OFT, open field test; SNK, Student-Newman-Keuls'; TST, tail suspension test; 2-BFI, 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline; 5-HT, serotonin.

\* Corresponding author at: Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com) (M.A. Rubin).

Traditionally, imidazoline I<sub>2</sub> sites have been characterized using the α<sub>2</sub>-adrenoceptor antagonist [<sup>3</sup>H]-idazoxan in the presence of an α<sub>2</sub>-adrenoceptor masking substance (Michel and Insel, 1989). However, idazoxan is also an agonist at 5-HT<sub>1A</sub> receptors which has limited the characterization of I<sub>2</sub>-imidazoline sites with this drug (Lladó et al., 1996). Then some ligands have been developed with high selectivity for these sites, notably 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) and its quinoline and isoquinoline analogs, 2-(4,5-dihydroimidaz-2-yl)-quinoline (BU224) and 2-(4,5-dihydroimidaz-2-yl)-isoquinoline (BU226) (Lione et al., 1998; Nutt et al., 1995). 2-BFI has been shown to selectively label imidazoline I<sub>2</sub> sites in mice (Anderson et al., 2006), rabbit (Lione et al., 1996) and human brains (Wiest and Steinberg, 1997).

There is evidence that imidazoline I<sub>2</sub> binding sites are allosteric sites located on monoamine oxidase (MAO) (Eglen et al., 1998; Raddatz et al., 1997; Tesson et al., 1991), an enzyme responsible for the oxidative deamination of neurotransmitters, like serotonin (5-hydroxy tryptamine, 5-HT), noradrenaline and dopamine (DA), and exogenous amines. Moreover, the abnormal function of this enzyme is thought to be involved in several psychiatric disorders, such as depression (Lanni et al., 2009; Manji et al., 2003; Millan, 2004).

Several imidazoline I<sub>2</sub> ligands have been shown to inhibit MAO activity (Carpéné et al., 1995; Jones et al., 2007; Raasch et al., 1999). In

vitro experiments showed that imidazolines, including 2-BFI and BU224, reversibly inhibit monoamine oxidase A (MAO-A) with a similar potency to that of the reversible MAO-A inhibitor moclobemide (Lalies et al., 1999). Furthermore, post-mortem studies have shown that the density of I<sub>2</sub> sites was altered in suicide/depressive patients (García-Sevilla et al., 1996, 1998). Probably through this inhibitory action on MAO-A, selective ligands for I<sub>2</sub> sites may possess antidepressant-like properties (Finn et al., 2003).

Therefore, the aim of the present study was to assess the possible antidepressant-like effect of the 2-imidazoline derivative, 2-BFI, and its mechanism of action in mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Swiss mice (25–30 g) from our own colony were used in this study. Mice were maintained in polycarbonate cages with free access to food and water, on a 12-h alternating light–dark schedule in a temperature-controlled (22 ± 3 °C) room. The procedures in this study were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University (Protocol no. 119/2010). For behavioral tests, drugs were administered in random order, and the behavioral measure was carried out by a blinded investigator.

### 2.2. Drugs

2-BFI synthesis was carried out by the method of condensation involving aldehydes and ethylenediamine in the presence of *N*-bromosucinimide, reaching 100% purity according to analysis of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra, as previously reported (Sant'Anna et al., 2009). 2-BFI and diazepam (Compaz®, Cristália, Brazil) were dissolved in a vehicle solution (5% Tween 80, 20% polyethyleneglycol and 75% saline). Idazoxan, methysergide (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and haloperidol (Haldol®, Janssen-Cilag, Brazil) were dissolved in saline. Injections were performed in a 10 ml/kg volume by the subcutaneous (s.c.) or intraperitoneal (i.p.) route.

### 2.3. Tail suspension test (TST)

The antidepressant-like effect of 2-BFI was measured using the tail suspension test (TST), according to Steru et al. (1985). Briefly, mice were suspended by their tails using adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail and hung approximately 30 cm above the table. The animals were suspended for 6 min, and the duration of immobility was scored manually during the last 4-min interval of the test. Mice were considered immobile only when they hung passively.

Firstly, a time–course curve was performed. For this, mice were submitted to the TST at 15, 30 and 60 min after the administration of 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) or the vehicle. For the dose–response curve, mice were treated with 2-BFI (30, 100 or 300 µmol/kg, s.c.; equivalent to 6, 19 or 56 mg/kg respectively) or vehicle 30 min before the TST.

To assess the involvement of imidazoline sites, and serotonergic, and dopaminergic receptors in the antidepressant-like effect of 2-BFI, mice received a single injection of idazoxan (0.4 µmol/kg, i.p.; equivalent to 0.1 mg/kg, a I<sub>2</sub> site antagonist), methysergide (4 µmol/kg, i.p.; equivalent to 2 mg/kg, a non-selective serotonergic receptor antagonist), haloperidol (0.1 µmol/kg, i.p.; equivalent to 0.05 mg/kg, a non-selective dopaminergic receptor antagonist) or saline 15 min (idazoxan) or 30 min (methysergide and haloperidol) before the administration of 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) or vehicle. Thirty minutes after the treatment with 2-BFI or vehicle solution, the animals were

submitted to the TST. All doses of antagonists used in this work were chosen according to previous literature data (Duarte et al., 2008; Machado et al., 2007; Rénéric et al., 2001).

### 2.4. Forced swimming test (FST)

To confirm the antidepressant-like effect of 2-BFI the forced swimming test (FST) was used. Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), containing 19 cm of water maintained at 25 ± 1 °C; the total duration of immobility during the 6-min test was scored as described previously (Zomkowski et al., 2004). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. Mice were submitted to the FST 30 min after the administration of 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.) or the vehicle.

### 2.5. Open-field test (OFT)

To assess the possible effects of 2-BFI on locomotor activity, mice were evaluated in the open-field test (OFT), as described previously (Archer, 1973). The number of crossings was counted in a 5-min session. Mice were injected with 2-BFI (100 or 300 µmol/kg, s.c.) or vehicle 30 min before testing. Another groups of mice were pretreated with idazoxan (0.4 µmol/kg, i.p.), methysergide (4 µmol/kg, i.p.) or haloperidol (0.1 µmol/kg, i.p.) 15 min (idazoxan) or 30 min (methysergide and haloperidol) before the administration of vehicle or 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.). Thirty minutes after this treatment, the animals were submitted to the OFT.

### 2.6. Rota-rod test

To evaluate the effect of 2-BFI on motor coordination, the rota-rod test was carried out (Godoy et al., 2004). The apparatus consisted of a rotatory bar (3.7 cm in diameter) divided into 3 separate compartments that was placed at a height of 25 cm and rotate at a fixed velocity of 8 rpm. The animals were submitted to a training session 24 h before testing. On the test day, mice were injected with 2-BFI (100 or 300 µmol/kg, s.c.) or vehicle 30 min before testing. Another groups of mice were pretreated with idazoxan (0.4 µmol/kg, i.p.), methysergide (4 µmol/kg, i.p.) or haloperidol (0.1 µmol/kg, i.p.) 15 min (idazoxan) or 30 min (methysergide and haloperidol) before the administration of vehicle or 2-BFI (100 µmol/kg, s.c.). Thirty minutes after this treatment, the animals were submitted to the rota-rod test. In the test session, the latency for the first fall and the total number of falls were evaluated during a 4-min period.

### 2.7. Elevated plus maze test

The anxiety-related behaviors were assessed using the mouse elevated plus maze test (Lister, 1987). The apparatus consists of two open arms (30 × 5 cm) and two enclosed arms (30 × 5 × 15 cm) positioned 40 cm above the floor. The junction of four arms forms a central square platform (5 × 5 cm). Mice received a single administration of 2-BFI (100 or 300 µmol/kg, s.c.) or vehicle 30 min before testing. As a positive control, diazepam (7 µmol/kg, s.c.; equivalent to 2 mg/kg) was administered to mice 30 min before testing (Naderi et al., 2008). Each animal was placed on the central platform facing one of the open arms and was allowed to explore freely for 5-min. The behavior parameters recorded were the % of number of entries and the % of time spent in the open and closed arms.

### 2.8. Statistical analyses

The results are expressed as the mean ± SEM. Student's *t*-test and a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) were used to

analyze the statistical significance between groups, followed by Bonferroni's or Student-Newman-Keuls' (SNK) post-hoc tests using GraphPad Prism 5.0 software. The level of significance was set at  $p < 0.05$ , and only significant results are shown. To meet ANOVA assumptions, haloperidol or vehicle  $\times$  2-BFI or vehicle interaction data were subjected to log transformation before statistical analysis.

### 3. Results

Fig. 1A shows the time-course curve of 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) on immobility time in the TST. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant 2-BFI or vehicle  $\times$  time interaction [ $F(1,33) = 3.52$ ;  $p < 0.01$ ]. Post hoc analysis revealed a  $47 \pm 7\%$  reduction in immobility time 30 min after 2-BFI administration. Then, a 30-min pretreatment was chosen to carry out the dose-response curve and subsequent experiments. Fig. 1B shows the dose-response curve of 2-BFI (30–300  $\mu\text{mol/kg}$ ) on immobility time in the TST. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that 2-BFI decreased immobility time [ $F(3,26) = 8.43$ ;  $p < 0.01$ ]. Post hoc analysis (SNK) showed that 100 and 300  $\mu\text{mol/kg}$  of 2-BFI reduced the immobility time by  $41 \pm 8\%$  and  $53 \pm 8\%$  respectively. Fig. 1C shows that 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) produced a  $19 \pm 3\%$  reduction on the immobility time in the FST [T = 4.46;  $p < 0.01$ , Student's t-test].

With the purpose of investigating the mechanisms underlying the antidepressant-like effect of 2-BFI in the TST, mice were pre-treated with idazoxan, methysergide or haloperidol. Fig. 2A shows the effect of pretreatment with the  $I_2$  site antagonist idazoxan (0.4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) on the reduction in the immobility time induced by 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ ). Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant idazoxan or vehicle  $\times$  2-BFI or vehicle interaction [ $F(1,40) = 4.14$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analysis (Bonferroni's) indicated that pretreatment with idazoxan significantly blocked the decrease in immobility time induced by 2-BFI.

Fig. 2B shows the effect of pretreatment with the non-selective 5-HT receptor antagonist methysergide (4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) on the reduction in the immobility time induced by 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ ). Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant methysergide or vehicle  $\times$  2-BFI or vehicle interaction [ $F(1,31) = 4.16$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analysis (Bonferroni's) indicated that pretreatment with methysergide significantly blocked the decrease in immobility time induced by 2-BFI.

Fig. 2C shows the effect of the pretreatment with the non-selective dopaminergic antagonist haloperidol (0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) on the reduction in the immobility time induced by 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ ). Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant haloperidol or vehicle  $\times$  2-BFI or vehicle interaction [ $F(1,30) = 4.70$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc analysis (Bonferroni's) indicated that pretreatment with haloperidol significantly blocked the decrease in immobility time induced by 2-BFI.

Fig. 3 shows the effect of the classic anxiolytic benzodiazepine, diazepam (7  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) and the effect of 2-BFI (100 and 300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) on the % of number of entries (A) and the % of time spent (B) in the open arms of the plus-maze. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that diazepam and 2-BFI (300  $\mu\text{mol/kg}$ ) significantly increased the % of number of entries [ $F(3,36) = 6.34$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 3A] and the % of time spent in the open arms [ $F(3,36) = 10.53$ ;  $p < 0.01$ , Fig. 3B], confirming the suitability of the method used to evaluate anxiety in the present study and suggesting an anxiolytic role for this compound. Diazepam and 2-BFI had no effect on the % of number of entries and the % of time spent in the closed arms (data not shown).

It has been found that compounds that induce changes in locomotor activity can alter the behavioral responses of mice in the TST. Therefore, we investigated the effects of 2-BFI alone and in combination with idazoxan, methysergide or haloperidol on locomotor activity and motor coordination function. The results are shown in Table 1. The treatment with 2-BFI (100 and 300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) did not cause

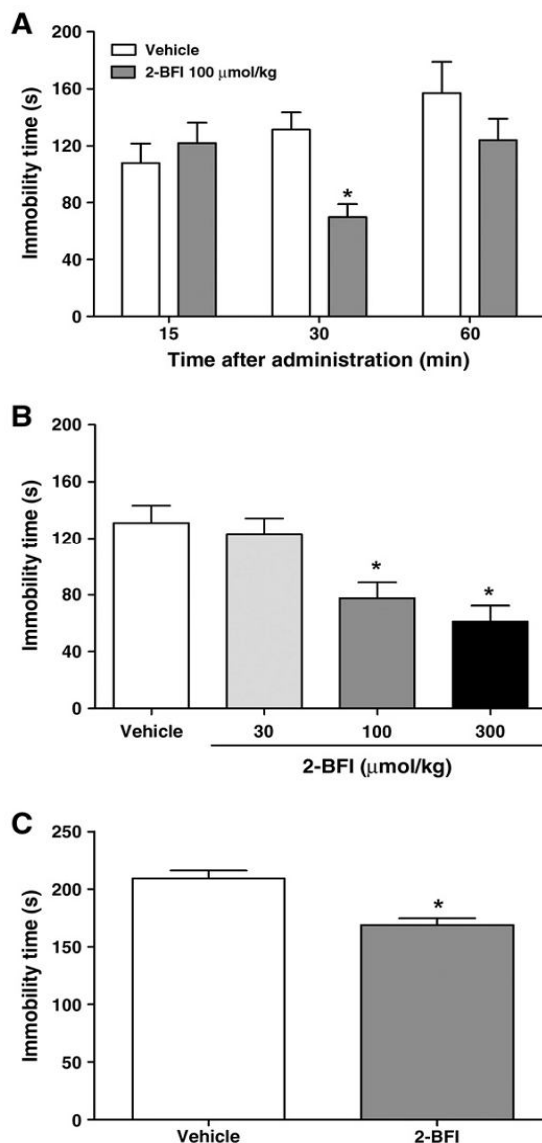
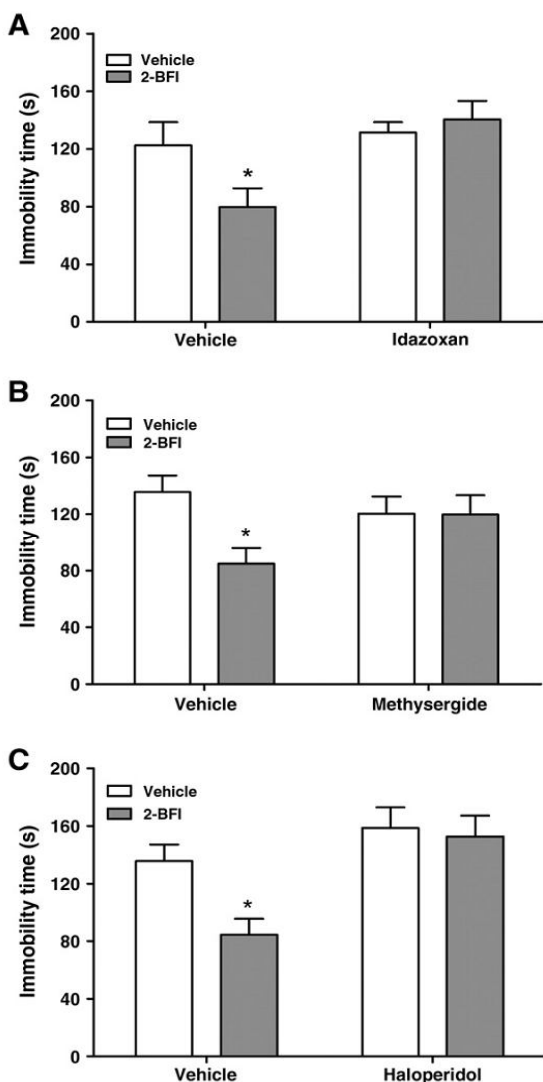


Fig. 1. Effect of 2-BFI administration on immobility time in the TST and in the FST in mice. (A) Time-course curve of 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. (B) Dose-response curve of 2-BFI (30–300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. (C) 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) on immobility time in the FST. The values are means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ –8 animals in each group). \* $p < 0.01$  compared with the respective vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni test (A), one-way ANOVA followed by SNK (B) or Student's t-test (C).

significant alterations in the locomotor ability of the animals, as assessed by the similar number of crossings in the OFT when compared to vehicle. The co-treatment of mice with 2-BFI and idazoxan (0.4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), methysergide (4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or haloperidol (0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) causes no changes on locomotor activity, when compared to saline plus vehicle treated animals. In addition, 2-BFI alone or in combination with antagonists did not significantly affect motor coordination, as assessed by similar fall latencies and total number of falls in the rota-rod when compared to control groups.

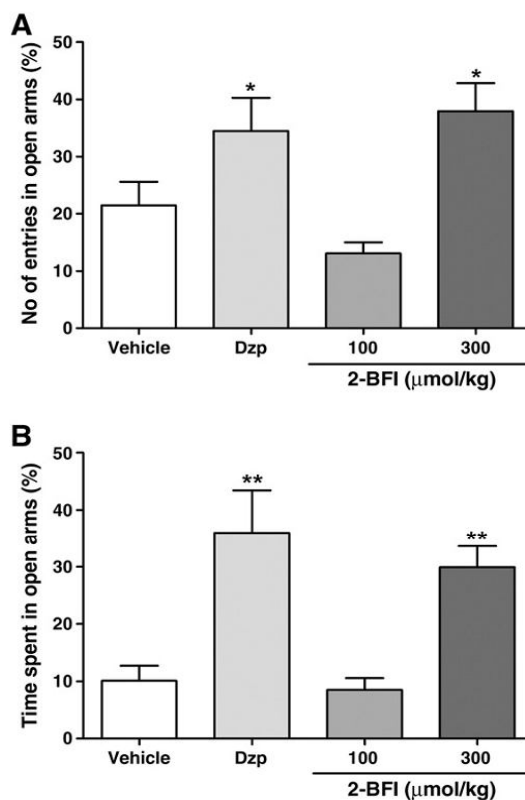
### 4. Discussion

In the present study, subcutaneous injection of 2-BFI, a 2-imidazole derivative, decreased the immobility time in the TST,



**Fig. 2.** Effect of pretreatment of mice with idazoxan (0.4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; A), methysergide (4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; B) and haloperidol (0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.; C) on the anti-immobility effect of 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) in the TST. The values are means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ –11 animals in each group). \* $p < 0.05$  compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

showing an antidepressant-like effect. Previous studies were conflicting on the antidepressant-like potential of imidazoline compounds. O'Neill et al. (2001) demonstrated that selective  $I_2$  receptor ligands (such as BU224) do not show antidepressant-like effects in the FST in BKTO mice. However, Taksande et al. (2009) showed that  $I_2$  receptor ligands (including 2-BFI) were effective in reducing the immobility time in the FST and in potentiating antidepressant-like effects on selective 5-HT reuptake inhibitors in Swiss mice. The differences between these studies may be explained by the differences among  $I_2$  receptor ligands, the test used to detect the antidepressant-like effects and the strain of mice used. 2-BFI, but not BU224, binds with low affinity to  $\alpha_2$ -adrenoceptors (Eglen et al., 1998). Accordingly, the nature of the interaction between the 2-BFI to  $\alpha_2$ -adrenoceptors is still uncertain. Of note,  $\alpha_2$ -adrenoceptors antagonists have antidepressant-like effects (Haddjeri et al., 1995). Indeed, mirtazapine, a highly potent  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, is effective in the treatment of patients with depression (De Boer, 1996). In addition, an increased level of  $\alpha_2$ -adrenoceptors (31–



**Fig. 3.** Effects of diazepam (7  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), 2-BFI (100 and 300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) or vehicle on the % of number of entries (A) and the % of time spent (B) in the open arms by mice submitted to a 5-min test in the elevated plus maze. The values are means  $\pm$  SEM ( $n = 10$  animals in each group). \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$  compared with the vehicle group; one-way ANOVA followed by SNK.

40%) was found in the prefrontal cortex of depressed patient (García-Sevilla et al., 1999). Then, if the 2-BFI is interacting as an  $\alpha_2$ -adrenoceptors antagonist, this propriety may, at least in part, explain its effect.

Regarding the test, the TST is the most common animal test specifically used for the screening of new antidepressant drugs because it is easy to execute and highly reliable (Bourin et al., 2005; Cryan et al., 2002). In this test, mice are exposed to an aversive situation, from which there is no escape, and will, after periods of agitation, cease

**Table 1**

Effects of vehicle or 2-BFI (100 or 300  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) treatment and 2-BFI (100  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) plus idazoxan (0.4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), methysergide (4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or haloperidol (0.1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) co-treatment on the number of crossing in open-field test and fall latency and number of falls in rota-rod test in mice.

Treatment ( $\mu\text{mol/kg}$ )	Number of crossing	Fall latency (s)	Number of falls
Vehicle	28.4 $\pm$ 3.9	190.8 $\pm$ 26.3	0.5 $\pm$ 0.3
2-BFI (100)	33.0 $\pm$ 6.0	142.5 $\pm$ 28.9	1.4 $\pm$ 0.6
2-BFI (300)	24.5 $\pm$ 3.2	221.6 $\pm$ 18.4	0.1 $\pm$ 0.1
Saline + vehicle	44.0 $\pm$ 8.9	222.5 $\pm$ 17.5	0.2 $\pm$ 0.2
Idazoxan + vehicle	34.8 $\pm$ 4.6	193.8 $\pm$ 30.7	0.3 $\pm$ 0.2
Methysergide + vehicle	50.3 $\pm$ 6.0	210.2 $\pm$ 27.7	0.8 $\pm$ 0.6
Haloperidol + vehicle	40.8 $\pm$ 6.8	207.8 $\pm$ 32.2	0.3 $\pm$ 0.3
Idazoxan + 2-BFI (100)	37.3 $\pm$ 4.5	166.8 $\pm$ 34.5	0.8 $\pm$ 0.5
Methysergide + 2-BFI (100)	30.2 $\pm$ 5.3	188.2 $\pm$ 34.0	0.5 $\pm$ 0.3
Haloperidol + 2-BFI (100)	29.0 $\pm$ 4.8	201.2 $\pm$ 28.6	1.0 $\pm$ 0.7

The values are mean  $\pm$  SEM of 6–10 animals in each group (rota-rod test) and 6–7 animals in each group (open-field test).

attempts to escape and become immobile, similar to the immobility observed in the FST (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). Perhaps one of the most important differences between these tests is the apparent higher sensitivity of the TST in detecting the response to drugs (Cryan et al., 2005). Thus, the better sensitivity of the TST may facilitate the detection of the antidepressant-like effects of  $I_2$  receptor ligands. Finally, there is an important difference in the response to antidepressants between mouse strains, but Swiss mice are most commonly used because they exhibit increased responses to these drugs (Bourin et al., 2005). As Taksande et al. (2009), the present study used Swiss mice, which may improve the assessment of the antidepressant-like effects of 2-BFI.

Confirming the results found in TST, 2-BFI decreased the immobility time in the FST. In accordance with Taksande et al. (2009), that showed that 2-BFI and others  $I_2$  receptor ligands were effective in reducing the immobility time in the FST. Similar to 2-BFI, agmatine, an endogenous ligand at  $I_1$  and  $I_2$  receptors, presented antidepressant and anxiolytic activity in rodents (Aricioglu and Altunbas, 2003; Zomkowski et al., 2002). Of note, agmatine displaced the binding of [ $^3$ H]2-BFI to  $I_2$ -imidazoline receptors (Alemany et al., 1997). In addition, the catabolism of agmatine by agmatinase has recently been found to be increased in post-mortem brains of patients with unipolar and bipolar disorder (Bernstein et al., 2012). Thus, with the putative reduction of the endogenous ligand, the use of synthetic  $I_2$  receptor ligands, such as 2-BFI, could be useful in this illness.

Clinical depression in humans is associated with dysregulation or overexpression of imidazoline sites in platelets and brain tissues of depressed patients (García-Sevilla et al., 1999; Holt, 2003; Piletz et al., 2008). Considering that these sites have a role in mood disorders, the involvement of the imidazoline sites in the antidepressant-like effect of 2-BFI in the TST was studied by using an  $I_2$  antagonist to examine the behavioral responses to 2-BFI (García-Sevilla et al., 1999; Piletz et al., 1996). Our study showed that the reduction in the immobility time elicited by 2-BFI in the TST was blocked by pretreatment of mice with idazoxan, a preferential imidazoline  $I_2$  receptor antagonist, suggesting the involvement of imidazoline  $I_2$  receptors in the antidepressant-like effect of 2-BFI. Some studies have shown that idazoxan prevented the antidepressant-like effect of desipramine, a noradrenaline reuptake inhibitor, in the FST (Cervo et al., 1990; Rénéric et al., 2001). Agreeing with the involvement of 2-BFI with imidazoline  $I_2$  receptors, previous studies reporting that [ $^3$ H]2-BFI bound with higher affinity than [ $^3$ H]idazoxan, an  $\alpha_2$ -adrenoceptors antagonist traditionally used to characterize  $I_2$ -imidazoline receptors, to a similar number of brain  $I_2$ -imidazoline receptors (Alemany et al., 1997).

An enzyme that causes oxidative deamination of neurotransmitters like 5-HT, noradrenaline, DA and exogenous amines is the MAO. For decades, the notion that perturbed monoaminergic transmission is causally implicated in depressive states has been enshrined in the literature (Manji et al., 2003). There is evidence that imidazoline  $I_2$  binding sites are located in MAO (Eglen et al., 1998; Raddatz et al., 1997; Tesson et al., 1991), and that 2-BFI can inhibit MAO activity in a non-competitive manner (Carpéné et al., 1995). It was recently shown that 2-imidazoline derivatives showed good potency and selectivity in inhibiting the *in vitro* activity of MAO in the rat brain (Sant'Anna et al., 2009). Among these compounds, 2-BFI showed a great potency to reversibly inhibit the *in vitro* activity of MAO-A (Lalies et al., 1999; Sant'Anna et al., 2009). Thus, the antidepressant-like action of 2-BFI could be related to the monoaminergic system owing to its inhibitory effect on MAO activity.

Besides the interaction with imidazoline  $I_2$  site, imidazol(ine) ligands can interact with DA receptors. Sastre-Colla et al. (2001) demonstrated that 2-BFI presents very low affinity for  $D_2$ -dopamine receptors *in vitro*. However until now, do not have any study showing the affinity of 2-BFI to 5-HT receptors.

It is well known that the 5-HT system plays an important role in the neural regulation of mood (Duman et al., 1997). The

antidepressant drugs used clinically promote an increase in 5-HT and noradrenaline availability at the synaptic cleft (Elhwuegi, 2004). Some studies have shown the involvement of 5-HT receptors in depression (Pitchot et al., 2005; Svenningsson et al., 2006). In the present study, we also investigated the involvement of the serotonergic and dopaminergic systems on the antidepressant-like effect of 2-BFI in the TST. The decrease in the immobility time elicited by 2-BFI was reversed by pretreatment of mice with methysergide, a non-selective serotonin receptor antagonist. In the same way, the results demonstrated that haloperidol, a non-selective DA receptor antagonist, significantly antagonized the anti-immobility effect of 2-BFI in mice. These results indicate that the antidepressant-like effect produced by 2-BFI may also involve the serotonergic and dopaminergic systems.

It has been shown that the effects of some antidepressants are prevented by the concurrent administration of a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist (Detke et al., 1995). Also, there was a significant hypersensitivity of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the brains of depressed suicide victims (Rosel et al., 2000).

Depressed patients have been reported to have increased DA D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> receptor binding (Shah et al., 1997) and reduced DA transporter activity (Neumeister et al., 2001). Pharmacological experiments suggest that the DA-like receptors play a key role in the response to biological antidepressant treatments (Lammers et al., 2000; Maj et al., 1996; Rogoz and Dziedzicka-Wasylevska, 1999).

Some studies have demonstrated that antidepressant agents, including the MAOIs, can also possess anxiolytic properties in different anxiety animal models (De Angelis, 1996; Eroglu and Güven, 1998). Thus, to investigate if 2-BFI exerts anxiolytic activity, mice were submitted to the plus maze test, and the results showed that 2-BFI (300  $\mu$ mol/kg) was able to significantly increase the % of number of entries and the % of time spent in the open arms. These data suggest that 2-BFI, besides producing antidepressant-like effects, may present anxiolytic properties in high doses.

The anti-immobility effect of 2-BFI seems unassociated with alterations on locomotor activity, since mice treated with 2-BFI at doses that were effective in the TST (100 and 300  $\mu$ mol/kg) did not exhibit increased ambulation when tested in the OFT. The effect of 2-BFI on coordination function was also evaluated using the rota-rod test. No changes in motor coordination activity 30 min after 2-BFI treatment were observed in both 100 and 300  $\mu$ mol/kg doses. This indicates that a psychostimulant effect is not responsible for the decrease in the immobility elicited by 2-BFI in the TST.

## 5. Conclusion

In conclusion, the present results show that 2-BFI presents antidepressant-like effects in mice in both TST and FST. The 2-BFI antidepressant-like effect is reversed by pretreatment with idazoxan, methysergide and haloperidol, suggesting a relationship to the serotonergic, dopaminergic and imidazoline ( $I_2$  receptors) systems. Further studies using other selective or highly specific analytical and pharmacological tools are needed to more reasonably define the role of serotonergic, dopaminergic and imidazoline systems in the antidepressant-like effects of 2-BFI.

## Disclosure/conflicts of interest

We have no conflicts of interest to disclose.

## Acknowledgments

This study was supported by CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 481176/2010-1) and PRONEX/CNPq/FAPERGS. Tamiozzo, L.; Martins, M.A.P.; Ferreira, J. and Rubin, M.A. are recipients of CNPq

fellowships. Tonello, R. and Trevisan, G. are the recipient of a CAPES fellowship.

## References

- Alemayn R, Olmos G, García-Sevilla JA. Labelling of I<sub>2</sub>B-imidazoline receptors by [<sup>3</sup>H] 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) in rat brain and liver: characterization, regulation and relation to monoamine oxidase enzymes. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1997;356:39–47.
- Anderson NJ, Seif I, Nutt DJ, Hudson AL, Robinson ESJ. Autoradiographical distribution of imidazoline binding sites in monoamine oxidase A deficient mice. *J Neurochem* 2006;96:1551–9.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973;21:205–35.
- Aricioglu F, Altunbas H. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann N Y Acad Sci* 2003;1009:136–40.
- Bernstein HG, Stich C, Jäger K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J. Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* 2012;62:237–46.
- Bourin M, Chenu F, Ripoll N, David DJ. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res* 2005;164:266–9.
- Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;230:232–6.
- Carpéné C, Collon P, Remaury A, Cordi A, Hudson A, Nutt D. Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I2 sites. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:681–8.
- Cervo L, Grignaschi G, Samanin R. Alpha 2-adrenoceptor blockade prevents the effect of desipramine in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 1990;175:301–7.
- Chan SL, Brown CA, Scarpello KE, Morgan NG. The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites. *Br J Pharmacol* 1994;112:1065–70.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:238–45.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:571–625.
- De Angelis L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1996;354:379–83.
- De Boer T. The pharmacologic profile of mirtazapine. *J Clin Psychiatry* 1996;57(Suppl. 4):19–25.
- Detke MJ, Wieland S, Lucki I. Blockade of the antidepressant-like effects of 8 OHDPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT1A receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;119:47–54.
- Duarte FS, Lach G, Martins PRC, Romero GA, Lima TCM. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10,11-dihydro-5H-dibenzo [a, d] cycloheptane in mice evaluated in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:368–74.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:597–606.
- Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NJ, Wilson WG, et al. Seeing through a glass darkly: casting light on imidazoline “I” sites. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:381–90.
- Eihwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:435–51.
- Eroğlu L, Güven O. The effects of moclobemide on the yohimbine-induced anxiogenic action in the elevated plus-maze. *Pharmacol Res* 1998;37:137–43.
- Finn DP, Martí O, Harbuz MS, Vallès A, Belda X, Márquez C, et al. Behavioral, neuroendocrine and neurochemical effects of the imidazoline I2 receptor selective ligand BU224 in naive rats and rats exposed to the stress of the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;167:195–202.
- García-Sevilla JA, Escribá PV, Sastre M, Walzer C, Busquets X, Jaquet G, et al. Immunodetection and quantitation of imidazoline receptor proteins in platelets of patients with major depression and in brains of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53:803–10.
- García-Sevilla JA, Escribá PV, Walzer C, Bouras G, Guimon J. Imidazoline receptor proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1998;247:95–8.
- García-Sevilla JA, Escribá PV, Ozaita A, La Harpe R, Walzer C, Eytan A, et al. Up-regulation of immunolabeled alpha2A-adrenoceptors, Gi coupling proteins, and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides. *J Neurochem* 1999;72:282–91.
- Godoy MC, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, et al. Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol* 2004;496:93–7.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C. Noradrenergic modulation of central serotonergic neurotransmission: acute and long-term actions of mirtazapine. *Int Clin Psychopharmacol* 1995;4:11–7.
- Holt A. Imidazoline binding sites on receptors and enzymes: emerging targets for novel antidepressant drugs? *J Psychiatry Neurosci* 2003;28:409–14.
- Jones TZ, Giurato L, Guccione S, Ramsay RR. Interactions of imidazoline ligands with the active site of purified monoamine oxidase A. *FEBS J* 2007;274:1567–75.
- Lalies MD, Hibell A, Hudson AL, Nutt DJ. Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline 2 site selective ligands. *Ann N Y Acad Sci* 1999;881:114–7.
- Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P. Selective increase of dopamine D3 receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol Psychiatry* 2000;5:378–88.
- Lanni C, Govoni S, Lucchelli A, Cinzia B. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspect. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2985–3008.
- Lione LA, Nutt DJ, Hudson AL. [3H]-2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline: a new selective high affinity radioligand for the study of rabbit brain imidazoline I2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;304:221–9.
- Lione LA, Nutt DJ, Hudson AL. Characterisation and localisation of [<sup>3</sup>H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline binding in the rat brain: a selective ligand for imidazoline I2 receptors. *Eur J Pharmacol* 1998;353:123–35.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;92:180–5.
- Lladó J, Esteban S, García-Sevilla JA. The α2-adrenoceptor antagonist idazoxan is an agonist at 5-HT1A autoreceptors modulating serotonin synthesis in the rat brain in vivo. *Neurosci Lett* 1996;218:111–4.
- 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* 2007;31:421–8.
- Maj J, Dziedzicka-Wasylewska M, Rogoz R, Rogoz Z, Skuza G. Antidepressant drugs given repeatedly change the binding of the dopamine D2 receptor agonist, [3H]N-0437, to dopamine D2 receptors in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 1996;304:49–54.
- Manji HK, Quiroz JA, Sporn J, Payne JL, Denicoff K, Gray NA, et al. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry* 2003;53:707–42.
- Michel M, Insel P. Are there multiple imidazoline binding sites? *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:342–4.
- Millan MJ. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol* 2004;500:371–84.
- Naderi N, Haghparast A, Saber-Tehrani A, Rezaei N, Alizadeh AM, Khani A, et al. Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;89:64–75.
- Neumeister A, Willeit M, Praschak-Rieder N, Asenbaum S, Stastny J, Hilger E, et al. Dopamine transporter availability in symptomatic depressed patients with seasonal affective disorder and healthy controls. *Psychol Med* 2001;31:1467–73.
- Nutt DJ, French N, Handley S, Hudson A, Husbands S, Jackson H, et al. Functional studies of specific imidazoline-2 receptor ligands. *Ann N Y Acad Sci* 1995;763:125–39.
- O'Neill MF, Osborne DJ, Woodhouse SM, Conway MW. Selective imidazoline I2 ligands do not show antidepressant-like activity in the forced swim test in mice. *J Psychopharmacol* 2001;15:18–22.
- Piletz JE, Halaris A, Nelson J, Qu Y, Bari M. Platelet I1-imidazoline binding sites are elevated in depression but not generalized anxiety disorder. *J Psychiatr Res* 1996;30:147–68.
- Piletz JE, Baker R, Halaris A. Platelet imidazoline receptors as state marker of depressive symptomatology. *J Psychiatr Res* 2008;42:41–9.
- Pitchot W, Hansenne M, Pinto E, Reggers J, Fuchs S, Ansseau M. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. *Biol Psychiatry* 2005;58:854–8.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalife M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977;229:327–36.
- Raasch W, Muhle H, Dominiak P. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives. *Ann N Y Acad Sci* 1999;881:313–31.
- Raddatz R, Parini A, Lanier SM. Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase B. *Mol Pharmacol* 1997;52:549–53.
- Regunathan S, Reis DJ. Imidazoline receptors and their endogenous ligands. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:511–44.
- Rénérac JP, Bouvard M, Stinus L. Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:379–90.
- Rogoz R, Dziedzicka-Wasylewska M. Effects of antidepressant drugs on dopamine D2/D3 receptors in the rat brain differentiated by agonist and antagonist binding – an autoradiographic analysis. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1999;359:178–86.
- Rosel P, Arranz B, San L, Vallejo J, Crespo JM, Urretavizcaya M, et al. Altered 5-HT (2A) binding sites and second messenger inositol trisphosphate (IP(3)) levels in hippocampus but not in frontal cortex from depressed suicide victims. *Psychiatry Res* 2000;99:173–81.
- Sant'Anna GS, Machado P, Sauzem PD, Rosa FA, Rubin MA, Ferreira J, et al. Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:546–9.
- Sastre-Colla A, Estebana S, Miralles A, Zanettia R, García-Sevilla JA. The imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline is a dopamine-releasing agent in the rat striatum in vivo. *Neurosci Lett* 2001;301:29–32.
- Shah BH, Saeed SA, Rashid F, Gilani AH. Dopamine potentiation of calcium ionophore, A 23187-induced platelet aggregation. *Adv Exp Med Biol* 1997;407:537–40.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1985;85:367–70.
- Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajole M, Zhang X, El Yacoubi M, et al. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 2006;311:77–80.
- 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* 2009;57:415–24.



- Tesson F, Prip-Buus C, Lemoine A, Pegorier JP, Parini A. Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. Major localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1991;266:155–60.
- Wiest SA, Steinberg MI. Binding of [3H]-2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (BFI) to human brain: potentiation by tranylcypromine. *Life Sci* 1997;60:605–15.
- Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport* 2002;13:387–91.
- Zomkowski ADE, Rosa AO, Lin J, Santos ARS, Calixto JB, Rodrigues ALS. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res* 2004;1023:253–63.

## **5. CONCLUSÕES**

---

## 5. Conclusões

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1- O 2-BFI apresentou um efeito tipo-antidepressivo em camundongos no teste de suspensão da cauda e no teste do nado forçado.
- 2- Este efeito tipo-antidepressivo do 2-BFI está relacionado com os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e imidazolínico, visto que antagonistas destes sistemas preveniram o efeito tipo-antidepressivo apresentado pelo 2-BFI.
- 3- O 2-BFI, além de produzir efeitos tipo antidepressivos, apresentou propriedade ansiolítica na maior dose testada.
- 4- O efeito tipo antidepressivo do 2-BFI não está associado a nenhum efeito motor, já que as doses administradas não afetaram a atividade locomotora e a coordenação motora dos animais.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. Referências Bibliográficas

- ALEMANY, R.; OLMOS, G.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. **The effects of phenelzine and other monoamine oxidase inhibitors antidepressants on brain and liver I<sub>2</sub> imidazoline-preferring receptors.** *Brit. J. Pharmacol.* 114:837-845, 1995.
- ALEMANY, R., OLMOS, G., GARCÍA-SEVILLA, J.A. **Labelling of I<sub>2</sub>B-imidazoline receptors by [<sup>3</sup>H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline (2-BFI) in rat brain and liver: characterization, regulation and relation to monoamine oxidase enzymes.** *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 356: 39–47, 1997.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, (4th ed., text revision). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- ANDERSON, N. J. et al. **Autoradiographical distribution of imidazoline binding sites in monoamine oxidase A deficient mice.** *J. Neurochem.* 96:1551–1559, 2006.
- AIRAKSINEN, M. M.; KARI, I. **β-carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: occurrence, origin and metabolism.** *Med. Biol.* 59:21-34, 1981.
- ARICIOGLU, F.; ALTUNBAS, H. **Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent?** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009:136-140, 2003.
- ATLAS, D.; BURSTEIN, Y. **Isolation and partial purification of a clonidine-displacing endogenous brain substance.** *Eur. J. Biochem.* 144:187-93, 1984.
- ATLAS, D. **Clonidine-displacing substance (CDS) and its putative imidazoline receptor. New leads for further divergence of alpha 2-adrenergic receptor activity.** *Biochem. Pharmacol.* 41:1541-49, 1991.
- ATOMARE, C. et al. **Inhibition of monoamine oxidase B by condensed pyridazines and pyrimidines: effects of lipophilicity and structure-activity relationships.** *J. Med. Chem.* 41:3812-3820, 1998.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. **Mechanisms of disease: major depressive disorder.** *N. Engl. J. Med.* 358:55-68, 2008.
- BERG, D. et al. **Inhibition of monoamine oxidase B by selected benzimidazole and caffeine analogues.** *Bioorg. Med. Chem.* 15:3692-3702, 2007.
- BERTON, O.; NESTLER, E. J. **New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines.** *Nat. Rev. Neurosci.* 7:137-151, 2006.
- BILICI, M. et al. **Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments.** *J. Affect. Disord.* 64:43-51, 2001.

- BOUR, S. et al. **The imidazoline I2-sites ligands BU224 and 2-BFI inhibit MAO-A and MAO-B activities, hydrogen peroxide production, and lipolysis in rodent and human adipocytes.** Eur. J. Pharmacol. 552:20-30, 2006.
- BOUSQUET, P.; FELDMAN, J.; SCHWARTZ, J. **Central cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 230:232-36, 1984.
- BOYAJIAN, C.; JOUGHLIN, S. E.; LESLIE, F. M. **Anatomical evidence for the alfa2-adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of <sup>3</sup>H-rauwolscine and <sup>3</sup>H-idazoxan in rat brain.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 241:1079-91, 1987
- BRICCA, G. et al. **The imidazoline preferring recetor: binding studies in bovine, rat and human brainstem.** Eur. J. Pharmacol. 162:1-9, 1989.
- CARPENÉ, C. et al. **Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I2 sites.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 272:681-688, 1995.
- CARRIERI, A. et al. **Bindong models of reversible inhibitors to type-B monoamine oxidase.** J. Computer-Aided Mol. Des. 16:769-778, 2002.
- CESURA, A. M.; PLETSCHER, A. **The new generation of monoamine oxidase inhibitors.** Prog. Drug. Res. 38:171-257, 1992.
- CESURA, A. M. et al. **Investigation on the structure of the active site of monoamine oxidase B by affinity labeling with selective inhibitor lazabemide and by site-directed mutagenesis.** Eur. J. Biochem. 236:96-1002, 1996.
- CHAN, S. L. et al. **The alpha2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K<sup>+</sup> ATP channels in insulin-secreting cells.** Eur. J. Pharmacol. 204:41-48, 1991.
- CHIMENTI, F. et al. **Synthesis and molecular modeling of novel substituted-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole derivatives as potent and higly selective monoamine oxidase-A inhibitors.** Chem. Biol. Drug Des. 67:206-214, 2006.
- CONTIELLO, H. F.; LANIER, S. M. **α<sub>2</sub>-adrenergic receptors and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in the intestinal epithelial cell line, HT-29.** J. Biol. Chem. 264:16000-16007, 1989.
- COUPRY, I. et al. **Imidazoline-guanidinium receptive site in renal proximal tubule: asymmetric distribution, regulation by cation and interaction with an endogenous clonidine displacing substance.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 252:293-99, 1990.
- CRANE, G. E. **The psychiatric effects of iproniazid.** Am. J. Psychiatry. 122:494-501, 1956.
- DAILLY, E. et al. **Dopamine, depression and antidepressants.** Fundam. Clin.

- Pharmacol. 18:601-607, 2004.
- DANBURY, T. C. et al. **Imidazoline (I<sub>2</sub>) binding sites in chicken brain.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 881:189 – 192, 1999.
- DA PRADA, M. et al. **On tyramine, food beverages and the reversible Mao inhibitors moclobemide.** J. Neural. Transm. 26:33-36, 1988.
- DE ANGELIS, L. **Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 354:379-383, 1996.
- DE VOS, H. et al. **Autoradiographic distribution of  $\alpha_2$ -adrenoceptors, NAIBS, and 5-HT<sub>1</sub> receptors in human brain using [<sup>3</sup>H]-idazoxan and [<sup>3</sup>H]-rauwolscine.** Brain Res. 566:13-20, 1991.
- DE VOS, H. et al. **Imidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the human central nervous system.** Neuroscience 59:589-598, 1994.
- D'HAENEN, H. A.; BOSSUYT, A. **Dopamine D2 receptors in depression measured with single photon emission computed tomography.** Biol. Psychiatry. 35:128–132, 1994.
- DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; BEAUREPAIRE, R. **Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies?** Neurosci. Biobehav. Rev. 29:891-909, 2005.
- DURÀ-VILÀ, G.; LITTLEWOOD, R.; LEAVEY, G. **Depression and the medicalization of sadness: Conceptualization and recommended help-seeking.** Int. J. Soc. Psychiatry. 2011 Dec 20. [Epub ahead of print]
- EDMONDSON, D. E. et al. **New insights into the structures and functions of human monoamine oxidase A and B.** J. Neural. Transm. 114:703-705, 2007.
- EFENDIC, S. et al. **Two generations of insulinotropic imidazoline compounds.** Diabetes. 51 Suppl 3:S448-54, 2002.
- EGLIN, R. M. et al. **'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites.** Trends Pharmacol. Sci. 19:381-390, 1998.
- EROGLU, L.; GÜVEN, O. **The effects of moclobemide on the yohimbine-induced anxiogenic action in the elevated plus-maze.** Pharmacol. Res. 37:137-143, 1998.
- ERNSBERGER, P. et al. **Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla.** Eur. J. Pharmacol. 134:1-13, 1987

- FAVA, M.; KENDLER, K. S. **Major Depressive Disorder.** *Neuron* 28:335–341, 2000.
- FINN, D. P. et al. **Behavioral, neuroendocrine and neurochemical effects of the imidazoline I2 receptor selective ligand BU224 in naive rats and rats exposed to the stress of the forced swim test.** *Psychopharmacology (Berl)* 167:195-202, 2003.
- FOLEY P. et al. **MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders?** *Parkinsonism Relat. Disord.* 6:25-47, 2000.
- FORNAI, F. et al. **Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B deficient mice: a brain dialysis study.** *J. Neurochem.* 73:2434-2440, 1999.
- FOWLER, C. J.; MANTLE, T. J.; TIPTON, K. F. **The nature of the inhibition of the rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline.** *Biochem. Pharmacol.* 31:3555-3561, 1982.
- GABILONDO, A. M.; MEANA, J. J.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. **Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims.** *Brain Res.* 682:245-250, 1995.
- GALEOTTI, N. et al. **Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test.** *Br. J. Pharmacol.* 126(7):1653-9, 1999.
- GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. **Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test.** *Neuropharmacology* 50:309-316, 2006.
- GHAZALEH, H. A. et al. **The effect of 1-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) isoquinoline on monoamine release and turnover in the rat frontal cortex.** *Neurosci. Lett.* 422:109-113, 2007.
- GOODWIN, G. M. **Depression and associated physical diseases and symptoms.** *Dialogues. Clin. Neurosci.* 8(2):259-65, 2006
- GOLD, P. W. et al. **Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications.** *Mol. Psychiatry* 1:257-264, 1996.
- GRIMSBY, J. et al. **Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA.** *J. Neurochem.* 55:1166-1169, 1990.
- HALARIS, A.; PILETZ, J. E. **Relevance of Imidazoline Receptors and Agmatine to Psychiatry.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1009:1–20, 2003.
- HARFENIST, M. et al. **Selective inhibitors of monoamine oxidases. 3. Structure-activity relationship of tricyclics bearing imidazoline, oxadiazole, or tetrazole groups.** *J. Med. Chem.* 39:1857-1863, 1996.



- HEAD, G. A.; MAYOROV, D. N. **Imidazoline Receptors, Novel Agents and Therapeutic Potential.** Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem. 4:17-32, 2006.
- HOLSBOER, F.; BARDEN, N. **Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation.** Endocr. Rev. 17:40-45, 1996.
- HOLT, A.; WIELAND, B.; BAKER, G. B. **Allosteric modulation of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities in vitro by imidazoline receptors ligands.** Brit. J. Pharmacol. 143:495-507, 2004
- HUDSON, A. L.; et al. **Harmane, norharmane and tetrahydro-  $\beta$ -carboline have high affinity for rat imidazoline binding sites.** Brit. J. Pharmacol. 126:2P, 1999
- HUSBANDS, S. M.  **$\beta$ -carboline binding to imidazoline receptors.** Drug Alcohol Depend. 64:203-208, 2001.
- JAHNG, J. W. et al. **Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the brain by in situ hybridization.** Synapse 25:30-36, 1997.
- JANOWSKY, D. S.; OVERSTREET, D. H. The role of acetylcholine mechanisms in mood disorders. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.** New York: Raven, 1995. p. 945–956, 1995).
- JOHNSTON, J. P. **Some observations up on a new inhibitors of monoamine oxidase in brain tissue.** Biochem. Pharmacol. 17:1285-98, 1968.
- JONES, T. Z. et al. **Interactions of imidazoline ligands with the active site of purified monoamine oxidase A.** FEBS J. 274:1567-1575, 2007
- KANARIK, M. et al. **Changes in regional long-term oxidative metabolism induced by partial serotonergic denervation and chronic variable stress in rat brain.** Neurochem. Int. 52:432-437, 2008.
- KIMURA, A. et al. **Identification of an I2 binding protein from rabbit brain.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 1009:364-366, 2003.
- KLIMEK, V. et al. **Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression.** J. Neurosci. 17:8451–8458, 1997.
- KNOLL, J.; MAGYAR, K. **Some puzzling pharmacologic effects of monoamine oxidase inhibitors.** Adv. Biochem. Psychopharmacol. 5:393-408, 1972.
- LAASONEN-BALK, T. et al. **Striatal dopamine transporter density in major depression.** Psychopharmacology (Berl) 144:282–285, 1999.
- LALIES, M. D. et al. **Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline2 site-selective ligands.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 881:114-117, 1999.

- LANIER, S. M. et al. **Visualization of multiple imidazoline/guanidinium-receptive sites.** Biol. Chem. 268:16047-16051, 1993.
- LANNI, C. et al. **Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects.** Cell. Mol. Life Sci. 66:2985–3008, 2009.
- LAVINSKY, D.; ARTENI, N.S.; NETTO, C.A. **Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats.** Behav. Brain Res. 141:19-24, 2003.
- LI, G. et al. **Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain.** Science 263:966-69, 1994.
- LI, Y.F. et al. **Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism.** Eur. J. Pharmacol. 469:81-88, 2003.
- LIMON-BOULEZ, I. et al. **Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive site from rabbit kidney.** J. Biol. Chem. 267:21645-21649, 1992.
- LIMON-BOULEZ, I. et al. **I<sub>2</sub>-imidazoline binding sites: Relationship with different monoamine oxidase domains and identification of histidine residues mediating ligand binding regulation by H<sup>+</sup>.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 276:359-364, 1996
- LIONE, L. A.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. **[<sup>3</sup>H]-2-(2-benzofuranyl)-2- imidazoline: a new selective high affinity radioligand for the study of rabbit brain imidazoline I<sub>2</sub> receptors.** Eur. J. Pharmacol. 304:221-229, 1996.
- LIONE, L .A.; NUTT, D. J.; HUDSON, A. L. **Characterization and localization of [3H]2(2-benzofuranyl)-2-imidazoline binding in the rat brain: a selective ligand imidazoline I<sub>2</sub> receptors.** Eur. J. Pharmacol. 353:123-135, 1998
- LIU, P. et al. **Behavioral effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats.** Behav. Neurosci. 122:557-569, 2008.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F. et al. **Half a century of antidepressant drugs – On the clinical introduction of monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, and tetracyclics. Part I: Monoamine oxidase inhibitors.** J. Clin. Psychopharmacol. 27:555-9, 2007.
- LUCCA, G. et al. **Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain.** Neurochem. Int. 54(56):358-362, 2009.
- MANJI, H.K.; DREVETS, W.P.; CHARMEY, D.S. **The cellular neurobiology of depression.** Nat. Med. 7:541-547, 2001.
- MALISON, R. T. et al. **Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [<sup>123</sup>I]-2 beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)-tropane and single photon emission computed tomography.** Biol. Psychiatry. 44:1090-1098, 1998.

- MANNA, F. et al. **Inhibition of amine oxidases activity by 1-acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole derivatives.** Bioor. Med. Chem. Lett. 12:3629-3633, 2002.
- MEYER, J. H. et al. **Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression.** Arch. Gen. Psychiatry 63:1209-16, 2006.
- MICHEL, M.; INSEL, P. **Are there multiple imidazoline binding sites?** Trends Pharmacol. Sci. 10:342-344, 1989
- MICHEL, M. C.; ERNSBERGER, P. **Keeping an eye on the I site: imidazoline-preferring receptors.** Trends Pharmacol. Sci. 13:369-370, 1992.
- MORGAN, N. G. et al. **Characterization of the imidazoline binding site involved in regulation of insulin secretion.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 763:361-373, 1995
- NAGATSU, T. **Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering.** Neurotoxicol. 25:11-20, 2004.
- NAKAGAWA, Y. et al. **Involvement of GABA(B) receptor systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats.** Brain Res. 709:215-220, 1996.
- NARDI, A. E. **Depressão no ciclo da vida.** Revista Brasileira de Psiquiatria. 22: 49-152, 2000.
- NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. **Treatment of mood disorders.** Nat. Neurosci. 5:1068-1070, 2002.
- NESTLER, E. J. et al. **Neurobiology of depression.** Neuron 34:13-25, 2002.
- NUTT, D. J. et al. **Functional studies of specific imidazoline-2 receptor ligands.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 763, 125-139, 1995.
- OLMOS, G. et al. **Chronic treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline down-regulates non-adrenergic [3H]-idazoxan binding sites in the rat brain.** Brit. J. Pharmacol. 108:597-603, 1993.
- OLMOS, G. et al. **Pharmacologic and molecular discrimination of I<sub>2</sub>-imidazoline receptors subtypes.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 881: 144-160, 1999.
- O'NEILL, M. F. et al. **Selective imidazoline I<sub>2</sub> ligands do not show antidepressant-like activity in the forced swim test in mice.** J. Psychopharmacol. 15:18-22, 2001
- ORDWAY, G. A. et al. **Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression.** Biol. Psychiatry 53:315-23, 2003.

- OZAITA, A. et al. **Inhibitions of MAO A and B activities by imidazol(ine)/guanidine receptive drugs, nature of the interaction and distinction from I<sub>2</sub>-imidazoline receptors in rat liver.** *Brit. J. Pharmacol.* 121:901-912, 1997.
- OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. **Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter.** *Clin. Chem.* 40:288–295, 1994.
- PARINI, A. et al. **The elusive family of imidazoline binding sites.** *Trends Pharmacol. Sci.* 17(1):13-6, 1996.
- PATERSON, L. M. et al. **In vitro and in vivo effect of BU99006 (5-isothiocyanato-2-benzofuranyl-2-imidazoline) on I<sub>2</sub> binding in relation to MAO: Evidence for two distinct I<sub>2</sub> binding sites.** *Neuropharmacology* 52:395-404, 2007
- PERERA, T. D. et al. **Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates.** *J. Neurosci.* 27:4894-4901, 2007.
- PETRIE, R. X. A.; REID, I. C.; STEWART, C.A. **The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic, plasticity and depressive disorder. A critical review.** *Pharmacol. Ther.* 87:11-25, 2000.
- PILETZ, J. E.; HALARIS, A.; ERNBERGER, P. R. **Psychopharmacology of imidazoline and alpha 2-adrenergic receptors: Implications for depression.** *Crit. Rev. Neurobiol.* 9:29 – 66, 1994.
- PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. **Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms.** *Neuropsychopharmacology* 33:88-109, 2008.
- PRELL, G. D. et al. **Imidazoleacetic acid-ribotide: An endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:13677-13682, 2004.
- RAASCH, W.; MUHLE, H.; DOMINIAK, P. **Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivatives.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 881:313-331, 1999.
- RADDATZ, R.; PARINI, A.; LANIER, S. M. **Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase.** *B. J. Biol. Chem.* 270:27961-8, 1995.
- RADDATZ, R., LANIER, S. M. **Relationship between imidazoline/guanidinium receptive sites and monoamine oxidase A and B.** *Neurochem. Int.* 30(1):109-17, 1997.
- RANG & DALE. **Fármacos Antidepressivos.** In: **Farmacologia.** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 39, p. 557.

- REMAURY, A. et al. **Analysis of the pharmacological and molecular heterogeneity of I(2)-imidazoline-binding proteins using monoamine oxidase-deficient mouse models.** Mol. Pharmacol. 58(5):1085-90, 2000.
- ROBINSON, D. S. **Monoamine oxidase inhibitors: A new generation.** Psychopharmacol. Bull. 36:124-138, 2002
- ROGOZ, R.; DZIEDZICKA-WASYLEVSKA, M. **Effects of antidepressant drugs on dopamine D2/D3 receptors in the rat brain differentiated by agonist and antagonist binding--an autoradiographic analysis.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359:178-86, 1999.
- SANDERS, A. R.; DETERA-WADLEIGH, S. D.; GERSHON, E. S. Molecular genetics of mood disorders. In: CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J.; BUNNEY, B. S. (Org.). **Neurobiology of Mental Illness.** New York: Oxford, 1999. p. 299-316, 1999.
- SANT'ANNA, G. S. **Efeito de 2-aryl (heteroaril)-4,5-dihidro-1H-imidazóis sobre a atividade da enzima monoamina oxidase *in vitro*.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- SANT'ANNA, et al. **Ultrasound promoted synthesis of 2-imidazolines in water: a greener approach toward monoamine oxidase inhibitors.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 19:546-549, 2009.
- SARGENT, P.A. et al. **Brain serotonin1A receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment.** Arch. Gen. Psychiatry. 57:174-180, 2000.
- SASTRE, M.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. **Opposite age-dependent changes of  $\alpha$ 2A-adrenoceptors and non-adrenoceptors [<sup>3</sup>H]-idazoxan binding sites (I<sub>2</sub>-imidazoline sites) in the human brain: strong correlation of I<sub>2</sub> with Mao-B sites.** J. Neurochem. 61:881-889, 1993.
- SASTRE, M. et al. **Decrease de number and immunoreactivity of I<sub>2</sub>-imidazoline receptors in the frontal cortex of suicide victims.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 763:520-522, 1995.
- SASTRE-COLL, A.; ESTEBAN, S.; GARCIA-SEVILLA, J.A. **Effects of imidazoline receptor ligands on monoamine synthesis in the rat brain *in vivo*.** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 360:50-62, 1999.
- SASTRE-COLL, A. et al. **The imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline is a dopamine-releasing agent in the rat striatum *in vivo*.** Neurosci. Lett. 301:29-32, 2001.

- SAURA, J. et al. **Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidase A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization.** *Neuroscience* 70:755-74, 1996.
- SELIKOFF, I. J.; ROBITZEK, E. H.; ORNSTEIN, G. G. **Toxicity of hydrazine derivatives of isonicotinic acid in the chemotherapy of human tuberculosis.** *Quart. Bull. Sea View Hosp.* 13:17-26, 1952.
- SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. **Monoamine oxidase: from genes to behavior.** *Ann. Rev. Neurosci.* 22:197-217, 1999.
- SIVASUBRAMANIAM, S. D. et al. **A comparative study of the expression of monoamine oxidase-A and -B and protein in non-CNS human tissues.** *Cell. Tissue Res.* 313:291-300, 2003.
- SOUTHAM, R. et al. **Effect of lamotrigine on the activities of monoamine oxidase A and B in vitro and on monoamine disposition in vivo.** *Eur. J. Pharmacol.* 519:237-245, 2005.
- STOCKMEIER, C. A. et al. **Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—postmortem evidence for decreased serotonin activity.** *J. Neurosci.* 18:7394–7401, 1998.
- STROLIN-BENEDTTI, M.; DOSTERT, P. **Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors.** *Adv. Drug. Res.* 23:65-125, 1992.
- TAKSANDE, B. G. et al. **Agmatine, an endogenous imidazoline receptor ligand modulates ethanol anxiolysis and withdrawal anxiety in rats.** *Eur. J. Pharmacol.* 637:89-101, 2009a.
- TAKSANDE, B. G. et al. **Antidepressant like effect of selective serotonin reuptake inhibitors involve modulation of imidazoline receptors by agmatine.** *Neuropharmacology* 57:415-424, 2009b.
- TAYLOR, C. et al. **Mechanisms of action of antidepressant: from neurotransmitter systems to signaling pathway.** *Cell. Signal.* 17:549-557, 2005.
- TESSON, F. et al. **Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver.** *J. Biol. Chem.* 266:155-60, 1991.
- TESSON, F.; PARINI, A. **Identification of an imidazoline-guanidinium receptive sites in mitochondria from rabbit cerebral cortex.** *Eur. J. Pharmacol.* 208:81-83, 1991.
- TESSON, F.; LIMON, I.; PARINI, A. **Tissue-specific localization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive sites.** *Eur. J. Pharmacol.* 219:335-38, 1992.

- TESSON, F. et al. **Localization of I<sub>2</sub>-imidazoline binding sites on monoamine oxidase.** J. Biol. Chem. 270:9856-9861, 1995.
- TIMMERMANS, P. B. M. W.; VAN ZWIETEN, P. A.  **$\alpha_2$ -adrenoceptors: classification, localization, mechanisms and target for drugs.** J. Med. Chem. 25:1389-1401, 1982.
- UGEDO, L. et al. **Imidazoline-induced inhibition of firing rate of 5-HT neurons in rat dorsal raphe by modulation of extracellular 5-HT levels.** Ann. N.Y. Acad. Sci. 881:365-8, 1999.
- VERSIANI, M. et al. **Pharmacotherapy of social phobia: a controlled study with moclobemide and phenelzine.** Br. J. Psychiatry 161:353-360, 1992.
- WESTLUND, K. N. et al. **Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain.** Science 250:181-183, 1985.
- WIKBERG, J. E. **High affinity binding of idazoxan to a non-catecholaminergic binding site in the central nervous system: description of a putative idazoxan-receptor.** Pharmacol. Toxicol. 64:152-55, 1989.
- WISE, T. N., FISHBAIN, D. A., HOLDER-PERKINS, V. **Painful physical symptoms in depression: a clinical challenge.** Pain Med. Suppl. 2:S75-82, 2007.
- WONG, M. L.; LICINIO, J. **Research and treatment approaches to depression.** Nat. Rev. Neurosci. 2:343-51, 2001.
- WONG, M. L.; LICINIO, J. **From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression.** Nat. Rev. Drug Discov. 3:136-151, 2004.
- YAMADA, M.; YASUHARA, H. **Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future.** Neurotoxicology 25:215-221, 2004.
- YODIM, M. B. H.; WEINSTOCK, M. **Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation.** Neurotoxicology 25:243-250, 2004.
- YODIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTOM, K. E. **The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors.** Nat. Rev. Neurosc. 7:295-309, 2006.
- ZHU, H. I. A. et al. **Chronic imipramine treatment upregulates IR<sub>2</sub>-imidazoline receptive sites in rat brain.** Neurochem. Int. 30:101-107, 1997.
- ZOMKOWSKI, A.D. et al. **Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice.** Neuroreport 13:387-391, 2002.